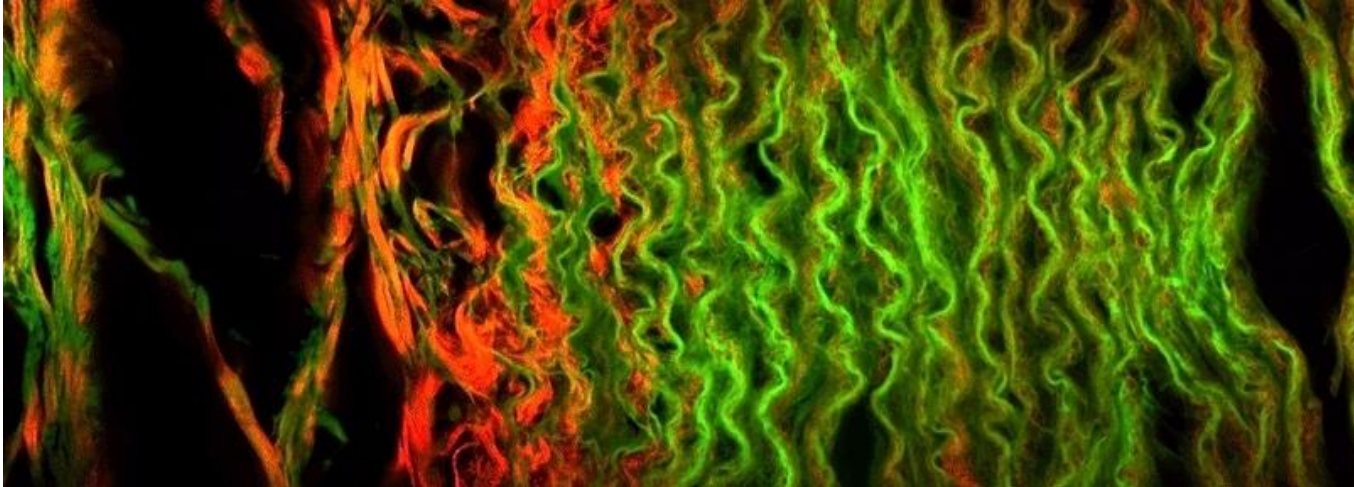
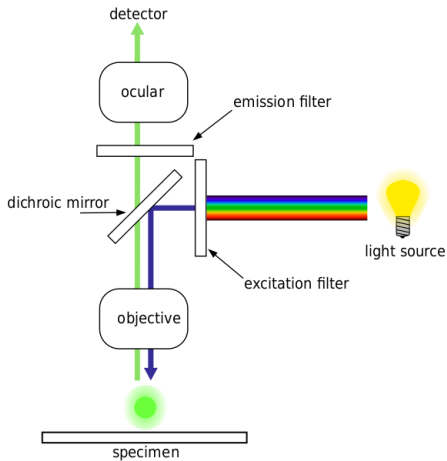


Μη γραμμική μικροσκοπία

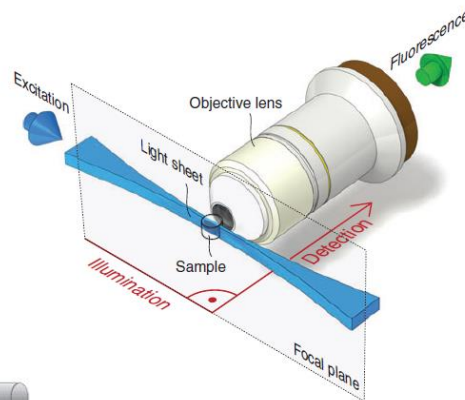


Το πρόβλημα της σκέδασης και απορρόφησης

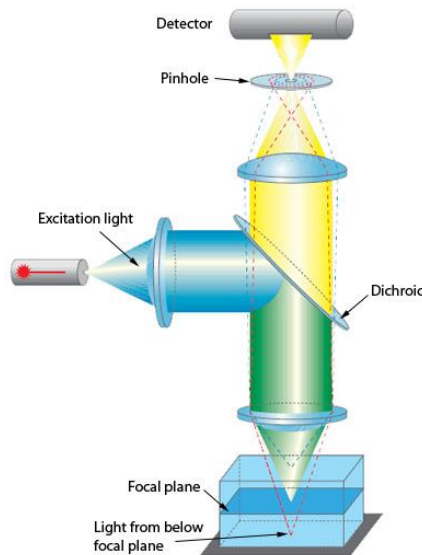
Widefield



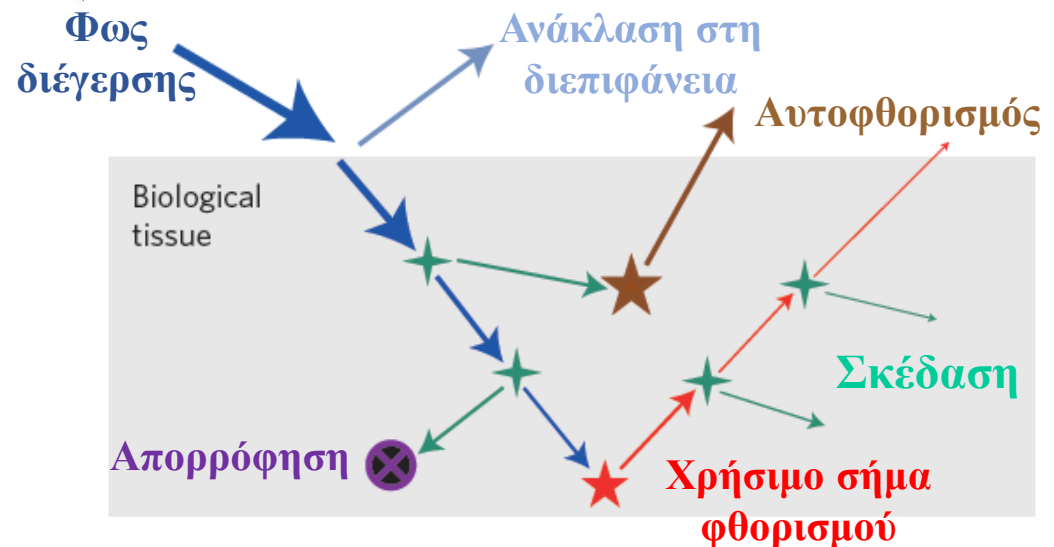
SPIM



Confocal

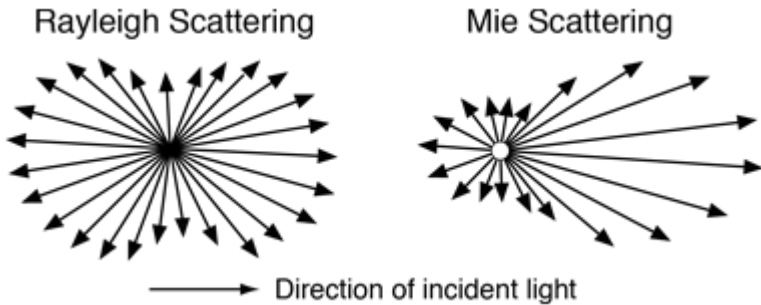


- Χρήση ορατής ακτινοβολία (400-700 nm) για τη διέγερση των φθοροφόρων
- Κατάλληλες τεχνικές για σχετικά λεπτά δείγματα που παρουσιάζουν οπτική διαφάνεια
- Τα ορατά μήκη κύματος σκεδάζονται και απορροφώνται από τους ιστούς περιορίζοντας το μέγιστο απεικονιστικό βάθος



Οπτική σκέδαση στον ιστό

Κύριοι σκεδαστές

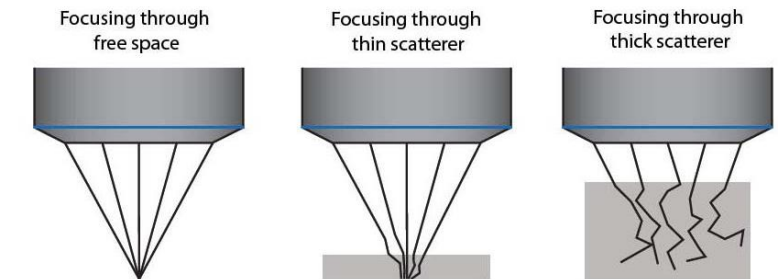
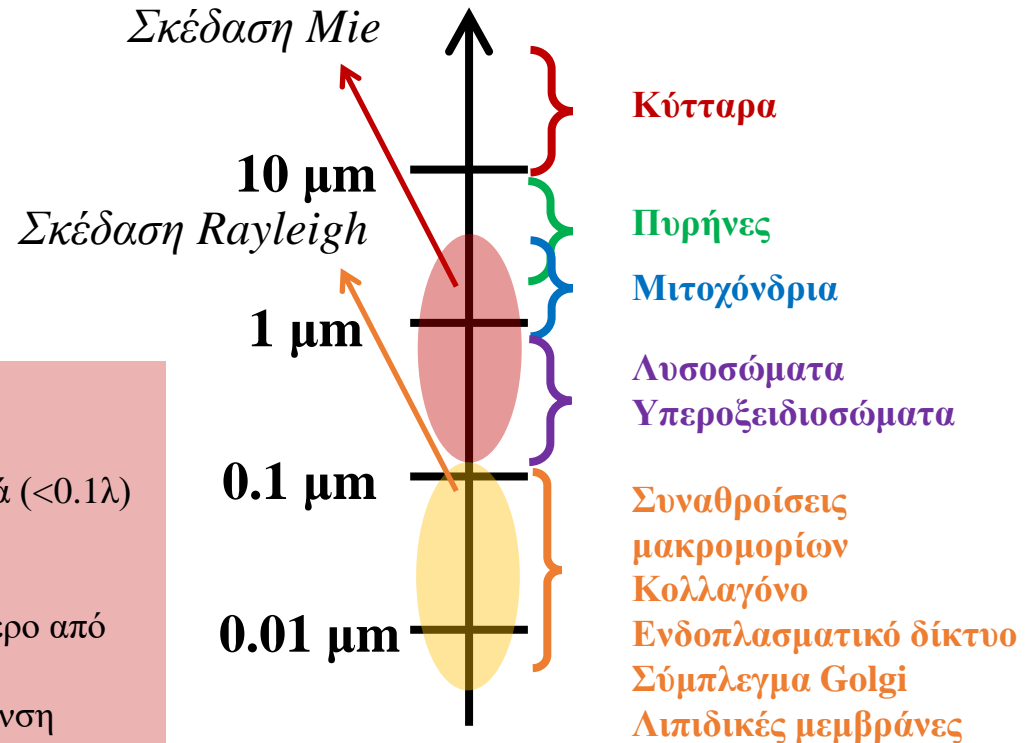


Σκέδαση Rayleigh

- Οφείλεται σε σωματίδια τα οποία είναι πολύ μικρά ($<0.1\lambda$) σε σχέση με το μήκος κύματος
- Εξαρτάται από το μήκος κύματος ως $1/\lambda^4$
- Τα μπλε μήκη κύματος σκεδάζονται 4X περισσότερο από τα κόκκινα
- Το φως σκεδάζεται κυρίως παράλληλα στη διεύθυνση διάδοσης του φωτός (προς τα εμπρός και προς τα πίσω)

Σκέδαση Mie

- Οφείλεται σε σωματίδια τα οποία είναι συγκρίσιμα ή μεγαλύτερα σε σχέση με το μήκος κύματος
- Ασθενική εξάρτηση από το μήκος κύματος
- Όλα τα μήκη κύματος σκεδάζονται σχεδόν το ίδιο
- Το φως σκεδάζεται κυρίως στην διεύθυνση διάδοσης του φωτός προς τα εμπρός



Mean free scattering path: Μέση απόσταση μεταξύ γεγονότων σκέδασης ($\sim 50 \mu\text{m}$ για επιδερμίδα, $\sim 8 \mu\text{m}$ για αίμα στο ορατό φάσμα).

Οπτική σκέδαση στον ιστό – πείραμα



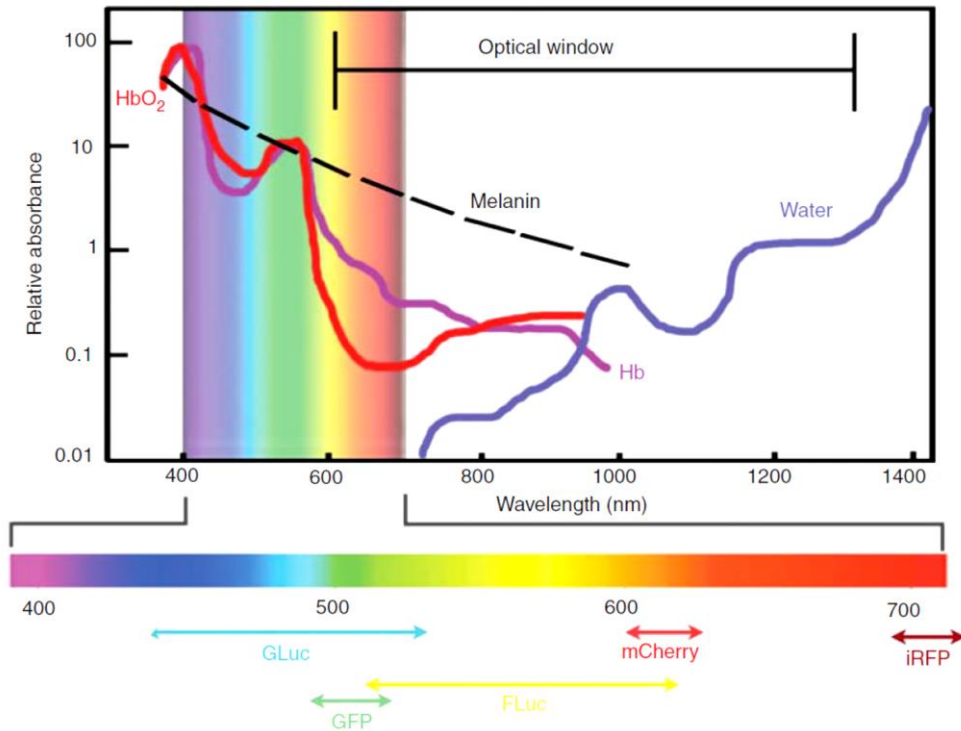
<https://www.youtube.com/watch?v=BLB0Eo8GhfU>



- Όταν διέρχεται μέσα στο νερό, η δέσμη του λέιζερ είναι αόρατη εφόσον δεν υπάρχει σκεδαζόμενο φως που θα φτάσει στα μάτια μας
- Με την προσθήκη γάλακτος, εισάγεται ισχυρή οπτική σκέδαση που κάνει τη δέσμη ορατή
- Σε πολύ πυκνές περιοχές, το φως σταματά να διαδίδεται ευθύγραμμα και διαχέεται εντελώς εντός του μίγματος

Οπτική απορρόφηση στον ιστό

Το «οπτικό παράθυρο» του ιστού (600-1300 nm)

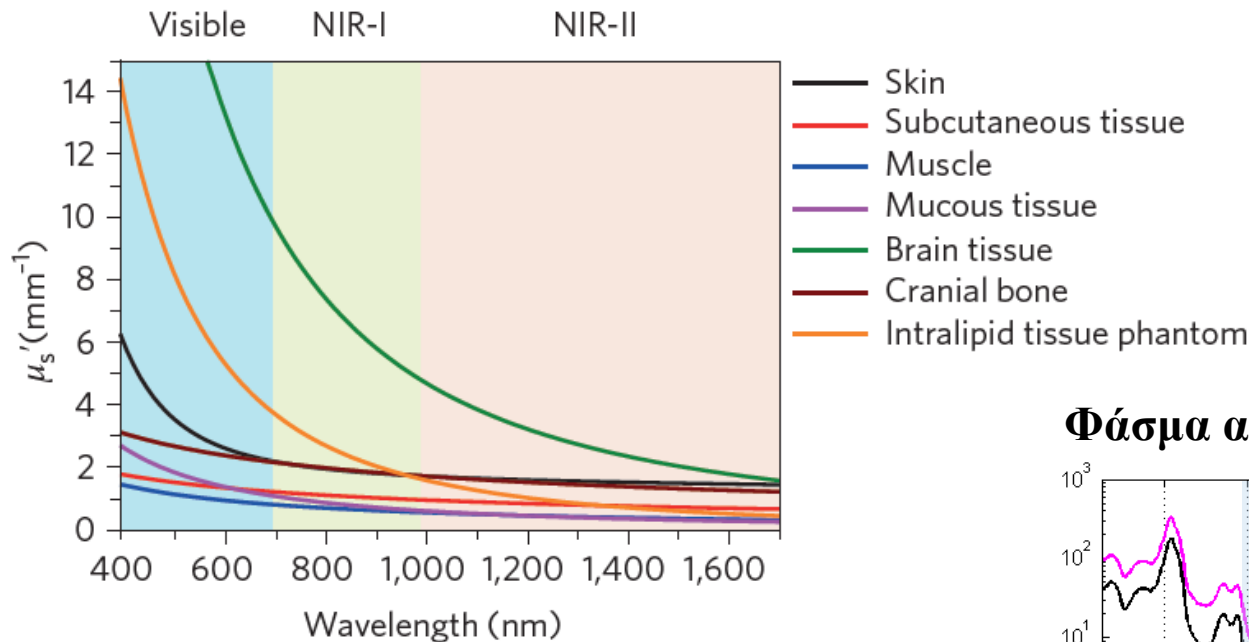


Lyons et al, Cold Spring Harbor Protocols, 2013

- Στην ορατή περιοχή του φάσματος το φως απορροφάται έντονα κυρίως από τη μελανίνη και την αιμοσφαιρίνη
- Η φασματική περιοχή 600-1300 nm ονομάζεται «οπτικό παράθυρο» του ιστού
- Στο «οπτικό παράθυρο», η μελανίνη και η αιμοσφαιρίνη παρουσιάζουν ταυτόχρονα χαμηλή απορρόφηση
- Συνεπώς στην περιοχή 600-1300 nm μπορεί να επιτευχθεί το μέγιστο βάθος οπτικής απεικόνισης
- Σε μήκη κύματος μεγαλύτερα των 1300 nm, ξεκινά να γίνεται έντονη η απορρόφηση του νερού

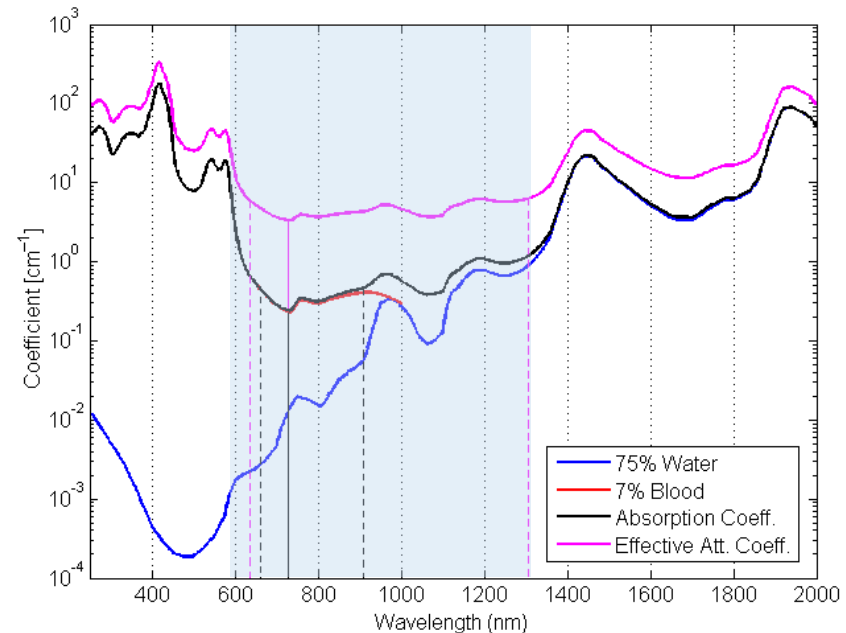
Φάσματα σκέδασης / απορρόφησης ιστών

Φάσμα σκέδασης διαφόρων ιστών



Hong et al, Nature Biomedical Engineering, 2017

Φάσμα απορρόφησης μαστικού ιστού

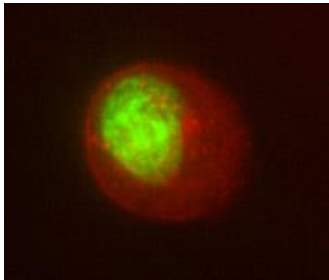


Το «οπτικό παράθυρο» παρουσιάζει πλεονέκτημα τόσο από την άποψη της απορρόφησης όσο και από την άποψη της σκέδασης εφόσον τα υπέρυθρα μήκη κύματος παρουσιάζουν μειωμένη σκέδαση Rayleigh

Πως μπορώ να κάνω χρήση του οπτικού παραθύρου;

Προσέγγιση #1: Χρήση φθοροφόρων που απορροφούν στο κοντινό υπέρυθρο

Κύτταρο A431



- Μειωμένο σήμα φθορισμού
- Χημική αστάθεια
- Δυσκολία ανίχνευσης υπέρυθρου σήματος λόγω μικρής ευαισθησίας PMTs, CCDs

Red: IRDye 800CW EGF

Green: Sytox Green

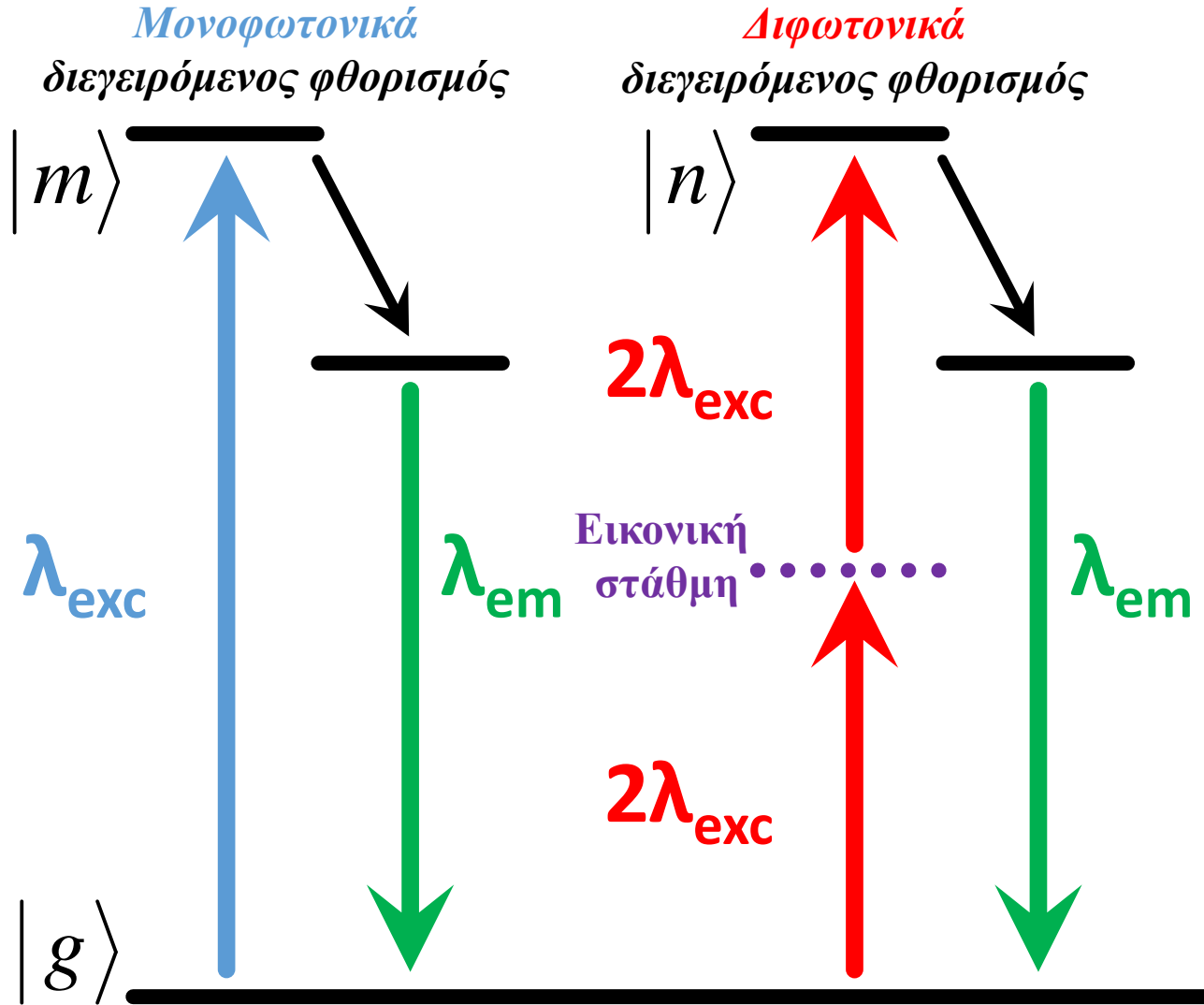
<https://www.licor.com/bio/applications/microscopy/>

Προσέγγιση #2: Μη γραμμική (πολυφωτονική) διέγερση φθοροφόρου



- Πως επιτυγχάνεται η πολυφωτονική διέγερση φθορισμού;
- Γιατί η διαδικασία αυτή είναι μη γραμμική;
- Ποια η διαφορά με τη γραμμική διαδικασία μονοφωτονικής διέγερσης φθορισμού όπως π.χ. στο confocal?

Ο διφωτονικά διεγυρόμενος φθορισμός



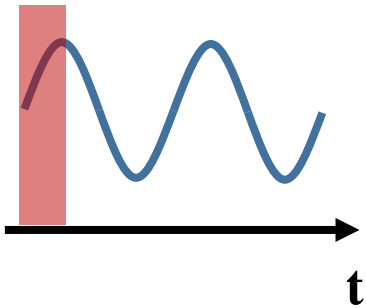
Π.χ. Αντί να διεγυρῶ με 1 ορατό φωτόνιο των 532 nm, χρησιμοποιῶ 2 υπέρυθρα φωτόνια των 1064 nm που ἔχουν συνολικά ἴδια ἐνέργεια

Η αρχή απροσδιοριστίας χρόνου - ενέργειας

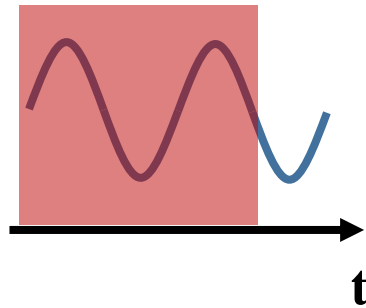
Ενέργεια
ηλεκτρονίου
 $\delta E = hf$



Όσο καλύτερα γνωρίζω τη
συχνότητα f , τόσο
ακριβέστερα ξέρω και την
ενέργεια του ηλεκτρονίου



Μικρός χρόνος
αναμονής, μεγάλη
αβεβαιότητα στη
συχνότητα, μεγάλη
αβεβαιότητα στην
ενέργεια



Μεγάλος χρόνος
αναμονής, μικρή
αβεβαιότητα στη
συχνότητα,
μικρή αβεβαιότητα
στην ενέργεια

Αρχή απροσδιοριστίας χρόνου - ενέργειας

Υπάρχει ένα όριο ΔE στην ακρίβεια που μπορούμε να γνωρίζουμε την ενέργεια ενός συστήματος, αν το σύστημα παραμένει σε μια κατάσταση για χρόνο Δt

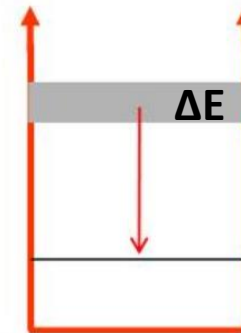
$$\Delta E \cdot \Delta t \approx \hbar$$

\hbar : Σταθερά Planck / 2π

ΔE : Η αβεβαιότητα στην ενέργεια



Εικονική στάθμη: μια πραγματική ενεργειακή κατάσταση που είναι διευρυμένη λόγω της αρχής απροσδιοριστίας-χρόνου ενέργειας και έχει εξαιρετικά μικρό χρόνο ζωής της τάξης του fs (10^{-15} s)



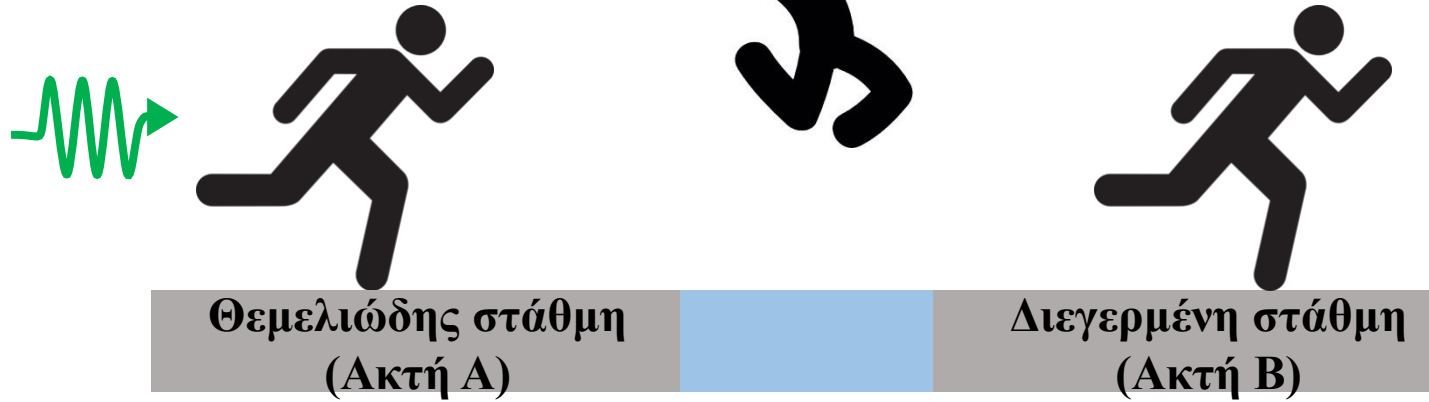
Πεπερασμένος χρόνος
ζωής κατάστασης Δt



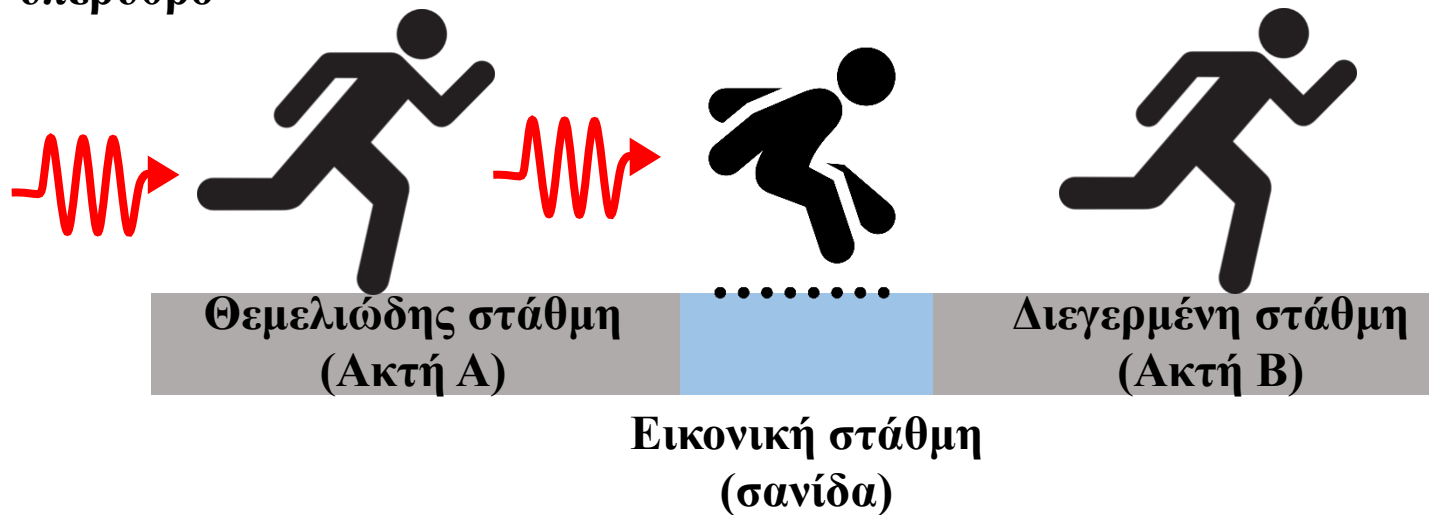
Διεύρυνση ενέργειας
κατάστασης ΔE

Πώς διασχίζω το ποτάμι;

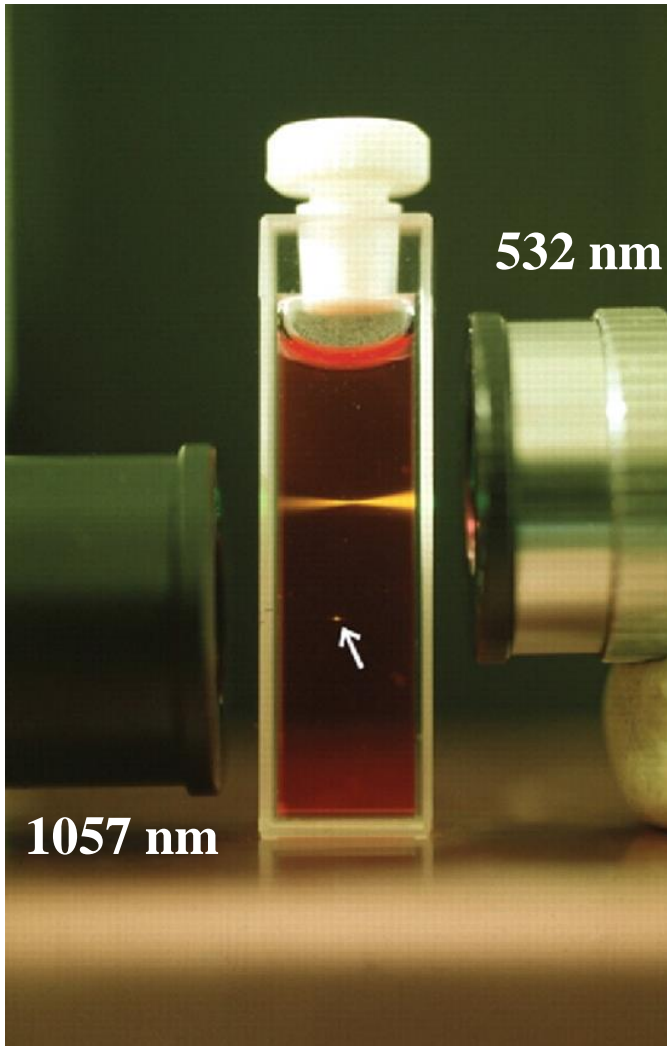
1 φωτόνιο
στο ορατό



2 φωτόνια στο
υπέρυθρο



Σύγκριση μονοφωτονικής και διφωτονικής διέγερσης



- Στη μονοφωτονική διέγερση (532 nm), ο φθορισμός προκύπτει σε έναν εκτεταμένο όγκο που περιλαμβάνει την εστία αλλά και τις περιοχές πριν και μετά από αυτή
- Αντίθετα, στη διφωτονική διέγερση (1057 nm), ο φθορισμός προκύπτει μόνο στην εστία του φακού, εκεί δηλαδή που συναντάται υψηλή ένταση ακτινοβολίας
- Το γεγονός αυτό συνεπάγεται πως στη μικροσκοπία διφωτονικά διεγερόμενου φθορισμού δεν απαιτείται χρήση οπής (pinhole) για την αφαίρεση του σήματος εκτός του εστιακού επιπέδου
- Η ένταση του μονοφωτονικά διεγερόμενου φθορισμού είναι ανάλογη της διεγείρουσας έντασης, ενώ του διφωτονικά διεγερόμενου φθορισμού εξαρτάται μη γραμμικά από το τετράγωνο αυτής

Διφωτονική διέγερση σημαίνει μη γραμμικότητα

Πιθανότητα να φέρω
κορώνα σε μία ρίψη: $\frac{1}{2}$



Πιθανότητα να φέρω 3 κορώνες
σε 3 ρίψεις: $\frac{1}{2} \cdot \frac{1}{2} \cdot \frac{1}{2} = \frac{1}{8}$

First Coin	Second Coin	Third Coin
H	H	H
H	H	T
H	T	H
T	H	H
T	T	T
T	T	H
T	H	T
H	T	T

Πιθανότητα να φέρω 2
κορώνες σε 2 ρίψεις: $\frac{1}{2} \cdot \frac{1}{2} = \frac{1}{4}$



Γενικά, αν P η πιθανότητα ενός επιμέρους ενδεχομένου, η πιθανότητα να συμβεί N φορές συνεχόμενα θα είναι P^N

- Ένταση ακτινοβολίας (I): ενέργεια ανά μονάδα χρόνου και ανά μονάδα επιφάνειας
- Η πιθανότητα αλληλεπίδρασης ενός φωτονίου με το ηλεκτρόνιο θα είναι ανάλογη της έντασης της ακτινοβολίας I
- Η πιθανότητα αλληλεπίδρασης δύο φωτονίων με το ηλεκτρόνιο θα είναι το γινόμενο των 2 επιμέρους πιθανοτήτων
- Ο φθορισμός που θα προκύψει θα εξαρτάται από το τετράγωνο της διεγείρουσας έντασης

Τυπικά μεγέθη στη μη γραμμική μικροσκοπία



Ο διφωτονικά διεγερόμενος φθορισμός έχει πολύ μικρή πιθανότητα να συμβεί λόγω του εξαιρετικά μικρού χρόνου ζωής της εικονικής στάθμης. Για να τον καταγράψουμε λοιπόν χρειαζόμαστε **εξαιρετικά μεγάλες εντάσεις!**

$$\text{Ένταση φωτός} = \frac{\text{(Ενέργεια)}}{\text{(Χρόνος)} \times \text{(Επιφάνεια)}}$$

Τιμές σύγκρισης



Ένα κουνούπι που πετάει έχει κινητική ενέργεια: **~160 nJ**



1 fs (10^{-15} s) είναι για το **1 s** ότι είναι το **1 s** για **33 εκατομμύρια χρόνια!**



Επιφάνεια διατομής μιας τρίχας: **~7850 μm^2**

↓ Η ενέργεια πρέπει να κρατηθεί όσο το δυνατόν χαμηλότερη έτσι ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος καταστροφής του δείγματος

↓ Μικρή χρονική διάρκεια παλμού

↓ Πολύ καλά εστιασμένη δέσμη

Τυπικές παράμετροι femtosecond λέιζερ

(Ενέργεια): **0.5 nJ**

(Χρόνος): **200 fs**

(Επιφάνεια): **0.78 μm^2**

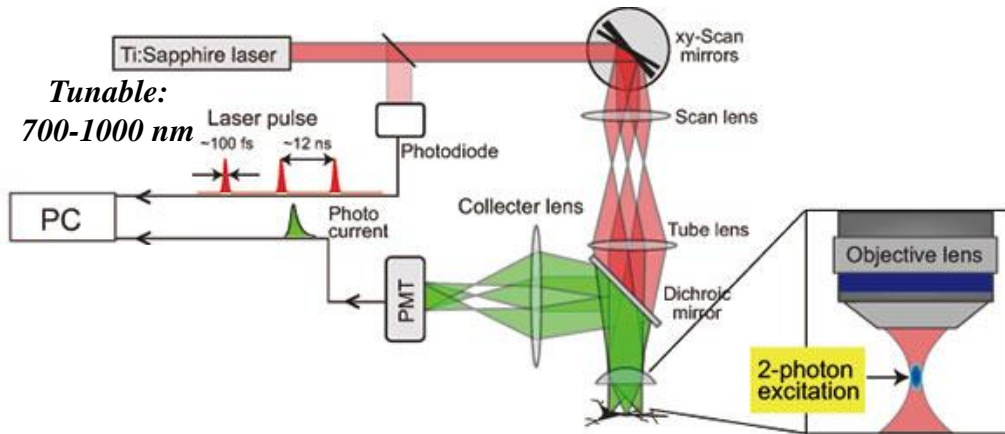


Ένταση φωτός: 320 GW/cm² !

Είναι σαν να έχουμε την κινητική ενέργεια 14 αεροπλάνων τύπου Airbus A380 να διαπερνάει μια επιφάνεια 1 cm² ανά δευτερόλεπτο!

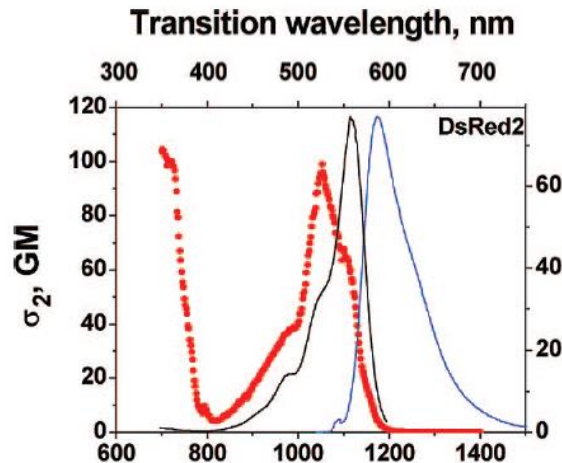
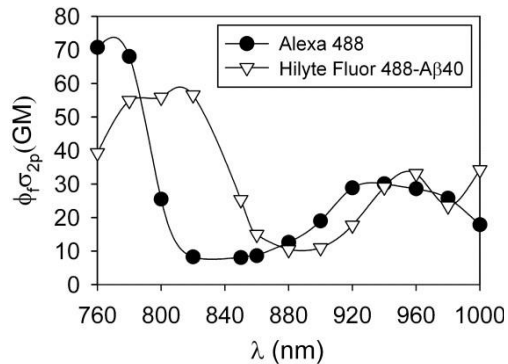
Κόστος fs λέιζερ: ~ 100.000 euros

Διάταξη μη γραμμικής μικροσκοπίας



- Δεν απαιτείται η χρήση pinhole για χωρικό φιλτράρισμα του φθορισμού πριν τον PMT
- Λιγότερη φωτολεύκανση εφόσον δεν υπάρχει διέγερση φθορισμού εκτός του εστιακού επιπέδου
- Λιγότερη φωτοτοξικότητα λόγω της χαμηλής ενέργειας των υπέρυθρων φωτονίων
- Μεγαλύτερο βάθος απεικόνισης (~500 μm) λόγω μειωμένης σκέδασης και απορρόφησης της υπέρυθρης ακτινοβολίας
- Χωρική ανάλυση συγκρίσιμη αλλά ελαφρώς χειρότερη από το confocal λόγω χρήσης μεγαλύτερων μηκών κύματος

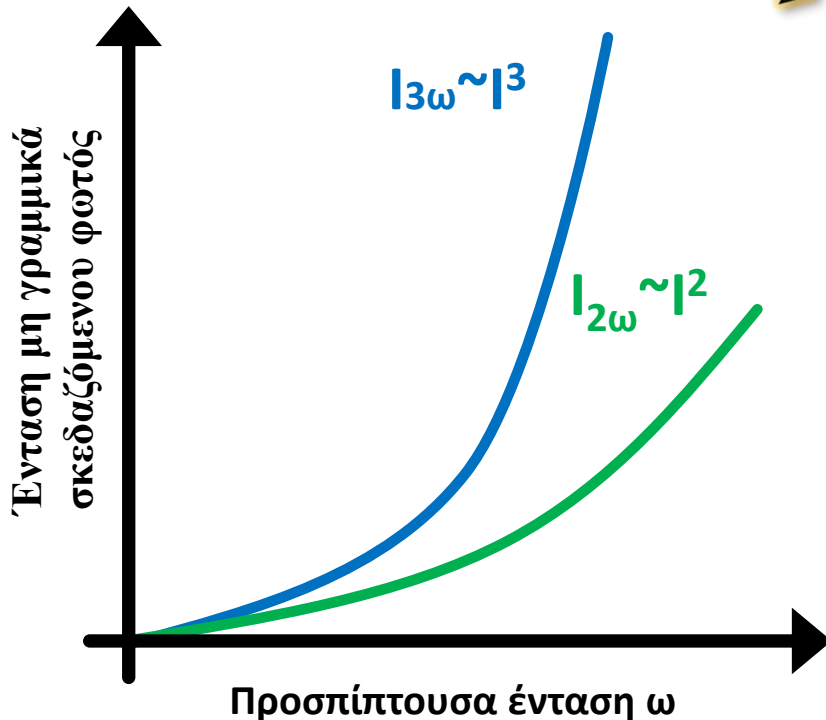
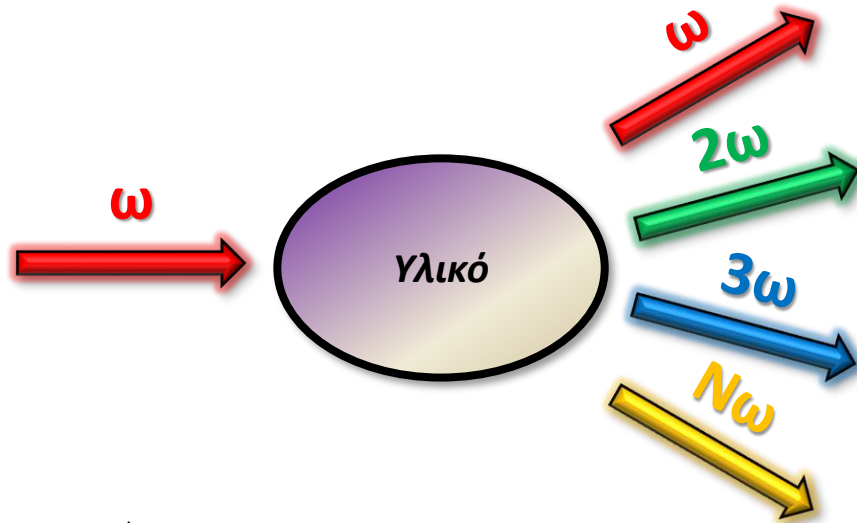
<https://www.nips.ac.jp/eng/research/group/post-28/>



Το διφωτονικό φάσμα διέγερσης είναι αρκετά ευρύ και επιτρέπει τη διέγερση πολλών φθοροφόρων με ένα μόνο μήκος κύματος

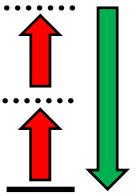
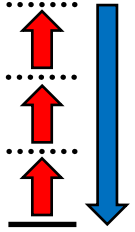

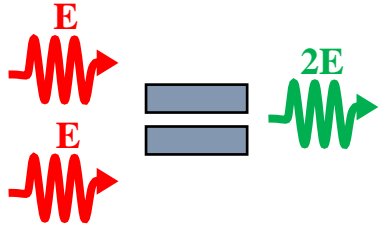
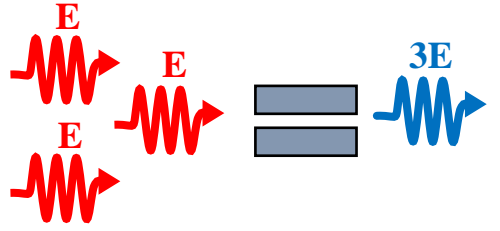
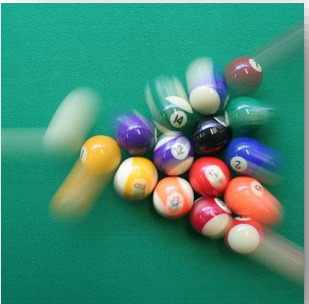
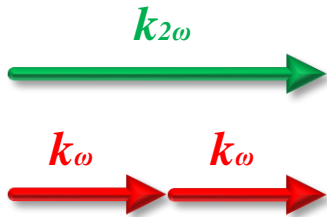
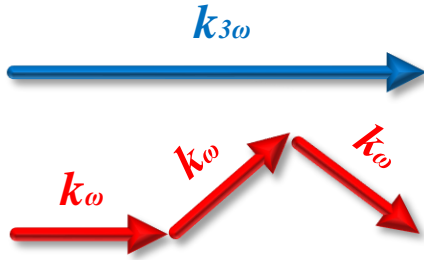
Το **διφωτονικό φάσμα διέγερσης** είναι εν γένει διαφορετικό από το δύο φορές το μονοφωτονικό

Παραγωγή οπτικών αρμονικών συχνοτήτων



- Μη γραμμικό φαινόμενο σύμφωνης σκέδασης
- Δεν υπάρχει απορρόφηση της ακτινοβολίας όπως στο φθορισμό
- N φωτόνια ενέργειας $\hbar\omega$ συνδυάζονται ώστε να προκύψει ένα φωτόνιο $N\hbar\omega$
- Π.χ. 2 φωτόνια στα 1064 nm δίνουν ένα φωτόνιο των 532 nm (2^η αρμονική)
- Π.χ. 3 φωτόνια στα 1064 δίνουν ένα φωτόνιο των ~ 355 nm (3^η αρμονική)
- Το φαινόμενο συμβαίνει όταν το ηλεκτρικό πεδίο του φωτός γίνει συγκρίσιμο με το πεδίο που επικρατεί εντός των μορίων
- Η παραγωγή 2^{ης} και 3^{ης} αρμονικής συχνότητας μπορεί να δώσει ταυτόχρονα συμπληρωματική πληροφορία σε ένα μη γραμμικό μικροσκόπιο φθορισμού

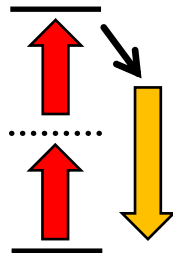
Συνθήκες παραγωγής SHG και THG

<p>Εικονικές στάθμες</p> <p>Second Harmonic Generation</p> 	<p>Third Harmonic Generation</p> 	
<p>Διατήρηση ενέργειας</p> 		
<p>Διατήρηση ορμής</p> 	<p>Οπτική ανισοτροπία: Εξάρτηση δείκτη διάθλασης από το επίπεδο πόλωσης του φωτός</p> 	<p>Οπτική ανομοιογένεια: Διεπιφάνειες υλικών με διαφορετικές οπτικές ιδιότητες</p> 

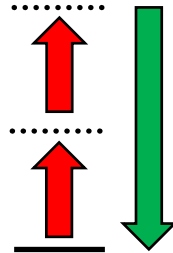
Απεικονιστική αντίθεση στις μη γραμμικές τεχνικές

Μη γραμμική τεχνική

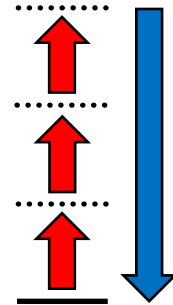
Two photon
excitation
fluorescence



Second
Harmonic
Generation

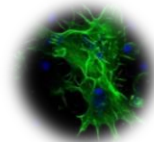


Third
Harmonic
Generation



Τί μπορώ να δω;

Οτιδήποτε μπορεί να σημειωθεί για
μικροσκοπία confocal αλλά με...

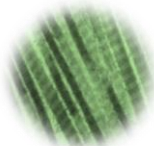


Υψηλό βάθος
απεικόνισης



Ελαχιστοποίηση
φωτολεύκανσης /
φωτοτοξικότητας

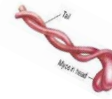
Εγγενές σήμα (label-free) από βιολογικές
δομές που παρουσιάζουν οπτική ανισοτροπία



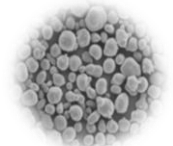
Collagen



Microtubules

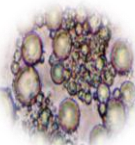


Myosin

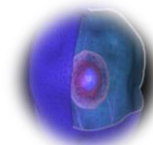


Starch

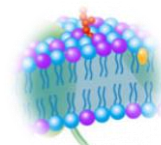
Εγγενές σήμα (label-free) από οποιαδήποτε
οπτική ανομοιογένεια εντός του δείγματος



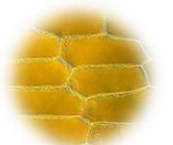
Lipids



Nuclei

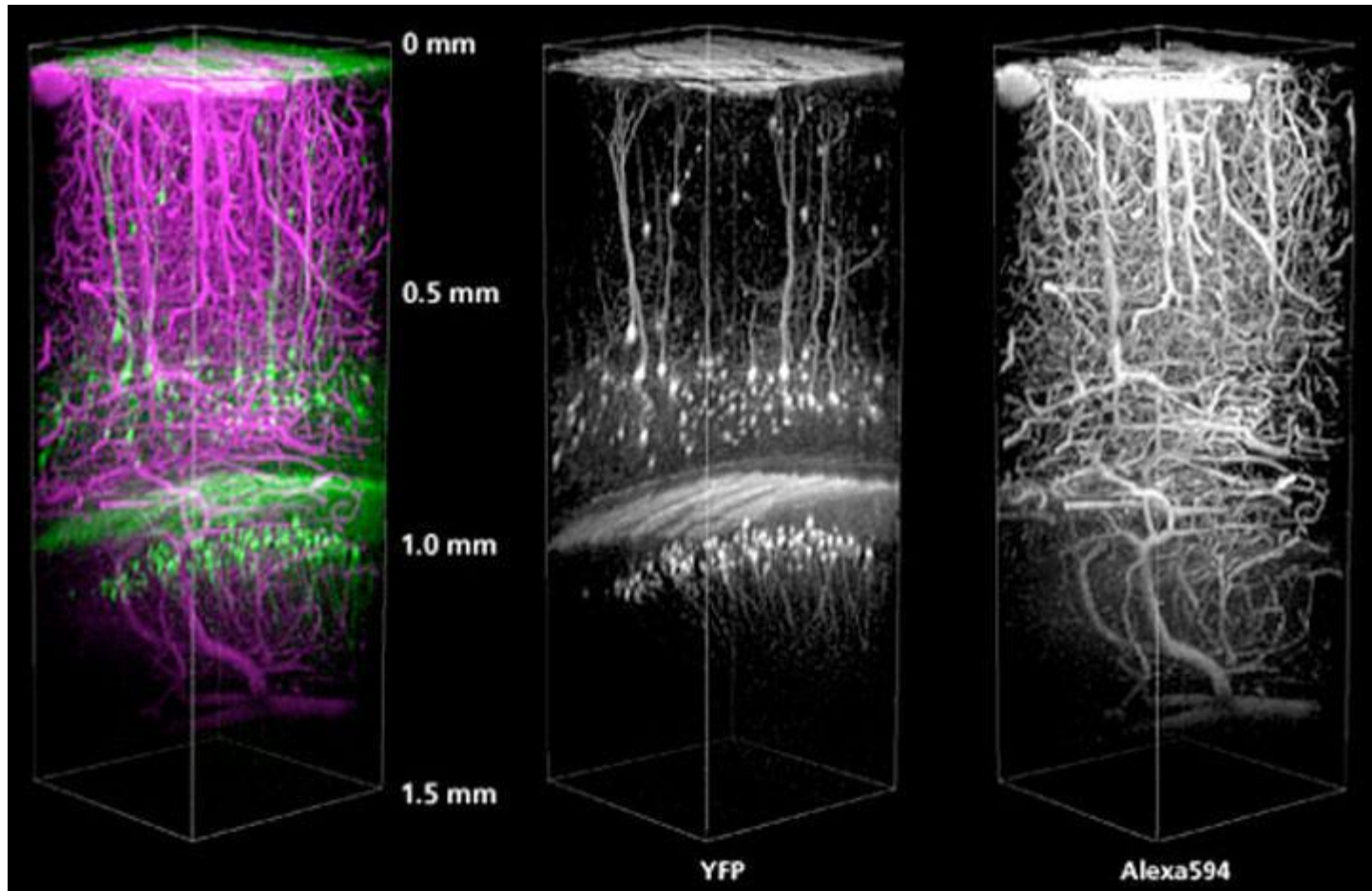


Membranes



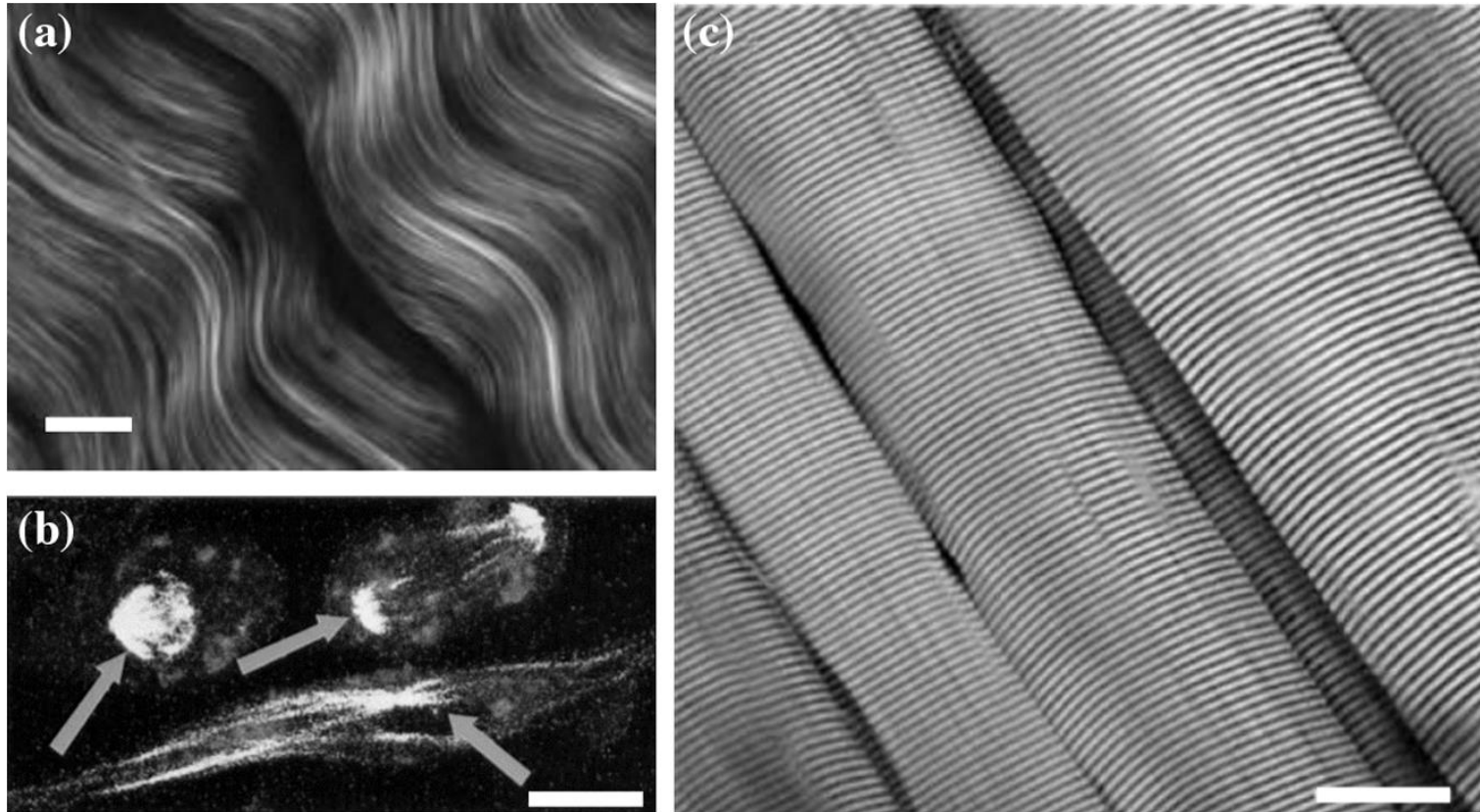
Cell wall

Εφαρμογές μη γραμμικής μικροσκοπίας



The cerebral cortex of an anesthetized YFP-H mouse (4-week-old) was studied with the open skull method. Alexa594 was injected into the tail vein to visualize the blood vessel.

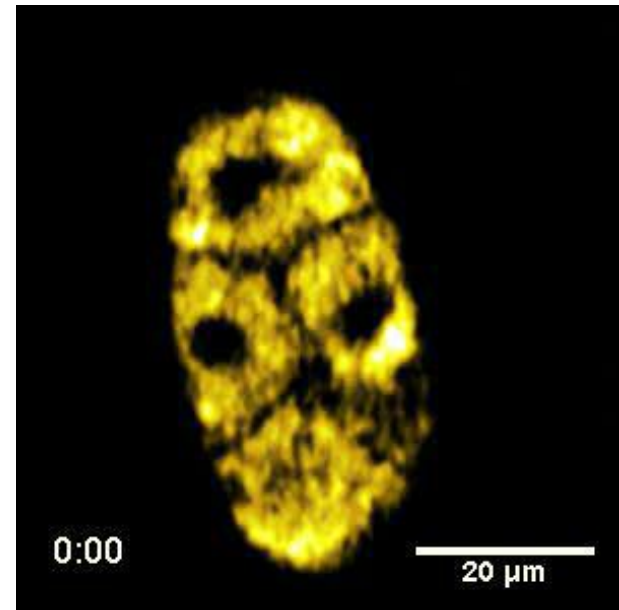
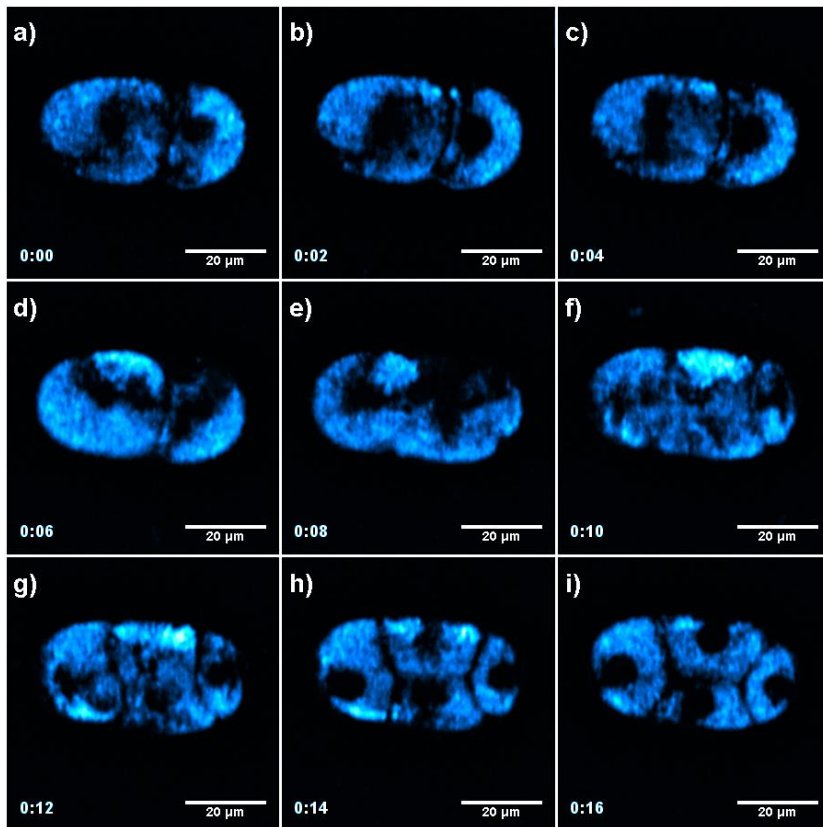
Εφαρμογές μη γραμμικής μικροσκοπίας - SHG



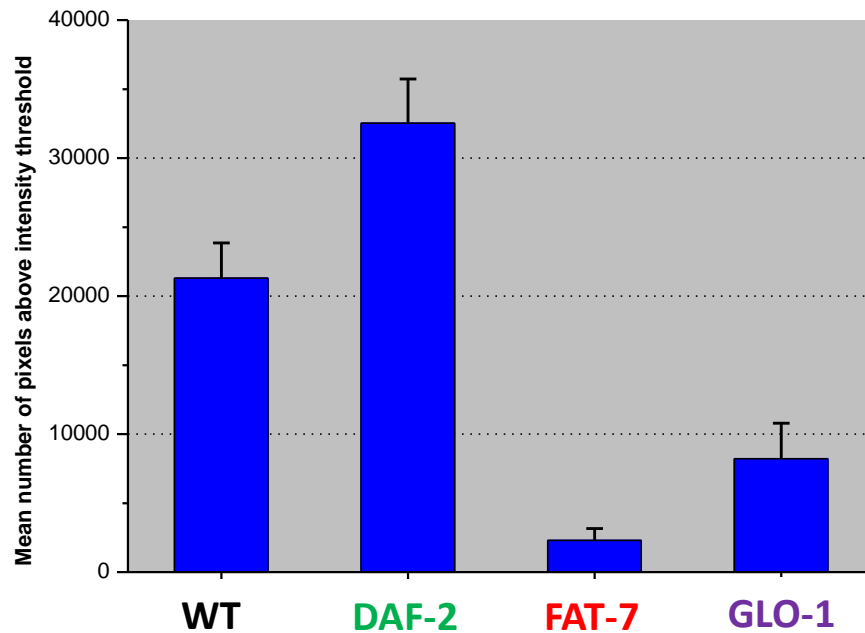
Endogenous second-harmonic-generation (SHG) imaging. (a) SHG image from a mature rat tail tendon collagen. (b) SHG imaging in living cells. SHG arises from mitotic spindles and from interphase microtubule ensembles in RBL cells. (c) SHG image of a gastrocnemius muscle.

Εφαρμογές μη γραμμικής μικροσκοπίας - THG

C. Elegans embryogenesis using THG



Εφαρμογές μη γραμμικής μικροσκοπίας - THG



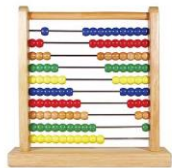
✓ Έλεγχος ANOVA: Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών ($p < 0.001$)

✓ Tukey's post-hoc test: Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ

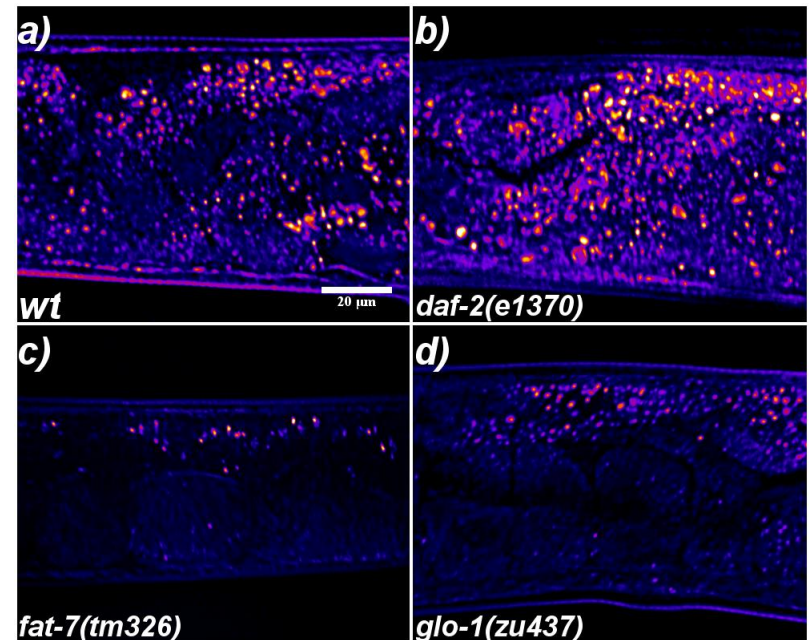
WT και **FAT-7** ($p < 0.001$)

WT και **GLO-1** ($p < 0.01$)

WT και **DAF-2** ($p < 0.05$)



THG απεικόνιση λιπιδικών εναποθέσεων σε wild type και μεταλλαγμένους σκόληκες *C. Elegans*



Tserevelakis et al, PLoS One, 2014

FAT-7



Horikawa et al. 2010

DAF-2



Kimura et al. 1997

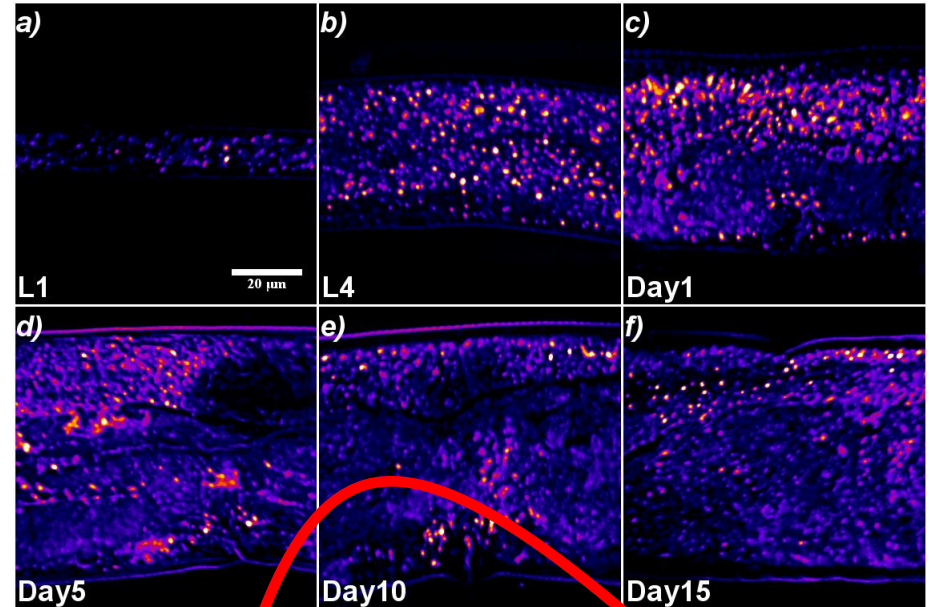
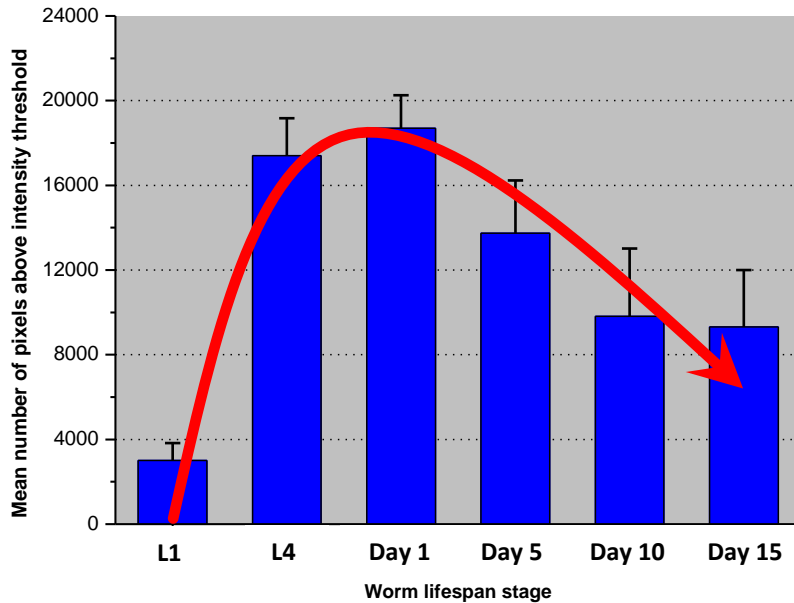
GLO-1



Έλεγχος μεταβολών λιπιδικού περιεχομένου

Εφαρμογές μη γραμμικής μικροσκοπίας - THG

Μεταβολές της λιπιδικής εναπόθεσης κατά τη γήρανση του σκώληκα άγριου τύπου

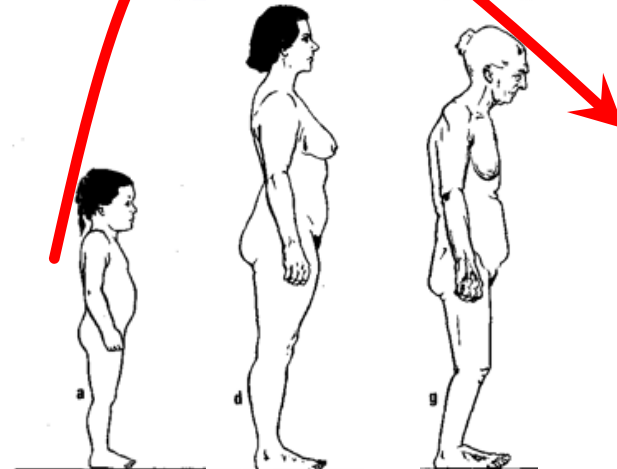
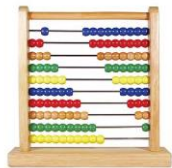


- ✓ Έλεγχος ANOVA: Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών ($p < 0.001$)
- ✓ Tukey's post-hoc test: Στατιστικά σημαντική αύξηση λίπους μεταξύ

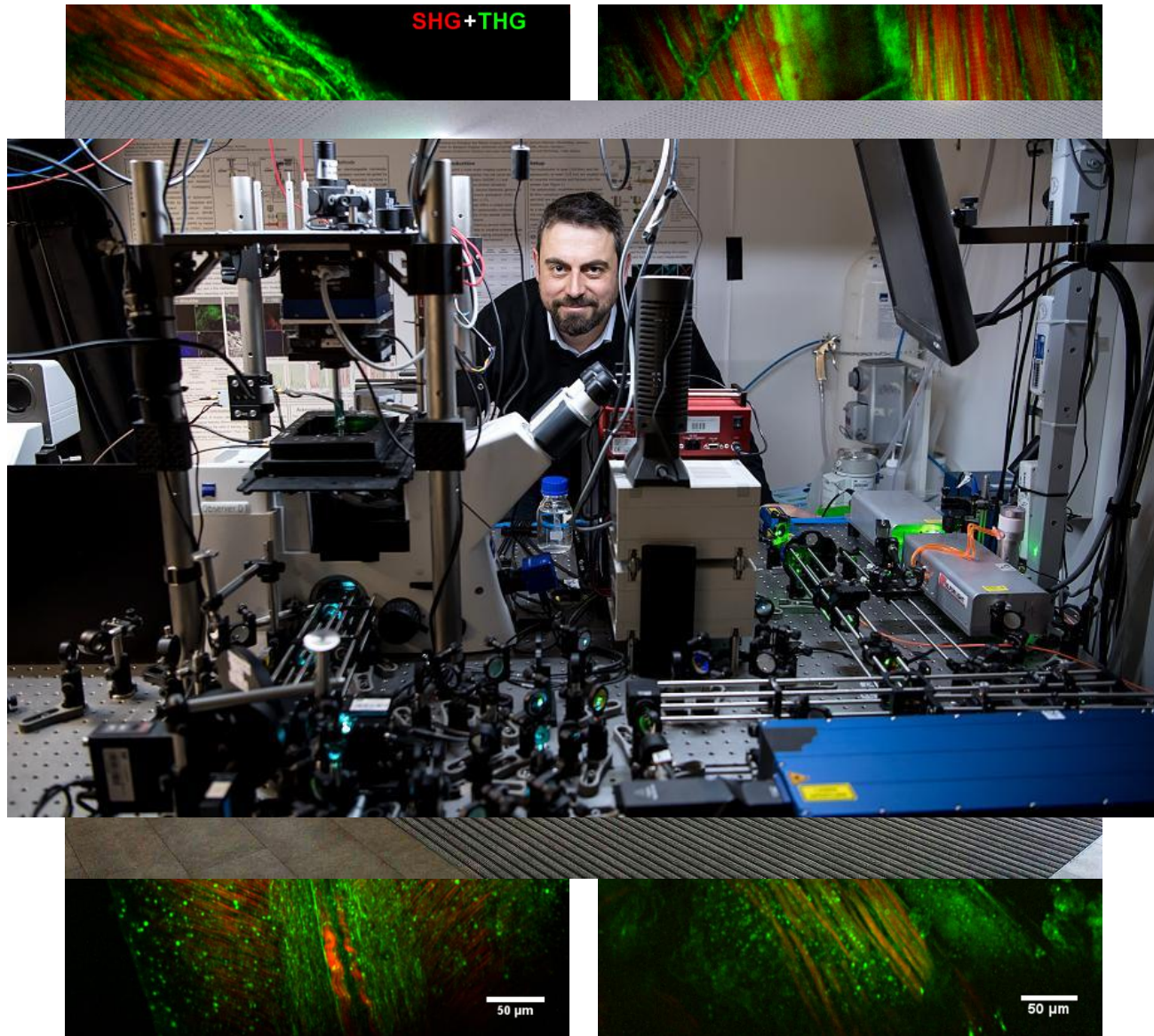
L1 και L4 ($p < 0.001$)

L1 και Day 1 ($p < 0.001$)

L1 και Day 5 ($p < 0.05$)



Συνδυασμένη απεικόνιση SHG/THG σε Zebrafish



Ποια ερωτήματα πρέπει να μπορούμε να απαντάμε;



Maria Goeppert Mayer
(1906-1972)

- Ποιοι είναι οι βασικοί σκεδαστές και απορροφητές εντός των ιστών στην ορατή περιοχή του φάσματος;
- Ποια είδη σκέδασης γνωρίζετε;
- Τι ονομάζουμε οπτικό παράθυρο του ιστού;
- Τι είναι ο διφωτονικά διεγερόμενος φθορισμός και σε τι διαφέρει από τη μονοφωτονική περίπτωση;
- Τι γνωρίζετε για την αρχή της απροσδιοριστίας χρόνου - ενέργειας και πως αυτή συνδέεται με τις εικονικές καταστάσεις;
- Ποιες είναι οι τυπικές παράμετροι λείζερ για την απόκτηση μη γραμμικού σήματος;
- Ποια είναι τα πλεονεκτήματα της μη γραμμικής μικροσκοπίας έναντι του confocal;
- Τι είναι οι οπτικές αρμονικές, πότε παράγονται και τι πληροφορία μπορούν να δώσουν;