

Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών

Τμήμα Φυσικής

Πανεπιστήμιο Κρήτης



Διπλωματική Εργασία

**« Μελέτη Μυών με Μικροσκοπία Γένεσης Δεύτερης
Αρμονικής ευαίσθητη στην Πόλωση »**

Βασίλης Τσαφάς

Υπεύθυνος Καθηγητής: Καθ. Κώστας Φωτάκης

Επιστημονικός Υπεύθυνος: Δρ. Σωτήρης Ψιλοδημητρακόπουλος

Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λέιζερ - ΙΗΔΛ

Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας – ΙΤΕ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λέιζερ(ΙΗΔΛ-IESL) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ITE-FORTH) με διευθύνοντα τον Καθ.Κώστα Φωτάκη.

Κατά το διάστημα αυτό χρειάστηκε να εργαστώ σκληρά και να μελετήσω συστηματικά προκειμένου να μπορέσω να ανταπεξέλθω στις απαιτήσεις αυτής της εργασίας. Ωστόσο ο κόπος μου αυτός με αντάμειψε πολλαπλά τόσο σε ακαδημαϊκό επίπεδο όσο και σε προσωπικό. Απέκτησα εργαστηριακή εμπειρία και γνώσεις πάνω στον τομέα της Φυσικής που με ενδιαφέρει και είμαι σίγουρος ότι θα αποτελέσουν σημαντικά εφόδιά για την συνέχειά μου ως Φυσικός. Παρόλα αυτά είμαι σχεδόν σίγουρος ότι χωρίς την βοήθεια, την στήριξη και τις γνώσεις κάποιων ανθρώπων η παρούσα εργασία θα ήταν ακόμα υπό κατασκευή! Για αυτό το λόγο νιώθω την ανάγκη αυτούς τους ανθρώπους να τους ευχαριστήσω....

Πρώτα από όλους οφείλω να ευχαριστήσω τον Υπεύθυνο Καθηγητή αυτής της εργασίας Καθ. Κώστα Φωτάκη αρχικά για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου αναθέτοντάς μου αυτό το έργο και στη συνέχεια για την αδιάλειπτη γενικότερη επίβλεψη των πραγμάτων προκειμένου τα πάντα να γίνουν στην εντέλεια.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ερευνητή Δρ. Γιώργο Φιλιππίδη για την παροχή των γνώσεών του και της εμπειρίας του στο τεχνολογικό επίπεδο της εφαρμογής και την Ερευνήτρια Δρ. Μερóπη Μάρη για την προετοιμασία των βιολογικών δειγμάτων.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ είναι το λιγότερο που θα μπορούσα να πω για τον Επιβλέπον Δρ. Σωτήρη Ψιλοδημητρακόπουλο ο οποίος από την αρχή που ξεκίνησα αυτή την εργασία δεν σταμάτησε στιγμή να με στηρίζει και να με βοηθάει. Οι αστείρευτες γνώσεις του στο θέμα της εργασίας μου αλλά και γενικότερα στη φυσική με βοήθησαν να καταλάβω σε βάθος κάθε φαινόμενο και στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, ενώ η μεγάλη του εργαστηριακή εμπειρία έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην γρήγορη αντιμετώπιση όποιον προβλημάτων παρουσιάστηκαν.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ:

Η μη γραμμική μικροσκοπία γένεσης δεύτερης αρμονικής (SHG-Second Harmonic Generation) ευαίσθητη στην πόλωση (PSHG-Polarization sensitive SHG) είναι μια νέα μέθοδος μικροσκοπίας όπου πέρα από την απεικόνιση μας δίνει την δυνατότητα για τον ποιοτικό αλλά και ποσοτικό προσδιορισμό των βασικών μονάδων που απαρτίζουν το εξεταζόμενο βιολογικό δείγμα. Ακόμα λόγω του ότι η ακτινοβολία που διεγείρουμε το δείγμα είναι στο υπέρυθρο (1028 nm) τα πειράματα μπορούν να γίνουν και in-vivo αφού ούτε τα βιολογικά δείγματα απορροφούν εκεί ούτε δημιουργούνται διάφορα φωτοτοξικά φαινόμενα σε αυτή την περιοχή του φάσματος. Ο συνδυασμός όλων των παραπάνω συν το γεγονός του ότι το εξεταζόμενο δείγμα δεν χρειάζεται κάποια ειδική επεξεργασία μας δίνει την δυνατότητα για μια γρήγορη εξέταση του δείγματος που μπορεί να οδηγήσει σε μια διάγνωση για το αν το δείγμα είναι παθολογικό ή όχι. Πρέπει να τονιστεί ότι η διάγνωση θα γίνεται με βάση και μόνο τα πειραματικά ποσοτικά και ποιοτικά αποτελέσματα και όχι από την εμπειρογνωσία κάποιου ειδικού σε θέματα απεικόνισης. Τέλος μία μελλοντική εφαρμογή της μικροσκοπίας PSHG τεράστιας σημασίας για ολόκληρη την ανθρωπότητα θα ήταν ίσως η ταχεία και έγκυρη διάγνωση καρκινικών κυττάρων σε πρώιμο στάδιο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή	5
Κεφάλαιο 1: Χαρακτηριστικά και Πλεονεκτήματα Της Μη-Γραμμικής Μικροσκοπίας	
1.1 Μονοφωτονικός Φθορισμός.....	7-8
1.2 Διφωτονικός Φθορισμός.....	8-10
1.3 Παραγωγή Δεύτερης Αρμονικής.....	10-19
1.4 Σύγκριση Γραμμικής και Μη-Γραμμικής Μικροσκοπίας	19-20
Κεφάλαιο 2: Θεωρία Της PSHG (Polarization sensitive SHG)	
2.1 Μακροσκοπική Προσέγγιση της PSHG.....	21-25
2.2 Μικροσκοπική Προσέγγιση της PSHG.....	25-27
Κεφάλαιο 3: Βιολογικό Δείγμα: C.Elegans	
3.1 Γενικές Πληροφορίες για το C.Elegans και η Χρησιμότητά του	28-29
3.2 Ανατομία C.Elegans body wall Muscle.....	29-31
Κεφάλαιο 4: Πειραματικό Μέρος	
4.1 Πειραματική διάταξη.....	32-35
4.2 Πειραματική διαδικασία.....	36-36
4.3 Παρουσίαση και Ανάλυση Πειραματικών Αποτελεσμάτων.....	36-39
Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα και Μελλοντικοί Στόχοι	
5.1 Συμπεράσματα.....	39-40
5.2 Μελλοντικοί στόχοι.....	40
Βιβλιογραφία	41-42

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Από τα αρχαία ακόμα χρόνια ο άνθρωπος είχε στρέψει το ενδιαφέρον του στον μικρόκοσμο γιατί ήξερε ότι αν κατάφερνε να τον παρατηρήσει θα μπορούσε να εξηγήσει διάφορα φαινόμενα. Το 1611 ο Kepler πρότεινε τρόπο κατασκευής σύνθετου μικροσκοπίου και από εκεί και έπειτα έχουν γίνει αναρίθμητες βελτιώσεις ενώ παράλληλα έχουν εφευρεθεί και νέες τεχνικές. Κάθε τεχνική έχει τα πλεονεκτήματα αλλά και τα μειονεκτήματά της ανάλογα με την εφαρμογή. Τρία είναι τα κυρία στοιχεία που πρέπει να συνυπάρχουν ταυτόχρονα για να μπορέσει η παρατηρούμενη εικόνα να δώσει κάποια πληροφορία: η μεγέθυνση, η διακριτική ικανότητα και η αντίθεση (contrast). Ωστόσο σε διάφορους τομείς όπως στις βιοϊατρικές επιστήμες όπου η παρατήρηση του εξεταζόμενου δείγματος πρέπει να γίνεται *in-vivo* μπαίνουν και άλλοι παράγοντες για το ποια τεχνική μικροσκοπίας κρίνεται καταλληλότερη για την κάθε εφαρμογή. Για παράδειγμα κάποιοι από αυτούς τους παράγοντες είναι : να μην χρειάζεται το υπο παρατήρηση δείγμα ειδική επεξεργασία η οποία θα σκότωνε τα κύτταρα, το μέσο παρατήρησης να μην αντιδρά ισχυρά με το δείγμα προκαλώντας του αλλοιώσεις, οι συνθήκες του πειράματος να είναι βιώσιμες για το κύτταρο κ.λ.π.... Είναι προφανές έτσι ότι παρόλο που η ηλεκτρονική μικροσκοπία έχει πολύ καλή διακριτική ικανότητα είναι αδύνατο να χρησιμοποιηθεί για *in-vivo* παρατήρηση κάποιου βιολογικού δείγματος. Αντιθέτως καταλληλότερα για *in-vivo* παρατήρηση βιολογικών δειγμάτων φαίνονται να είναι πια διάφορα είδη μη γραμμικής μικροσκοπίας όπως ο διφωτονικά διεγερόμενος φθορισμός (TPEF-Two photon excited fluorescence) και η γένεση δεύτερης και τρίτης αρμονικής (SHG και THG αντίστοιχα). Οι παραπάνω τεχνικές μπορούν να απεικονίσουν περίπλοκες υποκυτταρικές δομές και διαδικασίες με μεγάλη αντίθεση και υψηλότερη 2-D, 3-D χωρική και χρονική ανάλυση βοηθώντας έτσι στην κατανόηση βιολογικών συστημάτων και διαδικασιών. Αν και το θεωρικό υπόβαθρο για την μη γραμμική μικροσκοπία υπήρχε και προτάθηκε δεκαετίες πριν, στερήθηκαν της εφαρμογής τους έως ότου πριν λίγα χρόνια όπου έχει παρατηρηθεί ένα έντονο ενδιαφέρον για αυτό τον τομέα. Σημαντικό ρόλο σε αυτή την αλλαγή έπαιξε η έλευση των LASER υπέρ-βραχέων παλμών στην υπέρυθη (IR) περιοχή του φάσματος αφού μπορούν να προσφέρουν μεγάλες εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου (που είναι απαραίτητες για την μη γραμμική μικροσκοπία) για μικρό χρονικό διάστημα.

Στο Κεφάλαιο 1 θα παρουσιαστούν οι σημαντικότερες σήμερα τεχνικές μικροσκοπίας ώστε να γίνουν πιο κατανοητά τα πλεονεκτήματα της SHG, ενώ στο Κεφάλαιο 2 θα παρουσιαστεί μια αναλυτική περιγραφή για την SHG σε βιολογικά δείγματα, η οποία παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των συστατικών του δείγματος. Στο κεφάλαιο 3 θα δώσουμε πληροφορίες για τον υπό εξέταση ζωντανό οργανισμό, ενώ στο κεφάλαιο 4 αφού παρουσιάσουμε την πειραματική διάταξη θα δούμε πως καταφέραμε να αντλήσουμε πληροφορίες σε

μοριακό επίπεδο από το μινικό σύστημα του οργανισμού. Τέλος, θα καταλήξουμε παρουσιάζοντας τους μελλοντικούς στόχους αυτής της εργασίας.

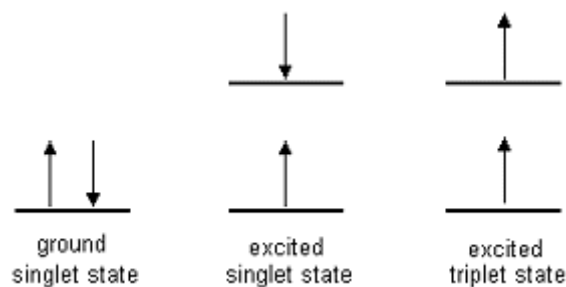
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Χαρακτηριστικά και Πλεονεκτήματα Της Μη-Γραμμικής Μικροσκοπίας

Σκοπός αυτού του κεφαλαίου είναι η περιγραφή των πιο διαδεδομένων τεχνικών μικροσκοπίας σε βιολογικά δείγματα, ώστε να αναδεικνυθούν τα πλεονεκτήματα της μη γραμμικής μικροσκοπίας.

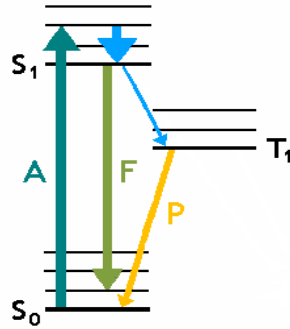
1.1 Μονοφωτονικά διεγερόμενος Φθορισμός (OPEF: One Photon Excited Fluorescence)

Το φαινόμενο του Μονοφωτονικά διεγερόμενου Φθορισμού περιγράφεται ως εξής[3,9]: Ηλεκτρόνιο που βρίσκεται στη θεμελιώδη μονήρη κατάσταση (ground singlet state) ενός μορίου αλληλεπιδρά με φωτόνιο ενέργειας μεγαλύτερης της ενεργειακής διαφοράς της πρώτης διεγερμένης από τη θεμελιώδη κατάσταση. Το ηλεκτρόνιο διεγείρεται έτσι σε κάποιο δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης στάθμης. Στη συνέχεια το ηλεκτρόνιο μεταβαίνει μέσω μη ακτινοβολητικών διαδικασιών στην θεμελιώδη δονητική στάθμη της πρώτης διεγερμένης κατάστασης πριν μεταπέσει σε κάποιο από τα δονητικά επίπεδα της θεμελιώδους κατάστασης, εκπέμποντας ένα φωτόνιο φθορισμού. Ως μονήρεις (singlet) ορίζονται οι καταστάσεις στις οποίες τα ηλεκτρόνια έχουν συνολικό σπιν μηδέν (ηλεκτρόνια με αντιπαράλληλα σπιν). Ωστόσο υπάρχει πιθανότητα κατά την διέγερση ενός ηλεκτρονίου να αλλάξει το σπιν του. Σε αυτή την περίπτωση τα δύο ηλεκτρόνια έχουν παράλληλα σπιν και η κατάσταση τους ονομάζεται τριπλή (triplet) (Σχήμα 1). Σε αυτή την περίπτωση, κατά την αποδιέγερση από την τριπλή κατάσταση στη θεμελιώδη στάθμη, εκπέμπεται ένα, όπως λέγεται, φωτόνιο φωσφορισμού.



Σχήμα 1: Singlet και triplet καταστάσεις ηλεκτρονίων

Στο παρακάτω Σχήμα 2 παρουσιάζεται διαγραμματικά η διαδικασία διέγερσης και αποδιέγερσης ενός μορίου με την εκπομπή φθορισμού ή φωσφορισμού. Οι ενεργειακές στάθμες S_1 και S_0 αναπαριστούν τη διεγερμένη και τη θεμελιώδη κατάσταση του μορίου αντίστοιχα, ενώ οι ενδιάμεσες στάθμες είναι τα δονητικά ενεργειακά επίπεδά τους. Με A συμβολίζεται η απορροφώμενη ακτινοβολία (absorption), με F η ακτινοβολία φθορισμού (fluorescence) και με P η ακτινοβολία φωσφορισμού (phosphorescence), (Σχήμα 2).



Σχήμα 2: Διαγραμματική παρουσίαση φθορισμού.

Από το Σχήμα 2 είναι φανερό πως η φθορίζουσα ή φωσφορίζουσα ακτινοβολία έχει μικρότερη ενέργεια, συνεπώς μεγαλύτερο μήκος κύματος, από την απορροφώμενη. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται Stokes Shift και διευκολύνει το διαχωρισμό του σήματος φθορισμού από τη αρχική ακτινοβολία διέγερσης. Τέλος ένα από βασικά μετρήσιμα φυσικά μεγέθη που αφορούν το μονοφωτονικά διεγερόμενο φθορισμό είναι η ενεργός διατομή απορρόφησης ενός βιολογικού μορίου που δίνεται από τη σχέση(1):

$$\sigma_1 = \frac{\ln\left(\frac{I}{I_{out}}\right)}{nl} \quad (1)$$

όπου I η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στο δείγμα, I_{out} η ένταση του φωτός που εξέρχεται από το δείγμα, n ο αριθμός των μορίων ανά μονάδα όγκου (cm^{-3}) και l το μήκος της διαδρομής του φωτός στο δείγμα (για διαφανή υλικά το πάχος του δείγματος) (cm). Η ενεργός διατομή σ_1 είναι της τάξης μεγέθους 10^{-17} cm^2 και σχετίζεται με τον ρυθμό απορρόφησης (W_1) του μονοφωτονικά διεγερόμενου φθορισμού (OPEF), μέσω της εξίσωσης (η ένταση I εκφράζεται σε $\text{photons/cm}^2\text{sec}$)

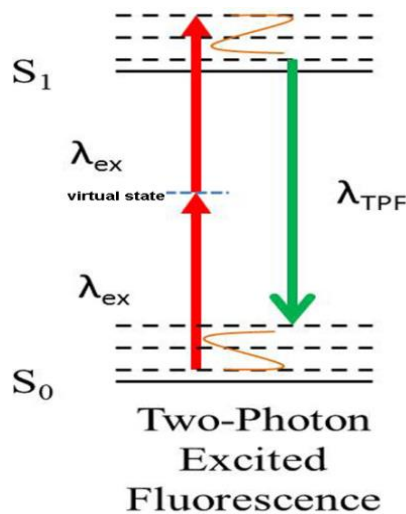
$$W_1 = \sigma_1 \cdot I. \quad (2)$$

παρατηρούμε πως ο ρυθμός απορρόφησης εξαρτάται γραμμικά από την ακτινοβολία διέγερσης.

1.2 Διφωτονικά διεγερόμενος Φθορισμός (TPEF : Two Photon Excited Fluorescence)

Στο προηγούμενο υποκεφάλαιο είδαμε πως αλληλεπιδρά ένα ηλεκτρόνιο με ένα φωτόνιο παράγοντας φθορισμό. Ωστόσο νωρίς στην κβαντομηχανική είχε γίνει αντιληπτό πως υπάρχει πιθανότητα ένα ηλεκτρόνιο να διεγερθεί από δύο ή περισσότερα φωτόνια και αποδιεγερόμενο να δώσει πάλι ακτινοβολία φθορισμού. Αυτό το είδος φθορισμού ονομάζεται διφωτονικά διεγερόμενος φθορισμός ή TPEF-Two Photon Excited Fluorescence.

Μια απλουστευμένη θεωρητική περιγραφή του παραπάνω φαινομένου είναι η εξής[3,13]: Όταν το ηλεκτρόνιο αλληλεπιδράσει με το πρώτο από τα δύο φωτόνια θα μεταβεί σε μια εικονική στάθμη (virtual state) η οποία θα βρίσκεται ανάμεσα στην θεμελιώδη και την πρώτη διεγερμένη στάθμη. Αυτή η εικονική στάθμη έχει εξαιρετικά μικρό χρόνο ζωής. Σύμφωνα με την αρχή της απροσδιοριστίας ενέργειας-χρόνου $\Delta E \cdot \Delta t \approx \hbar$ ο χρόνος παραμονής του ηλεκτρονίου σε αυτή την εικονική στάθμη θα είναι περίπου $\Delta t \approx \hbar / \Delta E$, όπου ΔE η ενεργειακή διαφορά της θεμελιώδους από την εικονική. Για μια τυπική τιμή του ΔE 1 eV προκύπτει ότι $\Delta t \approx 0.5$ fs. Αν το ηλεκτρόνιο μέσα σε αυτό το σύντομο χρονικό διάστημα αλληλεπιδράσει με δεύτερο φωτόνιο μπορεί τελικά να μεταβεί σε κάποιο δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης στάθμης, δίνοντας έτσι σήμα φθορισμού κατά την αποδιέγερσή του. Η παραπάνω περιγραφή παρουσιάζεται διαγραμματικά στο ακόλουθο Σχήμα 3.



Σχήμα 3: Διαγραμματική απεικόνιση διφωτονικά διεγειρόμενου φθορισμού. Με S_0 και S_1 συμβολίζεται η θεμελιώδης και η πρώτη ενεργειακή στάθμη του μορίου, αντίστοιχα ενώ οι μαύρες διακεκομμένες συμβολίζουν τα διάφορα δονητικά τους επίπεδα. Η μπλε διακεκομμένη συμβολίζει την εικονική στάθμη και συνήθως ισχύει $\lambda_{\text{TPF}} \approx \lambda_{\text{ex}}/2$

Όμως αυτός ο πολύ μικρός χρόνος ζωής της εικονικής στάθμης έχει σαν αποτέλεσμα την εξαιρετικά μικρή πιθανότητα να πραγματοποιηθεί το παραπάνω φαινόμενο περιορίζοντας έτσι την ένταση του παραγόμενου σήματος. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι η ενεργός διατομή διφωτονικής απορρόφησης σ_2 είναι της τάξης 10^{-49} $\text{cm}^4 \cdot \text{sec} / \text{photons} \cdot \text{molecule}$. Προκειμένου να αντιμετωπιστεί το παραπάνω δύο είναι οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν ουσιαστικά, εκμεταλλευόμενοι και οι δυο το γεγονός ότι η ισχύς W μιας πηγής διέγερσης παραμένει σταθερή. Ο πρώτος τρόπος είναι χρήση αντικειμενικού φακού μεγάλου αριθμητικού ανοίγματος ($\text{NA} > 0.8$) που εστιάζει ισχυρά τη δέσμη με αποτέλεσμα να αυξήσει την ένταση I της δέσμης στο σημείο εστίασης αφού $I = W/S$ όπου S η επιφάνεια της δέσμης. Ο δεύτερος τρόπος είναι η χρήση παλμικού LASER. Αφού η ισχύς πρέπει να μένει κατά μέσο όρο σταθερή στο χρόνο, είναι προφανές ότι οι τιμές που θα παίρνει κατά τη διάρκεια του παλμού θα είναι πολλαπλάσιες φορές μεγαλύτερες, άρα και η έντασή του I σε

σχέση με ένα LASER ίδιας ισχύος αλλά συνεχές. Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι ο ρυθμός απορρόφησης W_2 ενός βιολογικού δείγματος στο διφωτονικό φθορισμό και η ισχύς P_{TPEF} που εκπέμπει, μετρούμενη σε photons/sec, εξαρτώνται μη γραμμικά και πιο συγκεκριμένα με το τετράγωνο της έντασης της αρχικής έντασης ακτινοβολίας διέγερσης I , όπως φαίνεται και από τους παρακάτω τύπους[10] :

$$W_2 = \frac{I}{2} \sigma_2 \cdot I^2 \quad (3)$$

όπου σ_2 η ενεργός διατομή απορρόφησης μετρούμενη σε $\text{cm}^4 \cdot \text{sec} / \text{photons} \cdot \text{molecule}$

$$P_{TPEF} = \frac{I}{2} \Phi_{2f} \sigma_2 I^2 \quad (4)$$

Όπου Φ_{2f} ονομάζεται όρος κβαντικής απόδοσης του TPEF και ορίζεται ως : $\Phi_{2f} =$ αριθμός εκπεμπόμενων φωτονίων φθορισμού/αριθμός απορροφημένων ζευγαριών φωτονίων. Η τετραγωνική εξάρτηση της ισχύος P_{TPEF} από την ένταση της ακτινοβολίας διέγερσης έχει ως αποτέλεσμα η P_{TPEF} να μειώνεται πολύ γρήγορα γύρω από το εστιακό κέντρο, αυξάνοντας έτσι τη διακριτική ικανότητα της μικροσκοπίας φθορισμού. Περισσότερα για τα πλεονεκτήματα της μη-γραμμικής μικροσκοπίας θα δούμε στο Υποκεφάλαιο 1.4.

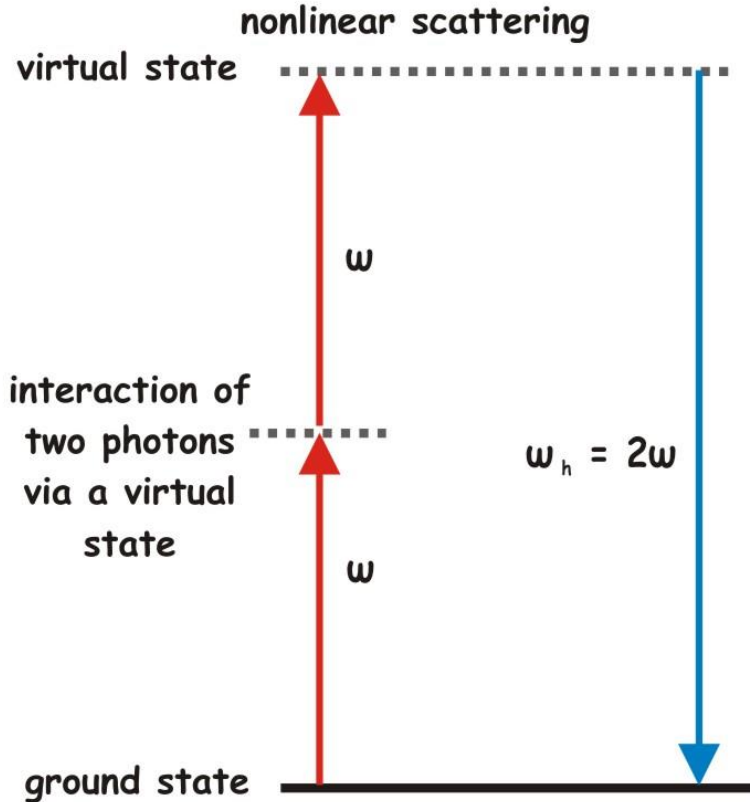
1.3 Μικροσκοπία Γέννησης Δεύτερης Αρμονικής (SHG-Second Harmonic Generation)

Όπως και στην περίπτωση της μικροσκοπίας διφωτονικά διεγερόμενου φθορισμού, έτσι και η χρήση της μικροσκοπίας SHG είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη ιδιαίτερα στον τομέα της βιολογίας, αλλά και σε άλλους τομείς[11,12]. Η εκτεταμένη χρήση αυτής της τεχνικής έγινε έπειτα από την ανακάλυψη ότι ενδογενείς δομές των βιολογικών οργανισμών μπορούν να δώσουν δεύτερη αρμονική. Η SHG, σε αντίθεση με τον TPEF, είναι ένα *σύμφωνο φαινόμενο* και βασίζεται σε *μη γραμμική σκέδαση*.

Σε αυτή την περίπτωση, σε αντίθεση με τον διφωτονικά διεγερόμενο φθορισμό η διέγερση των ηλεκτρονίων δεν περιλαμβάνει τη συμμετοχή πραγματικής διεγερμένης ενεργειακής στάθμης, αλλά 2 εικονικών σταθμών (Σχήμα 4). Όπως βλέπουμε στο Σχήμα 4, όπως και στον διφωτονικά διεγερόμενο φθορισμό, 2 φωτόνια διεγείρουν ένα ηλεκτρονίο αλλά τώρα το ηλεκτρόνιο δεν βρίσκει διαθέσιμη (πραγματική) ενεργειακή στάθμη και δεν απορροφά, αλλά σκεδάζει. Δηλαδή επιστρέφει στη θεμελιώδη στάθμη χωρίς απορρόφηση και συνεπαγόμενη εναπόθεση ενέργειας στο μόριο, και εκπέμποντας ένα φωτόνιο διπλάσιας ενέργειας ($\omega + \omega = 2\omega$). Έτσι, όπως και στον TPEF, επειδή η ισχύς SHG εξαρτάται από το τετράγωνο της προσπίπτουσας ακτινοβολίας [9]

$$P_{SHG} = \frac{I}{2} \sigma_{SHG} I^2 \quad (5)$$

έχουμε την ίδια αύξηση της διακριτικής ικανότητας.



Σχήμα 4: Ενεργειακό διάγραμμα SHG. Φωτόνιο συχνότητας ω διεγείρει ηλεκτρόνιο που βρίσκεται στην *groundstate*, διεγείροντάς το σε μία *virtual state*. Στη συνέχεια πριν το ηλεκτρόνιο προλάβει να αποδιεγερθεί αλληλεπιδρά άλλο ένα φωτόνιο συχνότητας ω διεγείροντάς το σε *virtual state*, ενέργειας διπλάσιας της πρώτης. Τελικά το ηλεκτρόνιο δεν έχει αρκετή ενέργεια για να αποικίσει κάποια διεγερμένη κατάσταση του, και αποδιεγείρεται εκπέμποντας φωτόνιο συχνότητας 2ω

Διάφορα φαινόμενα που συμβαίνουν κατά τη διάδοση του φωτός, όπως για παράδειγμα η διάθλαση ή η ανάκλαση, περιγράφονται συνήθως με μια γραμμική σχέση μεταξύ της αρχικής και της τελικής έντασης του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου. Ωστόσο υπάρχουν περιπτώσεις όπου υπό κατάλληλες συνθήκες η παραπάνω γραμμική σχέση παύει να ισχύει και ο λόγος είναι ότι πολλοί νόμοι της φυσικής ισχύουν προσεγγιστικά. Ένα σχετικό και απλό παράδειγμα είναι ο νόμος του Hooke που περιγράφει την δύναμη F που ασκεί ένα ελατήριο όταν παραμορφωθεί κατά Δx

σύμφωνα με τη σχέση $F=-k\Delta\chi$ όπου k η σταθερά ελατηρίου[4]. Όμως η γραμμική αυτή εξάρτηση του F με το $\Delta\chi$ παύει για μεγάλα $\Delta\chi$ να ισχύει αφού αρχίζουν να εμφανίζονται και άλλες μεγαλύτερες δυνάμεις του $\Delta\chi$. Ανάλογα οπτικά μη γραμμικά φαινόμενα συμβαίνουν και στην περίπτωση ενός πολύ ισχυρού ηλεκτρομαγνητικού πεδίου κατά την διέλευσή του μέσα από κάποιο υλικό. Ένα ηλεκτρομαγνητικό πεδίο κατά την διέλευσή του από κάποιο σύνθετο υλικό ασκεί δυνάμεις στα ηλεκτρόνια των μορίων, κυρίως των εξωτερικών στιβάδων, δημιουργώντας έτσι μια ηλεκτρική πόλωση στο υλικό, μια συνολική διπολική ροπή ανά μονάδα όγκου δηλαδή, η οποία για μικρές εντάσεις του πεδίου είναι ανάλογη αυτού. Στην περίπτωση ακόμα όπου το πεδίο είναι χρονομεταβαλλόμενο η σχέση που θα συνδέει τα δύο μεγέθη, την πόλωση $P(t)$ και το πεδίο $E(t)$, θα έχει την ακόλουθη μορφή:

$$P(t)=\epsilon_0 \chi^{(1)} E(t) \quad (6)$$

όπου η σταθερά $\chi^{(1)}$ είναι γνωστή ως γραμμική ή πρώτης τάξης επιδεκτικότητα και ϵ_0 η ηλεκτρική διαπερατότητα στον κενό χώρο και για λόγους απλότητας θα τεθεί ίση με τη μονάδα προς το παρόν.

Ωστόσο η παραπάνω σχέση για μεγάλες τιμές του πεδίου E , όπως και στην περίπτωση του νόμου του Hooke, παύει να ισχύει ή καλύτερα παύει να είναι τόσο καλή προσέγγιση της πραγματικότητας. Στην περίπτωση αυτή πρέπει να συμπεριλάβουμε στους υπολογισμούς μας και τις μη γραμμικές συνεισφορές του πεδίου τις οποίες θεωρούσαμε αμελητέες μέχρι τώρα, όπως είναι λογικό, για μικρές τιμές του πεδίου. Έτσι η Σχέση (6) θα μετατραπεί στην ακόλουθη μορφή:

$$P(t)=\chi^{(1)} E(t)+\chi^{(2)} E^2(t)+\chi^{(3)} E^3(t)+\dots \quad (7)$$

όπου οι ποσότητες $\chi^{(2)}$ και $\chi^{(3)}$ είναι γνωστές ως δεύτερης και τρίτης τάξης μη γραμμικές επιδεκτικότητες αντίστοιχα.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να επισημάνω το γεγονός ότι για λόγους απλότητας έχει γίνει η θεώρηση για τις σχέσεις (6) και (7) ότι βρισκόμαστε σε 1 διάσταση και το υλικό που εφαρμόζουμε το πεδίο είναι ομοιογενές(συνεχές). Αυτή η θεώρηση έχει ως αποτέλεσμα οι ποσότητες $P(t)$ και $E(t)$ να είναι βαθμωτές και οι $\chi^{(1)}, \chi^{(2)}, \chi^{(3)}$ να είναι σταθερές. Στην περίπτωση που βρισκόμαστε στις 3 διαστάσεις τα $P(t)$ και $E(t)$ μετατρέπονται σε διανύσματα στον τρισδιάστατο χώρο ενώ οι $\chi^{(1)}, \chi^{(2)}, \chi^{(3)}$ σε τανυστές τάξης αντίστοιχης των εκθετών τους. Αυτή η περίπτωση θα αναλυθεί λεπτομερώς στο επόμενο κεφάλαιο. Προς το παρόν για την συνέχεια αυτού του υποκεφαλαίου θα συνεχίσουμε να βρισκόμαστε στη 1 διάσταση.

Υποθέτουμε τώρα ότι εφαρμόζουμε στο υλικό ένα πεδίο της μορφής $E(t)=E \sin(\omega t)$. Αντικαθιστώντας αυτό το πεδίο στην Σχέση (7) θα έχουμε την εξής επαγόμενη πόλωση :

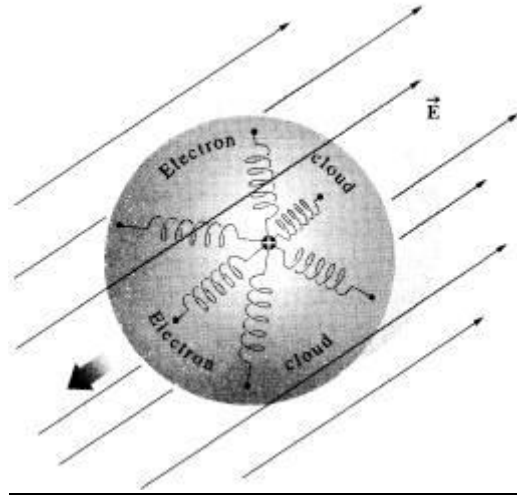
$$P(t)=\chi^{(1)}E \sin(\omega t)+\chi^{(2)}E^2\sin^2(\omega t)+ \dots \quad (8)$$

όπου η παραπάνω σχέση με την χρήση γνωστής τριγωνομετρικής ταυτότητας μπορεί να μετατραπεί στην ακόλουθη μορφή

$$P(t)=\chi^{(1)} E \sin(\omega t)+\chi^{(2)} E^2 [(1-\cos(2\omega t))]/2 \quad (9)$$

Παρατηρώντας τώρα την Σχέση (9) βλέπουμε ότι αποτελείται από δύο όρους. Ο πρώτος όρος είναι η γνωστή γραμμική απόκριση του υλικού στο εφαρμοζόμενο χρονομεταβαλλόμενο πεδίο. Ο δεύτερος όρος, που έχει και το μεγαλύτερο ενδιαφέρον για εμάς τώρα, αποτελείται από δύο μέρη. Το πρώτο μέρος είναι μια σταθερά, ονομάζεται οπτική ανόρθωση και δημιουργεί ένα σταθερό με το χρόνο ηλεκτρικό πεδίο στο εσωτερικό του υλικού. Ωστόσο το δεύτερο μέρος είναι μια χρονική αρμονική μεταβολή συχνότητας 2ω . Αυτή η αρμονική μεταβολή της πόλωσης σημαίνει αρμονική επιτάχυνση ηλεκτρονίων παράγοντας έτσι τελικά ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα συχνότητας διπλάσιας του αρχικού προσπίπτοντος κύματος. Το παραπάνω φαινόμενο ονομάζεται παραγωγή δεύτερης αρμονικής και από ότι φαίνεται από την Σχέση (9) εξαρτάται από το τετράγωνο του πεδίου.

Στη συνέχεια θα παρουσιαστεί ένα μοντέλο που παρά την απλότητα και τις αδυναμίες του κατάφερε να εξηγήσει με μεγάλη ακρίβεια το φαινόμενο της γένεσης δεύτερης αρμονικής και να δώσει αρκετά καλές προσεγγίσεις της $\chi^{(2)}$. Στα τέλη του 19ου αιώνα προτάθηκε το γραμμικό ατομικό μοντέλο Lorentz που αντιμετωπίζει το άτομο ως έναν απλό αρμονικό ταλαντωτή [1,4]. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, το ηλεκτρονιακό νέφος του ατόμου υπόκειται σε μια ηλεκτρική δύναμη που ασκείται από τον ακίνητο θετικά φορτισμένο πυρήνα και η οποία το διατηρεί σε μια κατάσταση ισορροπίας. Μπορούμε με άλλα λόγια να υποθέσουμε, όπως συμβαίνει σε κάθε σταθερό μηχανικό σύστημα που δεν διαλύεται από μικρές διαταραχές, την ύπαρξη μιας δύναμης επαναφοράς η οποία θα επιστρέφει το σύστημα στην ισορροπία (Σχήμα 5).



Σχήμα 5 : Το άτομο σαν ένα σύστημα συζευγμένων ελατηρίων που ταλαντώνεται υπο την επίδραση ενός πεδίου σύμφωνα με το μοντέλο Lorentz

Για μικρές μετατοπίσεις του ηλεκτρονιακού νέφους από την κατάσταση ισορροπίας, η δύναμη επαναφοράς σχετίζεται γραμμικά με τη μετατόπιση όπως ακριβώς περιγράφεται από το νόμο του Hooke στη μηχανική. Για μεγαλύτερες μετατοπίσεις όμως η γραμμικότητα αυτή χάνεται, με αποτέλεσμα την εμφάνιση μη γραμμικών όρων στη δύναμη επαναφοράς του ηλεκτρονιακού νέφους. Στην περίπτωση αυτή μιλάμε πλέον για τη μη γραμμική εκδοχή του μοντέλου. Ας υποθέσουμε λοιπόν ότι μονοχρωματική πολωμένη κατά τον άξονα x Η/Μ ακτινοβολία συχνότητας ω προσπίπτει πάνω σε ένα ιστροπικό υλικό. Το χρονομεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο της ακτινοβολίας θα αλληλεπιδράσει με το ηλεκτρονιακό νέφος των ατόμων του μέσου, μέσω της δύναμης Lorentz

$$F = q(E + \frac{u}{c} \times B) \quad (10)$$

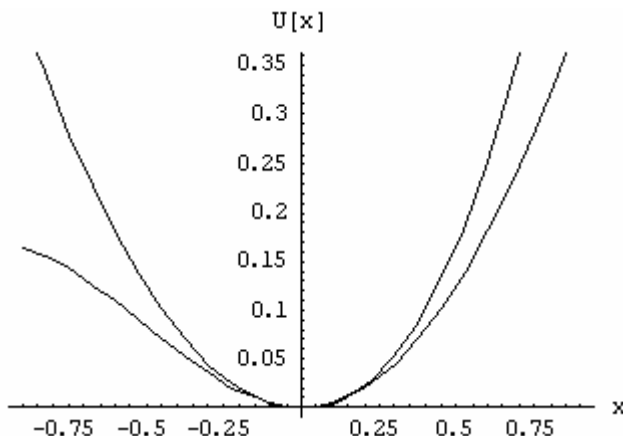
με αποτέλεσμα αυτό να αρχίσει να ταλαντώνεται γύρω από τον ακίνητο πυρήνα. Το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια το σχηματισμό διπολικής ροπής στο κάθε άτομο, η οποία στη γραμμική περίπτωση θα μεταβάλλεται ημιτονοειδώς στο χρόνο με τη συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Σύμφωνα με το μοντέλο θα δεχτούμε επίσης ότι η ταχύτητα του επιταχυνόμενου ηλεκτρονιακού νέφους είναι πολύ μικρότερη από εκείνη του φωτός και άρα το μαγνητικό πεδίο της ακτινοβολίας αλληλεπιδρά απειροελάχιστα με αυτό. Συνεπώς μπορούμε να παραλείψουμε το μαγνητικό όρο της δύναμης Lorentz στην περαιτέρω ανάλυσή μας. Ας μελετήσουμε πρώτα την απλούστερη δυνατή μη αρμονική περίπτωση, σύμφωνα με την οποία η δύναμη επαναφοράς του ηλεκτρονιακού νέφους αποτελείται όχι μόνο από τον συνήθη γραμμικό όρο αλλά και από έναν μη γραμμικό όρο με εξάρτηση από το τετράγωνο της μετατόπισης

$$F_{restoring} = -m\omega_0^2 x - ma x^2 \quad (11)$$

Ο συντελεστής α στον όρο αυτό είναι μια θετική παράμετρος η οποία χαρακτηρίζει την ισχύ της μη γραμμικότητας. Η συνάρτηση της δυναμικής ενέργειας που αντιστοιχεί σε μια τέτοια δύναμη δίνεται από τη σχέση

$$U(x) = -\int F_{restoring} dx = \frac{1}{2}m\omega_0^2 x^2 + \frac{1}{3}m\alpha x^3 \quad (12)$$

Εδώ ο πρώτος όρος αντιστοιχεί στο αρμονικό δυναμικό ενώ ο δεύτερος όρος αντιστοιχεί στη μη γραμμική διόρθωση του. Επιπροσθέτως στο Σχήμα 6 παρουσιάζεται το παρόν μη αρμονικό δυναμικό $U(x)$ σε σύγκριση με το παραβολικό δυναμικό.



Σχήμα 6 : Σύγκριση παραβολικού και μη αρμονικού (μη κεντροσυμμετρικού) δυναμικού

Εύκολα παρατηρεί κάποιος από το Σχήμα 6 ότι η $U(x)$ δεν είναι συμμετρική ως προς τον άξονα των y εφόσον έχει τόσο άρτιους όσο και περιττούς όρους. Τα μέσα που χαρακτηρίζονται από άτομα με τέτοια μορφή δυναμικού επαναφοράς του ηλεκτρονιακού νέφους, ονομάζονται μη κεντροσυμμετρικά μέσα. Ας γράψουμε στη συνέχεια την κλασσική εξίσωση κίνησης του ηλεκτρονιακού νέφους για ένα τέτοιο μέσο που αλληλεπιδρά με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Παίρνοντας το δεύτερο νόμο του Νεύτωνα έχουμε ότι

$$-m\omega_0^2 x - m\alpha x^2 - 2m\gamma\dot{x} - eE(t) = m\ddot{x} \quad (13)$$

όπου οι δύο πρώτοι όροι αντιστοιχούν στη δύναμη επαναφοράς Σχέση (10), ο τρίτος όρος αντιστοιχεί σε μια δύναμη απόσβεσης, ανάλογης της ταχύτητας λόγω της αλληλεπίδρασης του ατόμου – ταλαντωτή με γειτονικά άτομα, που οδηγεί τελικά σε απώλεια της ενέργειάς του εντός του υλικού υπό μορφή θερμότητας, ενώ ο τέταρτος όρος αποτελεί τη δύναμη Lorentz Σχέση (10) εξαιτίας του ηλεκτρικού πεδίου της H/M ακτινοβολίας.

Δεν υπάρχει γνωστή αναλυτική λύση της Σχέσης (13) εφόσον το ηλεκτρικό πεδίο $E(t)$ περιγράφεται από ένα επίπεδο κύμα συχνότητας ω , δηλαδή ως $E(t) = E_0 e^{-i\omega t}$. Ωστόσο, εάν θεωρήσουμε το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο αρκετά ασθενές, ο μη γραμμικός όρος της δύναμης επαναφοράς θα είναι πολύ μικρότερος από τον αντίστοιχο γραμμικό, για κάθε μετατόπιση του ηλεκτρονιακού νέφους από τη θέση ισορροπίας. Κάτω από αυτές τις συνθήκες η εξίσωση μπορεί να επιλυθεί μέσω της θεωρίας διαταραχών, αντικαθιστώντας το $E(t)$ με το γινόμενο $\lambda E(t)$, όπου το λ

αποτελεί μια παράμετρο η οποία εκτείνεται συνεχώς μεταξύ του μηδενός και της μονάδας. Η παράμετρος αυτή χαρακτηρίζει την ισχύ της διαταραχής και στο τέλος των υπολογισμών θα εξισωθεί με τη μονάδα. Στη συνέχεια αναζητούμε τη λύση της εξίσωσης υπό μορφή δυναμοσειράς ως προς την παράμετρο λ .

$$x = \lambda x^{(1)} + \lambda^2 x^{(2)} + \lambda^3 x^{(3)} + \dots \quad (14)$$

Αντικαθιστώντας την σχέση (14) στην (13) και απαιτώντας οι όροι που είναι ανάλογοι του λ , λ^2, λ^3 κτλ. να την ικανοποιούν ξεχωριστά, φτάνουμε τελικά στις εξισώσεις για τα $x^{(1)}, x^{(2)}$ που έχουν αναλυτική λύση.

$$\ddot{x}^{(1)} + 2\gamma\dot{x}^{(1)} + \omega_o^2 x^{(1)} = -\frac{eE(t)}{m} \Rightarrow x^{(1)}(t) = C^{(1)} e^{-i\omega t} \quad (15)$$

$$\ddot{x}^{(2)} + 2\gamma\dot{x}^{(2)} + \omega_o^2 x^{(2)} = -a(x^{(1)})^2 \Rightarrow x^{(2)}(t) = C^{(2)} e^{-i2\omega t} \quad (16)$$

Η steady state λύση της Σχέσης (15) φανερώνει ότι η πρώτη διόρθωση $x^{(1)}$ αντιστοιχεί σε συνάρτηση μετατόπισης και άρα επιτάχυνσης του ηλεκτρονιακού νέφους με συχνότητα ω , ίση δηλαδή με τη συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, με αποτέλεσμα την επανεκπομπή H/M ακτινοβολίας στην ίδια ακριβώς συχνότητα. Υψώνοντας τη λύση για το $x^{(1)}$ στο τετράγωνο και αντικαθιστώντας στην Σχέση (16) θα προκύψει ένας όρος διεγείρουσας δύναμης στην εξίσωση ταλάντωσης, με συχνότητα 2ω . Αυτός ο όρος στη steady state θα δώσει αντίστοιχα τη δεύτερη αρμονική. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι σε ένα μη κεντροσυμμετρικό μέσο επιτρέπεται η παραγωγή όλων των αρμονικών συχνοτήτων, τόσο άρτιων όσο και περιττών.

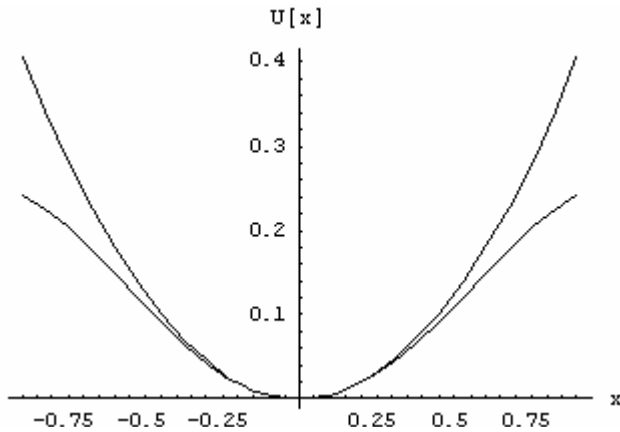
Ας δούμε τώρα τι συμβαίνει στην περίπτωση όπου η δύναμη επαναφοράς του ηλεκτρονιακού νέφους έχει μη γραμμικό κομμάτι, που είναι ανάλογο του κύβου της μετατόπισης και χαρακτηρίζεται από θετική παράμετρο b που δείχνει την ισχύ της μη γραμμικότητας. Ο τύπος της δύναμης θα είναι τότε

$$F_{restoring} = -m\omega_o^2 x + mb x^3 \quad (17)$$

ενώ η συνάρτηση δυναμικής ενέργειας που αντιστοιχεί στη συγκεκριμένη δύναμη (16) δίνεται από τη σχέση

$$U(x) = -\int F_{restoring} dx = \frac{1}{2} m\omega_o^2 x^2 - \frac{1}{4} m b x^4 \quad (18)$$

και είναι φανερό ότι πρόκειται για μια άρτια συνάρτηση με κατοπτρική συμμετρία ως προς τον άξονα των y . Τα μέσα των οποίων τα άτομα διαθέτουν τέτοιο συμμετρικό δυναμικό επαναφοράς ονομάζονται κεντροσυμμετρικά.



Σχήμα 7: Σύγκριση παραβολικού και μη αρμονικού κεντροσυμμετρικού δυναμικού

Στο Σχήμα 7 μπορούμε να δούμε τη γραφική παράσταση της συνάρτησης δυναμικού $U(x)$ που δίνεται από τη σχέση (18) σε σχέση με το κλασικό παραβολικό δυναμικό. Παρόμοια, γράφοντας το δεύτερο νόμο του Νεύτωνα για την περίπτωση αυτή παίρνουμε τη διαφορική εξίσωση κίνησης για το ηλεκτρονιακού νέφος

$$-m\omega_o^2 x + mbx^3 - 2m\gamma\dot{x} - eE(t) = m\ddot{x} \quad (19)$$

Η εφαρμογή της θεωρίας διαταραχών θα οδηγήσει ξανά σε ένα σύνολο εξισώσεων για τα $x^{(1)}$ και $x^{(2)}$

$$\ddot{x}^{(1)} + 2\gamma\dot{x}^{(1)} + \omega_o^2 x^{(1)} = -\frac{eE(t)}{m} \Rightarrow x^{(1)}(t) = A^{(1)} e^{-i\omega t} \quad (20)$$

$$\ddot{x}^{(2)} + 2\gamma\dot{x}^{(2)} + \omega_o^2 x^{(2)} = 0 \Rightarrow x^{(2)}(t) = A^{(2)} e^{-\gamma t} \sin(\omega t) \quad (21)$$

απ' όπου μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η ακτινοβολία δεύτερης αρμονικής μηδενίζεται στη steady state, εφόσον το $x^{(2)}$ αποτελεί τη γνωστή λύση ενός αποσβεσμένου αρμονικού ταλαντωτή. Τούτο σημαίνει ότι η παραγωγή δεύτερης αρμονικής λαμβάνει χώρα αποκλειστικά και μόνο εντός μη κεντροσυμμετρικών μέσων.

Το μη γραμμικό μοντέλο Lorentz που μόλις περιγράφηκε, εκτός του ότι μας δίνει μια κλασική περιγραφή της παραγωγής των αρμονικών συχνοτήτων, συμφωνεί με αρκετά καλή ακρίβεια με τις πειραματικές τιμές των μη γραμμικών ηλεκτρικών επιδεκτικότητας δεύτερης και τρίτης τάξης για διάφορα μέσα. Συνδυάζοντας τις Σχέσεις (22) και (23) για την ηλεκτρική πόλωση

$$P^{(n)}(t) = -Nex^{(n)} = -NeC^{(n)} e^{-i(n\omega)t} \quad (22)$$

$$P^{(n)}(t) = \epsilon_o \chi^{(n)} E^{(n)}(t) \quad (23)$$

καταλήγουμε σε μια έκφραση για τη νιοστής τάξης ηλεκτρική επιδεκτικότητα του μέσου

$$\chi^{(n)} = -\frac{NeC^{(n)}}{\epsilon_o E_o^n} \quad (24)$$

όπου N ο αριθμός των ηλεκτρονίων, e το φορτίο τους και τώρα έχουμε ξαναεκφράσει το ϵ_0

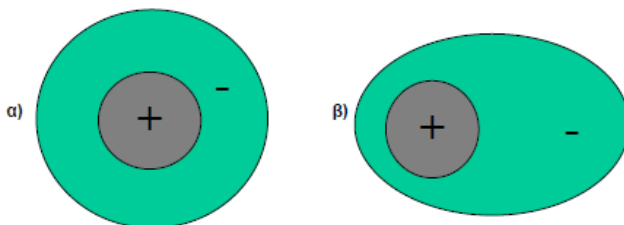
Οι αναλυτικές εξισώσεις του μοντέλου, σε συνδυασμό με ορισμένες παραδοχές καθώς και κάποιες τυπικές τιμές για τις εμφανιζόμενες παραμέτρους, προβλέπουν ικανοποιητικά την ηλεκτρική επιδεκτικότητα δεύτερης τάξης για μέσα όπως για παράδειγμα το LiIO_3 και το BBO.

$$\chi^{(2)} \approx \frac{e^3}{\epsilon_0 m^2 \omega_0^4 d^4} \approx 7 \cdot 10^{-12} \text{ m/V}$$

Material	$\chi^{(2)}$
Quartz	$0,6 \cdot 10^{-12} \text{ m/V}$
BBO	$4,4 \cdot 10^{-12} \text{ m/V}$
AgSbS_3	$16 \cdot 10^{-12} \text{ m/V}$
KDP	$0,9 \cdot 10^{-12} \text{ m/V}$
LiIO_3	$11 \cdot 10^{-12} \text{ m/V}$

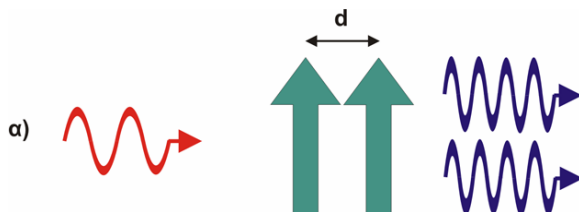
Όπου e το φορτίο του ηλεκτρονίου, ϵ_0 η ηλεκτρική διαπερατότητα στο κενό, m η μάζα του ηλεκτρονίου, ω_0 η συχνότητα συντονισμού του ατομικού συστήματος και d το μέγεθος του ατόμου.

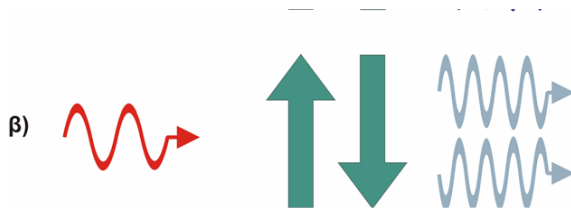
Με το παραπάνω μοντέλο φάνηκε γιατί μόνο στα μη κεντροσυμμετρικά μόρια μπορούμε να έχουμε γένεση δεύτερης αρμονικής. Στη (β) εικόνα του Σχήματος 8 απεικονίζεται πως είναι η κατανομή φορτίου των ηλεκτρονίων ενός τέτοιου μορίου



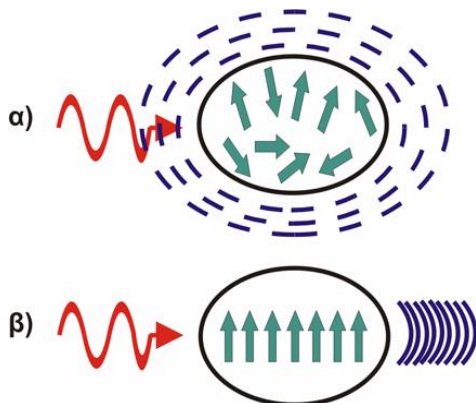
Σχήμα 8 α) Η κατανομή φορτίου λόγω των ηλεκτρονίων του μορίου (-), είναι *συμμετρική* με την κατανομή του φορτίου λόγω των πυρήνων (+). β) Μη συμμετρική κατανομή του ηλεκτρονιακού νέφους.

Ωστόσο όμως, για να δώσει ισχυρό σήμα δεύτερης αρμονικής ένα υλικό, θα πρέπει το μεγαλύτερο μέρος των μορίων να είναι σωστά προσανατολισμένα, δηλαδή ο προσανατολισμός τους να δείχνει στην ίδια παράλληλη διεύθυνση προκειμένου να έχουν ενισχυτική συμβολή. Σε αντίθετες περιπτώσεις το παραγόμενο σήμα είναι πολύ ασθενές όπως δείχνουν τα παρακάτω Σχήματα 9 και 10[3,14,15].





Σχήμα 9: α) Εάν τα μόρια «δείχνουν» στην ίδια κατεύθυνση, είναι σε φάση και συμβάλουν ενισχυτικά. β) Εάν τα δίπολα είναι διατεταγμένα αντιπαράλληλα τα παραγόμενα H/M κύματα είναι εκτός φάσης και εξουδετερώνεται.

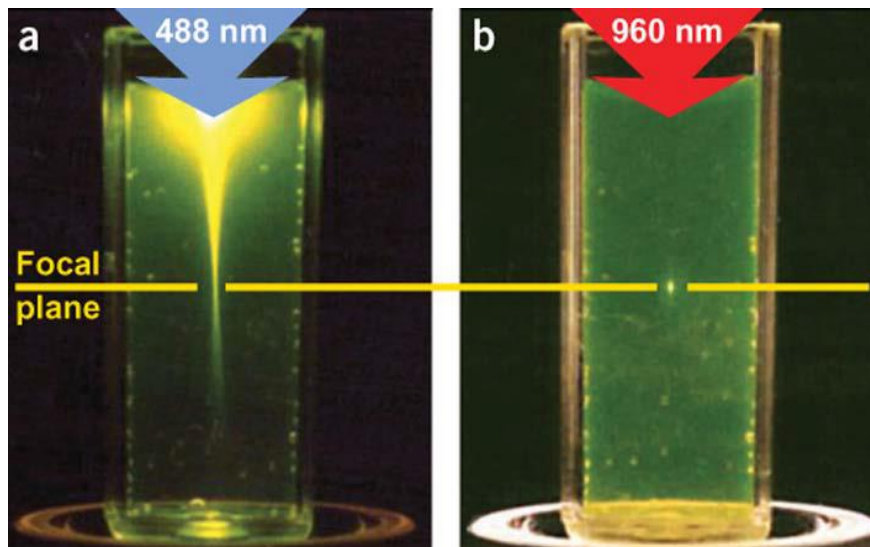


Σχήμα 10 : α) Αν τα μόρια είναι σε αταξία το σήμα της δεύτερης αρμονικής διαδίδεται προς όλες τις κατευθύνσεις και είναι πολύ ασθενές β) Αν τα μόρια έχουν τον σωστό προσανατολισμό το σήμα της δεύτερης αρμονικής έχει μεγάλη κατευθυντικότητα και μέγιστη τιμή

Τέλος αξίζει να τονίσουμε πάλι ότι στην δεύτερη αρμονική δεν έχουμε απορρόφηση φωτονίων. Το υλικό παίζει απλά το ρόλο του μέσου στο οποίο δύο φωτόνια συνδυάζονται δημιουργώντας έτσι ένα φωτόνιο διπλάσιας ενέργειας. Συνεπώς, σε αντίθεση με τον TPEF στη SHG δεν έχουμε εναπόθεση ενέργειας στο δείγμα, οπότε δίκαια η SHG θεωρείται ως μια από τις λιγότερο επεμβατικές μορφές μικροσκοπίας, κατάλληλη για εφαρμογή σε ζωντανούς οργανισμούς.

1.4 Σύγκριση Γραμμικής και Μη-Γραμμικής Μικροσκοπίας

Όπως είναι φανερό από τα προηγούμενα υποκεφάλαια η κύρια διαφορά των γραμμικών (OPEF) και μη γραμμικών φαινομένων (TPEF-SHG) στην οπτική είναι η εξάρτηση της έντασης της παρατηρούμενης ακτινοβολίας σε σχέση με την ακτινοβολία διέγερσης. Στα μεν γραμμικά φαινόμενα αυτή η εξάρτηση είναι γραμμική στα δε μη-γραμμικά τετραγωνική (Σχέσεις 4 και 5). Κάτι τέτοιο έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της διακριτικής ικανότητας του συστήματος τόσο στο παρατηρούμενο επίπεδο αλλά κυρίως στον κατακόρυφο άξονα. Αυτό γίνεται γιατί η ισχύς των υπό εξέταση μη-γραμμικών φαινομένων (TPEF-SHG), εξαρτάται τετραγωνικά όπως είδαμε από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (Σχέσεις 4 και 5), με αποτέλεσμα η παραγόμενη ακτινοβολία να φθίνει πολύ γρήγορα εκτός του εστιακού κέντρου, όπως φαίνεται και στο παρακάτω Σχήμα 11. Έτσι, επιτυγχάνεται εγγενής οπτικός τεμαχισμός του δείγματος με αύξηση της διακριτικής ικανότητας (ειδικά στον κατακόρυφο άξονα).



Σχήμα 11: α) Φωτογραφία μονοφωτονικής διέγερσης της *fluorescein* από εστιασμένη ($NA = 0.16$) δέσμη ($488nm$) συνεχούς LASER. Η διέγερση εκτείνεται πάνω και κάτω από το εστιακό επίπεδο (*focal plane*). β) Διφωτονική διέγερση της *fluorescein* με εστιασμένη ($NA = 0.16$) δέσμη fs LASER ($960nm$). Η περιοχή διέγερσης περιορίζεται στο εστιακό επίπεδο

Επιπλέον, λόγω αυτού του μικρού όγκου μειώνονται τα φαινόμενα φωτοτοξικότητας,. Επίσης επειδή στη μη-γραμμική μικροσκοπία χρησιμοποιούμε ακτινοβολία διέγερσης στο υπέρυθρο έχουμε μεγάλο βάθος διείσδυσης στο δείγμα. Άλλο ένα θετικό είναι ότι η ακτινοβολία διέγερσης είναι φασματικά πολύ μακριά από την ακτινοβολία εκπομπής, συνεπώς επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός τους κατά την ανίχνευση, με αποτέλεσμα την άυξηση του contrast.

Ο συνδυασμός όλων των παραπάνω δίνει τη δυνατότητα στη μη-γραμμική μικροσκοπία να είναι όσο το δυνατόν λιγότερο επεμβατική στο δείγμα με αποτέλεσμα την επιτυχή λήψη τρισδιάστατων εικόνων υψηλής ευκρίνειας, *in-vivo*.

Τέλος, όπως αναφέραμε και παραπάνω, οι διαφορές στην μικροσκοπία SHG σε σχέση με την TPEF είναι πως στην SHG δεν έχουμε καθόλου απορρόφηση ακτινοβολίας αλλά μη-γραμμική σκέδαση καθιστώντας έτσι τη μικροσκοπία SHG ως μια από τις λιγότερο επεμβατικές μεθόδους μικροσκοπίας υψηλής ανάλυσης στις μέρες μας. Επιπλέον, όπως θα δούμε στο επόμενο κεφάλαιο επειδή η SHG είναι ευαίσθητη στην πόλωση της διεγείρουσας ακτινοβολίας, μπορεί να δώσει πολύτιμες ποσοτικοποιημένες ενδογενείς πληροφορίες για την σύσταση του δείγματος, χωρίς την χρήση εξωγενών βοηθημάτων ή επεξεργασία του δείγματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Θεωρία Της PSHG (Polarization sensitive SHG)

Σε αυτό το κεφάλαιο θα αναλυθεί η θεωρία της PSHG και πως μπορεί να εφαρμοστεί στον χαρακτηρισμό της σύστασης βιολογικών δειγμάτων.

2.1 Μακροσκοπική Προσέγγιση της PSHG[1,2]

Στο προηγούμενο κεφάλαιο και συγκεκριμένα στο υποκεφάλαιο 1.4 είδαμε πως, για ισχυρό πεδίο, η πόλωση που επάγεται στο υλικό μπορεί να έχει και μη γραμμική εξάρτηση από αυτό, σύμφωνα με τη Σχέση (7),

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

όπου $\chi^{(2)}$ και $\chi^{(3)}$ οι μη γραμμικές επιδεκτικότητες δεύτερης και τρίτης τάξης αντίστοιχα.

Στην πιο γενική περίπτωση δράσης δύο ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων με καθορισμένες συχνότητες ω_1 και ω_2 και πλάτη ηλεκτρικού πεδίου ταλάντωσης $E(\omega_1)$ και $E(\omega_2)$ αντίστοιχα, η μη γραμμική πόλωση P δεύτερης τάξης που επάγεται δίνεται από τη σχέση

$$P_i(\omega_1 + \omega_2) = \sum_n \sum_m \chi_{inm}^{(2)}(\omega_1 + \omega_2, \omega_1, \omega_2) \cdot E_n(\omega_1) E_m(\omega_2) \quad (1)$$

ορίζοντας έτσι τα 27 στοιχεία του $\chi^{(2)}$ και όπου τα ijk αναφέρονται σε καρτεσιανές συνιστώσες. Από τον παραπάνω τύπο είναι φανερό πως οι δείκτες n, m μπορούν να εναλλαχθούν μεταξύ τους χωρίς να προκληθεί κάποια αλλαγή στη σχέση (1), δηλαδή με άλλα λόγια ισχύει $\chi_{inm}^{(2)} = \chi_{imn}^{(2)}$. Αυτή η συμμετρία εναλλαγής των δεικτών ονομάζεται permutation symmetry και οδηγεί στην ουσία τον $\chi^{(2)}$ να εξαρτάται μόνο από μια συχνότητα ω_3 , όπου $\omega_3 = \omega_1 + \omega_2$. Ωστόσο ο τανυστής $\chi^{(2)}$, αν και τώρα δεν είναι τόσο προφανές, υπόκεινται σε μια ακόμα πιο γενική συμμετρία εναλλαγής και των τριών δεικτών, γνωστή ως full permutation symmetry. Σύμφωνα με την full permutation symmetry, οι τρεις δείκτες μπορούν να εναλλάσσονται μεταξύ τους, αρκεί να εναλλάσσονται ταυτόχρονα και οι αντίστοιχοι ρόλοι των $\omega_3, \omega_1, \omega_2$ με τέτοιο τρόπο, έτσι ώστε η συχνότητα που εξαρτάται τελικά ο τανυστής $\chi^{(2)}$ να είναι όντως το άθροισμα των άλλων δύο. Ένα παράδειγμα της full permutation symmetry είναι το ακόλουθο

$$\chi_{ijk}^{(2)}(\omega_3 = \omega_1 + \omega_2) = \chi_{jki}^{(2)}(-\omega_1 = \omega_2 - \omega_3)$$

Η χρήση των παραπάνω συμμετριών σε συνδυασμό με άλλη μια που θα αναφερθεί στη συνέχεια, μηδενίζουν πολλά από τα στοιχεία του τανυστή $\chi^{(2)}$ απλοποιώντας τον σε μεγάλο βαθμό.

Στην περίπτωση όμως τώρα της δεύτερης αρμονικής τα δύο κύματα ταυτίζονται, δηλαδή $\omega_1 = \omega_2 = \omega$, οπότε η σχέση (1) θα μετατραπεί στη Σχέση (2)

$$P_i(2\omega) = \sum_n \sum_m^{ijk} \chi_{imm}^{(2)}(2\omega, \omega, \omega) \cdot E_n(\omega) E_m(\omega) \quad (2)$$

Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τις αναλυτικές λύσεις των εξισώσεων του ατομικού μοντέλου Lorentz, για γκαουσιανή δέσμη, που περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 1.4 η μη γραμμική επιδεκτικότητα δεύτερης τάξης εξαρτάται από την συχνότητα ω σύμφωνα με τη Σχέση (3)

$$\chi^{(2)}(2\omega) = -\frac{\alpha(e/m)^2 E^2}{D(2\omega)D^2(\omega)} \quad (3)$$

Όπου $D(\omega) = \omega_0^2 - \omega^2 - 2i\omega\gamma$, ω_0 η ιδιοσυχνότητα του υλικού και γ ο συντελεστής απόσβεσής του.

Είναι φανερό από τη Σχέση (3) ότι για ω πολύ μικρότερο από το ω_0 , πράγμα που συμβαίνει για H/M κύματα στο υπέρυθρο και συνήθη υλικά, η μη γραμμική επιδεκτικότητα δεύτερης τάξης είναι ανεξάρτητη της συχνότητας ω . (Το ω_0 για συνήθη υλικά κυμαίνεται σε τιμές $10^{15}-10^{16} \text{ sec}^{-1}$, ενώ το ω για την υπέρυθρη ακτινοβολία διέγερσης που χρησιμοποιήσαμε είναι $4.6 \cdot 10^{13} \text{ sec}^{-1}$). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την full permutation symmetry οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μπορούμε να εναλλάσσουμε και τους τρεις δείκτες των στοιχείων του $\chi^{(2)}$, χωρίς πάλι να προκληθεί κάποια αλλαγή στη σχέση (2). Αυτή η ιδιότητα ονομάζεται Kleinmann's symmetry.

Εισάγοντας τώρα τον νέο τανυστή $d_{ijk} = 1/2 \chi_{ijk}^{(2)}$ και αξιοποιώντας την permutation symmetry δεχόμενοι τον παρακάτω συμβολισμό:

jk: 11 22 33 23,32 31,13 12,21

l : 1 2 3 4 5 6

ο τανυστής d_{il} θα είναι ένας πίνακας 3x6 με την ακόλουθη μορφή:

$$d_{il} = \begin{pmatrix} d_{11} & d_{12} & d_{13} & d_{14} & d_{15} & d_{16} \\ d_{21} & d_{22} & d_{23} & d_{24} & d_{25} & d_{26} \\ d_{31} & d_{32} & d_{33} & d_{34} & d_{35} & d_{36} \end{pmatrix} \quad (4)$$

Υποθέτοντας ακόμα πως τα γιγαντο-μόρια του υπό εξέταση βιολογικού δείγματος διατάσσονται με εξαγωνική συμμετρία, ο τανυστής d_{il} απλοποιείται ακόμα περισσότερο [16,17]

$$\mathbf{d}_{il} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & d_{14} & d_{15} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & d_{15} & -d_{14} & 0 \\ d_{31} & d_{31} & d_{33} & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (5)$$

με $d_{15}=d_{31}$ και $d_{14}=0$ λόγω Kleinmann's symmetry. Αξίζει να τονιστεί ότι και πάλι λόγω Kleinmann's symmetry, ακριβώς την ίδια μορφή θα είχε ο τανυστής d_{il} και στην περίπτωση που τα γιγαντο-μορία ήταν τοποθετημένα και με κυλινδρική συμμετρία, πράγμα πολύ χρήσιμο αφού στην υπό παρατηρούμενη κλίμακα η χωρική συμμετρία των γιγαντο-μορίων μοιάζει πιο πολύ με κυλινδρική, παρά με εξαγωνική. Συνδυάζοντας τώρα τις Σχέσεις (2) και (5) έχουμε τελικά:

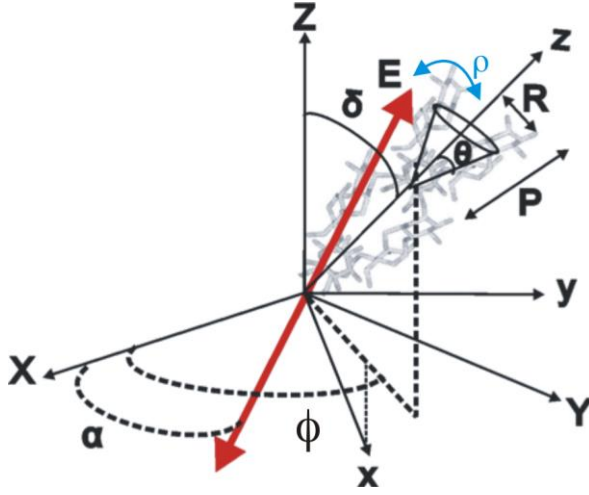
$$\begin{pmatrix} P_x^{2\omega} \\ P_y^{2\omega} \\ P_z^{2\omega} \end{pmatrix} \sim \chi_{il}^{(2)} \begin{pmatrix} E_x^\omega E_x^\omega \\ E_y^\omega E_y^\omega \\ E_z^\omega E_z^\omega \\ 2E_y^\omega E_z^\omega \\ 2E_x^\omega E_z^\omega \\ 2E_x^\omega E_y^\omega \end{pmatrix} \Rightarrow \begin{aligned} P_x^{2\omega} &\sim 2d_{15}E_x^\omega E_z^\omega \\ P_y^{2\omega} &\sim 2d_{15}E_y^\omega E_y^\omega \\ P_z^{2\omega} &\sim 4(d_{31}E_x^\omega E_x^\omega + d_{31}E_y^\omega E_y^\omega + d_{33}E_z^\omega E_z^\omega) \end{aligned} \quad (6)$$

Ωστόσο όλη η παραπάνω ανάλυση υποθέτει ότι στο σύστημα συντεταγμένων που εργαστήκαμε, ο άξονας κυλινδρικής ή εξαγωνικής συμμετρίας των γιγαντο-μορίων ταυτίζεται με τον άξονα των Z. Όμως στο δικό μας σύστημα συντεταγμένων, το σύστημα συντεταγμένων του εργαστηρίου, ο άξονας συμμετρίας των γιγαντο-μορίων μπορεί να σχηματίζει τυχαία γωνία δ με τον άξονα των Z. Για αυτό τον λόγο θα πρέπει να προβάλλουμε το εφαρμοζόμενο πεδίο στο σύστημα συντεταγμένων του γιγαντο-μορίου, έτσι ώστε να υπολογίσουμε σωστά τις συνιστώσες του, που αναφέρει η σχέση (6).

Έστω ότι το σύστημα συντεταγμένων του εργαστηρίου ορίζεται από τους άξονες X-Y-Z. Έστω ακόμα ότι η διεύθυνση διάδοσης του πεδίου διέγερσης συμπίπτει με τον άξονα των Z και ότι η πόλωση του πεδίου μπορεί να περιστρέφεται στο επίπεδο X-Y κατά μια γωνία α μετρούμενη από τον άξονα των X. Έτσι σε αυτό το σύστημα συντεταγμένων το πεδίο θα έχει την ακόλουθη μορφή:

$$\vec{E} = E_o (\cos(\alpha)X + \sin(\alpha)Y) \exp[kZ - \omega t] \quad (7)$$

Έστω ακόμα το σύστημα συντεταγμένων του γιγαντο-μορίου που ορίζεται από τους άξονες x-y-z με τον άξονα z να ταυτίζεται όπως ανέφερα με τον άξονα συμμετρίας του γιγαντο-μορίου και να σχηματίζει γωνία δ με τον Z, τον άξονα των y να είναι στο επίπεδο X-Y και τον άξονα των x να σχηματίζει γωνία ϕ με τον άξονα X. Και τα δύο συστήματα συντεταγμένων φαίνονται στο Σχήμα 1



Σχήμα 1 : Απεικόνιση των συστημάτων αναφοράς εργαστηρίου και γιγαντο-μορίου

Αμέσως παρακάτω φαίνεται ο τρόπος με τον οποίο προβάλλονται οι συντεταγμένες του εργαστηρίου στις συντεταγμένες του γιγαντο-μορίου

$$\begin{cases} \hat{X} = \cos(\delta) \cos(\varphi) \hat{x} - \sin(\varphi) \hat{y} + \sin(\delta) \cos(\varphi) \hat{z} \\ \hat{Y} = \cos(\delta) \sin(\varphi) \hat{x} + \cos(\varphi) \hat{y} + \sin(\delta) \sin(\varphi) \hat{z} \\ \hat{Z} = -\sin(\delta) \hat{x} + \cos(\delta) \hat{z} \end{cases} \quad (8)$$

Έτσι σύμφωνα με τη σχέση (8) το πεδίο μπορεί να εκφραστεί στις καινούργιες συντεταγμένες ως εξής:

$$\vec{E} = E_o [\cos(\delta) \cos(\varphi - \alpha) \hat{x} + \sin(\varphi - \alpha) \hat{y} + \sin(\delta) \cos(\varphi - \alpha) \hat{z}] \quad (9)$$

Με βάση τώρα την σχέση (9) ξανα-εκφράζουμε τη σχέση (6)

$$\begin{cases} P_x^{2\omega} \sim E_o^2 2d_{15} \{ \cos^2(\varphi - \alpha) \cos(\delta) \sin(\delta) \} \\ P_y^{2\omega} \sim E_o^2 d_{15} \{ \sin 2(\varphi - \alpha) \sin(\delta) \} \\ P_z^{2\omega} \sim E_o^2 \{ d_{31} [\sin^2(\varphi - \alpha) + \cos^2(\varphi - \alpha) \cos^2(\delta)] + d_{33} \cos^2(\varphi - \alpha) \sin^2(\delta) \} \end{cases} \quad (10)$$

Προκειμένου όμως να μετρήσουμε το παραγόμενο σήμα της δεύτερης αρμονικής, πρέπει να εκφράσουμε την επαγόμενη πόλωση στο σύστημα συντεταγμένων του εργαστηρίου. Έτσι χρησιμοποιώντας με αντίστροφο τρόπο την σχέση (8) έχουμε για την πόλωση

$$\begin{aligned} \vec{P} = P_x^{2\omega} (\cos(\delta) \cos(\varphi) \hat{X} + \cos(\delta) \sin(\varphi) \hat{Y} - \sin(\delta) \hat{Z}) + P_y^{2\omega} (-\sin(\varphi) \hat{X} + \cos(\varphi) \hat{Y}) \\ + P_z^{2\omega} (\sin(\delta) \cos(\varphi) \hat{X} + \sin(\delta) \sin(\varphi) \hat{Y} + \cos(\delta) \hat{Z}) \end{aligned} \quad (11)$$

Το πεδίο που παράγεται από την SHG δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$\begin{aligned} \vec{E}_{rad}^{2\omega} = P_x^{2\omega} \hat{X} + P_y^{2\omega} \hat{Y} = & (P_x^{2\omega} \cos(\delta) \cos(\varphi) - P_y^{2\omega} \sin(\varphi) + P_z^{2\omega} \sin(\delta) \cos(\varphi)) \hat{X} + \\ & (P_x^{2\omega} \cos(\delta) \sin(\varphi) + P_y^{2\omega} \cos(\varphi) + P_z^{2\omega} \sin(\delta) \sin(\varphi)) \hat{Y} \end{aligned} \quad (12)$$

οπότε η μέση παραγόμενη ένταση δεύτερης αρμονικής που θα μετρήσουμε θα είναι ανάλογη του τετραγώνου του μέτρου του παραπάνω παραγόμενου πεδίου και θα δίνεται από τη σχέση:

$$\begin{aligned} I^{2\omega} \sim \left| \overline{E_{rad}^{2\omega}} \right|^2 = & (P_x^{2\omega})^2 \cos^2(\delta) + (P_y^{2\omega})^2 + (P_z^{2\omega})^2 \sin^2(\delta) + 2P_x^{2\omega} P_z^{2\omega} \cos(\delta) \sin(\delta) \\ = & \left[P_x^{2\omega} \cos(\delta) + P_z^{2\omega} \sin(\delta) \right]^2 + (P_y^{2\omega})^2 \end{aligned} \quad (13)$$

Αντικαθιστώντας ακόμα την σχέση (12) στην (13) έχουμε τελικά ότι :

$$I^{2\omega} \sim d_{15}^2 E_0^4 \sin^2(\delta) \left\{ \sin^2 2(\phi - \alpha) + \left[\frac{d_{31}}{d_{15}} \sin^2(\phi - \alpha) + \left(\frac{d_{33}}{d_{15}} \sin^2(\delta) + \left(2 + \frac{d_{31}}{d_{15}} \right) \cos^2(\delta) \right) \cos^2(\phi - \alpha) \right]^2 \right\} \quad (14)$$

Η σχέση (14) μπορεί να ξαναγραφτεί στην ακόλουθη πιο συμπαγή μορφή

$$I^{2\omega} \sim E \left\{ \sin^2 2(\alpha - \phi) + [A \sin^2(\alpha - \phi) + B \cos^2(\alpha - \phi)]^2 \right\} \quad (15)$$

όπου

$$E = d_{15}^2 E_0^4 \sin^2 \delta \quad (16)$$

$$A = d_{31} / d_{15} \quad (17)$$

$$B = \frac{d_{33}}{d_{15}} \sin^2 \delta + \left(2 + \frac{d_{31}}{d_{15}} \right) \cos^2 \delta \quad (18)$$

Συνήθως ο άξονας συμμετρίας του δείγματος βρίσκεται στο επίπεδο X-Y οπότε $\delta = \pi/2$, άρα εάν υποθέσουμε Kleinmans symmetry ($d_{31} = d_{15}$) η μόνη ελεύθερη παράμετρος είναι το πηλίκο d_{33}/d_{15} και η γωνία φ , τα οποία θα προσδιοριστούν από το fit των δεδομένων στην παραπάνω καμπύλη.

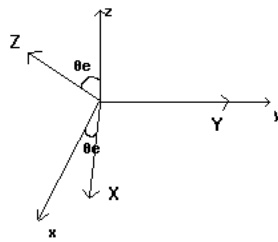
2.2 Μικροσκοπική προσέγγιση της PSHG

Στο προηγούμενο υποκεφάλαιο έγινε μια εκτενής ανάλυση της PSHG σε μακροσκοπικό επίπεδο. Προκειμένου όμως να καταφέρουμε να πάρουμε

πληροφορίες σε μοριακό επίπεδο θα πρέπει να γίνει μια μικροσκοπική προσέγγιση της PSHG και να συνδυαστεί με την μακροσκοπική.

Η μη γραμμική επιδεκτικότητα $\chi_{ijk}^{(2)}$, μπορεί να γραφτεί συναρτήσει της μικροσκοπικής υπερπολωσιμότητας β_{ijk} του κάθε συνεισφερόμενου μορίου, στη μορφή $\chi_{ijk}^{(2)} = N \langle \beta_{ijk} \rangle_{ijk}$ όπου i, j, k οι συνιστώσες στο μακροσκοπικό σύστημα αναφοράς του γιγαντομορίου και I, J, K οι συνιστώσες στο μικροσκοπικό σύστημα αναφοράς των επιμέρους μορίων [18]. Τέλος N είναι η πυκνότητα των μορίων που συνεισφέρουν στο σήμα SHG και οι αγκύλες $\langle \rangle$ δηλώνουν τον μέσο όρο των διευθύνσεων της υπερπολωσιμότητας.

Υποθέτουμε ότι τα επιμέρους μόρια χαρακτηρίζονται μόνο από μία αξονική υπερπολωσιμότητα β , την οποία μπορούμε να τη θέσουμε να ταυτίζεται με τον άξονα των Z . Αυτή η υπόθεση έχει χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν για να περιγράψει αρκετά ικανοποιητικά διάφορες βαφές, συστατικά ιστών και πολυμερή υδατανθράκων [18]. Η γωνία θ_e , που θα σχηματίζει τώρα ο άξονας των Z με τον άξονα των z φαίνεται στο παρακάτω σχήμα



Σχήμα 2 : Σχηματική απεικόνιση των 2 συστημάτων αναφοράς xyz, XYZ

Υποθέτοντας ακόμα, όπως συμβαίνει πολλές φορές, ότι τα μόρια υπόκεινται σε αζιμουθιακή συμμετρία, ο στατιστικός μέσος όρος του β_{zzz} προς όλες τις κατευθύνσεις θα δίνεται από την παρακάτω σχέση

$$\langle \beta_{zzz} \rangle = \int_0^{\pi} \beta_{zzz} \cdot G(\theta) \cdot \sin(\theta) \cdot d\theta \quad (19)$$

Στη συνέχεια θα υπολογιστούν τα στοιχεία του τανυστή $\chi_{ijk}^{(2)}$. Ωστόσο, όπως ξέρουμε από το προηγούμενο υποκεφάλαιο, τα μόνα μη μηδενικά στοιχεία του $\chi_{ijk}^{(2)}$ είναι τα $\chi_{15} = \chi_{31} = \chi_{xxz}$ και $\chi_{33} = \chi_{zzz}$. Έτσι με τη χρήση της σχέσης (19) έχουμε ότι

$$\chi_{xxz} = \frac{1}{2} N \int_0^{\pi} \beta_{zzz} \cdot \sin^2(\theta) \cdot \cos(\theta) \cdot G(\theta) \cdot \sin(\theta) \cdot d\theta \quad (20)$$

όπου το $\sin^2(\theta)$ και ο παράγοντας $1/2$ προέρχονται από την προβολή του β_{zzz} και του εφαρμοζόμενου πεδίου E στον άξονα των x , ενώ το $\cos(\theta)$ από την προβολή του E στον z . Με ανάλογο τρόπο υπολογίζεται ότι

$$\chi_{zzz} = \int_0^{\pi} \beta_{zzz} \cdot \cos^3(\theta) \cdot G(\theta) \cdot \sin(\theta) \cdot d\theta \quad (21)$$

Οι σχέσεις (20) και (21) μπορούν να ξαναγραφτούν στην ακόλουθη μορφή:

$$\begin{aligned} \chi_{xxz} &= \int_0^{\pi} \beta_{zzz} \cdot \sin^2(\theta) \cdot \cos(\theta) \cdot G(\theta) \cdot \sin(\theta) \cdot d\theta = \frac{1}{2} N \beta_{zzz} \langle \sin^2(\theta) \cos(\theta) \rangle = \\ &= \frac{1}{2} N \langle \beta_{zzz} \rangle (\langle \cos(\theta) \rangle - \langle \cos^3(\theta) \rangle) \end{aligned} \quad (22)$$

$$\chi_{zzz} = \int_0^{\pi} \beta_{zzz} \cdot \cos^3(\theta) \cdot G(\theta) \cdot \sin(\theta) \cdot d\theta = N \langle \beta_{zzz} \rangle \langle \cos^3(\theta) \rangle \quad (23)$$

$$\text{Όπου } \langle \cos^n(\theta) \rangle = \frac{\int_0^{\pi} \cos^n(\theta) \cdot G(\theta) \cdot \sin(\theta) \cdot d\theta}{\int_0^{\pi} G(\theta) \cdot \sin(\theta) \cdot d\theta} \quad (24)$$

Στην περίπτωση τώρα όπου η $G(\theta)$ έχει μη μηδενικές τιμές μόνο για μια στενή περιοχή γύρω από τη θ_e , γεγονός που συμβαίνει τις περισσότερες φορές, τότε ισχύει η προσέγγιση $\langle \cos^n(\theta) \rangle \approx \cos^n(\theta_e)$ [8]. Η γωνία θ_e ονομάζεται και ενεργός διεύθυνση της SHG (effective orientation SHG) και μας δείχνει την γωνία ως προς τον άξονα των Z από την οποία παίρνουμε το μεγαλύτερο μέρος του σήματος SHG. Τέλος ορίζεται μια νέα παράμετρος D , γνωστή ως orientation parameter, ως :

$$D = \frac{\langle \cos^3(\theta) \rangle}{\langle \cos(\theta) \rangle} = \frac{\chi_{33} / \chi_{15}}{2 + (\chi_{33} / \chi_{15})} = \frac{d_{33} / d_{15}}{2 + (d_{33} / d_{15})} \quad (25)$$

Συνδυάζοντας τη σχέση (25) και με την προσέγγιση $\langle \cos^n(\theta) \rangle \approx \cos^n(\theta_e)$ έχουμε ότι

$$\frac{d_{33} / d_{15}}{2 + (d_{33} / d_{15})} = \cos^2(\theta_e) \quad (26)$$

Υπολογίζοντας τώρα το λόγο d_{33} / d_{15} από το fit των μετρήσεων στη καμπύλη της σχέσης (15), μπορούμε βρούμε μια τιμή για την θ_e κάνοντας έτσι ταυτοποίηση του υπό μελέτη δείγματος. Για παράδειγμα η τιμή της θ_e για το μόριο της μυσίνης, μπορεί να υπολογιστεί με μεγάλη ακρίβεια σε πειράματα περίθλασης ακτίνων- X δίνοντας τη τιμή 68.6 μοίρες. [19]

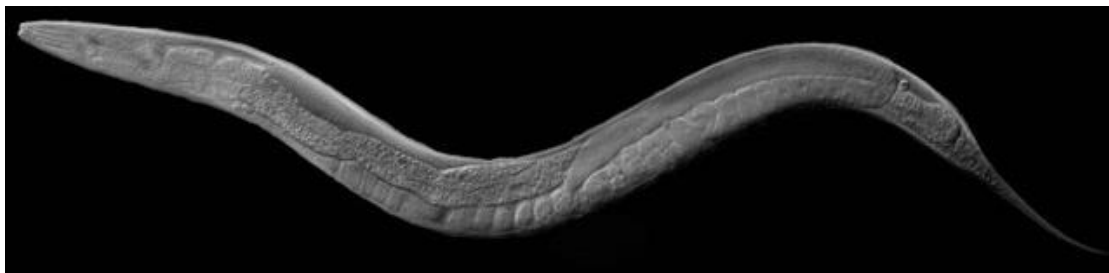
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Βιολογικό Δείγμα: C.Elegans

Ο βιολογικός οργανισμός που μελετήθηκε σε αυτή την εργασία, προκειμένου να εφαρμοστεί η θεωρία της PSHG που αναλύθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο σε βιολογικά δείγματα, ήταν ο νηματοειδής C.Elegans. Για το λόγο αυτό στο υποκεφάλαιο 3.1 θα γίνει μια συνοπτική παρουσίασή του, ενώ στο υποκεφάλαιο 3.2 θα αναλυθεί η ανατομία των body wall muscle, αφού αυτή ήταν η υπό εξέταση περιοχή των πειραμάτων μας

3.1 Γενικές Πληροφορίες για το C.Elegans και η Χρησιμότητά του

Ο νηματώδης *C. elegans* είναι ένας μικρός (περίπου 1 mm σε μήκος με μέγιστη διάμετρο 80 μm) και διάφανος, μη παρασιτικός νηματώδης που ζει στο χώμα. Είναι ερμαφρόδιτος νηματώδης με κύκλο ζωής 2,5 ημέρες στους 25°C. Ακόμα αυτός ο οργανισμός είναι ιδιαίτερα ανθεκτικός σε συνθήκες όπως υψηλές θερμοκρασίες, έλλειψη τροφής[6], ενώ μια εικόνα του φαίνεται παρακάτω



Εικόνα 1: Απεικόνιση νηματώδης *C.Elegans* μέσω DIC (Differential interference contrast) microscope

Η χρήση του *C.Elegans* ως οργανισμό μοντέλο προσφέρει πολλά και σημαντικά πλεονεκτήματα. Πρώτον είναι δυνατή η μεγάλης κλίμακας αναπαραγωγή σε σύντομο χρονικό διάστημα λόγω του μικρού κύκλου ζωής του. Επίσης η απλότητα του αναπαραγωγικού του κύκλου επιτρέπει την εύκολη εφαρμογή γενετικών αναλύσεων. Το μικρό του μέγεθος βοηθά στην εύκολη παρατήρηση των κυττάρων του με ηλεκτρονική ή άλλου είδους μικροσκοπία. Τέλος, ιδιαίτερα θετικός παράγοντας είναι η «σταθερότητα» στην ανάπτυξη σε μεταβαλλόμενες συνθήκες. Ο *C.Elegans* είναι ο μοναδικός οργανισμός για τον οποίο έχει επιτευχθεί ο καθορισμός της πλήρους σειράς των κυτταρικών διαιρέσεων που οδηγούν από το ένα κύτταρο (γονιμοποιημένο ωάριο) έως τα 959 του ενήλικου ατόμου[20]. Η έρευνα με την χρήση *C.Elegans* διευκολύνεται όμως και από το γεγονός ότι ο οργανισμός αυτός είναι πολύ καλά μελετημένος σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Το απλό σωματικό πρότυπο, η διαφάνεια των εμβρύων και της επιδερμίδας και το σχεδόν σταθερό αναπτυξιακό πρόγραμμα αυτού του νηματώδους διευκολύνει το λεπτομερή

φυσιολογικό και ανατομικό χαρακτηρισμό του ζώου. Όλα τα κύτταρα του έχουν χαρακτηριστεί, έχει καταγραφεί το σύνολο των κυτταρικών διαιρέσεων που οδηγεί στα 959 κύτταρα του ενήλικου ατόμου και υπάρχει πλήρες διάγραμμα των συνδέσεων των 302 νευρώνων του. Ερευνητές χρησιμοποιούν τα δεδομένα για το γονιδιώμα του ώστε να «παράγουν» με γονιδιακές μεταλλάξεις, με την μέθοδο της «αντίστροφης γενετικής», το συγκεκριμένο γένος που τους ενδιαφέρει και να απομονώνουν μεταλλαγμένα στελέχη με συγκεκριμένο φαινότυπο[21,22]. Η μοριακή βιολογία του *C.Elegans* επιτρέπει την γρήγορη άντληση μεγάλου όγκου πληροφοριών σχετικά με τις δραστηριότητες των γονιδίων *in vivo*.

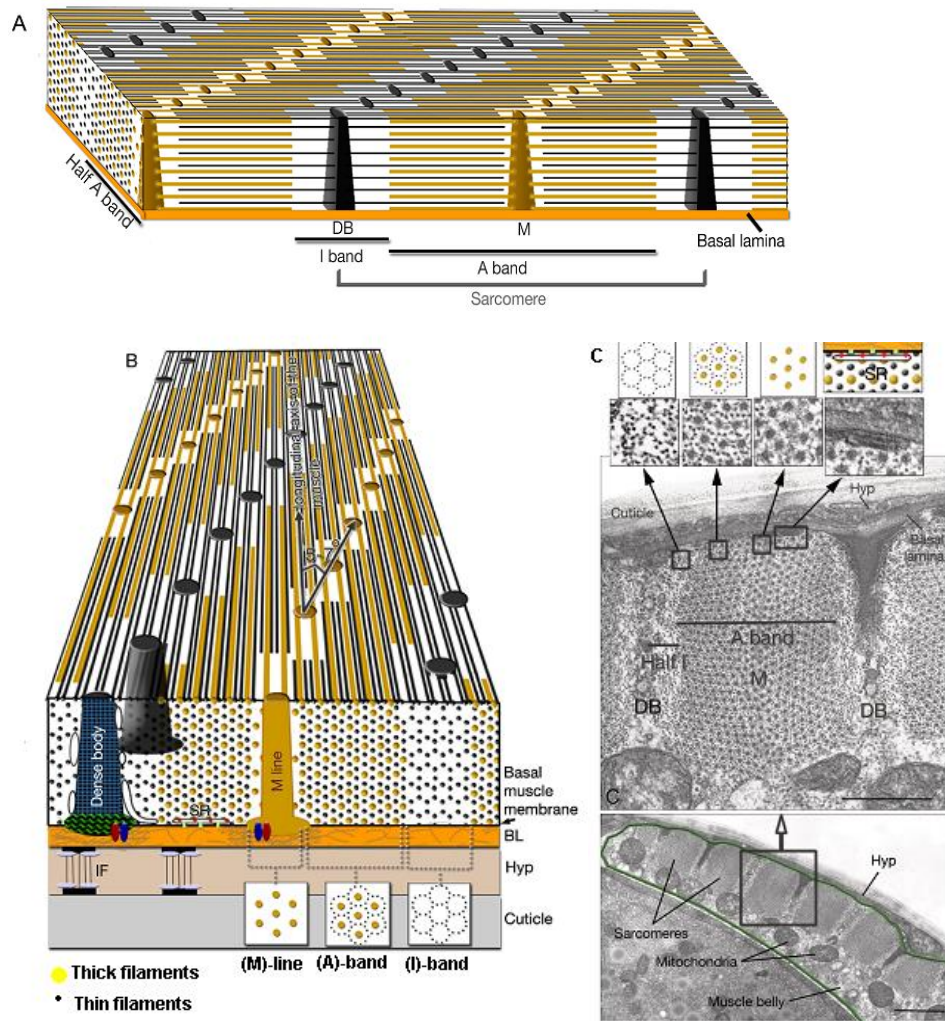
Από τα παραπάνω μπορεί κανείς εύκολα να κατανοήσει ότι λόγω του ευρύ φάσματος γενετικών και μοριακών τεχνικών που μπορούν να εφαρμοστούν στον *C. elegans*, ο οργανισμός αυτός αποτελεί ένα πρότυπο βιολογικό σύστημα, πάνω στο οποίο μπορούν να βασιστούν μελέτες σε βασικά προβλήματα της βιολογίας. Ένα παράδειγμα ενός τέτοιου βιολογικού προβλήματος, για το οποίο έχουν γίνει πολλές μελέτες και από ερευνητικές ομάδες του Ι.Τ.Ε. , είναι η κατανόηση των διαδικασιών της γήρανσης.

3.2 Ανατομία *C.Elegans* body wall Muscle

Ο νηματώδης *C.Elegans* αποτελεί ένα αρκετά ικανοποιητικό μοντέλο για την μελέτη της λειτουργίας των μυών σε μικροσκοπικό επίπεδο και οι κύριοι λόγοι για αυτό είναι οι εξής δύο : πρώτον έχει αρκετά μεγάλα σε μέγεθος σαρκομερή και δεύτερον διαθέτει δύο ειδών μυών, του αυλακωτούς και του μη-αυλακωτούς. Οι αυλακωτοί μύες αποτελούνται από πολλαπλά σαρκομερή και είναι παρόμοιοι με τους σκελετικούς μείς των σπονδυλωτών[23]. Από την άλλη, οι μη-αυλακωτοί αποτελούνται μόνο από ένα σαρκομερές και μοιάζουν με τα καρδιακά μυϊκά κύτταρα των θηλαστικών[23]. Η ανάλυση που θα ακολουθήσει αφορά τους αυλακωτούς μυς αφού αυτοί συναντώνται στα body walls του *C.Elegans*

Σαρκομερή: Αποτελούνται από τρεις διαφορετικές περιοχές: Την ισοτροπική περιοχή, η οποία με τη σειρά της αποτελείται από δύο μισές μάντες((I)-half bands) λεπτών ινών ακτίνης(thin filaments) στα άκρα του σαρκομερούς. Στο μέσω του σαρκομερούς υπάρχει η ανισοτροπική περιοχή (A)-band, η οποία περιέχει thin και thick filaments διατεταγμένα συμμετρικά. Τέλος στο μέσω της περιοχής (A) υπάρχει η περιοχή (M)-line, αποτελούμενη μόνο από thick filaments διατεταγμένα πάλι συμμετρικά.[7]

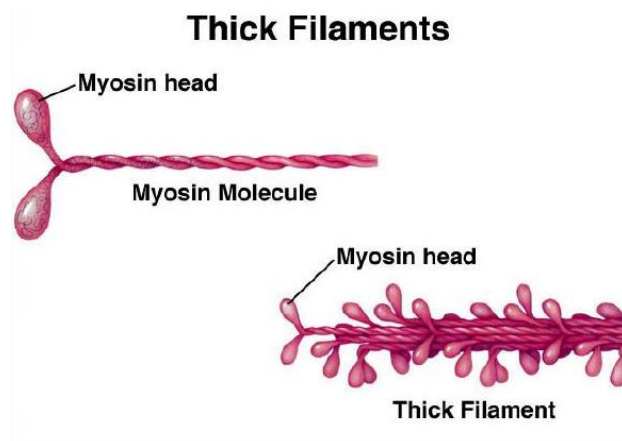
Στη συνέχεια παρουσιάζονται κάποιες χαρακτηριστικές εικόνες ενός σαρκομερούς



Εικόνα 2 : (A) Σχηματική απεικόνιση ενός σαρκομερόν *C.Elegans* από πλάγια όψη (B) Σχηματική απεικόνιση τμήματος αυλακωτού μυ *C.Elegans* κατά μήκος των filaments. Σε αυτή την εικόνα φαίνεται ακόμα ότι τα filaments σχηματίζουν μια γωνία 5-7 μοιρών με την μυϊκή ίνα (C) Διαδοχική απεικόνιση μέσω TEM (Transmission Electron Microscope) από ένα σαρκομερές στα filaments.[5]

Είναι φανερό από την Εικόνα 2 ότι τα thick filaments, τα οποία θεωρούνται ότι είναι τα υπεύθυνα γιγαντομόρια για την SHG στο σαρκομερές[7], είναι διατεταγμένα με εξαγωνική συμμετρία, η οποία ωστόσο μπορεί να θεωρηθεί και κυλινδρική λόγω του μεγάλου μήκους κύματος παρατήρησης που χρησιμοποιούμε (1028 nm) και τις μικρής απόστασης των filaments (περίπου 300 nm).

Τα thick filaments τώρα είναι χονδρές ίνες μήκους περίπου 10μm και κωνικού διαμέτρου από 33.4 nm έως 1nm. Αποτελούνται από μόρια μυοσίνης και είναι σκληρές και άκαμπτες δομές. Τα μόρια της μυοσίνης αποτελούνται με τη σειρά τους, από δύο μυϊκές πρωτεΐνες, οι οποίες σχηματίζουν μια διπλή έλικα και δύο heads όπως φαίνεται και στη παρακάτω εικόνα



Εικόνα 3 : Σχηματική απεικόνιση ενός μορίου μυοσίνης και ενός *thick filament*

Τέλος παρουσιάζεται μία εικόνα στην οποία φαίνεται η γωνία θ_0 (υποκεφάλαιο 2.2) η οποία ταυτίζεται με μία από τις έλικες στην ουρά της μυοσίνης.



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση μιας εκ των δύο ελίκων του μορίου της μυοσίνης και της γωνίας θ_0 , που σχηματίζουν όλοι οι άξονες των υπερπολωσιμότητων των επιμέρους μορίων, τα οποία απαρτίζουν την έλικα, με τον άξονα z της έλικας. Το πλάτος της έλικας συμβολίζει τα μόρια και του χημικούς δεσμούς που την απαρτίζουν.

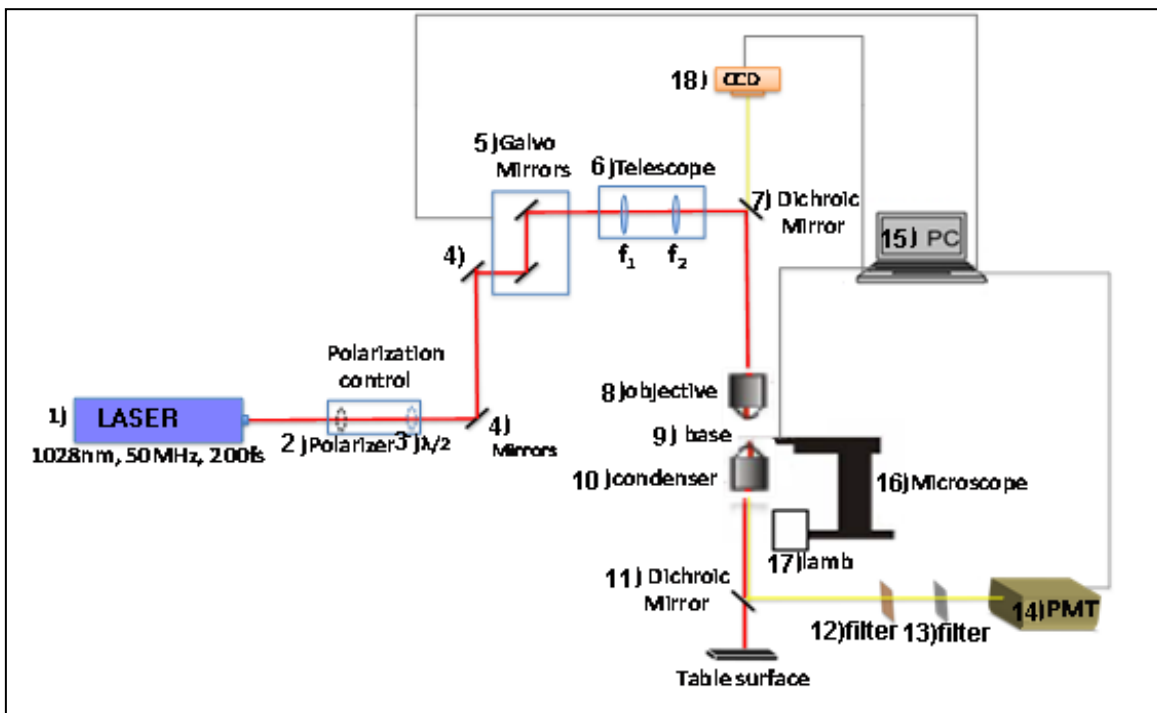
Στην πραγματικότητα το πλάτος της έλικας στην Εικόνα 4 είναι πολύ μικρότερο σε σχέση με την ακτίνα της. Αυτός είναι και ο λόγος που θεωρούμε άλλωστε ότι τα επιμέρους μόρια της έλικας έχουν μόνο αξονική υπερπολωσιμότητα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Πειραματικό Μέρος

4.1 Πειραματική Διάταξη

Τα πειράματα αυτής της εργασίας έλαβαν χώρα στο Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ (IESL) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (FORTH) στο εργαστήριο της μη-γραμμικής μικροσκοπίας. Η όλη διάταξη, εκτός από το PC έχει στηθεί πάνω σε αντικραδασμικό οπτικό τραπέζι (Newport). Στη παρακάτω εικόνα εμφανίζεται το block διάγραμμα της πειραματικής διάταξης



Εικόνα 1 : Block διάγραμμα πειραματικής διάταξης

Στη συνέχεια αναλύονται τα εξαρτήματα που είναι αριθμημένα στην εικόνα 1

(1) **LASER**: Χρησιμοποιούμε ως πηγή διέγερσης ένα παλμικό LASER (Amplitude systems t-pulse). Η μέση ισχύς στην έξοδό του μετριέται με φωτόμετρο $\sim 750 \text{ mW}$ (υπολογίζεται ότι στο δείγμα είναι $\sim 35 \text{ mW}$), ενώ η χρονική διάρκεια του παλμού κυμαίνεται (σύμφωνα με τον κατασκευαστή) από 180 έως 200 fs. Ο ρυθμός επανάληψης του παλμού είναι 50 MHz. Σύμφωνα με τις παραπάνω προδιαγραφές, η ενέργεια ενός μόνο παλμού ανέρχεται στα 0.7 nJ. Δεδομένου ότι αυτό το ποσό ενέργειας περιορίζεται χρονικά στα 200 fs, έχουμε πολύ μεγάλη απόδοση στη διέγερση μη γραμμικών φαινομένων. Το FWHM είναι $\sim 10 \text{ nm}$ και το κεντρικό μήκος

κύματος λ είναι $\sim 1028\text{nm}$. Η τιμή του κεντρικού μέγιστου του μήκους κύματος δεν παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και υπάρχουν μετατοπίσεις έως περίπου $\pm 2\text{ nm}$, που οφείλονται στη διακύμανση της θερμοκρασίας στο χώρο του εργαστηρίου και σε μικρές απευθυγραμμίσεις των οπτικών στοιχείων εντός του κουτιού του LASER. Η εξερχόμενη δέσμη είναι γραμμικά πολωμένη (99%).

Ο έλεγχος της διεύθυνσης της γραμμικής πόλωσης του πεδίου διέγερσης επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός πολωτή και ενός πλακιδίου $\lambda/2$ όπου ο συνδυασμός αυτών των δύο μας επιτρέπει τη στρέψη της γραμμικής πόλωσης της δέσμης.

(2) *Πολωτής*: Είναι τοποθετημένος μετά την έξοδο της δέσμης από το LASER και μας αξασφαλίζει την γραμμική πόλωσή της.

(3) *πλακίδιο $\lambda/2$* : η στρέψη του κατά γωνία ϕ στρέφει την πόλωση της δέσμης κατά γωνία 2ϕ

(4)*Κάτοπτρο*: Κάτοπτρα New Focus broad band IR που ανακλούν για γωνία πρόσπτωσης 45° στη φασματική περιοχή $900 - 1200\text{ nm}$, οδηγούν τη θεμελιώδη δέσμη στην είσοδο του μικροσκοπίου.

(5) *Galvo Mirrors*: Σύστημα γαλβανομετρικών κατόπτρων είναι συνδεδεμένοι με τον κεντρικό υπολογιστή(15) και μέσω του προγράμματος LabView μπορούν να σαρώνουν την δέσμη στο επίπεδο X-Y του δείγματος.

(6) *Telescope*: Τηλεσκοπικό σύστημα δύο συγκλίνων φακών με εστιακές αποστάσεις f_1, f_2 . Η χρήση του γίνεται για να αυξηθεί η διάμετρος της δέσμης, έτσι ώστε να καλύπτει ακριβώς το άνοιγμα του αντικειμενικού φακού(8), πράγμα απαραίτητο για την σωστή λειτουργία του τελευταίου.

(7) *Διχρωμικό κάτοπτρο*: 99% ανακλαστικότητα μόνο για μήκη κύματος μεγαλύτερα από 1000 nm και γωνία πρόσπτωσης 45° ενώ επιτρέπει τη διέλευση μικρών κύματος μικρότερων των 1000nm . Αποτρέπονται έτσι τυχόν ανακλάσεις από την πρόσπτωση της θεμελιώδους στο δείγμα να φτάσουν στην κάμερα (18).

(8) *Objective*: Αντικειμενικός φακός ο οποίος εστιάζει τη θεμελιώδη στο δείγμα. Σε αυτόν οφείλεται η ισχυρή εστίαση της δέσμης. Στα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε έναν αντικειμενικό(C-Achroplan, Carl Zeiss, water immersion) με μεγέθυνση $32\times$ και αριθμητικό άνοιγμα (NA) 0.82.

(9) *Base*: Μηχανικά ελεγχόμενη βάση σάρωσης στα επίπεδα $x - y - z$. Είναι στην ουσία ο συνδυασμός τριών μηχανικά ελεγχόμενων μηχανισμών μετατόπισης Standa 8MT167-100, ένας για κάθε επίπεδο μετακίνησης. Η βάση συνδέεται με τον υπολογιστή (15) όπου με το κατάλληλο λογισμικό ελέγχεται η κίνηση, δίνοντας τη δυνατότητα χωρικής σάρωσης του δείγματος. Το ελάχιστο βήμα είναι $1\ \mu\text{m}$, γεγονός που θέτει το πρώτο όριο της κατακόρυφης διακριτικής ικανότητας του συστήματος απεικόνισης. Πάνω στη βάση τοποθετούνται τα δείγματα, τα οποία είναι ανάμεσα σε

δύο ειδικά, ώστε να μην απορροφούν Η/Μ ακτινοβολία, γυάλινα κυκλικά slides πάχους 50 – 60 μm το καθένα. Δεδομένου ότι η απόσταση εργασίας του αντικειμενικού (8) είναι μόλις 0.54 mm, με το παραπάνω πάχος διασφαλίζεται ότι η θεμελιώδης δέσμη μπορεί να εστιαστεί μέσα στο δείγμα και όχι μέσα στο γυαλί. Επιπλέον, αποφεύγεται η πιθανή επαφή του δείγματος με τους φακούς.

(10) *Condenser*: Ο φακός condenser(συγκεντρωτικός) συλλέγει το σήμα της SHG και το οδηγεί σαν παράλληλη δέσμη στο διχρωϊκό κάτοπτρο(11). Επιπλέον, συγκεντρώνει το φως από την ενσωματωμένη λυχνία του μικροσκοπίου (17), παρέχοντας έτσι τον κατάλληλο φωτισμό για τη σωστή λειτουργία της κάμερας (18). Στα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε έναν συγκεντρωτικό φακό 40 \times (Carl Zeiss, Plan Neofluar, air immersion) και με αριθμητικό άνοιγμα (NA) 0.75 .

(11) *Dichroic Mirror*: Το διχρωϊκό κάτοπτρο που βρίσκεται στην πορεία της δέσμης έχει για γωνία πρόσπτωσης 45 $^\circ$ ανακλαστικότητα 99% στο φασματικό εύρος 450 – 550 nm . Με αυτό το φασματικό εύρος διασφαλίζεται ότι θα ανακλαστεί το μεγαλύτερο ποσοστό του σήματος SHG προς τον PMT (14), ενώ η θεμελιώδης δέσμη θα περάσει χωρίς να ανακλαστεί. Έτσι, διαχωρίζεται αρχικά η προς μελέτη μη γραμμική δέσμη από τη δέσμη του LASER.

(12) *Short Pass filter*: Πριν το φωτοπολλαπλασιαστή (14) έχει τοποθετηθεί ένα φίλτρο, για να εξασφαλιστεί η μέγιστη αποκοπή της θεμελιώδους δέσμης. Συγκεκριμένα, ένα SPF- 900-1.00 CVI, που επιτρέπει τη διέλευση μηκών κύματος μικρότερων των 900nm.

(13) *Bandpass filter*: Επιπλέον ένα interference bandpass φίλτρο CVI-Laser F03-514.5-4-1.00, USA, αποκόβει το σήμα δεύτερης αρμονικής από πιθανό διφωτονικά διεγερόμενο φθορισμό από το δείγμα.

(14) *Φωτοπολλαπλασιαστής(PMT)*: Αφού η δέσμη περάσει από τα φίλτρα Short Pass (12) και bandpass(13) εισέρχεται στον φωτοπολλαπλασιαστή (PMT) Hamamatsu R636-10. Ο συγκεκριμένος PMT έχει μεγάλη απόδοση στο ορατό φάσμα και πολύ μικρή απόδοση για μήκη κύματος μεγαλύτερα από 800 nm . Κατά συνέπεια, ακόμα και αν η θεμελιώδης δέσμη καταφέρει να φτάσει στο PMT, δεν ανιχνεύεται. Ο PMT συνδέεται με τον υπολογιστή (15), όπου το ρεύμα που δημιουργείται στο PMT μετατρέπεται σε ένδειξη τάσης. Ο φωτοπολλαπλασιαστής είναι τοποθετημένος σε μικρομετρική βάση $x - y - z$ μετακίνησης (New Focus).

(15) *Υπολογιστής (PC)* : Σε αυτόν συνδέονται ο φωτοπολλαπλασιαστής (14), η βάση μετακίνησης $x-y-z$ (9), η κάμερα (18) και οι galvo-mirrors (5). Ο φωτοπολλαπλασιαστής (14) μέσω μιας πλατφόρμας επικοινωνίας παρέχει στο PC την εκάστοτε τιμή σε Volt , η οποία είναι ανάλογη του αριθμού των φωτονίων που έχει συλλέξει. Ένα λογισμικό γραμμένο σε Labview ρυθμίζει την κίνηση της βάσης στήριξης του δείγματος (9) στο επίπεδο $x-y$ αλλά και στην κατακόρυφο άξονα των z . Στη συνέχεια με τη βοήθεια των galvo-mirrors (5), οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με το

PC και ο χειρισμός τους γίνεται μέσω πάλι ενός λογισμικού που είναι γραμμένο σε Labview, γίνεται η σάρωση στο επίπεδο $x-y$ σε μια προεπιλεγμένη τιμή z , και για κάθε θέση $x - y$ αντιστοιχίζεται η τιμή που δίνει ο PMT(14). Τέλος με τη χρήση της κάμερας (18) που είναι συνδεδεμένη με το PC είναι δυνατή και η διαρκή παρατήρηση της περιοχής του δείγματος που προσπίπτει το LASER και η λήψη φωτογραφιών που μπορούν να αποθηκευτούν στο PC βοηθώντας για την καλύτερη ερμηνεία και επεξεργασία των δεδομένων της σάρωσης.

(16) *Μικροσκόπιο* : ειδικά διαμορφωμένο μικροσκόπιο (Nikon Eclipse ME600D)

(17) *Λάμπα μικροσκοπίου*: Ο απαιτούμενος φωτισμός για τη σωστή λειτουργία της CCD () παρέχεται από τη λυχνία πυρακτώσεως του μικροσκοπίου (Philips 100 Watt).

(18) *Κάμερα*: Η κάμερα της διάταξης είναι μία CCD Camera, PixeLink, η οποία συνδέεται με τον υπολογιστή (15) μέσω του ανάλογου hardware, για τη λήψη και αποθήκευση εικόνας με τη μεγέθυνση του αντικειμενικού φακού (8). Έτσι, παρέχεται η δυνατότητα παρακολούθησης και φωτογράφισης του συγκεκριμένου σημείου του δείγματος όπου παράγεται το μη γραμμικό σήμα.

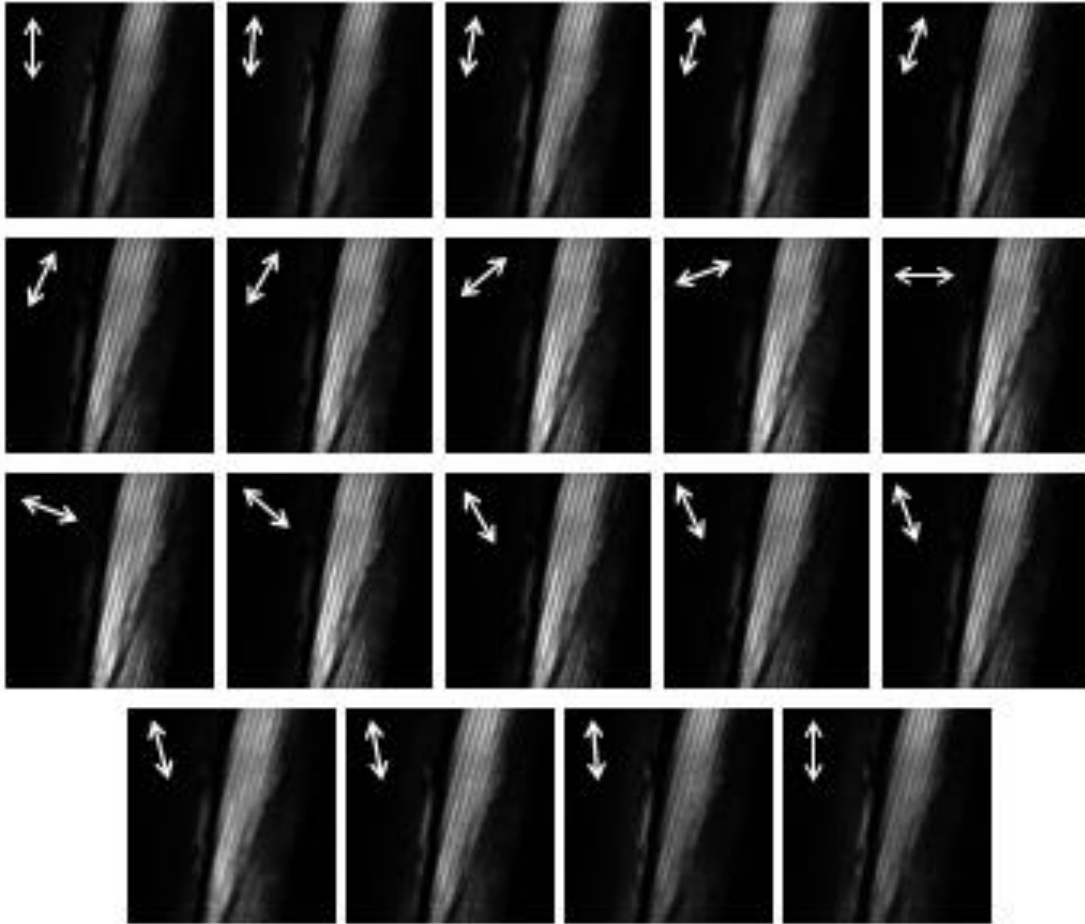
4.2 Πειραματική Διαδικασία

Η κύρια ιδέα του πειράματος είναι η ακτινοβολήση συγκεκριμένων περιοχών του βιολογικού δείγματος (body wall muscle), για πολλές διαφορετικές γωνίες πόλωσης της δέσμης του LASER (γωνία α υποκεφάλαιο 2.1), καταγράφοντας την ένταση της SHG για κάθε γωνία, προκειμένου να επαληθεύσουμε τη θεωρία που αναπτύχθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο.

Αρχικά μετρήσαμε την ελλειπτικότητα της πόλωσης του πεδίου διέγερσης (Laser) στο δείγμα. Τοποθετήσαμε έτσι έναν πολωτή στη θέση του δείγματος και στη συνέχεια ένα μετρητή έντασης H/M ακτινοβολίας (power meter). Στη συνέχεια στρέψαμε το πλακίδιο $\lambda/2$ ανά πέντε μοίρες μέχρι να κάνουμε μια πλήρη περιστροφή. Σε κάθε γωνία στρέψαμε τον πολωτή παράλληλα και κάθετα στην διεύθυνση πόλωσης της δέσμης και μετρούσαμε την ένταση. Βρήκαμε ελλειπτικότητα $\sim 8\%$, τιμή η οποία θεωρείται ικανοποιητική για τη συνέχεια των μετρήσεων. Λαμβάνοντας υπόψη πως μεταβάλλεται η γωνία α καθώς στρέφεται το πλακίδιο $\lambda/2$, το μόνο που μένει να γίνει είναι η σάρωση μιας περιοχής του δείγματος για τις γωνίες του πλακιδίου και η ταυτόχρονη καταγραφή της έντασης μέσω του PMT για κάθε σημείο στο δείγμα.

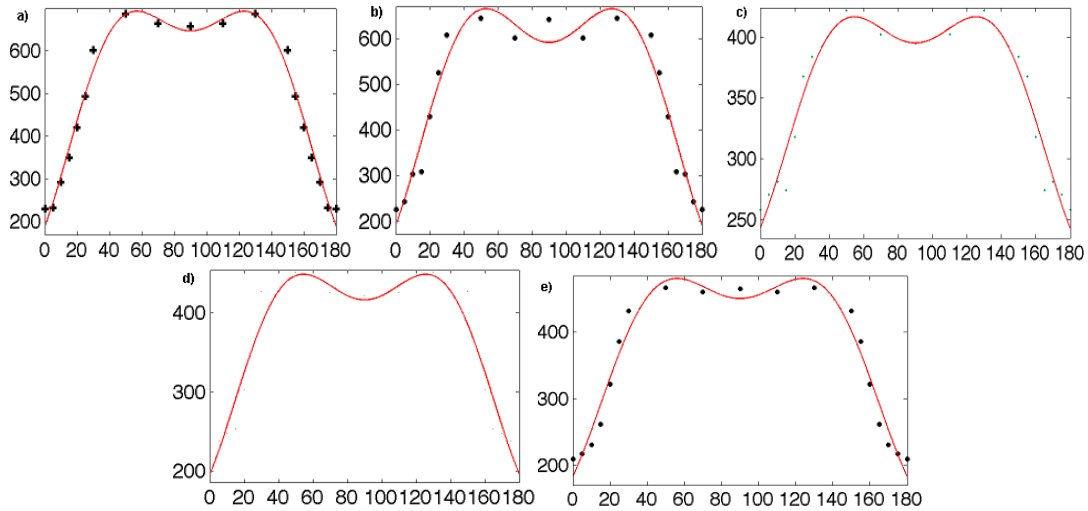
4.3 Παρουσίαση και Ανάλυση Πειραματικών Αποτελεσμάτων

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι διαδοχικές εικόνες που παίρναμε, από την ακτινοβολήση των body walls muscle του C.Elegans, καθώς στρέφαμε το πλακίδιο $\lambda/2$.



Εικόνα 2: Απεικόνιση σήματος SHG, από την ακτινοβολία *C.Elegans* body walls muscle, μέσω του προγράμματος ImageJ. Οι φωτεινές περιοχές αντιστοιχούν σε μεγάλες τιμές της έντασης, ενώ οι σκοτεινές σε μικρές. Το λευκό βελάκι είναι παράλληλο με το επίπεδο πόλωσης της δέσμης, δείχνοντάς μας πώς μεταβάλλεται η γωνία της πόλωσης καθώς στρέφουμε το πλακίδιο $\lambda/2$.

Κάθε επιμέρους εικόνα της Εικόνας 2 έχει προκύψει από την σύνθεση τριών. Οι λόγοι για αυτό ήταν οι εξής δύο: Πρώτον η ένταση του LASER, όπως αναφέρθηκε στην αρχή του κεφαλαίου, δεν ήταν συνεχώς σταθερή. Δεύτερον επειδή το βιολογικό δείγμα ήταν ζωντανό κάποιες φορές μετακινούνταν αλαφρά, για αυτό και μελετήθηκαν μικρές περιοχές στις μυϊκές ίνες και όχι σημεία. Η ένταση που παίρναμε για κάθε σημείο, καθώς στρέφονταν η πόλωση, ήταν ο μέσος όρος των εντάσεων σε αυτή την περιοχή. Παρακάτω παρουσιάζονται, τα διαγράμματα της έντασης συναρτήσει της γωνίας α , για κάθε περιοχή :



Εικόνα 3 : Διαγράμματα της έντασης SHG(κατακόρυφος άξονας μετρούμενος σε A.U.) συναρτήσει της γωνίας α(οριζόντιος άξονας μετρούμενος σε μοίρες), των 5 περιοχών που εξετάστηκαν. Οι κουκίδες αντιπροσωπεύουν τα data, ενώ η καμπύλη προκύπτει από το fitting των data στην θεωρητική καμπύλη που δίνεται από τη σχέση (15),υποκεφάλαιο 3.1. Το fitting των data έγινε με χρήση προγράμματος, που αναπτύχθηκε από τον Επιβλέπον αυτής της εργασίας Δρ.Σωτήρη Ψιλοδημητρακόπουλο, γραμμένο σε γλώσσα του λογισμικού MATLAB.

Ακόμα από το fit των δεδομένων στην Σχέση (15), υποκεφάλαιο 3.1, προκύπτουν οι τιμές για τον λόγο του $b=d_{33}/d_{15}$ και της γωνίας φ

Περιοχή	γωνία φ (σε μοίρες)	$\pm \Delta\varphi$ (σε μοίρες)	b	$\pm\Delta b$
a	0.0117	2.0626	0.3917	0.2160
b	0.0106	3.2085	0.4094	0.0329
c	0.0233	3.7242	0.7287	0.0342
d	0.0011	3.8961	0.5985	0.2010
e	0.0127	2.9794	0.0351	0.0053

Προκύπτει έτσι ένα μέσο b_m και ένα μέσο φ_m με τις παρακάτω τιμές

$$b_m=0.4326 \pm 0.2623 \tag{1}$$

$$\varphi_m=0.0119 \pm 0.0079 \tag{2}$$

Τα σφάλματα στις σχέσεις (1),(2) είναι τα S.E.M (Standard Error of the Mean) και υπολογίζεται από τον τύπο (3)

$$\Delta x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x)^2}{n}} \tag{3}$$

Όπου το Δx είναι το S.E.M της μετρούμενης μεταβλητής x , και το \bar{x} ο μέσος όρος της

Αντικαθιστώντας τώρα την τιμή του b_m στην σχέση (26),κεφάλαιο 3, έχουμε:

$$\frac{0.4326}{2+0.4326} = \cos^2(\theta_e) \Rightarrow \theta_e = 65.05^\circ \pm 0.12^\circ \quad (4)$$

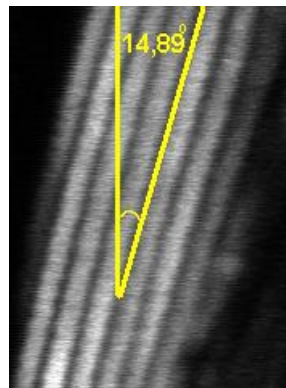
Το σφάλμα στην σχέση (4) προέρχεται από τη διαφορίση της σχέσης (26), κεφάλαιο 3, και στη συνέχεια την αντικατάσταση των τιμών : $b=0.4326, \theta=65.05$ και $db=0.2623$

$$(26) \Rightarrow -2 \cos(\theta) \sin(\theta) d\theta = \frac{2}{(2+b)^2} db \Rightarrow d\theta = 0.12^\circ \quad (5)$$

Συγκρίνοντας τώρα την τιμή της θ_e που μόλις υπολογίσαμε με την τιμή $\theta_x=68.6^\circ$, η οποία προέρχεται από πειράματα μεγάλης ακρίβειας περίθλασης ακτίνων-X[19] και μπορεί να υποθεθεί ότι είναι η θεωρητική, έχουμε την εξής ποσοστιαία διαφορά

$$\frac{\theta_x - \theta_e}{\theta_e} = 0.051 = 5.1\% \quad (6)$$

Τέλος όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4 το βιολογικό δείγμα είναι δεξιόστροφα στραμμένο, από τον κατακόρυφο άξονα της εικόνας, κατά 14.89 μοίρες. Αυτή η γωνία αντιστοιχεί κανονικά στη γωνία ϕ . Όμως η γωνία ϕ που προκύπτει από τα πειραματικά μας δεδομένα είναι 0.0119 ± 0.0079 μοίρες. Αυτή η διαφορά προέρχεται από την δομή των μυϊκών ινών. Όπως είχε επισημανθεί και φαίνεται στην Εικόνα 2(B), υποκεφάλαιο 3.2, τα thick filaments, τα οποία είναι υπεύθυνα για το παραγόμενο σήμα της SHG, σχηματίζουν δεξιόστροφη γωνία 5-7 μοιρών σε σχέση με τη μυϊκή ίνα. Αφαιρώντας έτσι την συνεισφορά αυτής της γωνίας, βλέπουμε ότι η γωνία ϕ_e της εικόνας διαφέρει τελικά ελάχιστα από την ϕ_m και βρίσκεται μέσα στα όρια πειραματικών λαθών κατά τη βαθμονόμηση.



Εικόνα 4 : Απεικόνιση της γωνίας που σχηματίζει ο κατακόρυφος άξονας της εικόνας, με τις μυϊκές ίνες του *C.Elegans*. Ο κατακόρυφος άξονας είναι παράλληλος με τον άξονα X του εργαστηρίου, ενώ οι μυϊκές ίνες παράλληλες με τον άξονα x του συστήματος συντεταγμένων του δείγματος. Έτσι η γωνία, που σχηματίζουν αυτοί οι δύο άξονες ισούται με την ϕ .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Συμπεράσματα και Μελλοντικοί Στόχοι

5.1 Συμπεράσματα

Μελετώντας τα διαγράμματα της Εικόνας 3, του προηγούμενου κεφαλαίου, τα οποία έδωσαν $\theta_e=65.05^\circ$ και συγκρίνοντάς τα με τα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας [19] μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα πειραματικά μας δεδομένα και η ανάλυση των δεδομένων ήταν επιτυχή. Το μακροσκοπικό μοντέλο που παρουσιάστηκε στο Κεφάλαιο 3, προσεγγίζει την πραγματικότητα σε πολύ μεγάλο βαθμό. Επαληθεύεται δηλαδή, ότι τα στοιχεία του τανυστή $\chi^{(2)}$ δεν εξαρτώνται από την συχνότητα ακτινοβολίας, όταν αυτή είναι πολύ μικρότερη από την ιδιοσυχνότητα του μέσου. Επαληθεύεται ακόμα, ότι τα γιγαντο-μόρια που παράγουν σήμα SHG, τα thick filaments, είναι διατεταγμένα με εξαγωνική, ή προσεγγιστικά κυλινδρική, συμμετρία. Οι πολύ μικρότερες σε πάχος σκοτεινές περιοχές, αντιστοιχούν στις (I)-bands που αποτελούνται από thin filaments ακτίνης. Έτσι, και η μικροσκοπική προσέγγιση έρχεται σε μεγάλη συμφωνία με την παρατήρηση. Η απόκλιση της γωνίας θ_e , κατά μόνο 5,1% από θεωρητική τιμή θ_x , μας επιτρέπει να θεωρήσουμε σωστή την υπόθεση που κάναμε, ότι δηλαδή τα μόρια (μυοσίνη), που αποτελούν τα γιγαντο-μόρια (thick filaments), χαρακτηρίζονται από αξονική υπερπολωσιμότητα σταθερής γωνίας σε σχέση με τον άξονα του γιγαντο-μορίου. Επιπλέον, μέσω της θεωρίας της PSHG μπορέσαμε να παρατηρήσουμε και να ποσοτικοποιήσουμε ακόμα ένα χαρακτηριστικό του βιολογικού δείγματος, την γωνία που σχηματίζουν τα thick filaments σε σχέση με τις μυϊκές ίνες. Ο συνδυασμός όλων των παραπάνω μας επιτρέπει να πούμε ότι, το μοντέλο της PSHG που παρουσιάστηκε σε αυτή την εργασία αναπαράγει με επιτυχία τις προηγούμενες παρατηρήσεις στους μύες των C.Elegans, οι οποίες έγιναν με άλλες πειραματικές τεχνικές. Επιπλέον επαληθεύεται ότι η μη γραμμική μικροσκοπία PSHG πέρα από τα πλεονεκτήματα και των υπολοίπων μη γραμμικών μικροσκοπιών, όπως η λήψη τρισδιάστατων εικόνων υψηλής ευκρίνειας in-vivo, είναι ικανή να χαρακτηρίζει ποσοτικά τα στοιχεία που αποτελούν το υπό παρατήρηση βιολογικό δείγμα.

5.2 Μελλοντικοί Στόχοι

Ο κύριος βραχυπρόθεσμος στόχος είναι η αυτοματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας. Είδαμε πως για να πάρουμε μετρήσεις της έντασης I της SHG συναρτήσει της γωνίας α , έπρεπε να στρέφουμε κάθε φορά το πλακίδιο $\lambda/2$ κατά 5 μοίρες. Ωστόσο ετοιμάζεται ένα project στο τμήμα I.E.S.L. του I.T.E. , υπεύθυνος του οποίου είναι ο Δρ.Σωτήρης Ψιλοδημητρακόπουλος, στο οποίο θα μπορεί να γίνεται απευθείας ακριβής υπολογισμός των παραμέτρων b, ϕ , κατά τη διάρκεια σάρωσης του δείγματος, χωρίς να χρειάζεται να στρέφεται η πόλωση της δέσμης. Ένας ακόμα τομέας της τομέας της PSHG, που γίνεται μεγάλη έρευνα, είναι μελέτη παθολογικών κυττάρων με σκοπό τη ανάπτυξη μιας νέας διαγνωστικής μεθόδου. Πιο συγκεκριμένα

οι μελέτες αποσκοπούν στην εύρεση κάποιων ιδιοτήτων των παθολογικών κυττάρων, ικανές να παρατηρηθούν μέσω της PSHG, οι οποίες θα διαφέρουν σε σχέση με των υγιών. Κάτι τέτοιο θα είχε σαν αποτέλεσμα τον προσδιορισμό της χωρικής και ποσοτικής κατανομής των παθολογικών κυτταρικών μυών. Η γνώση αυτή, δίνει την δυνατότητα για την ακριβή διάγνωση του σταδίου της συγκεκριμένης ασθένειας. Είναι αξιοσημείωτο ότι ακόμα και σήμερα, πολλές διαγνώσεις βασίζονται απλά και μόνο στην εμπειρογνωσία κάποιου ειδικού πάνω σε θέματα απεικόνισης, χωρίς σχεδόν καμία ποσοτική ανάλυση. Τέλος είναι φανερό πως, η εφαρμογή της παραπάνω μεθόδου στην πρόωρη διάγνωση κάποιου σταδίου του καρκίνου, θα ήταν παγκόσμιας σπουδαιότητας, αφού θα ήταν ικανή να δώσει μεγάλης ακρίβειας διαγνώσεις σε ελάχιστο χρόνο.

Βιβλιογραφία

- 1) R.W. Boyd, "The Nonlinear Optical Susceptibility", University of Rochester, New York (U.S.A.), (2003)
- 2) S.PSILODIMITRAKOPOULOS, "POLARIZATION SECOND HARMONIC IMAGING OF BIOLOGICAL SAMPLES", PhD Thesis, ICFO-THE INSTITUTE OF PHOTONIC SCIENCES, BARCELONA (2012)
- 3) S.PSILODIMITRAKOPOULOS, "ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΑΡΜΟΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΔΙΦΩΤΟΝΙΚΑ ΔΙΕΓΕΙΡΟΜΕΝΟΥ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΔΟΜΩΝ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ", ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΕΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ», ΑΘΗΝΑ (2005)
- 4) G.J. Tservelakis, "Non Linear Microscopy", ELMO notes, IESL/FORTH, 2010.
- 5) <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/musclesomatic/MusSomaticframeset.html>
- 6) Φωτεινή Ζαχαροπούλου, "Απεικόνιση του νηματώδους C.Elegans σε μικροσκοπικό επίπεδο με χρήση μη γραμμικών φαινομένων", Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Κρήτης-Τμήμα Φυσικής, (2004).
- 7) S. V. Plotnikov, A. C. Millard, P. J. Campagnola and W. A. Mohler, "Characterization of the myosin-based source for second harmonic generation from muscle sarcomeres," *Biophys.J.*, **90**, 328, (2006).
- 8) A. Leray, L. Leroy, Y. Le Greand, C. Odin, A. Renault, V. Vie, D. Ronede, T. Mallegal, O. Mongin, M. H. V. Werts and M. Blanchard-Desce, "Organization and Orientation of Amphiphilic Push-Pull Chromophores Deposited in Langmuir-Blodgett Monolayers Studied by Second Harmonic Generation and Atomic Force Microscopy", *Langmuir*, **20** (2004)
- 9) M. A. Mycek and B. W. Pogue, "Handbook of Biomedical Fluorescence", Marcel Dekker, (2003).
- 10) Michael Perry, "High-Order Multiphoton Ionization of the Noble Gases", Ph.D Thesis, Lawrence Livermore National Laboratory-University of California, (1987).
- 11) Y. Guo, P.P. Ho, H. Savage, D. Harris, P. Sacks, S. Schantz, F. Liu, N. Zhadin and R.R. Alfano, "Second-harmonic tomography of tissues", *Optics Letters*, **22**, 1323 (1997).

- 12) Y. Guo, P.P. Ho, A. Tirkliunas, F. Liu and R.R. Alfano, "Optical harmonic generation from animal tissues by the use of picosecond and femtosecond laser pulses", *Applied Optics*, **35**, 6810 (1996).
- 13) Τραχανάς Σ. Κβαντομηχανική Ι. Ηράκλειο Κρήτης: ΠΕΚ, 2005
- 14) L. Moreaux, O. Sandre and J. Mertz, "Membrane imaging by second-harmonic generation microscopy", *J. Opt. Soc. Am. B*, **17**, 1685, (2000).
- 15) J. I. Dadap, Shan, K. B. Eisenthal and T. F. Heinz, "Second-harmonic Rayleigh scattering from a sphere of centrosymmetric material", *Phys. Rev. Lett.*, **83**, 4045, (1999).
- 16) S. W. Chu, S.Y. Chen, G. W. Chern, T. H. Tsai, Y. C. Chen, B. L. Lin and C. K. Sun, "Studies of $\chi(2)/\chi(3)$ Tensors in Submicron-Scaled Bio-Tissues by polarization harmonic optical microscopy," *Biophys.J.*, **86**, 3914, (2004).
- 17) Y. Chang, C. Chen, J. Chen, Y. Jin and X. Deng "Theoretical simulation study of linearly polarized light on microscopic second-harmonic in collagen type I," *J. Biomed. Opt.*, **14**, 044016, (2009)
- 18) F. Ghebremichael, M. G. Kuzyk, and H. S. Lackritz, "Nonlinear Optics and Polymer Physics," in *Progress in Polymer Science*, Ed. O. Vogl, Pergamon Publication, **22**(6), 1147, (1997).
- 19) F. Tiaho, G. Recher and D. Rouede, "Estimation of helical angles of myosin and collagen by second harmonic generation imaging microscopy," *Opt. Express*, **15**, 12286, (2007).
- 20) J.E. Sulston, E. Schierenberg, J.G. White, J.N. Thomson, "The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*", *Dev. Biol.*, **100**, 64–119, (1983).
- 21) A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. Mello, "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*", *Nature*, **391**, 806–811, (1998).
- 22) C.C. Mello, J.M. Kramer, D. Stinchcomb, V. Ambros, "Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences", *EMBO J.*, **10**, 3959–3970, (1991).
- 23) H. Kagawa, T. Takaya, R. Ruksana, F. Anokye-Danso, Md. Z. Amin and H. Terami, "C. Elegans Model for Studying Tropomyosin and Troponin Regulations of Muscle Contraction and Animal Behavior," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **592**, 153–161, (2007).