



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΣΙΚΗΣ

ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ (ΙΤΕ)
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ LASER



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη δομικών αλλαγών λόγω γήρανσης στους ραβδωτούς μυς του μοντέλου οργανισμού *Caenorhabditis elegans* μέσω μετρήσεων δεύτερης αρμονικής ευαίσθητης στην πόλωση (PSHG).

Κωνσταντίνα Γιουρούκου

**Επιβλέποντες : Καθ. Δημήτριος Χαραλαμπίδης
Δρ. Γιώργος Φιλιππίδης**

Υπεύθυνος Εργασίας : Βασίλης Τσαφάς



UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF PHYSICS

**FOUNDATION FOR RESEARCH AND
TECHNOLOGY HELLAS (FORTH)**
**INSTITUTE OF ELECTRONIC STRUCTURE AND
LASER (IESL)**



BACHELOR THESIS

**Monitoring structural modifications in striated muscles of
Caenorhabditis elegans samples, due to aging, via PSHG
measurements.**

Konstantina Giouroukou

Supervisors: Prof. Dimitrios Charalambidis

Dr. George Filippidis

Advisor: Vasilis Tsafas

Heraklion 2021

“ There is a crack in everything
That's how the light gets in”.

Leonard Cohen, Selected Poems, 1956-1968

- Περίληψη -

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των αλλαγών λόγω γήρανσης των μορίων μυοσίνης με χρήση μικροσκοπίας δευτέρης αρμονικής με ευαισθησία στην πόλωση (PSHG). Η μικροσκοπία δευτέρης αρμονικής (SHG) καθίσταται κατάλληλη τεχνική για την απεικόνιση *in vivo* βιολογικών δειγμάτων αφού είναι αποτέλεσμα μη γραμμικής σκέδασης, ελαχιστοποιώντας έτσι το φαινόμενο φωτοτοξικότητας στο υπό εξέταση δείγμα. Στα πλεονεκτήματα της τεχνικής συμπεριλαμβάνεται η καλή διακριτική ικανότητα (περίπου 0.5 μ m), το μεγάλο βάθος διείδυσης της δέσμης στον ιστό (έως και 500 μ m) και η δυνατότητα 3D χωρικής ανάλυσης χωρίς την χρήση χρωστικών (label free). Η εξάρτηση του σήματος της μικροσκοπίας SHG από την πόλωση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας έχει ως αποτέλεσμα την απόκτηση σημαντικών ποσοτικών πληροφοριών από τα υπό μελέτη δείγματα. Στην περίπτωση μας, οι πληροφορίες αυτές συνέβαλαν στην μελέτη και καταγραφή δομικών τροποποιήσεων που υφίστανται τα μόρια μυοσίνης λόγω γήρανσης.

Το βιολογικό δείγμα που μελετήθηκε ήταν το μοντέλο οργανισμός *Caenorhabditis elegans* (*C. Elegans*) και πιο συγκεκριμένα ακτινοβολήθηκε η περιοχή στην οποία βρίσκονται οι ραβδωτοί μυς του σκουληκιού. Σύμφωνα με παλιότερες μελέτες, η ένταση της SHG περιγραφόταν από ένα μαθηματικό μοντέλο το οποίο στηριζόταν στην κυλινδρική συμμετρία που εμφανίζουν τα επιμέρους μόρια μυοσίνης με τον κύριο άξονα συμμετρίας της μυϊκής ίνας. Σε αυτήν την εργασία, η ανάλυση του σήματος της SHG συναρτήσκει της πόλωσης με την χρήση FFT (Fast Fourier Transform) αλγορίθμου ανέδειξε πως τα μόρια μυοσίνης περιγράφονται καλύτερα από ένα πιο γενικό μαθηματικό μοντέλο. Πιο συγκεκριμένα, τα γηραιότερα δείγματα έδειξαν να έχουν μεγαλύτερη “ανάγκη” να περιγραφούν από το γενικό μοντέλο σε σχέση με τα νεότερα. Αυτό υποδηλώνει ότι η δομή των μορίων μυοσίνης αλλάζει με το πέρασμα των χρόνων. Τα αποτελέσματά μας είναι ενθαρρυντικά για περαιτέρω μελέτη, εξετάζοντας και άλλες συμμετρίες που θα μπορούσαν να ταιριάζουν στο βιολογικό μας μοντέλο και να δώσουν επιπλέον πληροφορίες για τις δομικές αλλαγές των μορίων μυοσίνης λόγω γήρανσης. Μελλοντικός μας στόχος είναι η χρήση της μικροσκοπίας PSHG για την μελέτη μυϊκών ασθενειών, εξετάζοντας αλλαγές στην δομή των μορίων μυοσίνης που συσχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου.

- Abstract -

The target of this thesis is to investigate myosin structural modifications due to aging through Polarization sensitive Second Harmonic Generation (PSHG) imaging microscopy measurements. Second Harmonic Generation (SHG) is a non-linear scattering phenomenon, which means that the energy isn't absorbed from the sample making this imaging technique ideal for in-vivo observation in biological samples. Advantages of SHG include the high resolution (approximately $0.5\mu\text{m}$) which gives the ability for observation at a cellular level, the increased penetration depth of the beam into the tissue (up to $500\mu\text{m}$), and the capability for 3D spatial analysis. Also, SHG records label-free images minimizing photobleaching and phototoxicity effects on the biological specimens. Exploiting the sensitivity of SHG signal to the polarization of the incident radiation wave, we extract significant quantitative information from the samples. In our study, this information is contributed to the investigation and monitoring of structural changes that occur in myosin molecules due to aging.

The biological samples that we used in this survey were the model organisms *Caenorhabditis Elegans* (*C. Elegans*). We focused on the part of the worm where the striated muscles are located. According to previous studies, the intensity of SHG was described by a mathematical model which was based on the cylindrical symmetry that the myosin molecules are formulated with the major symmetry axis of the muscle fiber. In this project, the use of FFT (Fast Fourier Transform) algorithm for the SHG signal analysis shows that the myosin molecules are better described from a general mathematical model. Our experimental results demonstrate that the older biological samples present an increased need to be described from the general mathematical model than the younger ones. This fact indicates that the myosin molecules' structure is changed over time. These results are encouraging for a further study in which more symmetries that could be fit in our biological model will be examined, providing extra information about the myosin structure alterations due to aging. Our future goal is the application of PSHG microscopy for the investigation of muscle diseases, studying changes in the structure of myosin molecules during the disease progression.

Περιεχόμενα

Περίληψη	i
Abstract	ii
Περιεχόμενα.....	iii
Ευχαριστίες	iv
Εισαγωγή	v
Κεφάλαιο 1 : Θεωρητικό Υπόβαθρο	
1.1 Γενικά Περί Φωτός	1
1.2 Γραμμική Οπτική	1
1.2.1 Αλληλεπίδραση Φωτός- Ύλης	2
1.2.2 Μονοφωτονικά Διεγειρόμενος Φθορισμός	2
1.2.3 Φαινόμενο Σκέδασης	4
1.3 Μη Γραμμική Οπτική (NLOM).....	5
1.3.1 Διφωτονικά Διεγειρόμενος Φθορισμός (TPEF).....	5
1.3.2 Ποιοτική Προσέγγιση SHG.....	7
1.4 Παραγωγή SHG	8
1.4.1 Μη Γραμμική Πόλωση Υλικού.....	8
1.4.2 Μη Γραμμικό Ατομικό Μοντέλο Lorentz.....	9
1.4.3 Phase Matching	14
1.5 Πλεονεκτήματα Μη Γραμμικής Μικροσκοπίας.....	18
1.6 Παραγωγή Δεύτερης Αρμονικής Εξαρτώμενη από την Πόλωση (PSHG).....	20
Κεφάλαιο 2 : Βιολογικό Δείγμα	
2.1 Βιολογικό Δείγμα: Caenorhabditis elegans.....	23
2.2 Ανατομία Ραβδωτών Μυών C.elegans	24
2.3 Μυοσίνη και Γήρανση	26
2.4 Προετοιμασία Δείγματος.....	27
Κεφάλαιο 3 : Πειραματική Διάταξη και Διαδικασία	
3.1 Πειραματική Διάταξη.....	28
3.2 Πειραματική Διαδικασία.....	30
3.3 Θόρυβος Υποβάθρου και Απομόνωση Σήματος	32
Κεφάλαιο 4 : Ανάλυση Πειραματικών Δεδομένων και Παρουσίαση Αποτελεσμάτων	
4.1 Ανάλυση Πειραματικών Δεδομένων	33
4.2 Πειραματικά Αποτελέσματα	39
Κεφάλαιο 5 : Σύνοψη Αποτελεσμάτων και Μελλοντικοί Στόχοι	
5.1 Σύνοψη Αποτελεσμάτων.....	42
5.2 Μελλοντικοί Στόχοι.....	43
Βιβλιογραφία.....	44

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ (IESL) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) στο Εργαστήριο Μη-Γραμμικής Μικροσκοπίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Χαραλαμπίδη που δέχτηκε να είναι ο επιβλέπων καθηγητής μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Δρ. Γιώργο Φιλιππίδη που πέρα από την εμπιστοσύνη του, μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετέχω σε ένα ερευνητικό εργαστήριο υπό πραγματικές συνθήκες εργασίας και να ανακαλύψω την “μαγεία” της πειραματικής φυσικής. Η εργασία αυτή δεν θα μπορούσε να είχε επιτευχθεί χωρίς την πολύτιμη βοήθεια, την υποστήριξη και την άψογη συνεργασία με τον κ. Βασίλη Τσαφά. Η παρούσα πτυχιακή εργασία βασίστηκε στην διδακτορική διατριβή του κ. Τσαφά, ο οποίος με την επιστημονική κατάρτιση που διαθέτει με βοήθησε στην κατανόηση φυσικών φαινομένων που διέπουν την μικροσκοπία PSHG, στην εξοικείωση μου με τον πειραματικό εξοπλισμό και στην ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων. Νιώθω πραγματικά ευγνώμων για την δυνατότητα που μου δόθηκε να συμμετέχω σε ένα ερευνητικό εργαστήριο και μέσα από ένα περιβάλλον εξαιρετικής συνεργασίας να αποκτήσω γνώσεις και εμπειρίες που θα αποτελέσουν εφόδια για την μετέπειτα πορεία μου στην επιστήμη της φυσικής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την οικογένειά μου για την στήριξη τους στην προσπάθειά μου όλα αυτά τα χρόνια. Τους φίλους μου που μοιραζόμαστε τις ίδιες ανησυχίες και τον Στέλιο με την Εύα που με έμαθαν να μην παραιτούμαι, να θέτω στόχους και να τους βγάζω εις πέρας.

- Εισαγωγή -

Οι ραγδαίες εξελίξεις στον τομέα της κυτταρικής και της μοριακής βιολογίας κρίνουν αναγκαία την *in vivo* παρατήρηση βιολογικών δομών. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, την τελευταία δεκαετία έχουν βελτιωθεί και έχουν ανακαλυφθεί νέες τεχνικές απεικόνισης. Κάθε απεικονιστική τεχνική έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της ανάλογα την εφαρμογή της. Για παράδειγμα, η μικροσκοπία μονοφωτονικού φθορισμού (OPEF) είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική γραμμικής οπτικής μικροσκοπίας που χρησιμοποιείται για την παρατήρηση υποκυτταρικών δομών. Εξέλιξη της OPEF αποτελεί η συνεστιακή μικροσκοπία (confocal) η οποία δίνει την δυνατότητα τρισδιάστατης χωρικής (3D) ανάλυσης του δείγματος. Όμως, με τις παραπάνω τεχνικές δεν μπορεί να επιτευχθεί εις βάθος διεισδυση της δέσμης στο ιστό (συνήθως μικρότερη από 200 μm) και είναι έντονο το φαινόμενο φωτοτοξικότητας, το οποίο θα πρέπει να αποφεύγεται στην περίπτωση *in vivo* απεικόνισης. Λύση σε αυτά τα προβλήματα φαίνεται να δίνουν οι πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα της μη γραμμικής οπτικής, αποκαλύπτοντας νέες τεχνικές μικροσκοπίας που κρίνονται καταλληλότερες για την απεικόνιση βιολογικών δομών. Οι πιο διαδεδομένες τεχνικές είναι η μικροσκοπία διφωτονικού φθορισμού (TPEF) και η μικροσκοπία παραγωγής δεύτερης (SHG) και τρίτης (THG) αρμονικής. Η μη γραμμική οπτική μικροσκοπία υπερέχει έναντι της γραμμικής οπτικής λόγω της ικανότητά της να διεισδύει βαθύτερα στον ιστό, αποφεύγοντας φαινόμενα φωτοτοξικότητας και παρέχοντας την δυνατότητα 3D χωρικής ανάλυσης χωρίς την χρήση χρωστικών (label free). Στην ανάδειξη και την εφαρμογή της μη γραμμικής μικροσκοπίας συνέβαλαν τα LASER υπέρ-βραχέων παλμών στην υπέρυθη (IR) περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, παράγοντας τις απαραίτητες μεγάλες εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου με μικρή χρονική διάρκεια παλμού. Επιπλέον η εκπομπή στην περιοχή του κοντινού υπέρυθρου, εκεί όπου βρίσκεται το οπτικό παράθυρο για τον ιστό, επιτρέπει την απόκτηση πληροφορίας από βαθύτερα στρώματα του βιολογικού δείγματος λόγω μειωμένης απορρόφησης και σκέδασης.

Σε αυτήν την εργασία χρησιμοποιήθηκε μη γραμμική μικροσκοπία δεύτερης αρμονικής με ευαισθησία στην πόλωση (PSHG) με σκοπό να απεικονιστούν μυϊκές ίνες και να μελετηθούν οι αλλαγές που εμφανίζονται στην δομή των μορίων μυοσίνης με την γήρανση. Στο κεφάλαιο 1 παρατίθεται το θεωρητικό υπόβαθρο που απαιτείται για την κατανόηση βασικών γραμμικών και μη γραμμικών οπτικών φαινομένων, ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην παραγωγή δεύτερης αρμονικής και της PSHG, καθώς και στις συνθήκες που πρέπει να πληρούν τα μόρια για να παραχθεί ικανοποιητικό σήμα SHG. Στο κεφάλαιο 2 παρουσιάζεται ο βιολογικός οργανισμός *C.elegans*. Δίνονται πληροφορίες για την δομή των μυών του και των μορίων μυοσίνης που αποτελούν το αντικείμενο μελέτης μας. Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την διεκπεραίωση των πειραμάτων μας και η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την λήψη μετρήσεων περιλαμβάνονται στο κεφάλαιο 3. Η ανάλυση των πειραματικών δεδομένων και τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την έρευνα μας παρατίθενται στο κεφάλαιο 4. Τέλος, στο κεφάλαιο 5 γίνεται μια μικρή σύνοψη της εργασίας και αναφέρονται οι μελλοντικοί μας στόχοι.

Κεφάλαιο 1

Στο κεφάλαιο αυτό θα παρουσιαστεί το βασικό θεωρητικό υπόβαθρο που απαιτείται για την κατανόηση των μη γραμμικών φαινομένων και της παραγωγής δευτέρης αρμονικής συχνότητας (SHG).

1.1 Γενικά περί Φύσης Φωτός

Ο κυματοσωματιδιακός δυϊσμός της ύλης είναι το κυριότερο χαρακτηριστικό της κβαντικής θεωρίας και μια ειδοποιός διαφορά της σε σχέση με την κλασική θεωρία. Συνίσταται στο γεγονός ότι όλα τα φυσικά σωματίδια παρουσιάζουν και κυματική συμπεριφορά παράλληλα με την σωματιδιακή, όχι όμως ταυτόχρονα [1]. Οι σχέσεις που συνδέουν τα σωματιδιακά χαρακτηριστικά της ενέργειας E και της ορμής p με τα κυματικά χαρακτηριστικά της συχνότητας f και του μήκους κύματος λ είναι οι :

$$f = \frac{E}{h} \quad \lambda = \frac{h}{p} \quad [1.1]$$

όπου $h=6.626 \cdot 10^{-34}$ (J*s) η σταθερά Planck. Η αρχή του κυματοσωματιδιακού δυϊσμού σε συνδυασμό με πειραματικές μελέτες αποκάλυψαν την διπλή φύση του φωτός.

Το φως ως μια μορφή ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας εκπέμπεται σε διακριτές ποσότητες (κβάντα) που ονομάζονται φωτόνια, το καθένα από τα οποία μπορεί να θεωρηθεί ως σωματίδιο αλλά και ως κύμα που διαδίδεται στον χώρο. Σε φαινόμενα όπως η συμβολή, η περίθλαση και η πόλωση εκδηλώνεται η κυματική φύση του φωτός, ενώ σε φαινόμενα που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση του φωτός με την ύλη (σκέδαση, απορρόφηση) εκδηλώνεται η σωματιδιακή του φύση. Οι δύο φύσεις του φωτός είναι συμπληρωματικές και η μια δεν αναιρεί την ύπαρξη της άλλης.

1.2 Γραμμική Οπτική

Η γραμμική οπτική αποτελεί την βάση όλων των οπτικών διεργασιών, η κατανόηση των οποίων είναι απαραίτητη για την εν συνεχεία μελέτη μας στην μη γραμμική οπτική. Σε αυτήν την υποενότητα θα παρουσιαστούν τα βασικά γραμμικά οπτικά φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα κατά την αλληλεπίδραση φωτός-ύλης. Θα επικεντρωθούμε στην διέγερση ηλεκτρονίων παρουσιάζοντας το φαινόμενο μονοφωτονικού φθορισμού και το φαινόμενο σκέδασης.

1.2.1 Αλληλεπίδραση Φωτός - Ύλης

Όταν ένα φωτόνιο συγκεκριμένης ενέργειας πέφτει στην ύλη, αλληλεπιδρά με αυτήν και υπάρχει πιθανότητα να σκεδαστεί, να απορροφηθεί, να ανακλαστεί ή να διαδοθεί. Το αποτέλεσμα των πιθανοτήτων ορίζεται από την ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου και από την ενεργειακή κατάσταση του υλικού. Ηλεκτρομαγνητικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν για διαφορετικές κλίμακες της ύλης. Ανάλογα το ενεργειακό επίπεδο, τα κβάντα φωτός μπορούν να διεγείρουν :

- άτομα και μόρια ενώσεων
- ηλεκτρόνια ατόμων
- νουκλεόνια πυρήνα

Για την πραγματοποίηση αυτών των διεγέρσεων, τα προσπίπτοντα φωτόνια θα πρέπει να έχουν ενέργεια:

- 10^{-3} με 10^{-2} eV για θερμική διέγερση ατόμων και μορίων
- μερικά eV για διέγερση ηλεκτρονίων
- μερικά GeV για πυρηνική διέγερση

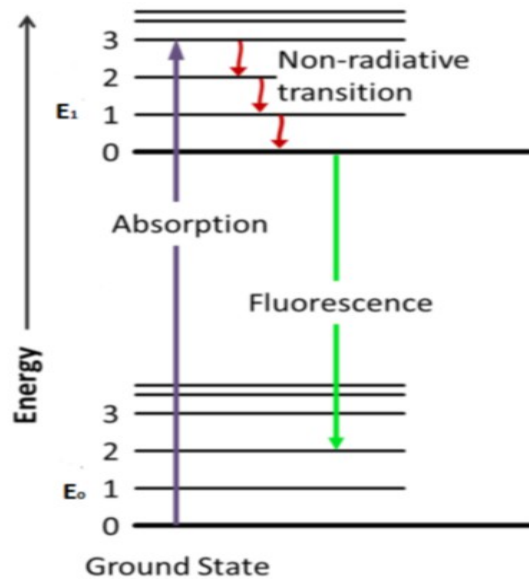
Η μελέτη μας επικεντρώνεται στην διέγερση ηλεκτρονίων. Συγκρίνοντας την ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου με την ενέργεια του ηλεκτρονίου στο άτομο διακρίνουμε τρεις διαδικασίες διέγερσης [2]. Έτσι αν E_γ είναι η ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου και ΔE τα ενεργειακά χάσματα των ατόμων/μορίων τότε έχουμε τις ακόλουθες περιπτώσεις διέγερσης:

- $E_\gamma > \Delta E$ φαινόμενο φθορισμού
- $E_\gamma < \Delta E$ φαινόμενο σκέδασης
- $E_\gamma = \Delta E$ συντονισμένη απορρόφηση

1.2.2 Μονοφωτονικά Διεγυρόμενος Φθορισμός

Έστω ότι ένα ηλεκτρόνιο βρίσκεται στην χαμηλότερη δονητική στάθμη της θεμελιώδους ενεργειακής κατάστασης E_0 (ground state) ενός μορίου. Το φαινόμενο φθορισμού προϋποθέτει $E_\gamma > \Delta E$, έτσι κατά την απορρόφηση φωτονίου ενέργειας E_γ (μια διαδικασία που διαρκεί $\sim 10^{-15}$ s) διεγείρεται ένα ηλεκτρόνιο από την ground state του μορίου σε μια δονητική κατάσταση της πρώτης διεγερμένης E_1 . Όλα όμως τα φυσικά συστήματα τείνουν να επανέλθουν σε συνθήκες χαμηλότερης ενέργειας, έτσι ένα μέρος της ενέργειας του ηλεκτρονίου μετατρέπεται σε θερμότητα λόγω μη ακτινοβολητικών διεργασιών και αποδιεγείρεται σε χαμηλότερη δονητική κατάσταση της E_1 . Το ηλεκτρόνιο παραμένει στην E_1 για ~ 10 ns και από εκεί αποδιεγείρεται πίσω στην ground state εκπέμποντας ένα φωτόνιο ενέργειας μικρότερης της αρχικής [3,4]. Η παραπάνω διαδικασία απεικονίζεται στην Εικόνα 1.1.

Κεφάλαιο 1 : Θεωρητικό Υπόβαθρο



Εικόνα 1.1 Διάγραμμα μονοφωτονικά διεγερμένου φθορισμού Jablonski : Με έντονες μαύρες γραμμές συμβολίζονται η θεμελιώδης E_0 και η πρώτη διεγερμένη E_1 ενεργειακή κατάσταση του μορίου. Με λεπτές μαύρες γραμμές συμβολίζονται οι δονητικές καταστάσεις κάθε στάθμης. Η απορρόφηση ενός φωτονίου από το μόριο οδηγεί κατά την αποδιέγερση του σε εκπομπή ενός φωτονίου με μήκος κύματος λ μεγαλύτερο από το αρχικό.

Παρατηρούμε ότι η ενέργεια του εκπεμπόμενου φωτονίου είναι μικρότερη από την ενέργεια του προσπίπτοντος. Δεδομένου ότι το εκπεμπόμενο φωτόνιο έχει μικρότερη ενέργεια, θα έχει μήκος κύματος μεγαλύτερο από το απορροφούμενο φωτόνιο. Η διαφορά στο μήκος κύματος μεταξύ του απορροφούμενου και του εκπεμπόμενου φωτός ονομάζεται μετατόπιση Stokes [4], συνήθως οφείλεται στις πλεγματικές ταλαντώσεις (φωνόνια) [5] και στο γεγονός ότι μέρος της ενέργειας του απορροφούμενου φωτονίου θα μετατραπεί σε θερμότητα ή κινητική ενέργεια του συστήματος. Η μετατόπιση Stokes διευκολύνει τον διαχωρισμό του σήματος φθορισμού από την ακτινοβολία διέγερσης.

Ο μονοφωτονικός φθορισμός χαρακτηρίζεται ως γραμμικό φαινόμενο καθώς ο ρυθμός απορρόφησης φωτονίων W_1 (photons/sec) εξαρτάται γραμμικά από την ένταση της ακτινοβολίας διέγερσης I (photons/sec/cm²) :

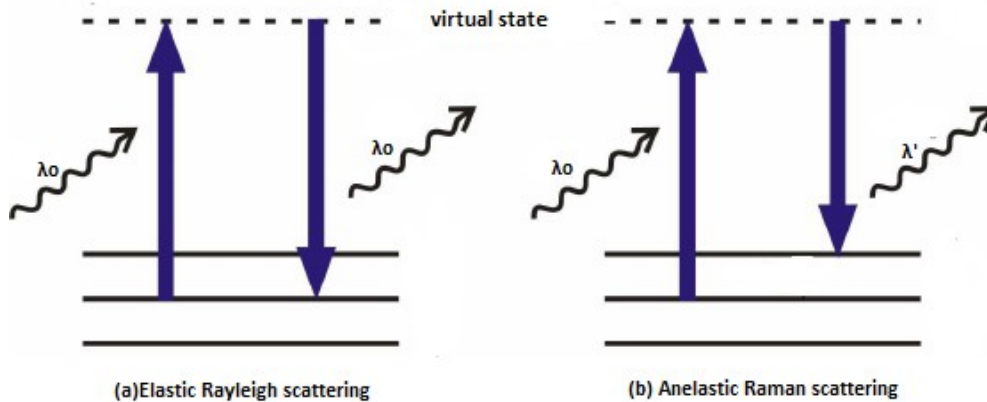
$$W_1 = \sigma_1 * I \quad [1.2]$$

όπου $\sigma_1 \sim 10^{-17}$ cm² η ενεργός διατομή σκέδασης του μονοφωτονικά διεγερμένου φθορισμού [6].

1.2.3 Φαινόμενο Σκέδασης

Η σκέδαση του φωτός είναι εν γένει μια φυσική διεργασία κατά την οποία το ηλεκτρομαγνητικό κύμα λόγω ανομοιογενειών του μέσου στο οποίο διαδίδεται αποκλίνει από την ευθύγραμμη τροχιά του [7][8]. Τα είδη των ανομοιογενειών που μπορούν να προκαλέσουν σκέδαση είναι γνωστά ως σκεδαστές και περιλαμβάνουν σωματίδια, σταγονίδια, μεταβολές της πυκνότητας σε υγρά και κύτταρα σε ιστούς.

Στην πιο απλή περίπτωση ένα φωτόνιο ενέργειας E_γ (με $E_\gamma < \Delta E$) αλληλεπιδρά με το ηλεκτρόνιο ενός ατόμου. Το ηλεκτρόνιο μιας και θα έχει ενέργεια μικρότερη από ΔE θα διεγερθεί σε μια μη πραγματική στάθμη (virtual state) χαμηλότερη ενεργειακά από την πρώτη διεγερμένη E_1 κατάσταση του ατόμου. Σύμφωνα με την αρχή απροσδιοριστίας ενέργειας-χρόνου $\Delta E \cdot \Delta t \geq \frac{\hbar}{2}$ για ενέργεια της τάξης των μερικών eV το ηλεκτρόνιο παραμένει στην μη πραγματική στάθμη $\sim 10^{-15}$ s. Όταν το ηλεκτρόνιο αποδιεγερθεί επιστρέφει στην θεμελιώδη κατάσταση του ατόμου εκπέμποντας ένα φωτόνιο. Το σκεδαζόμενο φωτόνιο μπορεί να έχει το ίδιο μήκος κύματος με το προσπίπτον φωτόνιο (ελαστική σκέδαση Rayleigh, Mie) ή διαφορετικό (ανελαστική σκέδαση Raman, Compton) [7][8]. Στην Εικόνα 1.2 παρουσιάζονται δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα ελαστικής και ανελαστικής σκέδασης.



Εικόνα 1.2 Στο διάγραμμα (α) απεικονίζεται η ελαστική σκέδαση Rayleigh ενώ στο διάγραμμα (β) η ανελαστική σκέδαση Raman. Με τις μαύρες γραμμές συμβολίζονται η ground state και οι δονητικές της καταστάσεις. Με τις διακεκομμένες γραμμές συμβολίζεται η μη πραγματική στάθμη κατά την οποία ένα διεγερμένο ηλεκτρόνιο παραμένει για $\sim 10^{-15}$ s και στην συνέχεια αποδιεγείρεται ελαστικά ή ανελαστικά.

1.3 Μη Γραμμική Οπτική (NLOM)

Τα γραμμικά φαινόμενα που περιγράψαμε στην υποενότητα 1.2 είναι οι συνήθεις τρόποι με τους οποίους τα ηλεκτρόνια στα άτομα και τα μόρια αλληλεπιδρούν με το φως. Τα χαρακτηρίσαμε γραμμικά οπτικά φαινόμενα, λόγω του γεγονότος ότι ένα φωτόνιο διεγείρει ένα ηλεκτρόνιο και αυτό με την σειρά του αποδιεγειρόμενο εκπέμπει ένα φωτόνιο, υπάρχει δηλαδή μια γραμμική αντιστοιχία μεταξύ τους. Στα φαινόμενα αυτά η οπτική απόκριση του υλικού εξαρτάται γραμμικά από την ένταση του προσπίπτοντος ηλεκτρομαγνητικού κύματος. Όμως, στην περίπτωση που διεγείρουμε ένα ηλεκτρόνιο με Η/Μ ακτινοβολία υψηλής έντασης και η χρονική διάρκεια του παλμού είναι μικρότερη από τον χρόνο παραμονής του ηλεκτρονίου σε μια διεγερμένη ενεργειακή κατάσταση, τότε το ηλεκτρόνιο διεγείρεται από περισσότερα από ένα φωτόνια. Οδηγούμαστε λοιπόν, σε μη γραμμικές αλληλεπιδράσεις φωτός-ύλης οι οποίες δημιουργούν ένα πλήθος μη γραμμικών φαινομένων, με πιο δημοφιλή το φαινόμενο διφωτονικού φθορισμού και την παραγωγή αρμονικών (SHG, THG).

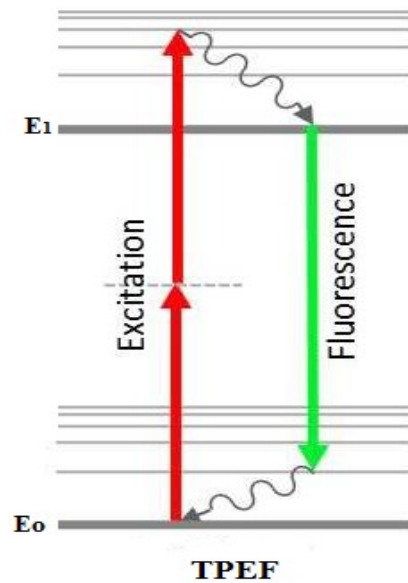
Η μη γραμμική μικροσκοπία (NLOM) χωρίζεται σε δύο κατηγορίες: στην μικροσκοπία ασύμφωνου φωτός και στην μικροσκοπία σύμφωνου. Η διαφορά τους έγκειται στην φάση του παραγόμενου σήματος. Στην NLOM ασύμφωνου φωτός τα σήματα παράγονται σε τυχαία φάση, με πιο κοινή την μικροσκοπία διφωτονικού φθορισμού (TPEF). Αντιθέτως στην NLOM σύμφωνου φωτός η φάση των παραγόμενων σημάτων καθορίζεται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου της φάσης του διεγερόμενου φωτός και της γεωμετρίας των ακτινοβολούμενων μορίων, με χαρακτηριστική την μικροσκοπία SHG [9].

1.3.1 Διφωτονικά Διεγερόμενος Φθορισμός (TPEF)

Ο TPEF είναι ένα μη γραμμικό οπτικό φαινόμενο απορρόφησης σύμφωνα με το οποίο δυο φωτόνια κατάλληλης ενέργειας απορροφούνται και διεγείρουν ένα ηλεκτρόνιο σε μια διεγερμένη κατάσταση του μορίου, όπου αποδιεγειρόμενο εκπέμπει ένα φωτόνιο ενέργειας μεγαλύτερης των αρχικών [10].

Μια απλή θεωρητική περιγραφή του TPEF είναι η εξής : Ηλεκτρόνιο βρίσκεται στην θεμελιώδη ενεργειακή κατάσταση του μορίου του και αλληλεπιδρά με φωτόνιο ενέργειας $E_\gamma > \Delta E/2$ (όπου ΔE η ενεργειακή διαφορά μεταξύ θεμελιώδης και πρώτης διεγερμένης). Κατά την αλληλεπίδραση θα μεταβεί σε μια εικονική στάθμη (virtual state) χαμηλότερη ενεργειακά από την πρώτη διεγερμένη. Η εικονική στάθμη έχει εξαιρετικά μικρό χρόνο ζωής περίπου 0.5fs [6]. Αν μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα το ηλεκτρόνιο αλληλεπιδράσει με δεύτερο φωτόνιο (αντίστοιχης ενέργειας με το αρχικό) θα μεταβεί σε κάποιο δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης κατάστασης. Από εκεί ένα μέρος της ενέργειας του ηλεκτρονίου εναποτίθεται στο μόριο καθώς αποδιεγείρεται στην πρώτη διεγερμένη και τελικά επιστρέφει πίσω στην θεμελιώδη κατάσταση εκπέμποντας ένα φωτόνιο ενέργειας μεγαλύτερης της αρχικής [11]. Η παραπάνω διαδικασία περιγράφεται στην Εικόνα 1.3.

Κεφάλαιο 1 : Θεωρητικό Υπόβαθρο



Εικόνα 1.3 Διάγραμμα Jablonski διφωτονικά διεγερμένου φθορισμού: Με έντονες γκρι γραμμές συμβολίζονται η θεμελιώδης E_0 και η πρώτη διεγερμένη E_1 ενεργειακή κατάσταση του μορίου. Με λεπτές γκρι γραμμές συμβολίζονται οι δονητικές καταστάσεις κάθε στάθμης. Δύο φωτόνια ίδιου μήκους κύματος (λ) που συνήθως βρίσκονται στην IR περιοχή του H/M φάσματος διεγείρουν ηλεκτρόνιο το οποίο αποδιεγερόμενο εκπέμπει ένα φωτόνιο μήκους κύματος στο ορατό [10].

Για να παρατηρηθεί το φαινόμενο του TPEF απαιτείται υψηλή ροή φωτονίων, και αυτό γιατί η πιθανότητα που έχουν τα ηλεκτρόνια της virtual κατάστασης να αλληλεπιδράσουν με ένα δεύτερο φωτόνιο είναι εξαιρετικά μικρή. Για τον σκοπό αυτό καθίσταται αναγκαία η χρήση παλμικού laser εκπομπής υπερστενών παλμών και φακών με μεγάλο αριθμητικό άνοιγμα NA. Οι φακοί μεγάλου NA διασφαλίζουν την εστίαση της ακτινοβολίας σε μια μικρή περιοχή, ενώ τα παλμικά laser εξασφαλίζουν την στιγμιαία υψηλή ισχύ που απαιτείται για την παραγωγή σημάτων TPEF.

Ο ρυθμός απορρόφησης W_2 (photons/sec) ενός βιολογικού δείγματος στον διφωτονικό φθορισμό εξαρτάται μη γραμμικά από την αρχική ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας I , όπως φαίνεται παρακάτω έχουμε τετραγωνική εξάρτηση [12] :

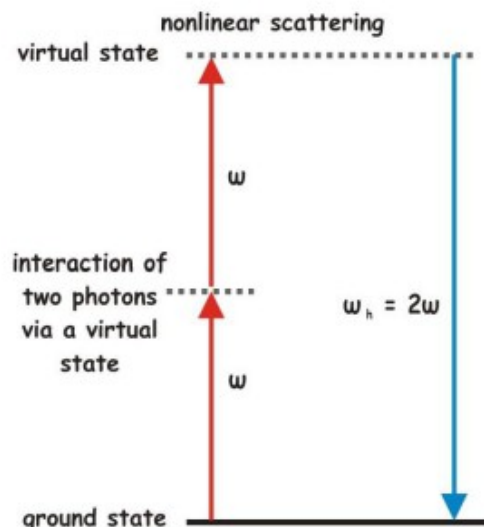
$$W_2 = \frac{1}{2} * \sigma_2 * I^2 \quad [1.3]$$

όπου $\sigma_2 \sim 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{sec}/\text{photon}$ η ενεργός διατομή απορρόφησης TPEF. Παρατηρούμε ότι η ενεργός διατομή σ_2 του TPEF είναι πολύ μικρότερη από την ενεργό διατομή σ_1 του μονοφωτονικού φθορισμού, αναμενόμενο δεδομένου ότι η πιθανότητα να παρατηρηθεί φαινόμενο TPEF είναι μικρότερη. Επίσης, η τετραγωνική εξάρτηση του ρυθμού απορρόφησης του TPEF από την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μας φανερώνει πως ο W_2 μειώνεται γύρω από τον εστιακό όγκο του μορίου που ακτινοβολείται, άρα το ανιχνεύσιμο σήμα μας θα προέρχεται από έναν μικρότερο εστιακό όγκο συγκριτικά με αυτό του μονοφωτονικού φθορισμού. Στην μη γραμμική μικροσκοπία εξαιτίας του μικρότερου εστιακού όγκου κερδίζουμε καλύτερη χωρική ανάλυση και διακριτική ικανότητα σε σχέση με άλλες τεχνικές [6]. Περισσότερα πλεονεκτήματα της NLOM θα συζητηθούν στο υποκεφάλαιο 1.5.

1.3.2 Ποιοτική Προσέγγιση SHG

Όπως η μικροσκοπία διφωτονικά διεγερόμενου φθορισμού έτσι και η μικροσκοπία SHG αποτελεί μια ιδιαίτερα διαδεδομένη τεχνική στον τομέα της βιολογίας [12]. Η ανακάλυψη ότι ορισμένες ενδογενείς δομές βιολογικών οργανισμών μπορούν να δώσουν σήμα δεύτερης αρμονικής την καθιστά μια πολλά υποσχόμενη τεχνική απεικόνισης. Αντίθετα από τον TPEF, η SHG είναι ένα σύμφωνο φαινόμενο και βασίζεται σε μη-γραμμική σκέδαση.

Στην SHG δύο φωτόνια συνολικής ενέργειας μικρότερης από ΔΕ και συχνότητας ω το καθένα, διεγείρουν ένα ηλεκτρόνιο σε μια μη πραγματική στάθμη (virtual state), έτσι το φωτόνιο δεν απορροφάτε από το μόριο αλλά σκεδάζεται. Το ηλεκτρόνιο επιστρέφει στην θεμελιώδη στάθμη εκπέμποντας ένα φωτόνιο διπλάσιας ενέργειας ($\omega+\omega=2\omega$). Στην Εικόνα 1.4 παρουσιάζεται η παραπάνω διαδικασία.



Εικόνα 1.4 Ενεργειακό διάγραμμα SHG. Φωτόνιο συχνότητας ω διεγείρει ηλεκτρόνιο που βρίσκεται στην θεμελιώδη στάθμη (ground state) σε μία εικονική στάθμη (virtual state). Στη συνέχεια πριν το ηλεκτρόνιο προλάβει να αποδιεγερθεί αλληλεπιδρά με 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 [6].

Η ισχύς της SHG εξαρτάται από το τετράγωνο της προσπίπτουσας έντασης και αυτό όπως είδαμε και στην περίπτωση του TPEF ερμηνεύεται ως εξής [13]: μικρός εστιακός όγκος αλληλεπίδρασης άρα καλύτερη διακριτική ικανότητα. Το κυριότερο πλεονέκτημα της SHG σε σχέση με την μικροσκοπία TPEF είναι η μείωση της φωτοτοξικότητας στο δείγμα, κάτι εξαιρετικά σημαντικό για την μελέτη in vivo βιολογικών δειγμάτων. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι η SHG οφείλεται σε φαινόμενο σκέδασης και άρα δεν έχουμε εναπόθεση ενέργειας στο δείγμα, σε αντίθεση με τον TPEF που οφείλεται σε φαινόμενο απορρόφησης. Το υλικό στην περίπτωση της SHG απεικόνισης δρα σαν μετατροπέας ενέργειας.

1.4 Παραγωγή SHG

Παραπάνω δόθηκε μια ποιοτική περιγραφή για την παραγωγή SHG. Σε αυτήν την ενότητα θα προσεγγίσουμε την παραγωγή δεύτερης αρμονικής μέσα από την κυματική φύση του φωτός. Αρχικά θα μελετήσουμε την μη γραμμική πόλωση που επάγεται σε ένα μέσο όταν σε αυτό ασκείται μεγάλη ένταση ηλεκτρικό πεδίο και θα δείξουμε πως συμβάλει στην παραγωγή SHG. Στην συνέχεια εκμεταλλευόμενοι το μη γραμμικό ατομικό μοντέλο Lorentz θα δείξουμε πως προκύπτει η γένεση δεύτερης αρμονικής από μη κεντροσυμμετρικά μέσα.

1.4.1 Μη Γραμμική Πόλωση Υλικού

Αν ένα υλικό αποτελείται από ουδέτερα άτομα (ή μη πολικά μόρια) και τοποθετηθεί μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο, τότε το πεδίο θα δημιουργήσει μια διπολική ροπή (ανακατανομή φορτίου) σε κάθε άτομο με κατεύθυνση παράλληλη σε αυτό. Στην περίπτωση που το υλικό αποτελείται από πολικά άτομα τότε το εφαρμοζόμενο πεδίο θα ασκήσει ροπή στις ήδη υπάρχουσες διπολικές ροπές των ατόμων ώστε να τις ευθυγραμμίσει με την κατεύθυνση του. Και στις δύο περιπτώσεις το βασικό αποτέλεσμα είναι ένα: δημιουργία διπόλων με κατεύθυνση αυτή του ηλεκτρικού πεδίου - με απλά λόγια το υλικό πολώνεται. Η πόλωση P ενός υλικού ορίζεται ως διπολική ροπή ανά μονάδα όγκου [14].

Στον κλασικό ηλεκτρομαγνητισμό, η πόλωση P του υλικού εξαρτάται γραμμικά από το ηλεκτρικό πεδίο E μέσω της σχέσης :

$$P(t) = \epsilon_0 \chi^{(1)} E(t) \quad [1.4]$$

Η σταθερά $\chi^{(1)}$ είναι γνωστή ως γραμμική ή πρώτης τάξης επιδεκτικότητα του μέσου, είναι αδιάστατη και δείχνει τον βαθμό πόλωσης του υλικού εξαιτίας του εφαρμοζόμενου εξωτερικού πεδίου. Η σταθερά ϵ_0 είναι η ηλεκτρική διαπερατότητα στο κενό όπου για λόγους απλότητας θα την θεωρήσουμε ίση με την μονάδα. Να σημειωθεί ότι η σχέση (1.4) γράφτηκε για την γενική περίπτωση χρονομεταβαλλόμενου πεδίου.

Η παραπάνω σχέση για μεγάλες τιμές του ηλεκτρικού πεδίου E παύει να είναι μια τόσο καλή προσέγγιση, έτσι θα πρέπει να συμπεριλάβουμε στους υπολογισμούς μας και τις μη γραμμικές συνεισφορές του πεδίου τις οποίες σωστά θεωρήσαμε αμελητέες για μικρότερες τιμές [14]. Έτσι η σχέση (1.4) παίρνει την μορφή :

$$P(t) = \epsilon_0 [\chi^{(1)} E(t) + \chi^{(2)} E^2(t) + \chi^{(3)} E^3(t) + \dots] \quad [1.5]$$

όπου οι ποσότητες $\chi^{(2)}$ και $\chi^{(3)}$ είναι οι μη γραμμικές επιδεκτικότητες δεύτερης και τρίτης τάξης αντίστοιχα. Για λόγους απλότητας στις σχέσεις (1.4) και (1.5) έχει γίνει η θεώρηση ότι βρισκόμαστε σε 1 διάσταση (1-D) και το υλικό στο οποίο εφαρμόζουμε το εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο είναι ομοιογενές. Αυτή η θεώρηση έχει σαν αποτέλεσμα οι ποσότητες $E(t)$ και $P(t)$ να είναι βαθμωτές και οι $\chi^{(1)}$, $\chi^{(2)}$, $\chi^{(3)}$ σταθερές. Στον τρισδιάστατο χώρο (3-D) τα $E(t)$ και $P(t)$ περιγράφονται από διανύσματα ενώ οι $\chi^{(1)}$, $\chi^{(2)}$, $\chi^{(3)}$ από τανυστές τάξης αντίστοιχης των εκθετών τους [6].

Κεφάλαιο 1 : Θεωρητικό Υπόβαθρο

Ας υποθέσουμε ότι το ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζουμε είναι της μορφής $E(t)=E\sin(\omega t)$, αντικαθιστώντας στην σχέση (1.5) και παίρνοντας μόνο τους δύο πρώτους όρους έχουμε την εξής επαγόμενη πόλωση :

$$P(t)=\chi^{(1)}E\sin(\omega t)+\chi^{(2)}E^2\sin^2(\omega t) \quad [1.6]$$

Με κατάλληλες τριγωνομετρικές ταυτότητες από την σχέση (1.6) οδηγούμαστε στην παρακάτω :

$$P(t)=\chi^{(1)}E\sin(\omega t)+\chi^{(2)}\frac{E^2}{2}[1-\cos(2\omega t)] \quad [1.7]$$

Ο λόγος για τον οποίο η πόλωση του υλικού παίζει σημαντικό ρόλο στην περιγραφή των μη γραμμικών οπτικών φαινομένων είναι ότι η χρονική μεταβολή της πόλωσης μπορεί να δράσει ως πηγή παραγωγής νέων ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων. Η κυματική εξίσωση στην μη γραμμική οπτική έχει την μορφή [15]:

$$\nabla^2 E - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2 E}{\partial t^2} = \frac{1}{\epsilon_0 c} \frac{\partial^2 P^{NL}}{\partial t^2} \quad [1.8]$$

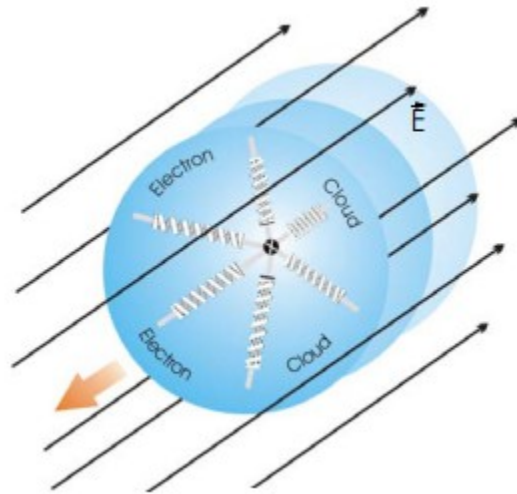
όπου n ο δείκτης διάθλασης του υλικού, c η ταχύτητα του φωτός και με P^{NL} συμβολίζεται η μη γραμμική πόλωση. Η εξίσωση (1.8) μαθηματικά είναι μια μη ομογενής διαφορική εξίσωση με τον μη ομογενή όρο να λειτουργεί σαν πηγή παραγωγής της ποσότητας E . Στην περίπτωσή μας ο όρος της δεύτερης παραγωγής της πόλωσης ως προς τον χρόνο είναι ένα μέτρο επιτάχυνσης των διπολικών ροπών που σχηματίζουν την συνολική επαγόμενη πόλωση εντός του μέσου και συμβάλλουν τελικά στην δημιουργία ηλεκτρικού πεδίου.

Παρατηρώντας την σχέση (1.7) βλέπουμε πως αποτελείται από δύο όρους. Ο πρώτος όρος είναι η γνωστή γραμμική απόκριση του υλικού στο εφαρμοζόμενο χρονομεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Ο δεύτερος όρος έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς αποτελείται από δυο επιμέρους μέρη. Το πρώτο μέρος είναι μια σταθερά, ονομάζεται οπτική ανόρθωση και με βάση την εξίσωση (1.8) 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 με βάση την (1.8) σημαίνει αρμονική επιτάχυνση ηλεκτρονίων παράγοντας τελικά ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα συχνότητας διπλάσιας του αρχικού προσπίπτοντος κύματος. Το φαινόμενο αυτό λέγεται γένεση δεύτερης αρμονικής [15] .

1.4.2 Μη Γραμμικό Ατομικό Μοντέλο Lorentz

Μέσα από το κλασικό ατομικό μοντέλο Lorentz θα μελετήσουμε την αλληλεπίδραση μεταξύ της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και του ατόμου ως προς την παραγωγή αρμονικών συχνοτήτων. Το γραμμικό ατομικό μοντέλο Lorentz αντιμετωπίζει το άτομο ως έναν απλό αρμονικό ταλαντωτή. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, το ηλεκτρονιακό νέφος του ατόμου υπόκειται σε μια ηλεκτρική δύναμη που ασκείται από τον ακίνητο θετικά φορτισμένο πυρήνα και τον διατηρεί σε κατάσταση ισορροπίας [16]. Με άλλα λόγια μπορούμε να υποθέσουμε την ύπαρξη μιας δύναμης επαναφοράς η οποία θα τείνει να επαναφέρει το σύστημα στην ισορροπία του (Εικόνα 1.5).

Κεφάλαιο 1 : Θεωρητικό Υπόβαθρο



Εικόνα 1.5 Μοντέλο Lorentz: Παριστάνεται το άτομο σαν ένα σύστημα συζευγμένων ελατηρίων που ταλαντώνεται υπό την επίδραση ενός πεδίου.

Για μικρές μετατοπίσεις του ηλεκτρονιακού νέφους από την κατάσταση ισορροπίας, η δύναμη επαναφοράς σχετίζεται γραμμικά με την μετατόπιση, όπως ακριβώς περιγράφεται από τον νόμο του Hooke. Για μεγαλύτερες μετατοπίσεις η γραμμικότητα χάνεται με αποτέλεσμα την εμφάνιση μη γραμμικών όρων στην δύναμη επαναφοράς του ηλεκτρονιακού νέφους, τότε μιλάμε για την μη γραμμική εκδοχή του μοντέλου [16].

Ας υποθέσουμε ότι σε ισοτροπικό μέσο προσπίπτει Η/Μ ακτινοβολία συχνότητας ω πολωμένη κατά τον x άξονα. Το χρονομεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο θα αλληλεπιδράσει με το ηλεκτρονιακό νέφος των ατόμων του μέσου, μέσω της δύναμης Lorentz :

$$F = q \left(E + \frac{u}{c} \times B \right) \quad [1.9]$$

Έτσι το ηλεκτρονιακό νέφος θα ταλαντώνεται γύρω από τον ακίνητο πυρήνα. Πριν ξεκινήσουμε την ανάλυσή μας θα κάνουμε την υπόθεση ότι η ταχύτητα u του επιταχυνόμενου ηλεκτρονιακού νέφους είναι πολύ μικρότερη από εκείνη του φωτός και άρα το μαγνητικό πεδίο της ακτινοβολίας αλληλεπιδρά απειροελάχιστα με αυτό. Συνεπώς θα παραλείψουμε το μαγνητικό όρο της δύναμης Lorentz.

Θα μελετήσουμε αρχικά την απλούστερη μη αρμονική περίπτωση, σύμφωνα με την οποία η δύναμη επαναφοράς αποτελείται από ένα γραμμικό όρο και από έναν μη γραμμικό με εξάρτηση από το τετράγωνο της μετατόπισης :

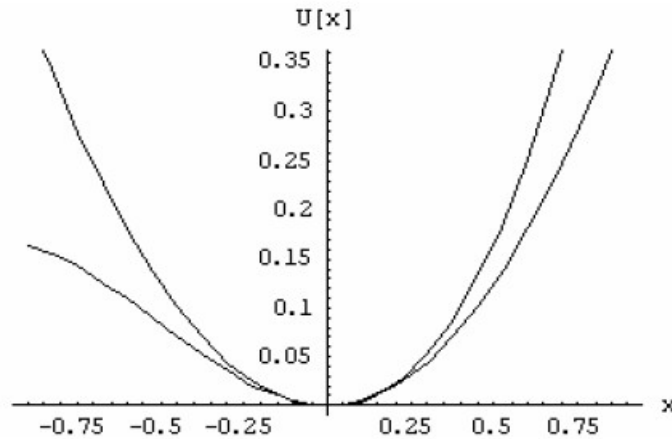
$$F_{\text{επαν}} = -m\omega_0^2 x - mkx^2 \quad [1.10]$$

όπου m η μάζα του ηλεκτρονίου, ω_0 η ιδιοσυχνότητα του συστήματος και k μια θετική παράμετρος η οποία χαρακτηρίζει την ισχύ της μη γραμμικότητας. Η συνάρτηση της δυναμικής ενέργειας που αντιστοιχεί σε μια τέτοια δύναμη δίνεται από την σχέση 1.11 :

Κεφάλαιο 1 : Θεωρητικό Υπόβαθρο

$$U(x) = -\int F_{\text{επαυ}} dx = \frac{1}{2} m\omega_0^2 x^2 + \frac{1}{3} m k x^3 \quad [1.11]$$

Ο πρώτος όρος αντιστοιχεί στο δυναμικό ενός αρμονικού ταλαντωτή ενώ ο δεύτερος όρος αντιστοιχεί στην μη γραμμική διόρθωσή του. Στην Εικόνα 1.6 αναπαριστάτε το δυναμικό $V(x)$ της σχέσης 1.11 και το παραβολικό δυναμικό.



Εικόνα 1.6 Σύγκριση παραβολικού και μη αρμονικού δυναμικού για μη κεντροσυμμετρικό μέσο.

Έτσι το δυναμικό της σχέσης 1.11 που οφείλεται στην δύναμη επαναφοράς (1.10) του ηλεκτρονιακού νέφους δεν θα είναι συμμετρικό ως προς τον άξονα y και υλικά τα οποία περιγράφονται από αυτό το δυναμικό χαρακτηρίζονται ως μη κεντροσυμμετρικά.

Στην συνέχεια γράφουμε την εξίσωση κίνησης του ηλεκτρονιακού νέφους ενός μη κεντροσυμμετρικού υλικού εξαιτίας της αλληλεπίδρασής του με H/M ακτινοβολία. Έτσι από τον 2ο Νόμο Νεύτωνα έχουμε:

$$-m\omega_0^2 x - m k x^2 - 2m\gamma \dot{x} - e E(t) = m \ddot{x} \quad [1.12]$$

όπου οι δύο πρώτοι όροι αντιστοιχούν στην δύναμη επαναφοράς, ο τρίτος όρος αντιστοιχεί σε μια δύναμη απόσβεσης η οποία οφείλεται στην αλληλεπίδραση του ατόμου με τα γειτονικά του άτομα και ο τέταρτος όρος είναι η δύναμη Lorentz (1.9) εξαιτίας του ηλεκτρικού πεδίου της H/M ακτινοβολίας.

Για την εξίσωση 1.12 δεν υπάρχει γνωστή αναλυτική λύση, εφόσον το ηλεκτρικό πεδίο E περιγράφεται από ένα επίπεδο κύμα συχνότητας ω , δηλαδή $E(t) = E_0 e^{-i\omega t}$. Ωστόσο αν θεωρήσουμε το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο αρκετά ασθενές τότε ο μη γραμμικός όρος της δύναμης επαναφοράς θα είναι πολύ μικρότερος από τον αντίστοιχο γραμμικό. Κάτω από αυτές τις συνθήκες η εξίσωση μπορεί να επιλυθεί μέσω της θεωρίας διαταραχών, αντικαθιστώντας το $E(t)$ με το γινόμενο $\lambda E(t)$. Το λ είναι μια παράμετρος που χαρακτηρίζει την ισχύ της διαταραχής και παίρνει τιμές μεταξύ μηδενός και μονάδας. Στην συνέχεια αναζητούμε την λύση της εξίσωσης υπό μορφή

Κεφάλαιο 1 : Θεωρητικό Υπόβαθρο

δυναμοσειράς ως προς την παράμετρο λ :

$$x = \lambda x^{(1)} + \lambda^2 x^{(2)} + \lambda^3 x^{(3)} + \dots \quad [1.13]$$

Αντικαθιστώντας την σχέση 1.13 στην εξίσωση 1.12 και απαιτώντας οι όροι που είναι ανάλογοι του λ , λ^2, λ^3 κτλ. να την ικανοποιούν ξεχωριστά, φτάνουμε τελικά σε ένα σύνολο εξισώσεων για τα $x^{(1)}, x^{(2)}, x^{(3)}$ που έχουν αναλυτική λύση:

$$\ddot{x}^{(1)} + 2\gamma \dot{x}^{(1)} + \omega_0^2 x^{(1)} = -\frac{eE(t)}{m}, \quad x^{(1)} \sim e^{-i\omega t} \quad [1.14]$$

$$\ddot{x}^{(2)} + 2\gamma \dot{x}^{(2)} + \omega_0^2 x^{(2)} = -k(x^{(1)})^2, \quad x^{(2)} \sim e^{-i(2\omega)t} \quad [1.15]$$

$$\ddot{x}^{(3)} + 2\gamma \dot{x}^{(3)} + \omega_0^2 x^{(3)} = -2k x^{(1)} x^{(2)}, \quad x^{(3)} \sim e^{-i(3\omega)t} \quad [1.16]$$

Η steady state λύση στην 1.14 φανερώνει ότι η πρώτη διόρθωση $x^{(1)}$ αντιστοιχεί σε συνάρτηση μετατόπισης και άρα επιτάχυνσης του ηλεκτρονιακού νέφους με συχνότητα ω , ίση δηλαδή με την συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, με αποτέλεσμα την επανεκπομπή Η/Μ ακτινοβολίας στην ίδια ακριβώς συχνότητα. Στην συνέχεια υψώνοντας την λύση για το $x^{(1)}$ στο τετράγωνο και αντικαθιστώντας στην εξίσωση 1.15 θα προκύψει ένας όρος διεγείρουσας δύναμης στην εξίσωση ταλάντωσης με συχνότητα 2ω . Ο όρος αυτός στην steady state θα δώσει αντίστοιχα την δεύτερη αρμονική, ενώ αντικαθιστώντας τις εκφράσεις για τα $x^{(1)}$ και $x^{(2)}$ στην εξίσωση 1.16 θα προκύψει όρος συχνότητας 3ω , ο οποίος θα είναι υπεύθυνος για τη γένεση της τρίτης αρμονικής κ.ο.κ. Καταλήγουμε λοιπόν στο συμπέρασμα ότι σε ένα μη κεντροσυμμετρικό μέσο επιτρέπεται η παραγωγή όλων των αρμονικών συχνοτήτων τόσο άρτιων όσο και περιττών.

Πάμε τώρα να εξετάσουμε την περίπτωση όπου η δύναμη επαναφοράς του ηλεκτρονιακού νέφους έχει μη γραμμική εξάρτηση ανάλογη του κύβου της μετατόπισης, περιγράφεται δηλαδή από την σχέση:

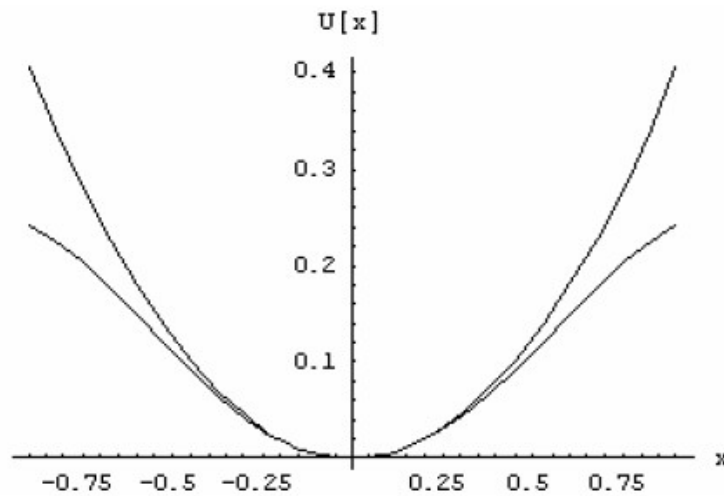
$$F_{\text{επαν}} = -m\omega_0^2 x + mbx^3 \quad [1.17]$$

όπου b μια θετική παράμετρος που δείχνει την ισχύ της μη γραμμικότητας. Η αντίστοιχη συνάρτηση δυναμικής ενέργειας για την δύναμη 1.17 δίνεται από την σχέση:

$$U(x) = -\int F_{\text{επαν}} dx = \frac{1}{2} m\omega_0^2 x^2 - \frac{1}{4} mbx^4 \quad [1.18]$$

Είναι ξεκάθαρο πως πρόκειται για μια άρτια συνάρτηση με κατοπτρική συμμετρία ως προς τον άξονα των y . Υλικά των οποίων τα άτομα διαθέτουν τέτοιο συμμετρικό δυναμικό ονομάζονται κεντροσυμμετρικά. Παραθέτουμε στην εικόνα 1.7 την γραφική παράσταση της δυναμικής ενέργειας $U(x)$ της σχέσης 1.18, σε σύγκριση με το κλασικό παραβολικό δυναμικό.

Κεφάλαιο 1 : Θεωρητικό Υπόβαθρο



Εικόνα 1.7 Σύγκριση παραβολικού και μη αρμονικού κεντροσυμμετρικού δυναμικού

Συνεχίζουμε την ανάλυση μας γράφοντας τον 2ο Νόμο Νεύτωνα για την κίνηση του ηλεκτρονιακού νέφους ενός κεντροσυμμετρικού υλικού εξαιτίας της αλληλεπίδρασης του με την Η/Μ ακτινοβολία και έχουμε :

$$-m\omega_0^2 x - mbx^2 - 2m\gamma \dot{x} - eE(t) = m\ddot{x} \quad [1.19]$$

Εφαρμόζοντας θεωρία διαταραχών και κάνοντας τις ίδιες παραδοχές με προηγουμένως οδηγούμαστε ξανά σε ένα σύνολο εξισώσεων $x^{(1)}$, $x^{(2)}$, $x^{(3)}$ κ.ο.κ , που έχουν αναλυτική λύση :

$$\ddot{x}^{(1)} + 2\gamma \dot{x}^{(1)} + \omega_0^2 x^{(1)} = -\frac{eE(t)}{m} \quad , \quad x^{(1)} \sim e^{-i\omega t} \quad [1.20]$$

$$\ddot{x}^{(2)} + 2\gamma \dot{x}^{(2)} + \omega_0^2 x^{(2)} = 0 \quad , \quad x^{(2)} = 0 \quad [1.21]$$

$$\ddot{x}^{(3)} + 2\gamma \dot{x}^{(3)} + \omega_0^2 x^{(3)} = b x^{(1)} x^{(1)} x^{(1)} \quad , \quad x^{(3)} \sim e^{-i(3\omega)t} \quad [1.22]$$

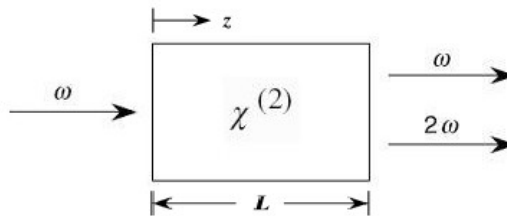
Με βάση την σχέση 1.21 η ακτινοβολία δεύτερης αρμονικής μηδενίζεται στην steady state, και οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η παραγωγή δεύτερης αρμονικής λαμβάνει χώρα αποκλειστικά και μόνο εντός μη κεντροσυμμετρικών μέσων.

Μελετώντας το μη γραμμικό ατομικό μοντέλο Lorentz χαρακτηρίσαμε τα άτομα που αποτελούν ένα μέσο ως κεντροσυμμετρικά ή μη κεντροσυμμετρικά και αποδείξαμε πως είναι δυνατή η παραγωγή δεύτερης αρμονικής μόνο για άτομα των οποίων το ηλεκτρονιακό νέφος υπόκειται σε μη κεντροσυμμετρικό δυναμικό. Τα μη κεντροσυμμετρικά μέσα είναι αυτά που θα μας απασχολήσουν και στην συνέχεια της μελέτης μας.

1.4.3 Phase Matching

Προηγουμένως συζητήσαμε για την παραγωγή SHG από ένα ατομικό ηλεκτρικό δίπολο, στην πραγματικότητα όμως η περιοχή που ακτινοβολούμε περιέχει περισσότερα από ένα δίπολα. Τα ηλεκτρικά αυτά δίπολα αλληλεπιδρούν με την Η/Μ ακτινοβολία, τίθενται σε ταλάντωση και τελικά παράγεται σήμα SHG [15,16]. Γεννάτε λοιπόν το εύλογο ερώτημα, ποια βασική συνθήκη θα πρέπει να ικανοποιείται μεταξύ της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στο μέσο με την παραγόμενη ακτινοβολία δεύτερης αρμονικής ώστε να έχουμε αποδοτική παραγωγή αρμονικών εντός ενός μη γραμμικού υλικού;

Για να δώσουμε απάντηση στο ερώτημα που θέσαμε, θα μελετήσουμε ένα απλό μοντέλο, έστω λοιπόν ότι έχουμε μονοδιάστατο μη γραμμικό υλικό μήκους L και προσπίπτει σε αυτό ακτινοβολία συχνότητας ω :



Θα λύσουμε την κυματική εξίσωση Maxwell σε μια διάσταση (σχέση 1.8) :

$$\frac{\partial^2 E^{\text{SHG}}}{\partial z^2} - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2 E^{\text{SHG}}}{\partial t^2} = \frac{1}{\epsilon_0 c} \frac{\partial^2 P_{\text{NL}}^{2\omega}}{\partial t^2}$$

Η $(P^{2\omega})_{\text{NL}}$ όπως παρουσιάστηκε στην υποενότητα 1.4.1. και την σχέση 1.7, είναι η μη γραμμική συνιστώσα της πόλωσης του υλικού που εξαρτάται από την διπλάσια συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η κυματική εξίσωση Maxwell είναι μια μη ομογενή διαφορική εξίσωση όπου το δεξί μέλος της λειτουργεί σαν πηγή για την παραγωγή της μεταβλητής ποσότητας στο αριστερό, αυτό μας φανερώνει και μαθηματικά πλέον πως η μη γραμμική $(P^{2\omega})_{\text{NL}}$ συνιστώσα είναι υπεύθυνη για την παραγωγή SHG. Τέλος n είναι ο δείκτης διάθλασης του υλικού για την συχνότητα της παραγόμενης ακτινοβολίας.

Έστω ότι το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο περιγράφεται από επίπεδο κύμα $E = E_0 \cos(kz - \omega t)$ και σε συνδυασμό με την εξίσωση 1.7, η μη γραμμική συνιστώσα της πόλωσης του υλικού $(P^{2\omega})_{\text{NL}}$ περιγράφεται από την σχέση:

$$P_{\text{NL}}^{2\omega} = \frac{\epsilon_0 d}{2} E_0^2 e^{2i(kz - \omega t)} + \text{c.c} \quad [1.23]$$

όπου ϵ_0 η ηλεκτρική επιδεκτικότητα στο κενό και $d = \chi^{(2)}/2$ ορίζεται ως η ηλεκτρική επιδεκτικότητα δεύτερης τάξης διά 2.

Κεφάλαιο 1 : Θεωρητικό Υπόβαθρο

Όσον αφορά το ηλεκτρικό πεδίο της SHG θα περιγράφεται από ένα επίπεδο κύμα πλάτους E_0^{SHG} με συχνότητα διπλάσια της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και άρα :

$$E^{SHG} = \frac{1}{2} E_0^{SHG} e^{i(k_{SHG}z - 2\omega t)} + c.c \quad [1.24]$$

Προχωράμε στην αντικατάσταση των σχέσεων 1.23 και 1.24 στην κυματική εξίσωση Maxwell και προτού ξεκινήσουμε την ανάλυση, κάνουμε την παραδοχή ότι το πλάτος της δεύτερης αρμονικής μεταβάλλεται αργά καθώς διαδίδεται μέσα στο υλικό, δηλαδή:

$$\frac{\partial^2 E_0^{SHG}}{\partial z^2} \ll \frac{\partial E_0^{SHG}}{\partial z} \quad [1.25]$$

Με την απλοποίηση η εξίσωση Maxwell θα εξαρτάται μόνο από την πρώτη παράγωγο του πλάτους της SHG ως προς την μετατόπιση, καθιστώντας την ευκολότερη να λυθεί. Ύστερα από πράξεις οδηγούμαστε τελικά στην σχέση:

$$\frac{\partial E_0^{SHG}}{\partial z} = A E_0^2 e^{i\Delta k z} \quad [1.26]$$

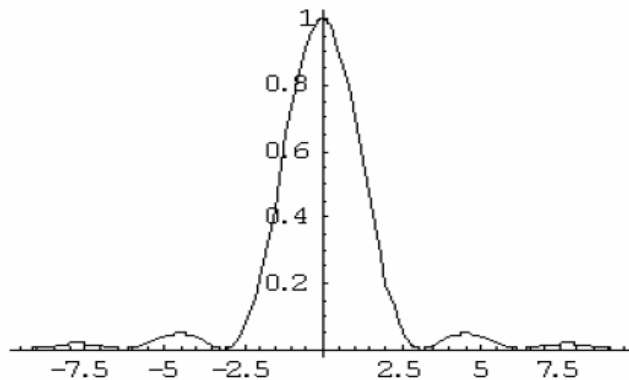
όπου E_0^{SHG} το πλάτος της ακτινοβολίας δεύτερης αρμονικής, E_0 το πλάτος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και Δk το wavevector mismatch. Το Δk στο οποίο και θα εστιάσουμε την προσοχή μας στην συνέχεια, ισούται με την διαφορά του κυματανύσματος της SHG με το διπλάσιο του κυματανύσματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, δηλαδή :

$$\Delta k = k_{SHG} - 2k \quad [1.27]$$

Ολοκληρώνοντας την σχέση 1.26 από 0 έως L παίρνουμε το πλάτος του ηλεκτρικού πεδίου της δεύτερης αρμονικής εντός του μη γραμμικού υλικού. Στην συνέχεια υπολογίζουμε την ένταση της SHG από το διάνυσμα Poynting, καταλήγοντας στην σχέση 1.28:

$$I_{SHG} \sim \text{sinc}^2\left(\frac{\Delta k L}{2}\right) \quad [1.28]$$

Στην 1.28 φανερώνεται η εξάρτηση της έντασης της δεύτερης αρμονικής από το τετράγωνο μιας συνάρτησης sinc που στο όρισμα της περιλαμβάνει το Δk wavevector mismatch. Σχεδιάζοντας την γραφική παράσταση της 1.28, διαπιστώνουμε ότι για $\Delta k = 0$ η ένταση παίρνει την μέγιστη τιμή της. Η συνθήκη αυτή ονομάζεται perfect phase matching και εφόσον αυτή ικανοποιείται, το σήμα της δεύτερης αρμονικής μεγιστοποιείται μιας και το παραγόμενο κύμα διατηρεί μια σταθερή φάση σε σχέση με την προσπίπτουσα δέσμη, με αποτέλεσμα την αποδοτικότερη εξαγωγή ενέργειας από τα προσπίπτοντα κύματα.



Εικόνα 1.8 Γραφική παράσταση της συνάρτησης $\text{sinc}^2(x)$.

Πως επιτυγχάνεται όμως στην πράξη η συνθήκη του perfect phase matching μέσα σε ένα μη γραμμικό υλικό; Αν υποθέσουμε ότι η Η/Μ ακτινοβολία (fundamental) που προσπίπτει στο μέσο έχει μήκος κύματος 1064nm με συχνότητα ω και το παραγόμενο Η/Μ κύμα της SHG έχει μήκος κύματος 532nm με συχνότητα 2ω . Οι αντίστοιχοι κυματάριθμοι προσδιορίζονται από τις σχέσεις:

$$k = \frac{\omega n(\omega)}{c} \quad \text{και} \quad k_{\text{SHG}} = \frac{2\omega n(2\omega)}{c} \quad [1.29]$$

όπου $n(\omega)$ ο δείκτης διάθλασης στα 1064nm, $n(2\omega)$ ο δείκτης διάθλασης στα 532nm και c η ταχύτητα του φωτός. Αντικαθιστώντας τις σχέσεις 1.29 στην συνθήκη για perfect phase matching $\Delta k=0$, καταλήγουμε :

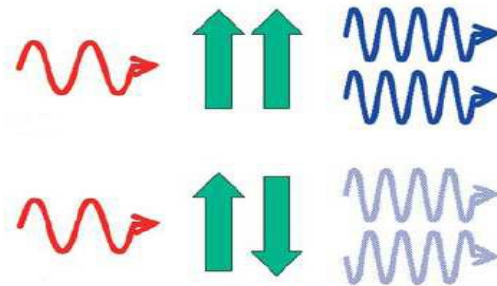
$$n(2\omega) = n(\omega) \quad [1.30]$$

Από την 1.30 παρατηρούμε ότι για να επιτευχθεί η συνθήκη phase matching θα πρέπει ο δείκτης διάθλασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας να “αισθάνεται” τον ίδιο δείκτη διάθλασης που “αισθάνεται” και η ακτινοβολία SHG. Άρα η συνθήκη perfect phase matching συνεπάγεται την συνθήκη refractive index matching και αντιστρόφως. Στα υλικά κανονικής διασποράς (normal dispersion) ο δείκτης διάθλασης αυξάνεται με την αύξηση της συχνότητας και η συνθήκη refractive index matching είναι αδύνατον να επιτευχθεί, αντίθετα αν εκμεταλλευτούμε το φαινόμενο διπλοθλαστικότητας που εμφανίζουν ορισμένα ανισοτροπικά υλικά η συνθήκη 1.30 μπορεί να ικανοποιηθεί.

Στα διπλοθλαστικά υλικά ο δείκτης διάθλασης του υλικού εξαρτάται από την κατεύθυνση πόλωσης της ακτινοβολίας. Αυτό οφείλεται στην ανισοτροπία των δυνάμεων που συγκρατούν τα ηλεκτρόνια ενός υλικού. Για συγκεκριμένη γωνία που σχηματίζει η δέσμη laser με τον οπτικό άξονα ενός κρυστάλλου είναι δυνατόν να επιτευχθεί η συνθήκη refractive index matching, με την συνιστώσα του ηλεκτρικού πεδίου συχνότητας 2ω να προβάλλεται στον γρήγορο άξονα και την συνιστώσα του ηλεκτρικού πεδίου συχνότητας ω στον αργό. Έτσι τα δύο αυτά ηλεκτρικά πεδία θα διαδίδονται με την ίδια ταχύτητα και θα αισθάνονται τον ίδιο δείκτη διάθλασης, επομένως ικανοποιείται η συνθήκη refractive index matching και μπορεί να επιτευχθεί phase matching.

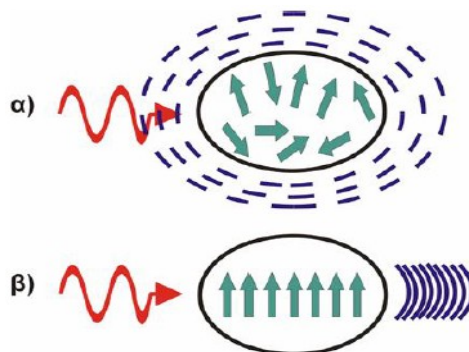
Κεφάλαιο 1 : Θεωρητικό Υπόβαθρο

Τα βιολογικά μόρια που παρουσιάζουν έντονο το φαινόμενο της διπλοθλαστικότητας και παράγουν σήμα SHG είναι η μυοσίνη, το κολλαγόνο και η τουμπουλίνη. Τα μόρια αυτά αποτελούνται από επιμέρους μόρια-δίπολα. Όταν ικανοποιείται η συνθήκη phase matching και έχουμε δύο ατομικά δίπολα παράλληλα μεταξύ τους σε απόσταση μικρότερη από το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, τότε τα δίπολα ταλαντώνονται σε φάση και το ηλεκτρικό πεδίο που παράγεται από το κάθε δίπολο προστίθεται ενισχυτικά στην κατεύθυνση της διεγείρουσας ακτινοβολίας με αποτέλεσμα τη μεγιστοποίηση του σήματος της δεύτερης αρμονικής [6][16]. Αντίθετα, στην περίπτωση που τα δύο δίπολα είναι προσανατολισμένα αντιπαράλληλα το μη γραμμικό σήμα μηδενίζεται εξαιτίας της καταστρεπτικής κυματικής συμβολής (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9 Δύο μη συμμετρικά ατομικά δίπολα τοποθετημένα το ένα δίπλα στο άλλο. Στην περίπτωση που τα δίπολα είναι παράλληλα ευθυγραμμισμένα ταλαντώνονται σε φάση και το ηλεκτρικό πεδίο που παράγεται από το καθένα συμβάλει ενισχυτικά στο σήμα της SHG. Αν είναι τοποθετημένα αντιπαράλληλα τότε συμβάλουν καταστρεπτικά. Τα μπλε βέλη υποδηλώνουν την κυματική αναπαράσταση της δεύτερης αρμονικής.

Δεδομένου ότι τα μόρια μας αποτελούνται από έναν μεγάλο πληθυσμό N ατομικών διπόλων, αν ταλαντώνονται υπό τυχαίες κατευθύνσεις στο χώρο τότε το παραγόμενο σήμα διπλάσιας συχνότητας στην περίπτωση αυτή θα είναι ασύμφωνο και θα διαδίδεται προς όλες τις κατευθύνσεις. Το φαινόμενο ονομάζεται High Rayleigh Scattering (HRS) και συμβαίνει στην περίπτωση όπου τα μόρια που αποτελούν το μέσο δεν χαρακτηρίζονται από κάποιας μορφής οργάνωση στο χώρο. Όταν τα μόρια βρίσκονται παράλληλα μεταξύ τους, εμφανίζουν δηλαδή έναν χωρικό προσανατολισμό, η HRS ακτινοβολία προστίθεται σύμφωνα με αποτέλεσμα την παραγωγή της δεύτερης αρμονικής (SHG) η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή κατευθυντικότητα και ένταση [16] (Εικόνα 1.10).

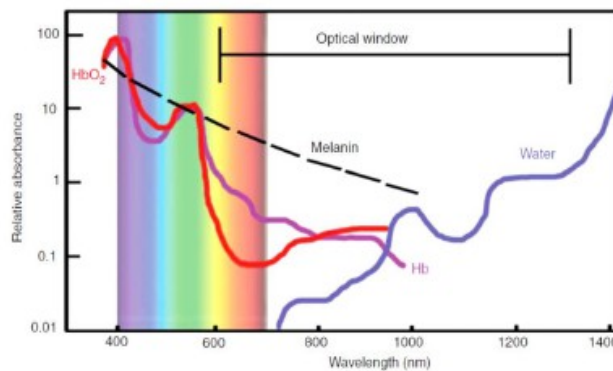


Εικόνα 1.10 : (α) High Rayleigh Scattering (HRS) και (β) δεύτερη αρμονική (SHG) από πληθυσμό N ατομικών διπόλων

1.5 Πλεονεκτήματα Μη Γραμμικής Μικροσκοπίας

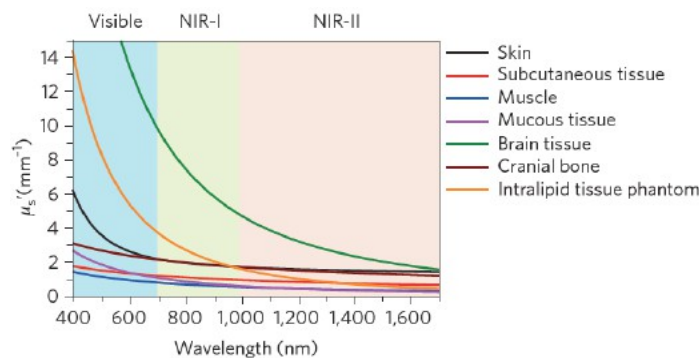
Οι εξελίξεις στην επιστήμη της κυτταρικής και της μοριακής βιολογίας απαιτούν την απεικόνιση κυτταρικών δομών και βιολογικών μορίων σε ζωντανούς οργανισμούς [13]. Για τον σκοπό αυτό, η μη γραμμική μικροσκοπία προσφέρει ένα συνδυασμό πλεονεκτημάτων σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη οπτικής μικροσκοπίας. Αρχικά, στην μη γραμμική μικροσκοπία χρησιμοποιείται κατά κανόνα ακτινοβολία υπέρυθρου μήκους κύματος (~1 μm), έτσι είναι δυνατόν να επιτευχθεί εις βάθος διείσδυση στον ιστό που σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να φτάσει έως και τα 500 μm . Αυτό συμβαίνει για δύο λόγους :

(a) Πρώτον, για τέτοια μήκη κύματος τα κύρια συστατικά που αποτελούν έναν ιστό όπως το νερό, η μελανίνη, η αιμοσφαιρίνη και οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν χαμηλό συντελεστή απορρόφησης. Δηλαδή ο ιστός καθίσταται σχεδόν διαφανής για μια περιοχή μηκών κύματος από 600 έως 1300 περίπου nm. (Εικόνα 1.11)



Εικόνα 1.11 Στο διάγραμμα παρουσιάζεται ο συντελεστής απορρόφησης συναρτήσει του μήκους κύματος. Παρατηρείται ότι για ένα οπτικό παράθυρο 600 με 1300 nm δεν παρατηρείται έντονη απορρόφηση ακτινοβολίας από τα κύρια συστατικά που αποτελούν έναν ιστό.

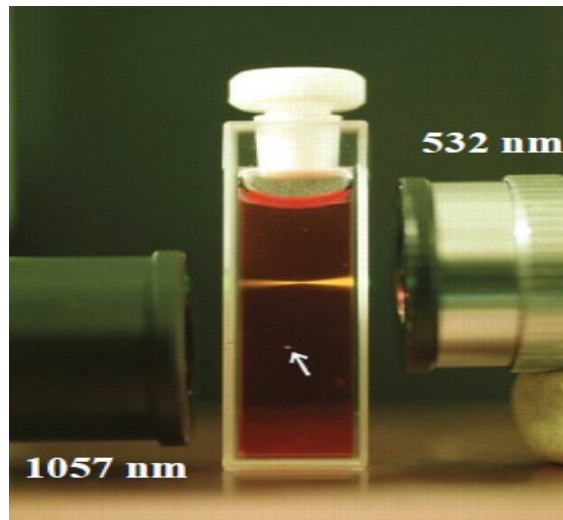
(b) Δεύτερον η υπέρυθη Η/Μ ακτινοβολία υφίσταται μειωμένη ελαστική σκέδαση σε σχέση με τις ορατές συχνότητες. Σύμφωνα με την σκέδαση Rayleigh, η οποία εξαρτάται από το αντίστροφο κλάσμα της τέταρτης δύναμης του μήκους κύματος της ακτινοβολίας, το υπέρυθρο φως σκεδάζεται σχεδόν δέκα φορές λιγότερο σε σύγκριση με το ορατό φως. Στην Εικόνα 1.12 φαίνεται το φάσμα σκέδασης διαφόρων τύπων ιστών, παρατηρείται πως όσο μεγαλώνει το μήκος κύματος της ακτινοβολίας τόσο μικρότερες σκεδάσεις πραγματοποιούνται εντός αυτού.



Εικόνα 1.12 Στο διάγραμμα απεικονίζεται η σκέδαση του φωτός συναρτήσει του μήκους κύματος από διάφορα βιολογικά δείγματα. Παρατηρείται ότι για μήκη κύματος μεγαλύτερα από 700nm η σκέδαση του φωτός μειώνεται δραματικά. <https://pc4b.gr/pdf/biol-403dem/09-mh-grammikh-mikroskopia.pdf>

Κεφάλαιο 1 : Θεωρητικό Υπόβαθρο

Η μη γραμμικότητα των φαινομένων και πιο συγκεκριμένα η εκθετική τους εξάρτηση από την προσπίπτουσα ακτινοβολία έχει ως αποτέλεσμα την περιορισμένη χωρική έκτασή τους. Το μη γραμμικό φαινόμενο θα λάβει χώρα σε σημαντικό βαθμό μόνο στην περιοχή όπου η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας θα είναι αρκετά υψηλή (Εικόνα 1.13). Το γεγονός αυτό μεταφράζεται ως αυξημένη ανάλυση της μεθόδου απεικόνισης που φτάνει μερικές φορές έως τα 500nm. Ωστόσο η δυνατότητα διείσδυσης σε μεγάλο βάθος εντός του ιστού σε συνδυασμό με το μικρό μέγεθος του εστιακού όγκου, μας παρέχουν την δυνατότητα λήψης τρισδιάστατων εικόνων. Με τον τρόπο αυτό είμαστε σε θέση να έχουμε μια πλήρη και ολοκληρωμένη αίσθηση για το πως διατάσσονται οι παρατηρούμενες δομές που μελετάμε στον τρισδιάστατο χώρο.



Εικόνα 1.13 Σύγκριση μονοφωτονικής (532 nm) και διφωτονικής διέγερσης (1057 nm) στο ίδιο μέσο. Παρατηρείται με το βελάκι ο μικρός εστιακός όγκος της μη γραμμικής διέγερσης σε αντίθεση με την μονοφωτονική. Στην περίπτωση της μονοφωτονικής διέγερσης παρατηρείται και έντονο το φαινόμενο απορρόφησης του φωτός. (<https://pc4b.gr/pdf/biol-403dem/09-mh-grammikh-mikroskopia.pdf>)

Ένα από τα συνήθη προβλήματα που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της οπτικής απεικόνισης μικροσκοπικών βιολογικών δειγμάτων είναι το φαινόμενο της φωτοτοξικότητας το οποίο προκαλεί το θάνατο των κυττάρων, πολλές φορές εντός μερικών δευτερολέπτων από την έναρξη της ακτινοβολίας. Στην μη γραμμική μικροσκοπία το παραπάνω πρόβλημα περιορίζεται δραματικά αφού ο εστιακός όγκος έχει πολύ μικρότερες διαστάσεις σε σχέση για παράδειγμα με την μικροσκοπία confocal (Εικόνα 1.13). Έτσι κατά την διάρκεια της τρισδιάστατης σάρωσης του δείγματος δεν υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των εστιακών όγκων με αποτέλεσμα τη μικρότερη δυνατή έκθεση του στην ακτινοβολία και άρα την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας καταστροφής του. Τέλος, σήμα δεύτερης και τρίτης αρμονικής δίνουν συγκεκριμένα βιολογικά μόρια όπως η μυοσίνη, το κολλαγόνο και η τουμπουλίνη. Επομένως παρέχεται έντονο φυσικό ενδογενές contrast χωρίς την ανάγκη χρώσης των δειγμάτων με χρωστικές.

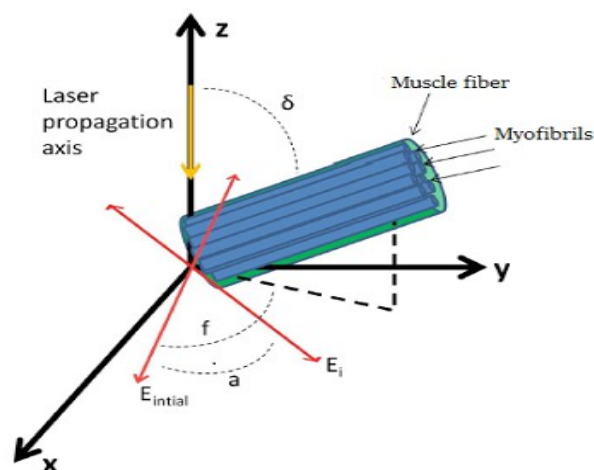
Κάθε μικροσκοπική τεχνική έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της ανάλογα την εφαρμογής της. Συγκεκριμένα η μικροσκοπία SHG κρίθηκε καταλληλότερη τεχνική για την *in vivo* απεικόνιση μορίων μυοσίνης, καθώς αποφεύγεται το φαινόμενο φωτοτοξικότητας και διαθέτει όλα τα πλεονεκτήματα της μη γραμμικής μικροσκοπίας. Από την άλλη δεν πληρούν όλα τα βιολογικά μόρια τις προϋποθέσεις για την παραγωγή σήματος SHG, όπως είδαμε είναι πολύ συγκεκριμένα και το γεγονός αυτό περιορίζει την εφαρμογή της μικροσκοπίας SHG στην μελέτη των βιολογικών δειγμάτων.

1.6 Παραγωγή Δεύτερης Αρμονικής Εξαρτώμενη από την Πόλωση PSHG.

Η μικροσκοπία SHG όπως περιγράφηκε παραπάνω αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την απεικόνιση βιολογικών δειγμάτων. Στις προηγούμενες υποενότητες αναλύθηκαν τόσο τα πλεονεκτήματα της τεχνικής όσο και οι προϋποθέσεις που θα πρέπει να πληρούνται για την παραγωγή δεύτερης αρμονικής.

Το σήμα της SHG που ανιχνεύουμε εξαρτάται από την πόλωση της διεγείρουσας ακτινοβολίας και από τον προσανατολισμό του μορίου που ακτινοβολείται [18]. Η μικροσκοπία PSHG βελτιώνει την δυναμική της μικροσκοπίας SHG εκμεταλλευόμενη την εξάρτηση των σημάτων SHG από την πόλωση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Έτσι οι εικόνες SHG που συλλέγονται κάτω από διαφορετικές πολώσεις προσδίδουν επιπλέον πληροφορίες σχετικά με το υπό εξέταση δείγμα [19]. Πιο συγκεκριμένα με την μικροσκοπία PSHG αποσπώνται ποσοτικές πληροφορίες σχετικά με την μικροσκοπική οργάνωση και τον προσανατολισμό κυττάρων, μορίων μυοσίνης και ινών κολλαγόνου. Μια πρόσφατη δουλειά του εργαστηρίου, στο οποίο εκπονήθηκε και η παρούσα πτυχιακή εργασία, ήταν η χρήση PSHG για την απεικόνιση ινών κολλαγόνου από καρκινικά δείγματα γυναικείου μαστού. Οι ποσοτικές πληροφορίες που αποσπάστηκαν ήταν σε θέση να αξιολογήσουν την κατάσταση του όγκου, να διαφοροποιήσουν κακοήθη από καλοήθη δείγματα ιστού και να διακρίνουν διαφορετικούς βαθμούς καρκίνου [20].

Για να γίνει κατανοητή στην συνέχεια η εξίσωση που περιγράφει την ανιχνεύσιμη ένταση της SHG, τίθεται απαραίτητος ο προσδιορισμός των συντεταγμένων του μορίου και του εργαστηρίου στον τρισδιάστατο χώρο. Στην Εικόνα 1.14 παρουσιάζεται το σύστημα συντεταγμένων του εργαστηρίου XYZ. Το Η/Μ κύμα διαδίδεται στον Z άξονα επομένως το διάνυσμα της πόλωσης βρίσκεται στο XY επίπεδο και μπορεί να μεταβάλλεται κατά μια γωνία α σε σχέση με την αρχική πόλωση. Ο άξονας συμμετρίας του μορίου σχηματίζει γωνία δ από τον Z άξονα του εργαστηρίου. Προβάλλουμε το μόριο στο XY επίπεδο του εργαστηρίου και ορίζουμε σαν f την γωνία που σχηματίζει η προβολή του μορίου από το αρχικό διάνυσμα της προσπίπτουσας πόλωσης.



Εικόνα 1.14 Απεικόνιση των συστημάτων αναφοράς εργαστηρίου και μορίου.

Κεφάλαιο 1 : Θεωρητικό Υπόβαθρο

Στην περίπτωση που τα μόρια που μελετάμε εμφανίζουν κυλινδρική συμμετρία, το σήμα SHG που ανιχνεύουμε περιγράφεται από την σχέση :

$$I_{\text{SHG}} \sim E \{ \sin^2 2(a-f) + [\sin^2(a-f) + B\cos^2(a-f)]^2 \} \quad [1.31]$$

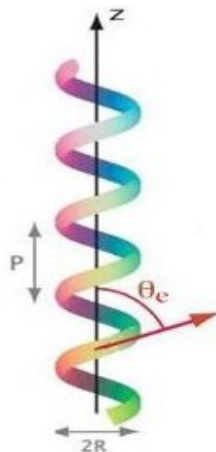
όπου E ένας πολλαπλασιαστικός παράγοντας και $(a-f)$ η γωνία που σχηματίζει η προβολή του μορίου στο xy επίπεδο με το διάνυσμα πόλωσης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο παράγοντας B ονομάζεται ανισότροπη παράμετρος και ορίζεται ως το πηλίκο: του ηλεκτρικού πεδίου της SHG που ανιχνεύουμε όταν η πόλωση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας είναι παράλληλη στον z άξονα συμμετρίας του μορίου προς το ηλεκτρικό πεδίο της SHG που ανιχνεύουμε όταν η πόλωση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας είναι κάθετη στον z . Η ανισότροπη παράμετρος περιγράφεται και από την σχέση [20] :

$$B = \frac{E_{//z}^{2\omega}}{E_{\perp z}^{2\omega}} = \frac{\chi_{33}}{\chi_{31}} \sin^2(\delta) + 3\cos^2(\delta) \quad [1.32]$$

όπου χ_{33} και χ_{15} είναι τα μη μηδενικά και ανεξάρτητα στοιχεία του τανυστή της ηλεκτρικής επιδεκτικότητας δεύτερης τάξης $\chi^{(2)}$. Όπως αναφέρθηκε και στην υποενότητα 1.4.1, η ηλεκτρική επιδεκτικότητα $\chi^{(2)}$ είναι ένας τανυστής και στο 3-D χώρο παριστάνεται από έναν πίνακα 3 επί 9 στοιχείων. Το πηλίκο χ_{33}/χ_{15} καθώς και η γωνία f θα προσδιοριστούν μέσα από τα πειραματικά μας δεδομένα. Στην πλειοψηφία των μετρήσεων μας η γωνία $\delta = \pi/2$ και τότε η ανισότροπη παράμετρος

$$B = \frac{\chi_{33}}{\chi_{31}} .$$

Σε μικροσκοπικό επίπεδο μια έλικα μωσίνης αποτελείται από επιμέρους μόρια-δίπολα, τα οποία σχηματίζουν γωνία θ_e με τον κύριο άξονα της (Εικόνα 1.15).



Εικόνα 1.15 Σχηματική απεικόνιση της διαμέτρου $2R$ της έλικας, του βήματός της P και της ενεργούς διεύθυνσής θ_e από την οποία λαμβάνουμε το ισχυρότερο σήμα δεύτερης αρμονικής.

Κεφάλαιο 1 : Θεωρητικό Υπόβαθρο

Η γωνία θ_e ονομάζεται ενεργός διεύθυνση της SHG, προσδιορίζεται από την σχέση 1.33 και μας δείχνει την γωνία απ' την οποία παίρνουμε το μεγαλύτερο μέρος του σήματος SHG ως προς τον z του μορίου.

$$\cos^2(\theta_e) = \frac{B}{2+B} \quad [1.33]$$

Θεωρητικά η γωνία θ που σχηματίζουν τα επιμέρους μόρια-δίπολα με τον κύριο άξονα του μορίου δίνεται από την σχέση:

$$\tan(\theta) = \frac{2\pi R}{P} \quad [1.34]$$

όπου R η ακτίνα της έλικας και P το βήμα της. Μέσα από την σχέση 1.33 και τον υπολογισμό της ανισότροπης παραμέτρου B μπορούμε να αποκτήσουμε ποσοτική πληροφορία για το μόριο που εξετάζουμε προσδιορίζοντας πειραματικά την γωνία θ_e . Περιμένουμε η θ_e να είναι μια καλή προσέγγιση της γωνίας θ του μορίου.

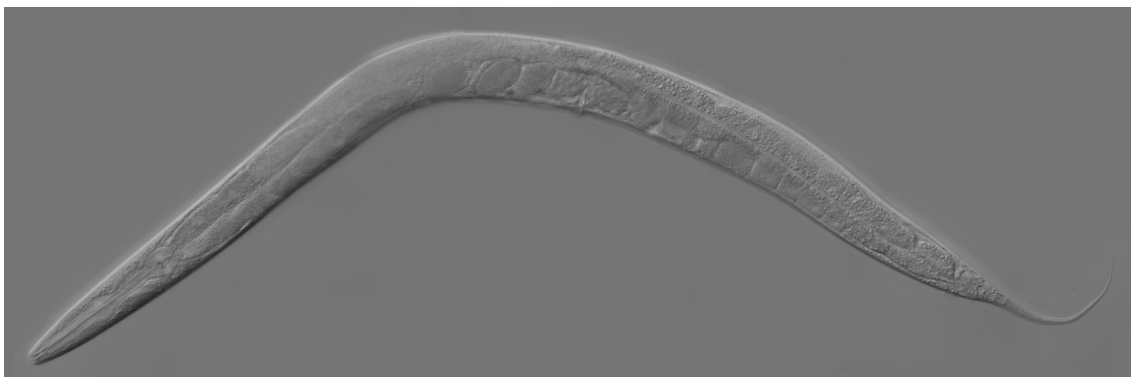
Κεφάλαιο 2

Στο κεφάλαιο αυτό παρατίθενται βασικές πληροφορίες για το βιολογικό δείγμα *C.elegans* καθώς και για την σύνθεση των ραβδωτών του μυών. Ιδιαίτερη προσοχή θα δοθεί στο μόριο μυοσίνης, το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή SHG.

2.1 Βιολογικό Δείγμα: *Caenorhabditis elegans*

Ο βιολογικός οργανισμός που μελετήθηκε σε αυτήν την εργασία είναι ο νηματώδης *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*). Ο νηματώδης *C. elegans* είναι ένας διάφανος μη παρασιτικός οργανισμός, μήκους περίπου 1mm και διαμέτρου 80μm που ζει στο χώμα. Είναι ερμαφρόδιτος με διάρκεια ζωής 2 εβδομάδων και ιδιαίτερα ανθεκτικός σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών και έλλειψης τροφής. Ο νηματώδης *C. elegans* καθίστατε ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα δείγματα στις βιολογικές μελέτες εξαιτίας των παρακάτω χαρακτηριστικών του [21] :

- Διαθέτει απλή δομή καθώς δεν έχει οστά, καρδιά ή κυκλοφορικό σύστημα και έτσι με μικροσκοπία μπορεί εύκολα να μελετηθεί η ανατομία και η ανάπτυξή του.
- Παράγει πάνω από χίλια αυγά την ημέρα και η απλότητα του αναπαραγωγικού του κύκλου επιτρέπει την εύκολη εφαρμογή γενετικών αναλύσεων.
- Παρουσιάζει γονίδια και μοριακές δομές που μοιάζουν με του ανθρώπου και για αυτό χρησιμοποιείται ως πρότυπο δείγμα για την μελέτη ανθρώπινων ασθενειών όπως νευρολογικών διαταραχών, καρδιακών παθήσεων και νεφρικών νόσων.
- Είναι εύκολη και φθηνή η καλλιέργεια του στο εργαστήριο.



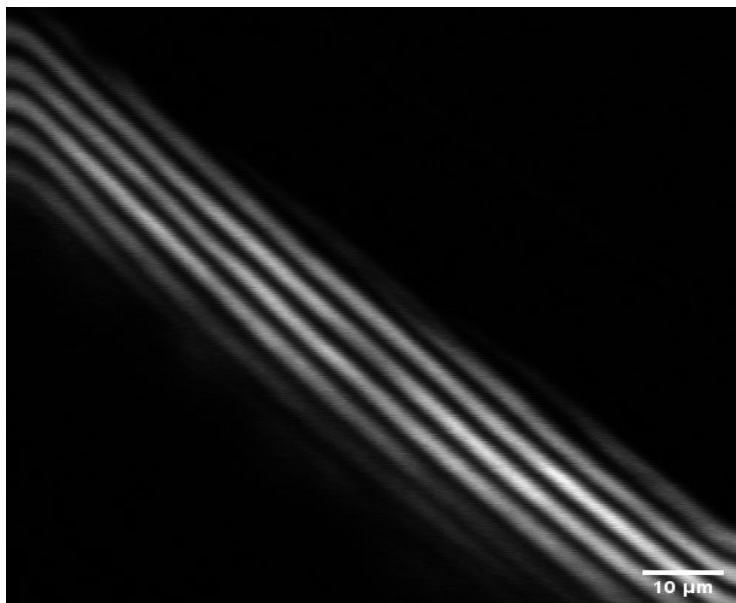
Εικόνα 2.1 Απεικόνιση ενήλικου *C. elegans*.

Ο *C. elegans* είναι ο πρώτος πολυκυτταρικός οργανισμός για τον οποίον καθορίστηκαν πλήρως οι σειρές των κυτταρικών διαιρέσεων από το πρώτο κύτταρο (γονιμοποιημένο ωάριο) έως και τα 959 του ενήλικου ατόμου [21]. Είναι ένας πολύ καλά μελετημένος οργανισμός σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Στην εργασία μας μελετήσαμε *C. elegans* ηλικίας 1 ημέρας, 6 και 9 ημερών αντίστοιχα. Χρησιμοποιήσαμε μικροσκοπία PSHG για να απεικονίσουμε το μυϊκό τους σύστημα και να αποσπάσουμε ποσοτική πληροφορία από τα μόρια μυοσίνης. Τα δείγματα μας τα παρείχε ο υποψήφιος διδάκτορας Κώστας Κουνάκης από το εργαστήριο του Καθ. Ν. Ταβερναράκη στο IMBB.

2.2 Ανατομία Ραβδωτών Μυών *C. elegans*

Τα *C. elegans* αποτελούν ένα ικανοποιητικό μοντέλο για την μελέτη της λειτουργίας των μυών σε μικροσκοπικό επίπεδο καθώς διαθέτουν μεγάλα σε μέγεθος σαρκομερή και εμφανίζουν δύο είδη μυών, ραβδωτούς και μη-ραβδωτούς. Οι ραβδωτοί μύες αποτελούνται από πολλαπλά σαρκομερή και είναι παρόμοιοι με τους σκελετικούς μυς του ανθρώπου ενώ οι μη-ραβδωτοί αποτελούνται από ένα σαρκομερές και μοιάζουν με τα μυϊκά κύτταρα της καρδιάς των θηλαστικών [22]. Στην έρευνα μας μελετήθηκαν οι ραβδωτοί μύες και συγκεκριμένα επικεντρωθήκαμε στην απόσπαση ποσοτικής πληροφορίας από την δομή των μορίων μυοσίνης μέσω της μικροσκοπίας PSHG. Τα μόρια μυοσίνης όπως θα φανεί και στην συνέχεια είναι βασικό δομικό στοιχείο του σαρκομερούς.

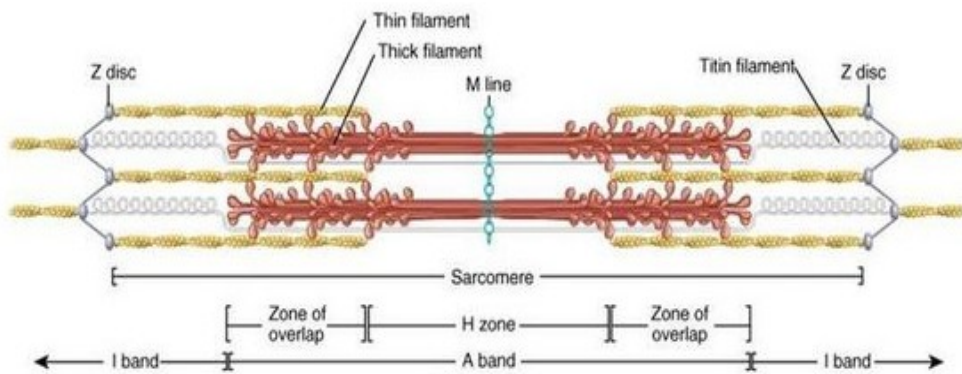
Τα σαρκομερή αποτελούν την σημαντικότερη λειτουργική μονάδα των μυϊκών κυττάρων καθώς σε αυτά οφείλονται οι μηχανικές διεργασίες της διεγερσιμότητας, της συσταλτικότητας και της ελαστικότητας των μυών [22]. Στους ραβδωτούς μυς των *C. elegans* τα σαρκομερή επαναλαμβάνονται διαδοχικά και προσδίδουν στον μυ “ραβδωτή” μορφή (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2 Απεικονίζεται ένα τμήμα των ραβδωτών μυών του *C. elegans* το οποίο βρίσκεται κοντά στην περιοχή του φάρυγγα. Η απεικόνιση έγινε στο εργαστήριό μας με την τεχνική της μικροσκοπίας PSHG και διακρίνεται η “ραβδωτή” μορφή τους.

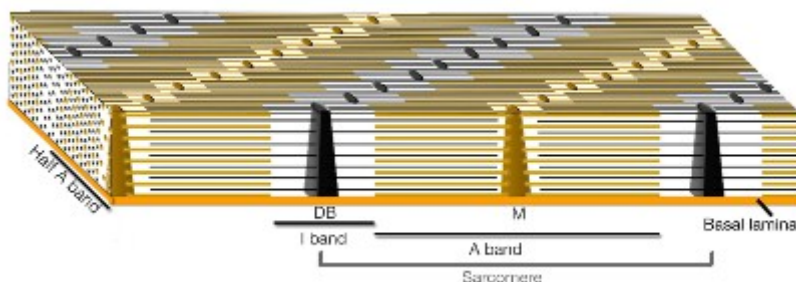
Ένα σαρκομερές αποτελείται από ζώνες διαφορετικής σύστασης όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.3:

- Η A-band είναι μια ανισότροπη περιοχή στο κέντρο του σαρκομερούς και αποτελείται από αλληλοκαλυπτόμενα και διατεταγμένα με κατάλληλη συμμετρία thick και thin filaments. Τα thick filaments είναι παχιά ινίδια που αποτελούνται από το μόριο της μυοσίνης ενώ τα thin filaments συντίθενται από λεπτά ινίδια ακτίνης. Μέσα στην A-band υπάρχει μια μικρή περιοχή που ονομάζεται H-band και συντίθεται μόνο από thick filaments [23,24]. Η H-band εξαιτίας των thick ινιδίων διατηρείται σταθερή κατά την άσκηση μηχανικών δυνάμεων στον μυ.
- Οι Z-lines οριοθετούν τις περιοχές μεταξύ γειτονικών σαρκομερών. Στην μικροσκοπία εμφανίζονται σαν μικρές μαύρες γραμμές και έτσι είναι εύκολο να τις διακρίνουμε. Οι Z-lines περιέχονται μέσα στις I-bands, οι οποίες αποτελούνται αποκλειστικά από μόρια ακτίνης και συνδέουν το ένα σαρκομερές με το άλλο [24]. Σήμα δεύτερης αρμονικής δίνουν μόνο τα μόρια μυοσίνης για αυτό και οι I-bands φαίνονται σαν σκοτεινές γραμμές με την μικροσκοπία SHG (Εικόνα 2.2) .



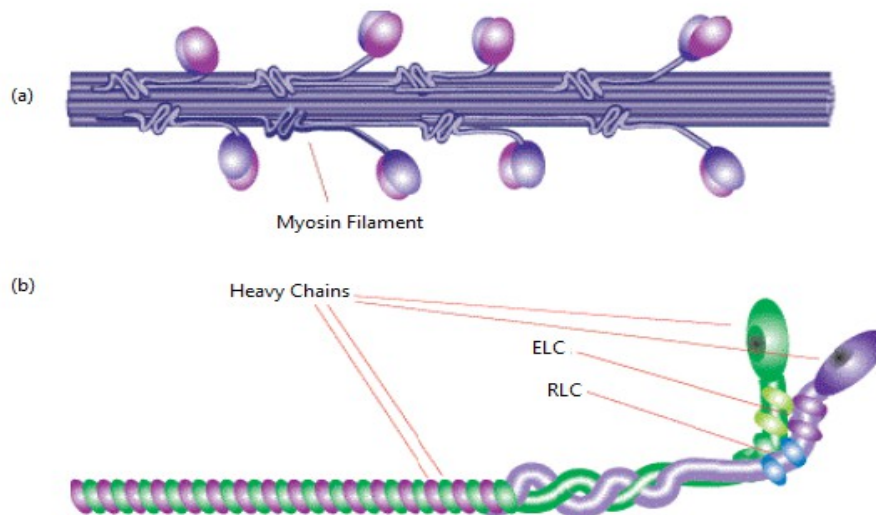
Εικόνα 2.3 Σχηματική αναπαράσταση του σαρκομερούς και των αντίστοιχων ζωνών του. Με κόκκινο χρώμα αναπαριστώνται τα thick filament μυοσίνης ενώ με κίτρινο τα thin filament ακτίνης.

Στην Εικόνα 2.4 αναπαριστάτε 3-D ο αυλακωτός μυς με τα διαδοχικά επαναλαμβανόμενα σαρκομερή του. Με μαύρο συμβολίζονται τα Z-lines τα οποία μας βοηθούν να ξεχωρίσουμε το ένα σαρκομερές από το άλλο και να μπορέσουμε τελικά να δούμε πως εκτείνονται στον μύ.



Εικόνα 2.4 Διαδοχικά επαναλαμβανόμενα σαρκομερή αποτελούν τους ραβδωτούς μυς των C.elegans. (<https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/musclesomatic/MusSomaticframeset.html>)

Το ενδιαφέρον μας βρίσκεται στα thick filaments. Τα thick filaments είναι χοντρές ίνες μήκους 10 μm , διαμέτρου από 33.4nm έως 1nm και εμφανίζουν προσεγγιστικά μια κυλινδρική συμμετρία εντός του σαρκομερούς κατά μήκος του κύριου άξονά τους. Αποτελούνται από μόρια μυοσίνης και σχηματίζουν σκληρές και άκαμπτες δομές. Τα μόρια μυοσίνης είναι αυτά που δίνουν σήμα δεύτερης αρμονικής και μας παρέχουν την δυνατότητα απεικόνισης των ραβδωτών μυών. Κάθε μόριο μυοσίνης συντίθεται από δύο μυϊκές πρωτεΐνες, τις heavy chains, οι οποίες αναδιπλώνονται και σχηματίζουν μια διπλή έλικα (Εικόνα 2.5).



Εικόνα 2.5 Σχηματικές αναπαραστάσεις : (a) Thick filaments τα οποία σχηματίζουν κυλινδρική συμμετρία κατά μήκος του κύριου άξονα τους, προεξέχουν οι κεφαλές των μορίων μυοσίνης. (b) Το μόριο μυοσίνης αποτελείται από δύο διπλές έλικες HC, κάθε heavy chain (HC) διαθέτει κεφαλή, light chain (LC) η οποία βρίσκεται στην περιοχή κάτω από την κεφαλή και ουρά. (<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/structural-proteins/myosin.html>)

2.3 Μυοσίνη και Γήρανση

Η γήρανση είναι άμεσα συνδεδεμένη με την σταδιακή απώλεια μυϊκής μάζας και δύναμης του μυοσκελετικού συστήματος του ανθρώπου, βιολογικά η επίδραση της γήρανσης στους μύς ονομάζεται σαρκοπενία. Το σύνδρομο της σαρκοπενίας [25] σχετίζεται με την ηλικία και κάνει την εμφάνιση της σε υγιείς ενήλικες άνω των 50 ετών, ωστόσο αποτελεί μεγάλο κίνδυνο για σωματική αναπηρία εξαιτίας της σταδιακής απώλειας μυών [26]. Σε μικροσκοπική κλίμακα τα παθολογικά αίτια της σαρκοπενίας οφείλονται σε αλλαγές τόσο στην σύσταση όσο και στην λειτουργία μορίων και πρωτεϊνών που αποτελούν δομικά στοιχεία του σαρκομερούς. Βιοχημικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι το μόριο της μυοσίνης που μελετάμε υφίσταται μοριακές αλλαγές με το πέρασμα των χρόνων, συμβάλλοντας έτσι στην εξέλιξη του συνδρόμου [26]. Βασισμένοι στην παραπάνω πληροφορία, η μελέτη μας στοχεύει μέσω της μικροσκοπίας PSHG να αποσπαστεί ποσοτική πληροφορία για τις αλλαγές που υφίσταται η δομή του μορίου μυοσίνης των *C.elegans* κατά την γήρανση.

2.4 Προετοιμασία δείγματος

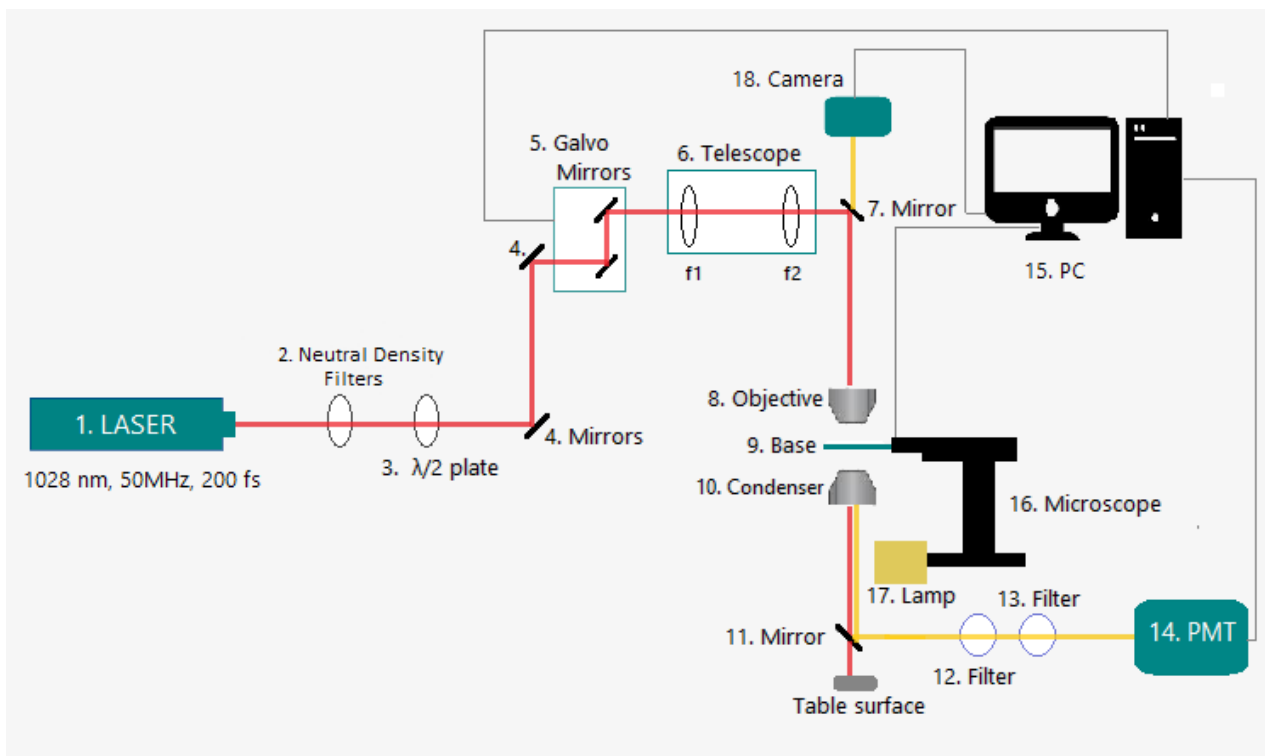
Τα βιολογικά δείγματα που χρησιμοποιήσαμε ήταν *C.elegans* wild type. Αναπτύχθηκαν σε πιάτα NGM (Nematode Growth Medium) όπου τρέφονταν με βακτήρια στελέχους OP50 της *E.coli* και ήταν τοποθετημένα σε θάλαμο 20°C. Τα δείγματα μεταφέρονταν ανά δύο μέρες σε νέα πιάτα με OP50 τροφή μέχρι τη μέρα της παρατήρησης. Στην έρευνα μας μελετήθηκαν *C.elegans* 1 ημέρας (νέα), 6 ημερών και 9 ημερών (γέρικά). Πρίν από κάθε παρατήρηση στα δείγματα χορηγήθηκε μίγμα αναισθητικού με τελικό όγκο 25 μL (12.5 μL λεβαμιζόλη 20 mM, 12.5 μL αζίδιο του νατρίου 200 mM). Η λεβαμιζόλη παραλύει τα ζώα επεμβαίνοντας στις νευρομυϊκές συνάψεις, ενώ το αζίδιο του νατρίου είναι ένας ισχυρός αναστολέας της αναπνευστικής αλυσίδας με μεγάλη τοξικότητα, όχι όμως θανατηφόρο για το δείγμα. Το δείγμα εισέρχεται σε κατάσταση νάρκωσης και παραμένει ζωντανό για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η παραπάνω διαδικασία σε συνδυασμό με την μικροσκοπία PSHG μας δίνουν την δυνατότητα για *in vivo* απεικόνιση των νηματωδών *C.elegans*.

Κεφάλαιο 3

Στο κεφάλαιο αυτό θα παρουσιαστεί η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε καθώς και η διαδικασία που προηγήθηκε για την λήψη των πειραματικών μας μετρήσεων. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Laser (IESL) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (FORTH) στο εργαστήριο μη-γραμμικής μικροσκοπίας, υπεύθυνος του οποίου είναι ο Δρ. Γιώργος Φιλίπιδης.

3.1 Πειραματική Διάταξη

Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζεται η πειραματική μας διάταξη η οποία είναι κατασκευασμένη πάνω σε αντικραδασμικό οπτικό τραπέζι.



Εικόνα 3.1 Προσομοίωση πειραματικής διάταξης.

1. Laser : Ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε διοδικά αντλούμενο παλμικό Ytterbium-based femtosecond laser. Η ισχύς της δέσμης στην έξοδο του laser είναι περίπου 780 mW και η χρονική διάρκεια του παλμού κυμαίνεται από 180 έως 200 fs. Η συχνότητα του παλμού είναι 50 MHz. Το μήκος κύματος της ακτινοβολίας είναι $\lambda \sim 1028$ nm. Η δέση κατά την έξοδο του laser είναι γραμμικά πολωμένη.

Κεφάλαιο 3 : Πειραματική Διάταξη και Διαδικασία

2. Neutral Density Filters: Χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα φίλτρα με τα οποία μειώσαμε την ισχύ της δέσμης από τα 780 mW στα ~ 290 mW.

3. Plate $\lambda/2$: Το πλακίδιο $\lambda/2$ χρησιμοποιήθηκε για να στρέφει το διάνυσμα πόλωσης της Η/Μ ακτινοβολίας του laser. Πιο συγκεκριμένα, προβάλλει τις συνιστώσες του ηλεκτρικού πεδίου σε έναν ταχύ και έναν αργό άξονα εισάγοντας διαφορά φάσης π μεταξύ των συνιστωσών του. Έτσι αν γραμμικά πολωμένο φως πέσει υπό γωνία θ στον οπτικό άξονα του πλακιδίου $\lambda/2$, θα εξέλθει γραμμικά πολωμένο κατά μια γωνία 2θ ως προς το αρχικό επίπεδο πόλωσής του.

4. Κάτοπτρα : Χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα διατεταγμένα silver coated κάτοπτρα με σκοπό να οδηγηθεί η δέσμη στην είσοδο του μικροσκοπίου. Τα συγκεκριμένα κάτοπτρα έχουν ανακλαστικότητα 99.9% και αυτό σημαίνει πως δεν έχουμε απώλειες στην ένταση της δέσμης κατά την διάδοση της.

5. Galvo mirrors : Ακολουθεί ένα σύστημα γαλβανομετρικών κατόπτρων silver coated τα οποία είναι συνδεδεμένα με τον κεντρικό υπολογιστή. Μέσω του προγράμματος LabView μας δίνεται η δυνατότητα να σαρώνουμε την δέσμη στο X-Y επίπεδο του δείγματος.

6. Telescope : Το τηλεσκοπικό σύστημα αποτελείται από δυο συγκλίνοντες φακούς. Η δέσμη περνώντας μέσα από αυτό αυξάνει την διάμετρό της έτσι ώστε να καλύπτει ακριβώς το άνοιγμα του αντικειμενικού φακού {8}, πράγμα απαραίτητο για την σωστή λειτουργία του τελευταίου.

7. Mirror : Κάτοπτρο silver coated οδηγεί την δέσμη στον αντικειμενικό φακό.

8. Objective : Ο αντικειμενικός φακός εστιάζει την θεμελιώδη δέσμη στο δείγμα. Στα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε αντικειμενικό φακό με μεγέθυνση $32\times$ και αριθμητικό άνοιγμα NA 0.85.

9. Base : Το δείγμα μας τοποθετήθηκε πάνω σε μια μηχανικά ελεγχόμενη βάση με την δυνατότητα σάρωσης στο x-y-z. Στην πραγματικότητα το σύστημα μας αποτελείται από τρεις μηχανικές βάσεις μία για κάθε επίπεδο μετακίνησης. Η βάση είναι συνδεδεμένη με τον υπολογιστή και μέσω ενός λογισμικού συστήματος μας επιτρέπεται να μετακινούμε κατάλληλα τα τρία αυτά επίπεδα σαρώνοντας χωρικά το δείγμα.

10. Condenser : Ο συγκεντρωτικός φακός συλλέγει το σήμα της SHG και το οδηγεί σαν παράλληλη δέσμη στο κάτοπτρο {11}. Στα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε συγκεντρωτικό φακό με μεγέθυνση $40\times$ και αριθμητικό άνοιγμα NA 0.75.

11. Mirror : Κάτοπτρο με επίστρωση αλουμινίου τοποθετημένο σε μετακινούμενη βάση ώστε να επιτρέπει την διέλευση του φωτός της λάμπας του μικροσκοπίου {17}.

12. Short Pass filter : Πριν τον φωτοπολλαπλασιαστή {14} τοποθετήσαμε ένα φίλτρο που επιτρέπει την διέλευση μηκών κύματος μικρότερων των 700nm αποκόπτοντας την θεμελιώδη δέσμη.

13. Bandpass filter : Στην συνέχεια τοποθετήσαμε ένα δεύτερο interference bandpass φίλτρο το οποίο απομονώνει το σήμα της SHG από πιθανό σήμα διφωτονικά διεγερόμενου φθορισμού, καθώς επιτρέπει την διέλευση μηκών κύματος $(514 \pm 1.5) \text{ nm}$.

14. Φωτοπολλαπλασιαστής (PMT) : Η δέσμη μας τελικά καταλήγει στον PMT. Ο PMT που χρησιμοποιήσαμε είχε μεγάλη απόδοση στο ορατό φάσμα και μικρή απόδοση για μήκη κύματος μεγαλύτερα από 800nm αποκόποντας αποτελεσματικά τον θόρυβο λόγω laser. Ο PMT συνδέεται με τον υπολογιστή και έτσι το ρεύμα που δημιουργείται εντός του μετατρέπεται σε ένδειξη τάσης.

15. Υπολογιστής (PC) : Στον υπολογιστή συνδέονται ο φωτοπολλαπλασιαστής {14}, η βάση {9}, η κάμερα {18} και οι galvo mirrors {5}. Το πρόγραμμα Labview που είναι εγκατεστημένο στον υπολογιστή μας επιτρέπει να κινούμε την βάση {9} στο x-y-z . Ενεργοποιώντας το αντίστοιχο πρόγραμμα για τους galvo mirrors η δέσμη σκανάρει το δείγμα μας στο επίπεδο που ορίσαμε. Το φωτεινό σήμα που προκύπτει από το ακτινοβολούμενο υλικό συλλέγεται τελικά από τον PMT (αφού περάσει πρώτα από τα κατάλληλα φίλτρα) και μέσω μιας πλατφόρμας επικοινωνίας με το PC η φωτεινή ισχύς μετατρέπεται σε τάση. Με την κάμερα {18} που είναι και αυτή συνδεδεμένη με τον υπολογιστή παρατηρούμε διαρκώς την ακτινοβολία του υλικού κατά την διάρκεια του πειράματος, επίσης μας παρέχεται η δυνατότητα λήψης φωτογραφιών βοηθώντας στην καλύτερη ερμηνεία και επεξεργασία των δεδομένων σύρωσης.

16. Μικροσκόπιο : Ειδικά διαμορφωμένο ορθό μικροσκόπιο (Nikon Eclipse ME600D)

17. Λάμπα μικροσκοπίου : Ο απαιτούμενος φωτισμός για τη σωστή λειτουργία της κάμερας {18} παρέχεται από τη λυχνία πυρακτώσεως του μικροσκοπίου.

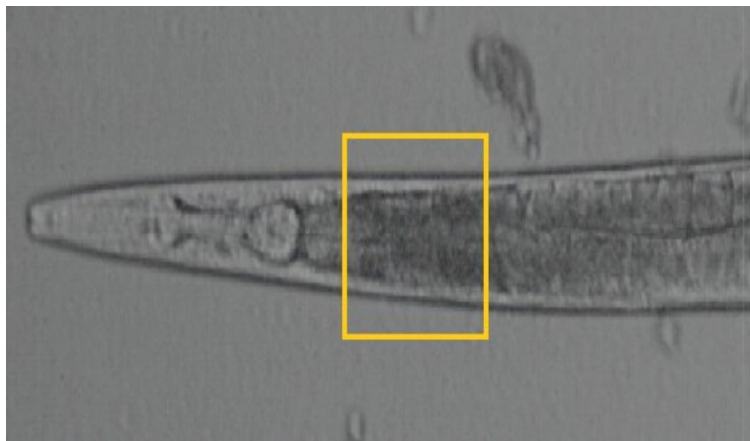
18. Κάμερα : Η κάμερα της διάταξης είναι μία CCD Camera PixeLink, συνδέεται με τον υπολογιστή {15} μέσω κατάλληλου λογισμικού και είναι υπεύθυνη για τη λήψη και αποθήκευση εικόνας με τη μεγέθυνση του αντικειμενικού φακού {8}. Έτσι, παρέχεται η δυνατότητα παρακολούθησης και φωτογράφισης του σημείου του δείγματος απ' το οποίο παράγεται το μη γραμμικό σήμα.

3.2 Πειραματική Διαδικασία

Σημαντική προϋπόθεση για να ισχύει η ανάλυση που προηγήθηκε στο υποκεφάλαιο 1.6 είναι η κάθετη πτώση της δέσμης του laser στην βάση μας. Για την ευθυγράμμιση του συστήματος, κάτοπτρα τοποθετήθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε η δέσμη να πέφτει κάθετα στο δείγμα. Υπενθυμίζουμε ότι στην σχέση 1.33 η διεύθυνση διάδοσης της δέσμης είναι στον z άξονα, το διάνυσμα της πόλωσης στο x-y επίπεδο του δείγματος και η γωνία δ που σχηματίζεται μεταξύ του z άξονα του εργαστηρίου και του κύριου άξονα του μορίου είναι 90° .

Η πειραματική διαδικασία ξεκινάει εντοπίζοντας τα δείγματα μέσω της κάμερας {18} και της λάμπας του μικροσκοπίου {17}. Με την κινούμενη βάση σαρώνουμε χωρικά το δείγμα καταγράφοντας ένα προς ένα τα *C.elegans* και τις χωρικές συντεταγμένες τους. Η περιοχή που μελετήθηκε (Εικόνα 3.3) για όλα τα δείγματα ήταν λίγο πιο κάτω από τον φάρυγγα δεδομένου ότι στην περιοχή αυτή υπάρχει μεγάλη πυκνότητα ραβδωτών μυών. Όσον αφορά την επιλογή των δειγμάτων να σημειωθεί ότι δείγματα στα οποία παρατηρήθηκε κίνηση κατά την διάρκεια της ακτινοβολήσής τους ή συσπάσεις των μυών τους δεν συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη. Επιπλέον απορρίφθηκαν από περαιτέρω ανάλυση και δείγματα στα οποία παρατηρήθηκαν διακυμάνσεις στην ισχύ του λέιζερ κατά την λήψη των μετρήσεων.

Κεφάλαιο 3 : Πειραματική Διάταξη και Διαδικασία



Εικόνα 3.3 Απεικόνιση *C.elegans* μέσω της χρήσης κάμερας και της λάμπας μικροσκοπίου. Με το κίτρινο πλαίσιο επισημαίνεται η κοινή περιοχή ακτινοβολήσης όλων των δειγμάτων. Η εικόνα λήφθηκε κατά την πειραματική μας μελέτη στο εργαστήριο μη-γραμμικής μικροσκοπίας IESL.

Αφού εντοπίσαμε τα δείγματα είμαστε σε θέση να ξεκινήσουμε την ακτινοβολήση. Κλείνουμε την λάμπα {17} και οποιαδήποτε άλλη πηγή φωτός στο εργαστήριο και ανοίγουμε το Laser. Η ενέργεια ανά παλμό της δέσμης του Laser στην περιοχή μελέτης του δείγματος είναι 0,8nJ. Εστιάζουμε σε ένα δείγμα δίνοντας στο λογισμικό που μετακινεί την βάση τις αντίστοιχες χωρικές συντεταγμένες του. Πλέον παρατηρούμε το δείγμα μέσα από την εικόνα της δεύτερης αρμονικής που σχηματίζεται στο περιβάλλον Labview του υπολογιστή {15}.

Ο τρόπος με τον οποίο σχηματίζεται η εικόνα είναι ο εξής: μέσω των galvo mirrors η δέσμη σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος με μια σταθερή ταχύτητα, ο PMT {14} έχει την δυνατότητα να καταγράφει τιμές της SHG ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Πιο συγκεκριμένα, βάζοντας σταθερή τάση στους galvo mirrors 1V (το οποίο αντιστοιχεί σε μια περιοχή σάρωσης της δέσμης 90x90 μm) το χρονικό διάστημα κατά το οποίο ο PMT καταγράφει την τιμή της SHG ρυθμίζεται έτσι ώστε σε κάθε γραμμή σάρωσης να γίνονται 500 μετρήσεις. Όταν τελειώσει η καταγραφή του σήματος SHG από την πρώτη γραμμή σάρωσης η δέσμη μετακινείται κατά 0,18 μm (90/500 μm) (τόση είναι και η χωρική απόσταση μεταξύ των δύο μετρήσεων του PMT για μια γραμμή σάρωσης). Η διαδικασία της σάρωσης τελειώνει όταν η δέσμη σαρώσει όλη την επιθυμητή επιφάνεια. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται ένας δισδιάστατος πίνακας 500x500 στοιχείων όπου κάθε στοιχείο αντιστοιχεί σε ένα σημείο της επιφάνειας που σαρώθηκε, ενώ η τιμή του κάθε σημείου αντιστοιχεί στην τιμή που μέτρησε ο PMT. Έτσι ολοκληρώνεται η πρώτη μας μέτρηση, σαρώνοντας την επιφάνεια που μελετάμε και λαμβάνοντας τις τιμές έντασης της SHG για κάθε ένα σημείο.

Οι μετρήσεις συνεχίζονται στρέφοντας το πλακίδιο $\lambda/2$ {3} από 0° έως 90° με βήμα 5°, καταγράφοντας για κάθε μέτρηση μια νέα εικόνα. Η διαδικασία ολοκληρώνεται όταν το πλακίδιο $\lambda/2$ έχει στραφεί κατά 90°, έχοντας συλλέξει 18 στο σύνολο εικόνες. Στρέφοντας το πλακίδιο $\lambda/2$ από 0°-90° μοίρες μεταβάλλουμε το διάνυσμα πόλωσης κατά 180°, όσο είναι δηλαδή και η περίοδος της 1.31. Η παραπάνω διαδικασία αποτελεί μια πλήρη σειρά μετρήσεων PSHG για την περιοχή του δείγματος που μελετάμε.

Για να έχουμε μια εικόνα σχετικά με το πως μεταβάλλεται το διάνυσμα πόλωσης της H/M ακτινοβολίας στο επίπεδο του δείγματος, προηγήθηκε ένα πείραμα στο οποίο ακτινοβολήθηκαν

Κεφάλαιο 3 : Πειραματική Διάταξη και Διαδικασία

κόκκοι αμύλου. Οι κόκκοι αμύλου αποτελούνται από μόρια αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης, η τελευταία είναι υπεύθυνη για την παραγωγή έντονου σήματος δεύτερης αρμονικής εξαιτίας της δομής της. Τα μόρια της αμυλοπηκτίνης προσανατολίζονται ακτινικά προς την εξωτερική επιφάνεια του κόκκου και ανάλογα την πόλωση του προσπίπτοντος φωτός δίνουν και το αντίστοιχο φωτεινό σήμα δεύτερης αρμονικής, έτσι λαμβάνουμε πληροφορία σχετικά με την διεύθυνση του διανύσματος πόλωσης στο επίπεδο του δείγματος.

Πραγματοποιήθηκαν αρκετές σειρές πειραμάτων εξετάζοντας *C.elegans* wild type ηλικίας 1 ημέρας, 6 ημερών και 9 ημερών αντίστοιχα. Δεδομένου ότι ο κύκλος ζωής των *C.elegans* είναι 13 με 15 ημέρες, τα *C.elegans* 9 ημερών είναι μια καλή επιλογή για την μελέτη γερασμένων μυών.

3.3 Θορύβος Υποβάθρου και Απομόνωση Σήματος

Αναπόφευκτα στα πειράματά μας εμφανίζεται θόρυβος υποβάθρου ο οποίος οφείλεται στην ευαισθησία των οργάνων ανίχνευσης και παρατήρησης. Τα πειράματα διεκπεραιώθηκαν κάτω από πλήρη συσκότιση με σκοπό την αποφυγή θορύβου εξαιτίας άλλων πηγών.

Ο PMT {14} είναι εξαιρετικά ευαίσθητος και έχει την δυνατότητα να καταγράφει οποιοδήποτε σήμα προέρχεται από εξωτερική πηγή, συγχέοντας τελικά το σήμα της SHG με τα εξωτερικά σήματα. Ο θόρυβος λόγω της ευαισθησίας των οργάνων δεν μπορούσε να αποφευχθεί καθώς οφείλεται στα κατασκευαστικά τους χαρακτηριστικά. Για τον λόγο αυτό κρίθηκε αναγκαίος ο υπολογισμός του θορύβου υποβάθρου. Για την μέτρηση του θορύβου ακτινοβολήθηκε μια περιοχή των coverslip που δεν περιλάμβανε δείγμα και καταγράφηκε το σήμα υποβάθρου που έλαβε ο PMT.

Με την καταγραφή του θορύβου μας δίνεται η δυνατότητα να εντοπίσουμε ποιες τιμές της έντασης που καταγράφουμε οφείλονται τελικά σε σήμα SHG. Στην μελέτη μας σαν αποδεκτές τιμές έντασης SHG δεχόμαστε τιμές με ένταση τρεις φορές μεγαλύτερη από την μέση τιμή του θορύβου. Με την χρήση κατάλληλου λογισμικού Matlab υπολογίστηκαν για κάθε πειραματική εικόνα τα σημεία που μας δίνουν τιμές I_{SHG} πάνω από τον θόρυβο, οι τιμές αυτών των σημείων αποτελούν τα πειραματικά μας δεδομένα.

Κεφάλαιο 4

Στο κεφάλαιο αυτό θα αναλυθούν τα πειραματικά μας δεδομένα και στην συνέχεια θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μελέτη μας.

4.1 Ανάλυση Πειραματικών Δεδομένων

Στην υποενότητα 1.6 παρουσιάστηκε η θεωρία της PSHG και μέσω της εξίσωσης 1.31 δόθηκε η σχέση που περιγράφει την ένταση της SHG όταν το δείγμα που μελετάμε χαρακτηρίζεται από κυλινδρική συμμετρία. Μέσα από απλές τριγωνομετρικές ταυτότητες η σχέση 1.31 παίρνει την ακόλουθη μορφή :

$$I_{SHG} = c_0 + c_2 \cos(2(a - f)) + c_4 \cos(4(a - f)) \quad [4.1]$$

και η ανισότροπη παράμετρος προσδιορίζεται μέσω των νέων μεταβλητών από την σχέση:

$$B = \sqrt{\frac{c_0 + c_2 + c_4}{c_0 - c_2 + c_4}} \quad [4.2]$$

Μελετώντας την εξίσωση 4.1 παρατηρούμαι ότι αποτελείται από έναν σταθερό όρο και από δύο συνημίτονα, με το δεύτερο διπλάσιας συχνότητας του πρώτου. Εξαιτίας της μορφής της διαπιστώνουμε πως είναι εφικτή η εφαρμογή Fast Fourier Transform (FFT) για τον υπολογισμό των μεταβλητών c_0, c_2, c_4 και της γωνίας f . Όπως αναφέραμε στην υποενότητα 3.3 από μια περιοχή που ακτινοβολείται καταγράφεται ένας πίνακας 500×500 χωρικών στοιχείων και για κάθε ένα σημείο στο χωρικό επίπεδο αντιστοιχεί μια τιμή της I_{SHG} , δημιουργώντας τελικά έναν 2D SHG χωρικό πίνακα. Όμως στα πειράματά μας μελετάμε την εξάρτηση του σήματος από την πόλωση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, επομένως σε κάθε περιοχή μελέτης οι μετρήσεις μας ολοκληρώθηκαν αφού μεταβάλλαμε το διάνυσμα πόλωσης από $a=0^\circ-180^\circ$ με βήμα 10° , πραγματοποιώντας για κάθε περιοχή τελικά 18 στο σύνολο μετρήσεις όσες και οι στροφές του πλακιδίου $\lambda/2$. Έτσι για κάθε περιοχή μελέτης δημιουργείται ένας 3D PSHG χωρικός πίνακας ο οποίος αποτελείται από $500 \times 500 \times 18$ στοιχεία. Το πλεονέκτημα της FFT έγκειται στον γρήγορο υπολογισμό του μεγάλου αυτού όγκου δεδομένων, με χρόνο που δεν ξεπερνά το 1 δευτερόλεπτο [27].

Όσον αφορά λοιπόν την ανάλυση των δεδομένων μας, με την χρήση κατάλληλου αλγορίθμου ο οποίος δημιουργήθηκε σε προγραμματιστικό περιβάλλον MATLAB εφαρμόζεται FFT στα στοιχεία της τρίτης διάστασης του PSHG matrix και υπολογίζονται οι μεταβλητές c_0, c_2 και η γωνία f . Στην συνέχεια ο αλγόριθμος εισάγει την γνωστή πλέον γωνία f στον δεύτερο συνημιτονοειδή όρο της σχέσης 4.1 και υπολογίζει την μεταβλητή c_4 .

Κεφάλαιο 4 : Ανάλυση Πειραματικών Δεδομένων και Παρουσίαση Αποτελεσμάτων

Η εξίσωση 4.1 περιλαμβάνει αρκετές γεωμετρίες και απλουστεύσεις του βιολογικού μοντέλου που εξετάζουμε. Για παράδειγμα, θεωρήσαμε ότι τα thick filaments από τα οποία προέρχεται το σήμα SHG κατανέμονται σε κυλινδρική συμμετρία κατά μήκος του άξονα συμμετρίας της μυϊκής ίνας. Αυτή η συμμετρία τροποποιεί τα στοιχεία του τανυστή δεύτερης τάξης της ηλεκτρικής επιδεκτικότητας $\chi^{(2)}$. Στην πραγματικότητα, ορισμένα στοιχεία μηδενίζονται και ο τανυστής $\chi^{(2)}$ απλοποιείται. Έτσι προέκυψε η ιδέα να χρησιμοποιήσουμε την γενική εξίσωση που περιγράφει την εξάρτηση της I_{SHG} από την γωνία α (εξίσωση 4.3) [28,29]:

$$I_{SHG} = b_0 + b_2 \cos(2\alpha) + b_4 \cos(4\alpha) + d_2 \sin(2\alpha) + d_4 \sin(4\alpha) \quad [4.3]$$

και απλοποιώντας την 4.3 καταλήγουμε στην σχέση 4.4 :

$$I_{SHG} = b_0 + b'_2 \cos(2(a-f_2)) + b'_4 \cos(4(a-f_4)) \quad [4.4]$$

Κατά την εξαγωγή της σχέσης 4.4 δεν λήφθηκαν υπόψη άξονες συμμετρίας ή άλλες απλουστεύσεις. Οι γωνίες f_2 και f_4 που προέκυψαν διαφέρουν αριθμητικά μεταξύ τους και δεν περιγράφουν μια σταθερή γωνία όπως στην περίπτωση της σχέσης 4.1. Εδώ ο αλγόριθμος υπολογίζει τις μεταβλητές b_4 και d_4 της εξίσωσης 4.3 εφαρμόζοντας FFT στην τρίτη διάσταση του PSHG matrix. Εισάγοντας τις γνωστές πλέον μεταβλητές στην εξίσωση 4.4 προσδιορίζονται η b'_4 και η γωνία f_4 . Δεν είναι απαραίτητο να επαναληφθούν οι υπολογισμοί για την εύρεση των b_0 , b_2 και της γωνίας f_2 καθώς παίρνουν τις ίδιες τιμές με αυτές των c_0, c_2 και της γωνίας f της εξίσωσης 4.1.

Από τον 3D PSHG πίνακα υπολογίζεται βάση του κυλινδρικού μοντέλου η μέση τιμή της ανισότροπης παραμέτρου B και η μέση τιμή της γωνίας f , υπενθυμίζουμε ότι η f είναι η γωνία που σχηματίζει η προβολή του μορίου στο xy επίπεδο με το αρχικό διάνυσμα πόλωσης. Για τον ορθό υπολογισμό των $\langle B \rangle$ και $\langle f \rangle$ θα πρέπει να εξαιρεθούν τα pixel που δεν περιγράφουν ικανοποιητικά το βιολογικό μας μοντέλο, αυτό επιτυγχάνεται με τον παράγοντα R^2 . Ο παράγοντας R^2 εκφράζει το κατά πόσο καλά αντιπροσωπεύονται οι πειραματικές μας τιμές από τα δεδομένα που προέκυψαν με την FFT ανάλυση και ορίζεται μέσω της εξίσωσης 4.5:

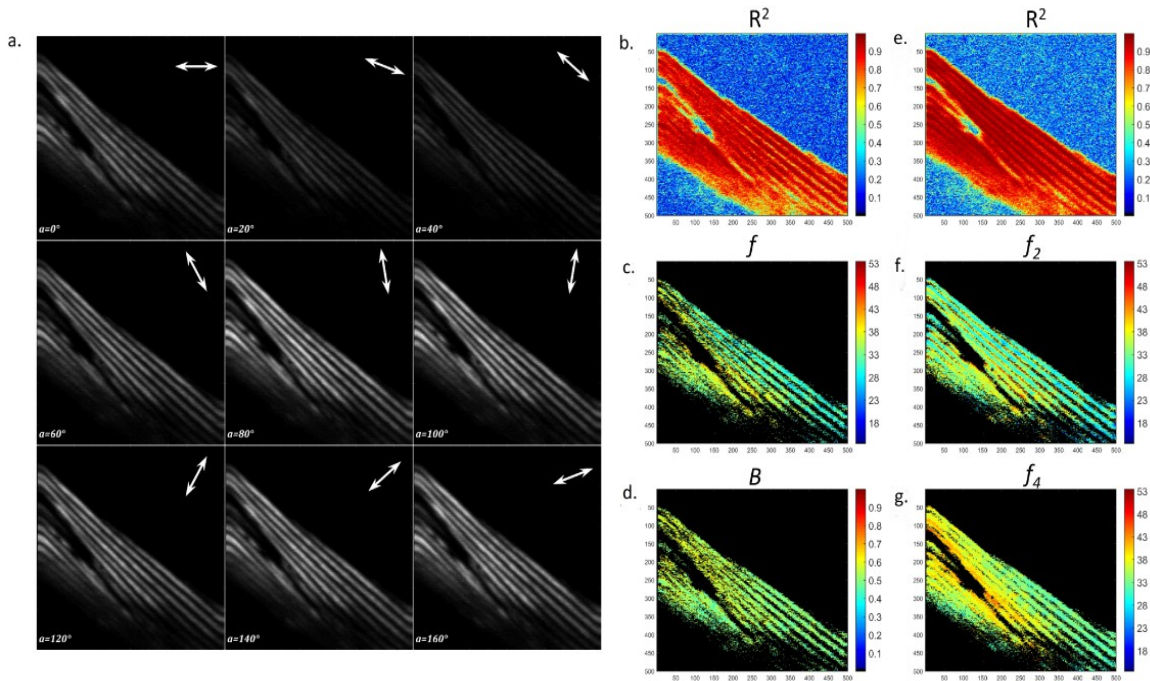
$$R^2 = 1 - \frac{\sum (y(i) - f(i))^2}{\sum (y(i) - \text{mean}(y(i)))^2} \quad [4.5]$$

όπου $y(i)$ οι πειραματικές τιμές και $f(i)$ τα δεδομένα που προέκυψαν από την εξίσωση 4.1 και 4.4 αντίστοιχα, για τις μεταβλητές που υπολογίζονται από την εφαρμογή FFT. Από τον ορισμό του παράγοντα R^2 είναι φανερό ότι η μέγιστη τιμή που μπορεί να πάρει είναι η μονάδα, τότε έχουμε την τέλεια προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στην 4.1 ή στην 4.4, ισχύει δηλαδή $y(i)=f(i)$. Στην πειραματική μας ανάλυση σαν κριτήριο φιλτραρίσματος χρησιμοποιήθηκε τιμή κατωφλίου $R^2 > 0.90$, αποκλείοντας pixel με τιμές μικρότερες αυτής [20,30]. Με αυτόν τον τρόπο συμπεριλαμβάνονται στην ανάλυση μόνο τα pixel που ταιριάζουν στο βιολογικό μας μοντέλο.

Κεφάλαιο 4 : Ανάλυση Πειραματικών Δεδομένων και Παρουσίαση Αποτελεσμάτων

Αφού μελετήσαμε τις βασικές εξισώσεις που περιγράφουν τα μόρια μυοσίνης και αναφέραμε συνοπτικά την εφαρμογή FFT στην επεξεργασία δεδομένων, είμαστε σε θέση να παραθέσουμε τα αποτελέσματα της ανάλυσης μας. Στην Εικόνα 4.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή του αλγορίθμου FFT σε *C.elegans* ηλικίας 1 ημέρας.

C.elegans 1 ημέρας



Εικόνα 4.1 Αποτελέσματα FFT ανάλυσης σε *C.elegans* ηλικίας 1 ημέρας για τον προσδιορισμό των μεταβλητών της εξίσωσης 4.1 (b-d) και της 4.4 (e-g). **a)** Παρατίθενται οι 9 από τις 18 εικόνες μιας πλήρους μέτρησης PSHG. Κάθε εικόνα απεικονίζει την ίδια περιοχή για διαφορετικές στροφές του διανύσματος πόλωσης. Το φωτεινό σήμα που παρατηρείται είναι σήμα SHG. Το άσπρο βέλος παριστάνει το διάνυσμα πόλωσης του laser και πως αυτό μεταβάλλεται για κάθε γωνία στροφής του πλακιδίου $\lambda/2$. **b)** Το χρώμα κάθε pixel αντιστοιχεί στην τιμή του R^2 όπως αυτό υπολογίζεται για κάθε pixel από την FFT ανάλυση. Pixel με $R^2 < 0.90$ εξαιρούνται από την ανάλυση μας και τα αντιστοιχούμε με μαύρο χρώμα στην συνέχεια των μετρήσεων **(c)** και **(d)**. **e)** Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την ανάλυση για τις τιμές της γωνία f . **d)** Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την ανάλυση για τις τιμές της ανισότροπης παραμέτρου B . **e-g)** Υπολογισμός των παραμέτρων f_2, f_4 και του παράγοντα R^2 της εξίσωσης 4.4.

Στην Εικόνα 4.1a παρουσιάζονται 9 από τις 18 εικόνες μιας πλήρους σειράς PSHG ενός *C.elegans* 1 ημέρας. Για κάθε στροφή του πλακιδίου $\lambda/2$ αναγράφεται και η αντίστοιχη μεταβολή του διανύσματος πόλωσης. Με μια πρώτη ματιά οι πληροφορίες που λαμβάνουμε από την παρακάτω εικόνα είναι οι εξής :

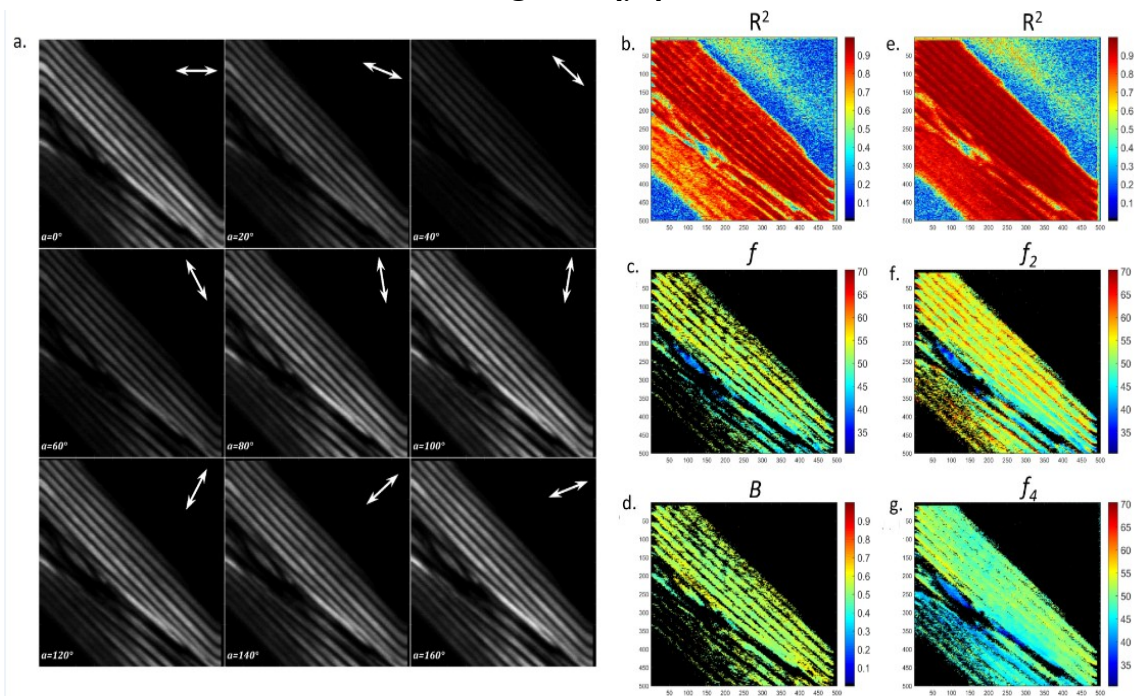
- i. Στην πρώτη υποεικόνα που το πλακίδιο $\lambda/2$ είναι στις 0° καθίσταται φανερή η σχετική διεύθυνση του δείγματος με το διάνυσμα πόλωσης της προσπίπτουσας δέσμης Laser. Οι μετρήσεις μας ξεκίνησαν με το πλακίδιο $\lambda/2$ στις 0° όπου διαπιστώνουμε ότι το διάνυσμα της πόλωσης σχηματίζει γωνία περίπου 45° με το δείγμα. Όπως αναφέρθηκε στην υποενότητα 3.2, για τον προσδιορισμό της διεύθυνσης του διανύσματος πόλωσης στο επίπεδο του δείγματος είχε προηγηθεί βαθμονόμηση με τους κόκκους αμύλου.

Κεφάλαιο 4 : Ανάλυση Πειραματικών Δεδομένων και Παρουσίαση Αποτελεσμάτων

- ii. Παρατηρούμε ότι για πόλωση κάθετη στο δείγμα λαμβάνουμε έντονο σήμα SHG ενώ για πόλωση παράλληλη με το δείγμα ανιχνεύουμε ελάχιστο σήμα SHG. Στην σχέση 1.32 προσδιορίσαμε την ανισότροπη παράμετρο B μέσω των λόγων της έντασης SHG για παράλληλη προς κάθετη πόλωση, προσεγγιστικά λοιπόν περιμένουμε για την B τιμή μικρότερη της μονάδας.

Στην Εικόνα 4.2 και στην Εικόνα 4.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για *C.elegans* ηλικίας 6 ημερών και 9 ημερών αντίστοιχα. Επίσης για όλα τα δείγματα ανεξαιρέτως ηλικιακού group ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία ανάλυσης.

C.elegans 6 ημερών



Εικόνα 4.2 Αποτελέσματα FFT ανάλυσης σε *C.elegans* ηλικίας 6 ημερών για τον προσδιορισμό των μεταβλητών της εξίσωσης 4.1 (b-d) και της 4.4 (e-g). **α)** Παρατίθενται οι 9 από τις 18 εικόνες μιας πλήρους PSHG μέτρησης. Παρατηρείται η μεταβολή του σήματος της SHG ανάλογα την διεύθυνση του διανύσματος πόλωσης. Το λευκό βελάκι συμβολίζει την κατεύθυνση του διανύσματος πόλωσης της δέσμης laser. Σε κάθε εικόνα αναγράφεται και η τιμή της γωνίας α . **β)** Το χρώμα κάθε pixel αντιστοιχεί στην τιμή του παράγοντα R^2 . Η χρωματική κλίμακα παρουσιάζεται δεξιά του πίνακα. Για τον υπολογισμό των μεταβλητών B και f εξαιρούνται από την ανάλυση pixel με τιμές $R^2 < 0.90$, εξισώνοντας τις τιμές αυτές με μαύρο χρώμα όπως φαίνεται στις εικόνες (c) και (d). **ε)** Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την ανάλυση για τις τιμές της γωνίας f . **δ)** Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την ανάλυση για τις τιμές της ανισότροπης παραμέτρου B . **ε-γ)** Επαναλαμβάνονται οι ίδιες μετρήσεις για την εξίσωση 4.4 με τους υπολογισμούς να αφορούν τις γωνίες f_2, f_4 και τον παράγοντα R^2 του γενικού μοντέλου.

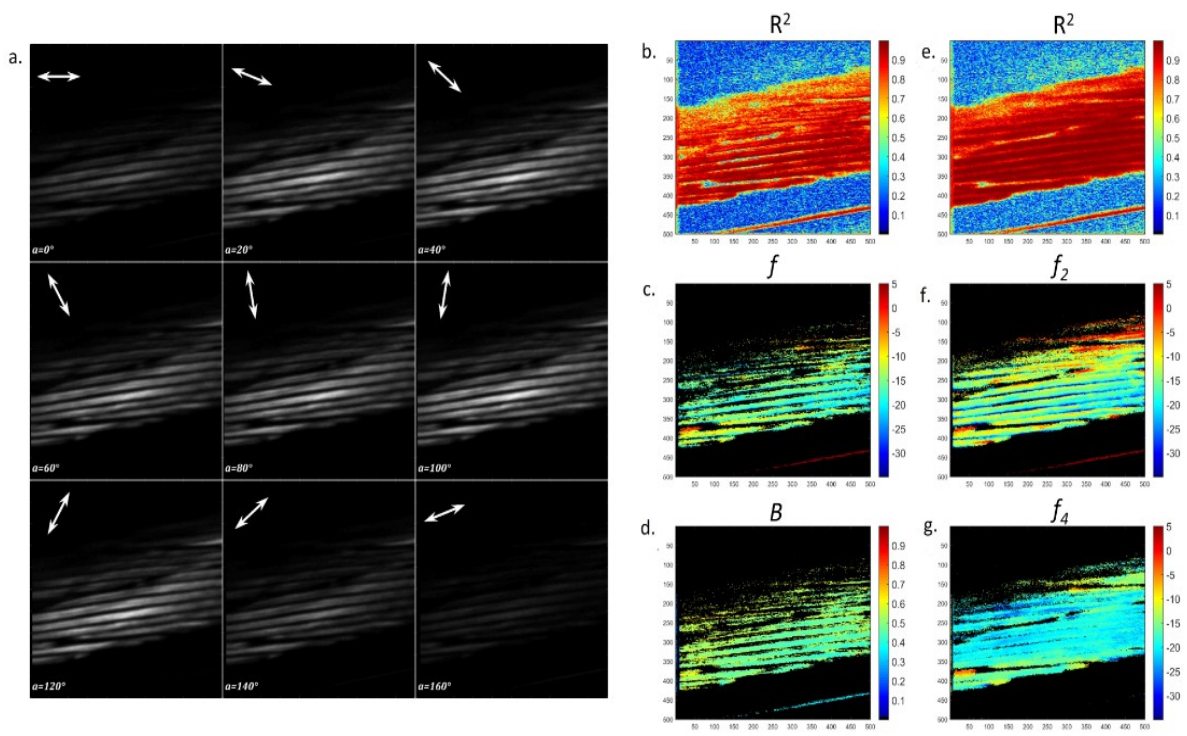
Ενδεικτικά για το δείγμα 6 ημερών, η πειραματική τιμή της μέσης τιμής της ανισότροπης παραμέτρου B ($\langle B \rangle$) για pixel με $R^2 > 0.90$ υπολογίστηκε 0.53 ± 0.04 . Γνωρίζοντας πλέον την τιμή της B υπολογίσαμε από την εξίσωση 1.33 την ενεργό γωνία θ_e και βρήκαμε ότι είναι $63^\circ \pm 1^\circ$. Όπως αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 1.5, η θ_e είναι η γωνία που σχηματίζουν τα επιμέρους μόρια μυοσίνης με τον άξονα συμμετρίας τους και προσεγγίζει την γωνία βήματος της έλικας του μορίου μυοσίνης. Μέσω πειραμάτων περίθλασης ακτίνων X η γωνία θ_e για το μόριο μυοσίνης είναι 68.3° [31], επομένως η προσέγγισή μας για την θ_e είναι αρκετά κοντά στην θεωρητική της τιμή.

Κεφάλαιο 4 : Ανάλυση Πειραματικών Δεδομένων και Παρουσίαση Αποτελεσμάτων

Για το ίδιο δείγμα, η μέση τιμή της γωνίας f ($\langle f \rangle$) για pixel με $R^2 > 0.90$ υπολογίστηκε $53^\circ \pm 5^\circ$. Στην πρώτη υποεικόνα της 4.2a παρατηρείται ότι το δείγμα σχηματίζει γωνία 45° με το αρχικό διάνυσμα πόλωσης. Εδώ θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα thick filaments δεν είναι ακριβώς παράλληλα με τον άξονα συμμετρίας της μυϊκής ίνας, αλλά σχηματίζουν μια γωνία 5° - 7° από αυτόν [32]. Λαμβάνοντας υπόψιν μας αυτήν την απόκλιση ($\pm 5^\circ$ - 7°), η γωνία f όπως υπολογίστηκε πειραματικά ταυτίζεται με την γωνία που σχηματίζει το αρχικό διάνυσμα πόλωσης με τον άξονα συμμετρίας της μυϊκής ίνας και είναι 45° .

Συγκρίνοντας τις εικόνες 4.2c και 4.2f βλέπουμε ότι οι γωνίες f και f_2 έχουν ίδια τιμή, αυτό το γνωρίζαμε εξ αρχής αφού υπολογίστηκαν με τον ίδιο τρόπο. Στην περίπτωση όμως της f_2 παρατηρείται αύξηση του αριθμού των pixel που ικανοποιούν την παράμετρο $R^2 > 0.90$. Αυτή η αύξηση συνδέεται με το γεγονός ότι η γωνία f_4 του γενικού μοντέλου (Εξίσωση 4.4) διαφέρει από την f_2 , όπως μπορούμε να διαπιστώσουμε και από τις τιμές των αντίστοιχων εικόνων 4.1f και 4.1g. Για να ποσοτικοποιήσουμε την αύξηση του παράγοντα R^2 ορίζουμε την παράμετρο ratio. Η παράμετρος ratio ορίζεται ο αριθμός των pixel με $R^2 > 0.90$ προς τον ολικό αριθμό των pixel από τα οποία ανιχνεύεται σήμα δεύτερης αρμονικής [20]. Για την εξίσωση 4.1 η παράμετρος ratio παίρνει την τιμή 0.48 ενώ για το γενικό μοντέλο και την εξίσωση 4.4 την τιμή 0.79. Συγκρίνοντας αυτές τις δύο τιμές συμπεραίνουμε ότι στο γενικό μοντέλο ο παράγοντας ratio αυξήθηκε κατά 0.31, αυτό δείχνει ότι τα πειραματικά μας σημεία περιγράφονται καλύτερα από το γενικό μοντέλο της εξίσωσης 4.4. Στην συνέχεια της μελέτη μας θα μας απασχολήσει η αυξητική τάση που εμφανίζει ο παράγοντας ratio στο γενικό μοντέλο.

C.elegans 9 ημερών



Εικόνα 4.3 Αποτελέσματα FFT ανάλυσης σε *C.elegans* ηλικίας 9 ημερών για τον προσδιορισμό των μεταβλητών της εξίσωσης 4.1 (b-d) και της 4.4 (e-g). **a)** Παρατίθενται οι 9 από τις 18 εικόνες μιας πλήρους μέτρησης PSHG. Κάθε εικόνα απεικονίζει την ίδια περιοχή για διαφορετικές στροφές του διανύσματος πόλωσης. Το φωτεινό σήμα που παρατηρείται είναι σήμα SHG. Το άσπρο βέλος παριστάνει το διάνυσμα πόλωσης του laser και πως αυτό μεταβάλλεται για κάθε γωνία στροφής του πλακιδίου $\lambda/2$. **b)** Το χρώμα κάθε pixel αντιστοιχεί στην τιμή του R^2 όπως αυτό

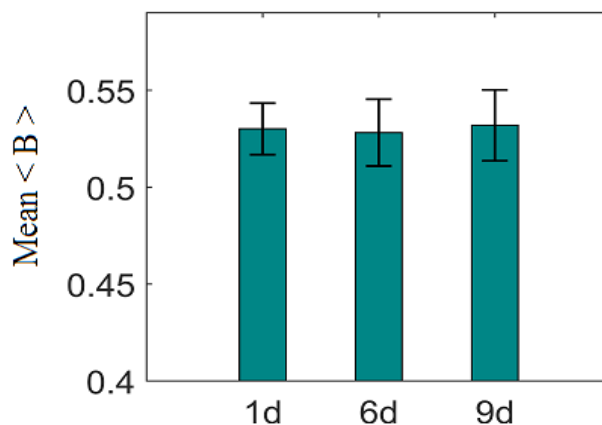
Κεφάλαιο 4 : Ανάλυση Πειραματικών Δεδομένων και Παρουσίαση Αποτελεσμάτων

υπολογίζεται για κάθε pixel από την FFT ανάλυση. Pixel με $R^2 < 0.90$ εξαιρούνται από την ανάλυση μας και τα αντιστοιχούμε με μαύρο χρώμα στην συνέχεια των μετρήσεων (c) και (d). **e)** Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την ανάλυση για τις τιμές της γωνία f . **d)** Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την ανάλυση για τις τιμές της ανισότροπης παραμέτρου B . **e-g)** Υπολογισμός των παραμέτρων f_2 , f_4 και του παράγοντα R^2 της εξίσωσης 4.4.

Συγκρίνοντας τις εικόνες 4.3a και 4.3b, παρατηρείται ότι στην 4.3b σε μια περιοχή κάτω από τους ραβδωτούς μυς του δείγματος έχει καταγραφεί σήμα SHG ενώ κάτι ανάλογο δεν εμφανίζεται σε καμία από τις υποεικόνες της 4.3a. Το σήμα αυτό προέρχεται από ινίδια κολλαγόνου, είναι αρκετά ασθενές και η φωτεινότητά του στην εικόνα 4.3a δεν είναι ανιχνεύσιμη από το ανθρώπινο μάτι. Στην υποενότητα 3.3 ορίσαμε ως αποδεκτές τιμές έντασης της SHG όσες τιμές είναι τρεις φορές μεγαλύτερες από την μέση τιμή του θορύβου. Άρα για να εμφανίζεται το σήμα του κολλαγόνου στην εικόνα 4.3b σημαίνει ότι υπερβαίνει το όριο του θορύβου. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι έχουμε ορίσει ορθά τον θόρυβο καθώς καταγράφεται σήμα SHG που δεν είναι ανιχνεύσιμο με το μάτι αλλά αποτελεί μέρος της πληροφορίας της υπό εξέταση περιοχής. Τέλος ο λόγος για τον οποίο αυτά τα σημεία φαίνονται τόσο έντονα στην εικόνα 4.3b είναι γιατί παρά τις χαμηλές τιμές SHG που παρουσιάζουν, περιγράφονται σε πολύ καλό βαθμό από το κυλινδρικό μοντέλο δίνοντας μεγάλες τιμές για τον παράγοντα R^2 . Στην ανάλυση των δεδομένων δεν λάβαμε υπόψιν μας τα σημεία SHG που προέκυψαν από το κολλαγόνο.

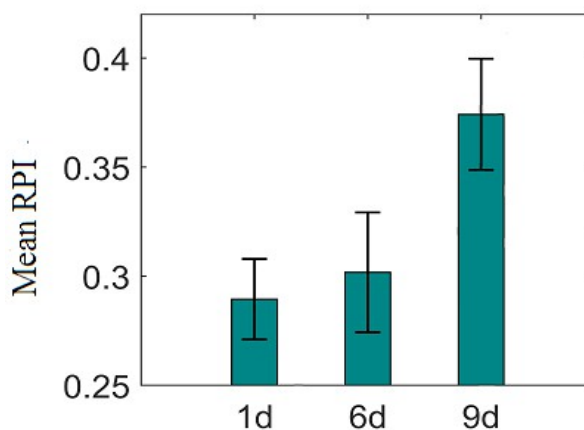
4.2 Πειραματικά Αποτελέσματα

Αφού υπολογίστηκαν για κάθε δείγμα οι απαραίτητες μεταβλητές ποσότητες είμαστε σε θέση να προχωρήσουμε στην ανάλυση των δεδομένων μας. Αρχικά συγκρίνοντας το χρώμα των διαγραμμάτων 4.1d, 4.2d και 4.3d παρατηρεί κανείς πως η τιμή της ανισότροπης παραμέτρου B κυμαίνεται σε παραπλήσιες τιμές για κάθε δείγμα. Πράγματι αυτό διαπιστώνεται και στατιστικά, στο Διάγραμμα 1 παρουσιάζονται οι τιμές της μέσης τιμής της $\langle B \rangle$ για κάθε ηλικιακό group και όπως φαίνεται δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστική διαφορά. Επομένως, δεν μπορούμε να ανιχνεύσουμε σημαντικές δομικές αλλαγές στους ραβδωτούς μυς των *C.elegans* μελετώντας την ανισότροπη παράμετρο B.



Διάγραμμα 1 Η μέση τιμή της $\langle B \rangle$ όπως προκύπτει από την μελέτη 10 δειγμάτων για κάθε ένα ηλικιακό group. Να σημειωθεί ότι αρχικά υπολογίστηκε η μέση τιμή του B για κάθε δείγμα και στην συνέχεια υπολογίστηκε ο μέσος όρος της $\langle B \rangle$ για τα 10 δείγματα του ίδιου ηλικιακού group. Τα error bars αντιστοιχούν στην μέση τιμή του τυπικού σφάλματος (SEM) κάθε group.

Η αύξηση που παρατηρήθηκε νωρίτερα στον παράγοντα ratio του γενικού μοντέλου, μας προέτρεψε σε περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων μας. Για τον σκοπό αυτό ορίσαμε την παράμετρο RPI. Η παράμετρος RPI ορίζεται ως η διαφορά του παράγοντα ratio που αντιστοιχεί στο γενικό μοντέλο από τον παράγοντα ratio που αντιστοιχεί στο κυλινδρικό μοντέλο. Μελετώντας την μέση τιμή της παραμέτρου RPI για κάθε ηλικιακό group παρατηρήθηκαν σημαντικές στατιστικές διαφορές, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 2.

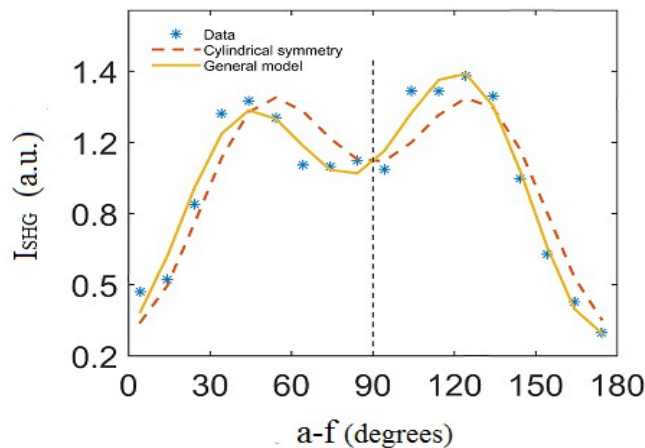


Διάγραμμα 2 Η μέση τιμή της παραμέτρου RPI όπως προκύπτει για κάθε ηλικιακό group *C.elegans*. Τα σφάλματα του διαγράμματος αντιστοιχούν στην μέση τιμή του τυπικού σφάλματος (SEM) κάθε group.

Κεφάλαιο 4 : Ανάλυση Πειραματικών Δεδομένων και Παρουσίαση Αποτελεσμάτων

Οι θετικές τιμές της μέσης τιμής του παράγοντα RPI αποδεικνύουν πως το γενικό μοντέλο της εξίσωσης 4.4 αντιπροσωπεύει καλύτερα τα δεδομένα της PSHG. Η κύρια διαφορά μεταξύ του κυλινδρικού και του γενικού μοντέλου εντοπίζεται στην εξίσωση 4.4 του γενικού μοντέλου, όπου οι γωνίες των συνημιτονοειδών όρων f_2 και f_4 διαφέρουν αριθμητικά. Αντίθετα στην περίπτωση του κυλινδρικού μοντέλου οι δύο συνημιτονοειδείς όροι της εξίσωσης 4.1 παίρνουν την ίδια σταθερή τιμή f .

Για να εξετάσουμε πως συμπεριφέρονται οι εξισώσεις 4.1 και 4.4 σε σχέση με τα πειραματικά μας δεδομένα, μελετήσαμε ένα σημείο του *C.elegans* και κατασκευάσαμε ένα κοινό διάγραμμα (Διάγραμμα 3) της έντασης της SHG συναρτήσει της γωνίας ($a-f$). Να σημειωθεί ότι το σημείο αυτό αντιστοιχεί στην περιοχή των ραβδωτών μυών ενός *C.elegans* ηλικίας 9 ημερών μιας και αυτά εμφάνισαν την μεγαλύτερη αύξηση του παράγοντα ratio. Οι μπλε αστερίσκοι αντιπροσωπεύουν τα πειραματικά μας δεδομένα. Μέσω της ανάλυσης FFT προσδιορίστηκαν οι μεταβλητές ποσότητες των εξισώσεων 4.1, 4.4 και στην συνέχεια κατασκευάστηκαν οι αντίστοιχες πειραματικές τους καμπύλες. Η κόκκινη διακεκομμένη καμπύλη αντιπροσωπεύει τα δεδομένα του κυλινδρικού μοντέλου (εξίσωση 4.1) και η κίτρινη καμπύλη τα δεδομένα του γενικού. Παρατηρούμαι πως τα πειραματικά μας δεδομένα αντιπροσωπεύονται καλύτερα από την καμπύλη του γενικού μοντέλου. Οι διαφορετικές τιμές των f_2 και f_4 της εξίσωσης 4.4 συνέβαλαν στο να σπάσει η συμμετρία γύρω από τις 90° , η οποία εμφανίζεται στην περίπτωση του κυλινδρικού μοντέλου και της εξίσωσης 4.1.

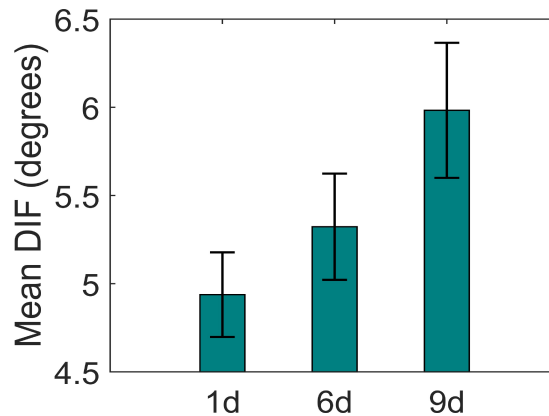


Διάγραμμα 3 Τα δεδομένα αφορούν την μελέτη ενός σημείου από τους ραβδωτούς μυς *C.elegans* 9 ημερών. Οι μπλε αστερίσκοι απεικονίζουν τις πειραματικές τιμές του καταγεγραμμένου σήματος SHG για κάθε τιμή της γωνίας $a-f$. Υπενθυμίζεται πως $a-f$ είναι η γωνία που σχηματίζει το διάνυσμα πόλωσης με την προβολή του μορίου στο xy επίπεδο. Με κόκκινη διακεκομμένη γραμμή απεικονίζεται η γραφική παράσταση του σήματος I_{SHG} συναρτήσει της γωνίας $a-f$ όπως προκύπτει από την εξίσωση 4.1 του κυλινδρικού μοντέλου. Με κίτρινη συνεχόμενη γραμμή απεικονίζεται η αντίστοιχη γραφική παράσταση για την εξίσωση 4.4 του γενικού μοντέλου. Η διαφορά της γωνίας f_4 με την γωνία f_2 και κατά συνέπεια και με την γωνία f ($f=f_2$) είναι προσεγγιστικά 7° .

Για το πειραματικό σημείο που μελετήσαμε η τιμή του παράγοντα R^2 για το κυλινδρικό μοντέλο είναι 0.87, ενώ για το γενικό μοντέλο είναι 0.97. Η αύξηση της παραμέτρου R^2 για το γενικό μοντέλο ήταν αναμενόμενη. Εξαρχής από τα πειραματικά αποτελέσματα των αντίστοιχων εικόνων 4.1b, 4.1e, 4.2b, 4.2e, 4.3b, 4.3e είχε παρατηρηθεί η αύξηση των pixel που δίνουν σήμα SHG για το γενικό μοντέλο. Από το Διάγραμμα 3 αποδεικνύεται πως η αύξηση της παραμέτρου R^2 οφείλεται στην διαφορά μεταξύ των γωνιών f_4 και f_2 . Η διαφορά αυτή είναι υπεύθυνη για την μη συμμετρική καμπύλη της γενικής εξίσωσης, η οποία όπως αποδείχθηκε και μέσω του διαγράμματος 3 αντιπροσωπεύει καλύτερα τα πειραματικά μας δεδομένα.

Κεφάλαιο 4 : Ανάλυση Πειραματικών Δεδομένων και Παρουσίαση Αποτελεσμάτων

Επόμενο βήμα είναι να μελετήσουμε την διαφορά των γωνιών f_2 και f_4 . Ήδη από τις εικόνες 4.1f, 4.1g, 4.2f, 4.2g, 4.3f, 4.3g που απεικονίζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των γωνιών f_4 , f_2 είναι φανερό πως υπάρχει διαφορά στις τιμές τους. Για να ποσοτικοποιήσουμε την διαφορά αυτή ορίσαμε τον παράγοντα DIF. Ο παράγοντας DIF ορίζεται ως η μέση τιμή της κατά απόλυτο διαφοράς των γωνιών f_4 και f_2 , για κάθε βιολογικό δείγμα. Στην συνέχεια υπολογίσαμε την μέση τιμή της παραμέτρου DIF για κάθε ηλικιακό group και κατασκευάσαμε το Διάγραμμα 4. Από το Διάγραμμα 4 παρατηρούμε ότι η παράμετρος DIF έχει μεγαλύτερη τιμή στην περίπτωση των 9 days C. Elegans.



Διάγραμμα 4 Η μέση τιμή της παραμέτρου DIF όπως προκύπτει για κάθε ηλικιακό group. Για κάθε δείγμα, η παράμετρος DIF έχει οριστεί ως η μέση τιμή της κατά απόλυτο διαφοράς των γωνιών f_2 και f_4 . Τα σφάλματα αντιστοιχούν στην μέση τιμή του τυπικού σφάλματος (SEM) κάθε group.

Η μελέτη του παράγοντα DIF αποτελεί την δεύτερη σημαντική στατιστική διαφορά που παρατηρήθηκε στα ηλικιακά group των C.elegans. Στο Διάγραμμα 4 είναι φανερή η αύξηση του DIF στα ηλικιωμένα δείγματα, αυτό σημαίνει πως με το πέρασμα των χρόνων στα μόρια μυοσίνης παρατηρείται αύξηση στην διαφορά των γωνιών f_2 και f_4 . Συγκρίνοντας το Διάγραμμα 4 με το Διάγραμμα 2 καθίσταται φανερή η αναλογία της παραμέτρου RPI με την DIF. Αυτό επιβεβαιώνει πως η αύξηση του παράγοντα RPI στα μεγαλύτερα ηλικιακά δείγματα οφείλεται στην αυξημένη τιμή του παράγοντα DIF.

Από τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα συμπεραίνουμε πως το σήμα της SHG συναρτήσκει της πόλωσης για τα μόρια μυοσίνης περιγράφεται καλύτερα από το γενικό μοντέλο. Να σημειωθεί ότι στο γενικό μοντέλο δεν λάβαμε υπόψη μας συμμετρίες ή απλουστεύσεις όπως στην περίπτωση του κυλινδρικού μοντέλου, και έτσι καταλήξαμε σε μια πιο γενική μαθηματική σχέση (εξίσωση 4.4) για την περιγραφή της I_{SHG} . Σύμφωνα με το διάγραμμα 3, το γεγονός ότι το γενικό μοντέλο περιγράφει καλύτερα τα πειραματικά δεδομένα οφείλεται στις διαφορετικές τιμές των γωνιών f_2 και f_4 της εξίσωσης 4.4. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε την έρευνα μας στην μελέτη της διαφοράς των γωνιών f_2 και f_4 . Μέσα από το Διάγραμμα 4 παρατηρήθηκε η αύξηση του παράγοντα DIF στα ηλικιωμένα δείγματα και καταλήξαμε σε δύο βασικά συμπεράσματα. Πρώτον τα γηραιότερα δείγματα δείχνουν να έχουν “ μεγαλύτερη “ ανάγκη να περιγραφούν από το γενικό μοντέλο και δεύτερον η αύξηση του παράγοντα DIF στα μεγαλύτερα ηλικιακά δείγματα φαίνεται να συνδέεται άμεσα με αλλαγές στην δομή των μορίων μυοσίνης που υφίστανται με το πέρασμα των χρόνων.

Κεφάλαιο 5

Στο τελευταίο αυτό κεφάλαιο παρουσιάζεται μια σύνοψη της ερευνητικής εργασίας και αναφέρονται περιεκτικά τα πειραματικά μας αποτελέσματα. Τέλος, βασισμένοι στα αποτελέσματα αυτής της εργασίας παραθέτουμε τους μελλοντικούς μας στόχους.

5.1 Σύνοψη Αποτελεσμάτων

Στη παρούσα εργασία παρουσιάστηκε η μικροσκοπία PSHG και η εφαρμογή της στην απεικόνιση μορίων μυοσίνης. Στόχος ήταν η εξοικείωση με την τεχνική και η απόσπαση ποσοτικής πληροφορίας από τα υπό μελέτη δείγματα (π.χ. η μελέτη της ανισότροπης παραμέτρου B , ο παράγοντας RPI, ο παράγοντας DIF), συσχετίζοντας την πληροφορία αυτή με την διεργασία γήρανσης των ραβδωτών μυών στους βιολογικούς οργανισμούς *C.elegans*. Σημαντική προϋπόθεση ήταν η “in vivo” μελέτη των δειγμάτων. Για τον σκοπό αυτό η μικροσκοπική τεχνική της PSHG αποδείχθηκε καταλληλότερη έναντι άλλων τεχνικών απεικόνισης. Η ανάλυση των πειραματικών δεδομένων έγινε με την εφαρμογή FFT αλγόριθμοι και έτσι επιτεύχθηκε γρήγορη ανάλυση μεγάλου όγκου δεδομένων. Το πρόγραμμα που περιλάμβανε τον αλγόριθμο ήταν αυτοσχέδιο, γεγονός που φάνηκε ιδιαίτερα χρήσιμο καθώς μπορούσαμε οποιαδήποτε στιγμή να τροποποιήσουμε τον αλγόριθμο ανάλογα το μαθηματικό μοντέλο που εξετάζαμε.

Προηγούμενες μελέτες περιέγραφαν την ένταση της SHG εκμεταλλευόμενες την κυλινδρική συμμετρία που εμφανίζουν τα επιμέρους μόρια μυοσίνης με τον κύριο άξονα συμμετρίας τους. Όμως η ανισότροπη παράμετρος B και το κυλινδρικό μοντέλο δεν μπόρεσαν να εντοπίσουν διαφορές στην βιολογική δομή των μορίων μυοσίνης που να τα συνδέει με την γήρανση. Έτσι προέκυψε για πρώτη φορά η ιδέα να εξετασθεί ένα πιο γενικό μαθηματικό μοντέλο, το οποίο δεν βασιζόταν σε συμμετρίες, και να μελετηθούν οι νέες ποσοτικές πληροφορίες που θα προέκυπταν. Αρχικά παρατηρήθηκε η αύξηση που εμφάνιζε ο παράγοντας RPI στα γηραιότερα δείγματα σε σύγκριση με τα νεότερα, βλέπαμε δηλαδή πως το γενικό μοντέλο είχε την τάση να δίνει περισσότερα σημεία SHG με $R^2 > 0.90$ σε σχέση με το κυλινδρικό για τα *C.elegans* 9 ημερών. Αυτό αποδείχθηκε και στο Διάγραμμα 3 του κεφαλαίου 4, όπου διαπιστώθηκε ότι η εξίσωση για το γενικό μοντέλο περιέγραφε καλύτερα τα πειραματικά δεδομένα για τις 18 μετρήσεις ενός σημείου παρατήρησης στην περιοχή των ραβδωτών μυών των *C.elegans* 9 ημερών. Παρόλα αυτά, η κύρια διαφορά κυλινδρικού και γενικού μοντέλου έγκειται στις διαφορετικές τιμές των γωνιών f_2 και f_4 , αυτό σημαίνει πως η αύξηση του παράγοντα R^2 συνδέεται άμεσα με την διαφορά αυτών των γωνιών. Ποσοτικοποιώντας την διαφορά των f_2, f_4 μέσω του παράγοντα DIF είδαμε πως η διαφορά μεγαλώνει για τα γηραιότερα δείγματα και οδηγούμαστε στο συμπέρασμα πως τα μεγαλύτερα ηλικιακά δείγματα έχουν ανάγκη να περιγραφούν από το γενικό μαθηματικό μοντέλο. Η διαφορά τιμών των γωνιών f_2 και f_4 δείχνει απομάκρυνση από το μοντέλο της κυλινδρικής συμμετρίας και καθιστά το γενικό μοντέλο κατάλληλο για την περιγραφή του σήματος SHG που προέρχεται από τους ραβδωτούς μυς των *C.elegans*. Επίσης, η αυξητική τάση του παράγοντα DIF στα ηλικιωμένα *C.elegans* φαίνεται να συνδέεται άμεσα με δομικές αλλαγές που υφίστανται τα μόρια μυοσίνης με το πέρασμα των χρόνων. Περαιτέρω πειράματα σε γενετικά τροποποιημένα (mutants) σκουλήκια (πχ. long lived animals) είναι αναγκαία για την πλήρη αποσαφήνιση των μορφολογικών τροποποιήσεων της δομής των μορίων μυοσίνης εξαιτίας της γήρανσης.

5.2 Μελλοντικοί Στόχοι

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, στόχος αυτής της εργασίας ήταν μέσω της μικροσκοπίας PSHG να αποσπαστεί ποσοτική πληροφορία από την δομή των μορίων μυοσίνης, η οποία θα μπορούσε να ερμηνεύσει την διεργασία γήρανσης των μυών. Από τα αποτελέσματα μας αποδείχθηκε πως το γενικό μοντέλο ταίριαζε καλύτερα στο βιολογικό μοντέλο που εξετάζαμε. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα ηλικιωμένα δείγματα είχαν μεγαλύτερη ανάγκη να περιγραφούν από το γενικό μοντέλο απ' ό,τι τα νεότερα. Βάση των ευρημάτων μας, επόμενος στόχος είναι η αναζήτηση διαφορετικών συμμετριών που θα μπορούσαν να δώσουν επιπλέον πληροφορίες για την δομή των μορίων μυοσίνης ή να ερμηνεύσουν ακόμα καλύτερα τα πειραματικά μας αποτελέσματα. Ένας ακόμα μελλοντικός στόχος θα ήταν η περαιτέρω έρευνα για συσχέτιση του παράγοντα DIF με αλλαγές στην έλικα του μορίου μυοσίνης, ποσοτικοποιώντας τις διαφορές αυτές. Τέλος θα ήταν αρκετά ενδιαφέρον, τα μαθηματικά μοντέλα που παρουσιάστηκαν σε αυτήν την εργασία να εφαρμοστούν και για την απόσπαση ποσοτικής πληροφορίας σε *C.elegans* με μυϊκές ασθένειες. Αρκετές μυϊκές παθήσεις συνδέονται με αλλαγές στα μόρια μυοσίνης. Ταυτόχρονα γονίδια που κωδικοποιούν αυτές τις ασθένειες στα *C.elegans* αντιστοιχούν με γονίδια του ανθρώπινου οργανισμού. Έτσι, θα ήταν εξαιρετικά ενδιαφέρον να μελετηθούν και να ποσοτικοποιηθούν οι αλλαγές στην δομή των μορίων μυοσίνης με την εξέλιξη της νόσου.

Βιβλιογραφία

- [1] Στέφανος Τραχανάς , Κβαντομηχανική I , Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης 2007
- [2] Savvas Bovasianos, “Imaging and differentiation of tissue samples via nonlinear optical microscopy”, Diploma Thesis, Physics Dept. University of Crete, 06/2019
- [3] Π.Χ. Αγγέλου , Σημειώσεις Μεταπτυχιακού Μαθήματος “ Προχωρημένη Αναλυτική Χημεία”, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών 2020
- [4] W. Gray (Jay) Jerome, Robert L. Price, Basic Confocal Microscopy 2018 , 26
- [5] B. Henderson and K.P. O’ Donnell, W.M. Yen (Ed.), Laser Spectroscopy of Solids II (Topics in Applied Physics), in Chapter 4: Laser spectroscopy of color centers 1989, 65
- [6] Tsafas V., Study of aging in muscles *in-vivo*, using Polarization sensitive Second Harmonic Generation microscopy, Master thesis, Foundation for Research and Technology Hellas – FORTH
- [7] Ralf Menzel, Photonics, in Chapter 3: Linear Interactions Between Light and Matter, 2007
- [8] David W. Hahn, Light Scattering Theory Notes, Department of Mechanical and Aerospace Engineering University of Florida, 2019
- [9] Jerome Mertz, Current Opinion in Neurobiology, in Chapter : Nonlinear Microscopy, September 2004 ,610
- [10] Peter T. C. So, Chen Y. Dong, Barry R. Masters and Keith M. Berland, Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy, 2020
- [11] Seth W.Perry, Ryan M.Burke and Edward B.Brown, Two-Photon and Second Harmonic Microscopy in Clinical and Translational Cancer Research, 2013
- [12] M. Perry, "High-Order Multiphoton Ionization of the Noble Gases", Ph.D Thesis, Lawrence Livermore National Laboratory-University of California, 1987
- [13] Javier Adur, Hernandes F. Carvalho, Carlos L. Cesar and Víctor H. Casco, Nonlinear Microscopy Techniques: Principles and Biomedical Applications, 2016
- [14] David J. Griffiths , Introduction to Electrodynamics (4th ed) , 2012
- [15] Robert W. Boyd, Nonlinear Optics (3rd ed), 1992 , 4
- [16] G. J. Tservelakis, “Non Linear Microscopy”, ELMO notes, IESL/FORTH, 2010
- [17] RP Photonics Encyclopedia: Phase matching
- [18] Ximeng Y. Dow, Emma L. DeWalt, Justin A. Newman, Christopher M. Dettmar, and Garth J.

Βιβλιογραφία

Simpson , Unified Theory for Polarization Analysis in Second Harmonic and Sum Frequency Microscopy , Purdue University, West Lafayette, Indiana, 2016

[19]Stefan G. Stanciu, Francisco J. Ávila, Radu Hristu & Juan M. Bueno, A Study on Image Quality in Polarization-Resolved Second Harmonic Generation Microscopy , 2017

[20] Vassilis Tsafas, Evangelia Gavgiotaki, Maria Tzardi, Effrosyni Tsafa, Costas Fotakis, Irene Athanassakis, George Filippidis, Polarization-dependent second-harmonic generation for collagen-based differentiation of breast cancer samples, July 2020

[21]Philip M. Meneely, Caroline L. Dahlberg, Jacqueline K. Rose, Working with Worms: Caenorhabditis elegans as a Model Organism, September 2019

[22] Donald G. Moerman and Benjamin D. Williams, Sarcomere assembly in *C. elegans* muscle, January, 2006

[23] Wikipedia: Myofibril, <https://en.wikipedia.org/wiki/Myofibril>

[24]Kathrin Gieseler, Hiroshi Qadota, and Guy M. Benian., Development, structure, and maintenance of *C.elegans* body wall muscle

[25]Valter Santilli, Andrea Bernetti, Massimiliano Mangone, and Marco Paoloni, Clinical definition of sarcopenia, December, 2014

[26] LaDora V. Thompson, Age-Related Muscle Dysfunction, May, 2008

[27] S. Psilodimitrakopoulos, “Polarization Second Harmonic Imaging Of Biological Samples”, Ph.D Thesis, ICFO–The Institute Of Photonic Sciences, Barcelona 2012.

[28] J. Duboisset, D. Aït-Belkacem, M. Roche, H. Rigneault, and S. Brasselet, “Generic model of the molecular orientational distribution probed by polarization-resolved second-harmonic generation,” *Phys. Rev. A - At. Mol. Opt. Phys.*, vol. 85, no. 4, p. 043829, Apr. 2012, doi: 10.1103/PhysRevA.85.043829.

[29] X. Y. Dow, E. L. DeWalt, J. A. Newman, C. M. Dettmar, and G. J. Simpson, “Unified Theory for Polarization Analysis in Second Harmonic and Sum Frequency Microscopy,” *Biophys. J.*, vol. 111, no. 7, pp. 1553–1568, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.bpj.2016.04.019.

[30] G. Ducourthial et al., “Monitoring dynamic collagen reorganization during skin stretching with fast polarization-resolved second harmonic generation imaging,” *J. Biophotonics*, vol. 12, no. 5, p. e201800336, May 2019, doi: 10.1002/jbio.201800336.

[31] F. Tiaho, G. Recher, and D. Rouède, “Estimation of helical angles of myosin and collagen by second harmonic generation imaging microscopy,” *Opt. Express*, vol. 15, no. 19, p. 12286, Sep. 2007, doi: 10.1364/oe.15.012286.

[32]“MusFIG9Legend.”<https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/musclesomatic/MusSomaticframeset.html> (accessed Jan. 11, 2021).