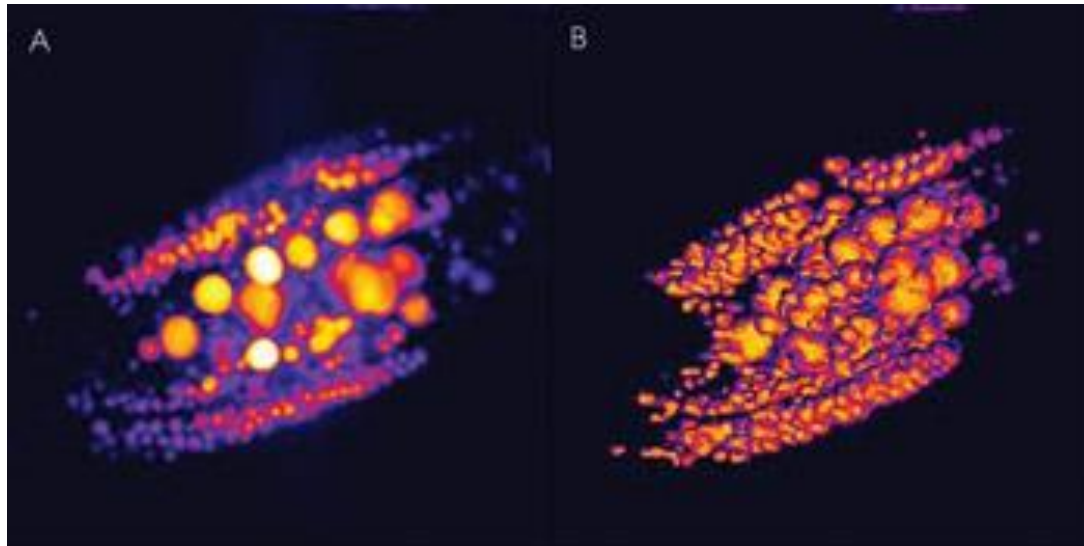


Μικροσκοπία CARS



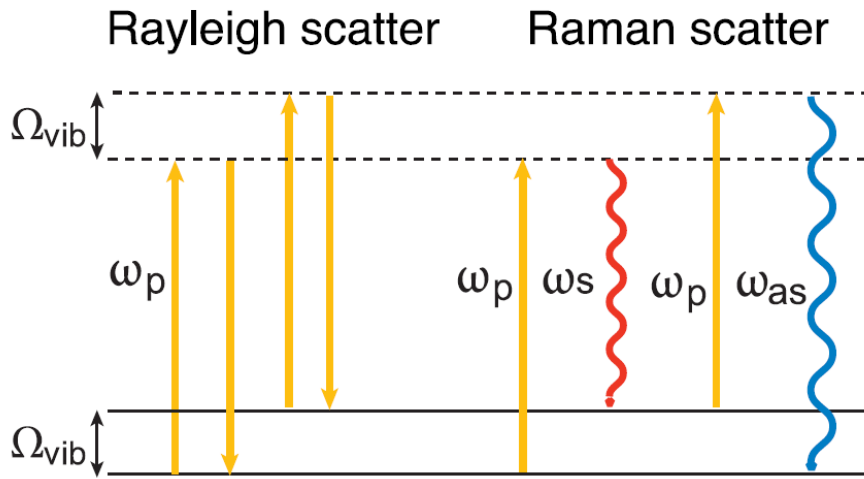
Ιστορική αναδρομή του φαινομένου Raman



Sir Chandrasekhara Venkata Raman
(1888-1970)

- Το φαινόμενο Raman είχε προβλεφθεί θεωρητικά από το Adolf Smekal το 1923, ωστόσο δεν είχε παρατηρηθεί στη φύση
- Το 1928 ο C.V. Raman μαζί με τον K.S. Krishnan ανακαλύπτουν τη μη ελαστική σκέδαση φωτονίων σε οργανικά υγρά χρησιμοποιώντας ηλιακό φως
- Το 1930 ήταν τόσο σίγουρος ότι θα κερδίσει το Νομπελ φυσικής για αυτή του την ανακάλυψη, που είχε κλείσει τα εισιτήρια του ταξιδιού του για την απονομή μήνες πριν
- Πράγματι, το 1930 γίνεται ο πρώτος μη λευκός επιστήμονας που κερδίζει το βραβείο Νόμπελ στις επιστήμες
- Η ανακάλυψη της σκέδασης Raman αποτέλεσε μια επιπλέον απόδειξη της κβαντικής φύσης του φωτός

Η αυθόρμητη σκέδαση Raman



Ισχύει ότι:

$$\omega_s = \omega_p - \Omega_{\text{vib}}$$

$$\omega_{\text{as}} = \omega_p + \Omega_{\text{vib}}$$

Συνεπώς, από τη μετατόπιση της συχνότητας του καταγραφόμενου φωτός σε σχέση με το προσπίπτον, μπορούμε να προσδιορίσουμε τις χαρακτηριστικές συχνότητες δόνησης του μορίου!



- Στο ενεργειακό διάγραμμα οι διακοπτόμενες γραμμές αναπαριστούν εικονικές στάθμες (virtual states), ενώ οι μη διακοπτόμενες τις δονητικές καταστάσεις του μορίου
- Ω_{vib} είναι η συχνότητα που αντιστοιχεί στη μετάβαση από τη θεμελιώδη στη διεγερμένη δονητική κατάσταση
- Στη σκέδαση Rayleigh, τα προσπίπτοντα φωτόνια ω_p (pump) σκεδάζονται ελαστικά διατηρώντας την αρχική τους ενέργεια (1 στα 10.000 φωτόνια)
- Στη σκέδαση Raman, ένα πολύ μικρό ποσοστό φωτονίων (1 στα 10.000.000) ανταλλάσσει ενέργεια με το μόριο και σκεδάζεται ανελαστικά
- Το φωτόνιο ω_p σκεδάζεται διεγείροντας το μόριο σε μια υψηλότερη δονητική στάθμη, με αποτέλεσμα την εκπομπή ενός φωτονίου χαμηλότερης ενέργειας ω_s (Stokes)
- Ένα ακόμα μικρότερο ποσοστό φωτονίων ω_{as} (anti-Stokes) θα σκεδαστεί σε υψηλότερες ενέργειες από το ω_p

Η αυθόρμητη σκέδαση Raman

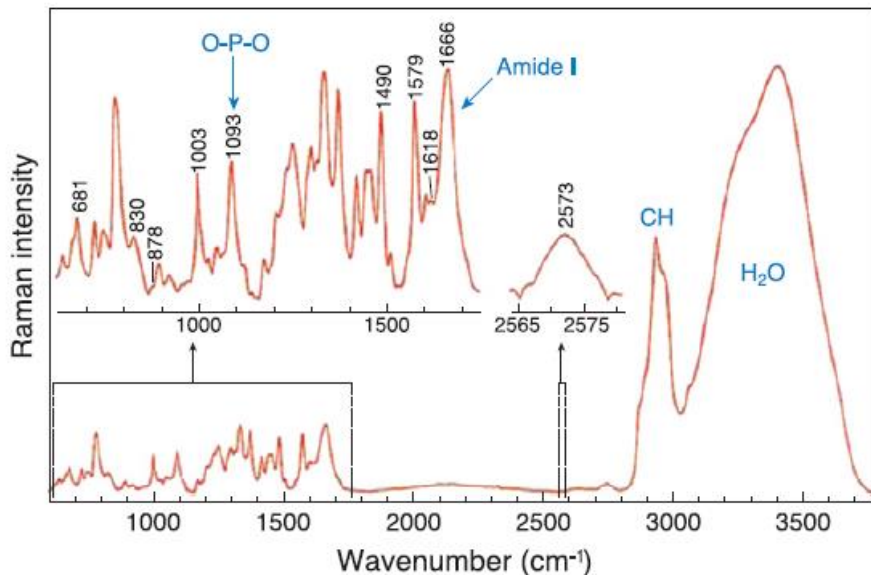
Raman shifts are typically expressed in wavenumbers, which have units of inverse length. As shown in the following equation:

$$\Delta\omega = \left(\frac{1}{\lambda_p} - \frac{1}{\lambda_s} \right)$$

$\Delta\omega$ is the Raman shift expressed in wavenumber, λ_p is the wavelength of the pump beam, and λ_s is the wavelength of the Stokes beam. Most commonly, the unit for expressing wavenumber is inverse centimeter (cm^{-1}), whereas wavelength is commonly expressed in units of nanometer (nm). The equation below can scale for this unit conversion:

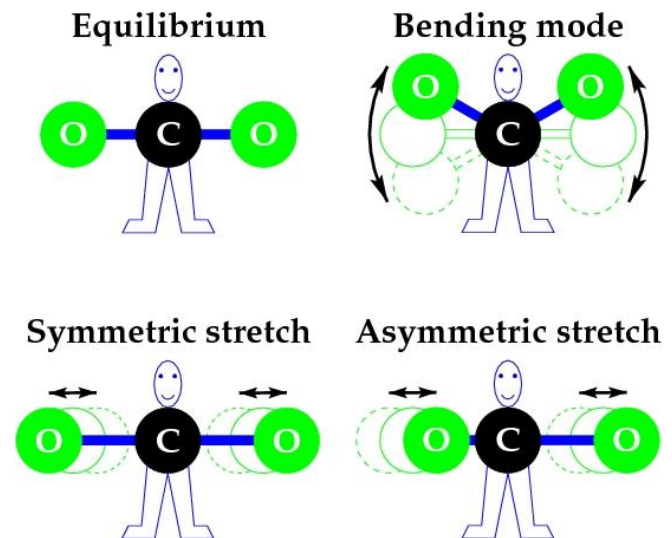
$$\Delta\omega(\text{cm}^{-1}) = \left(\frac{1}{\lambda_p(\text{nm})} - \frac{1}{\lambda_s(\text{nm})} \right) \times \frac{(10^7 \text{ nm})}{(\text{cm})}$$

Τυπικό φάσμα Raman από ιό P22



Τυπικοί δεσμοί και αντίστοιχες μετατοπίσεις Raman

Vibrational bond	Raman shifts (cm^{-1})	Indicative of
C-H ₂	2845	Lipids
C-H ₃	2950	Proteins, lipids
O-H	3250	Water
(C=C)C-H	3015	Unsaturated lipids
C=C	1655	Unsaturated lipids
Conjugated C=C	1590	Retinoic acid
N-C=O	1655	Proteins
Aryl ring	1600	Lignin
Ring breathing of phenylalanine	1004	Proteins
Asymmetric COC	1100	Cellulose
S=O	670	DMSO
Symmetric dioxy stretching of the phosphate backbone	1090-1100	Nucleic acids
Symmetric phosphodiester stretching and ring breathing modes of pyrimidine bases	783-790	Nucleic acids



Η αυθόρμητη σκέδαση Raman

Πλεονεκτήματα

- Απόκτηση χημικής πληροφορίας (μοριακό αποτύπωμα)
- Δεν απαιτείται προ-επεξεργασία του δείγματος
- Μη καταστρεπτική τεχνική

Μειονεκτήματα

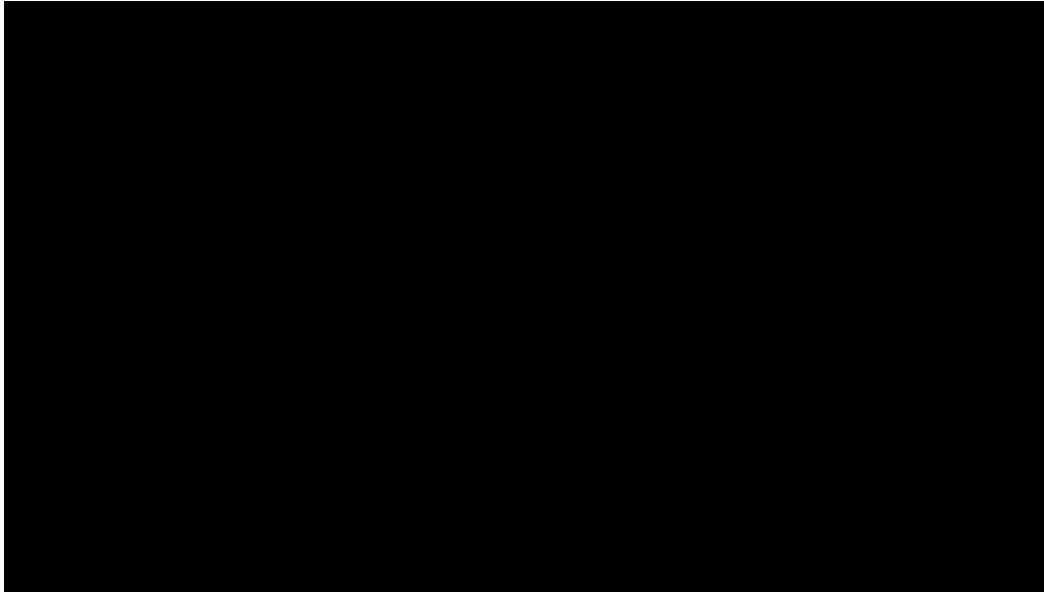
- Το φαινόμενο της σκέδασης Raman είναι πολύ ασθενές
- Για την ανίχνευση απαιτείται εξοπλισμός υψηλής εξειδίκευσης / ανάλυσης
- Ο φθορισμός του δείγματος μπορεί να υπερκαλύψει τη σκέδαση Raman

- Ο χρόνος ολοκλήρωσης για την απόκτηση ενός φάσματος Raman έπειτα από εστίαση της δέσμης σε ένα σημείο είναι της τάξης του 1 sec
- Ο χρόνος αυτός σχετίζεται με το γεγονός ότι η ένταση του σήματος είναι εξαιρετικά μικρή, συνεπώς θα πρέπει να περιμένουμε έως ότου καταγραφούν αρκετά φωτόνια
- Για μια εικόνα 256 x 256 pixels θα απαιτούνταν ~18 ώρες καταγραφής, γεγονός που κάνει την τεχνική πρακτικά μη χρήσιμη για βιολογική απεικόνιση



Θα μπορούσαμε με κάποιο τρόπο να ενισχύσουμε τη σκέδαση Raman και να αποφύγουμε το σήμα φθορισμού;

Τί είναι τα διακροτήματα;



<https://www.youtube.com/watch?v=pRpN9uLiouI>



Το διακρότημα είναι το αποτέλεσμα σύνθεσης δύο αρμονικών ταλαντώσεων με ελαφρώς διαφορετική συχνότητα, κατά το οποίο προκύπτει περιοδική αυξομείωση του πλάτους της τελικής ταλάντωσης

Συμβολή 2 ημιτονοειδών κυμάτων μοναδιαίου πλάτους με συχνότητες f_1 και f_2

$$S = \cos(2\pi f_1 t) + \cos(2\pi f_2 t)$$

Sum Identities

$$\sin A + \sin B = 2\sin\left(\frac{A+B}{2}\right)\cos\left(\frac{A-B}{2}\right)$$

$$\sin A - \sin B = 2\cos\left(\frac{A+B}{2}\right)\sin\left(\frac{A-B}{2}\right)$$

$$\cos A + \cos B = 2\cos\left(\frac{A+B}{2}\right)\cos\left(\frac{A-B}{2}\right)$$

$$\cos A - \cos B = -2\sin\left(\frac{A+B}{2}\right)\sin\left(\frac{A-B}{2}\right)$$



$$S = 2\cos\left(2\pi\frac{(f_1+f_2)}{2}t\right)\cos\left(2\pi\frac{(f_1-f_2)}{2}t\right)$$

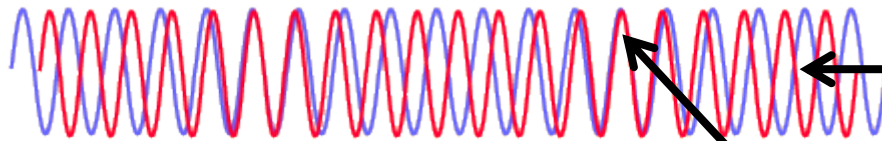
Ταλάντωση στο μέσο όρο των f_1 και f_2

Περιοδική αυξομείωση πλάτους σε συχνότητα f_1-f_2

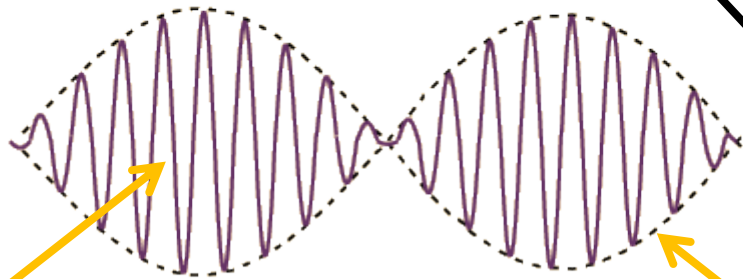
Τί είναι τα διακροτήματα;

$$f_1 = 250 \text{ Hz}$$

$$f_2 = 238 \text{ Hz}$$



Καταστρεπτική
συμβολή



Ενισχυτική
συμβολή

Ταλάντωση σε
συχνότητα **244 Hz**

Ταλάντωση πλάτους σε
συχνότητα **12 Hz (beat
frequency)**



Γιατί η ταλάντωση πλάτους της
ολικής ταλάντωσης είναι $f_1 - f_2$ και
όχι το μισό της διαφοράς αυτής;

Γιατί μας ενδιαφέρει η **απόλυτη τιμή**
του πλάτους που γίνεται μέγιστη όταν
ισχύει η συνθήκη:

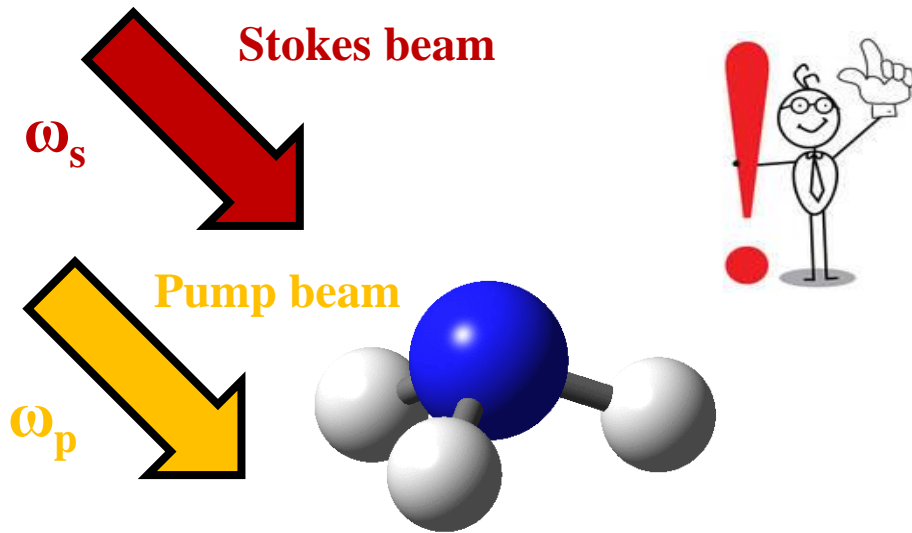
$$\cos\left(2\pi \frac{(f_1 - f_2)}{2} t\right) = \cos(n\pi), n = 0, 1, 2, 3 \dots$$



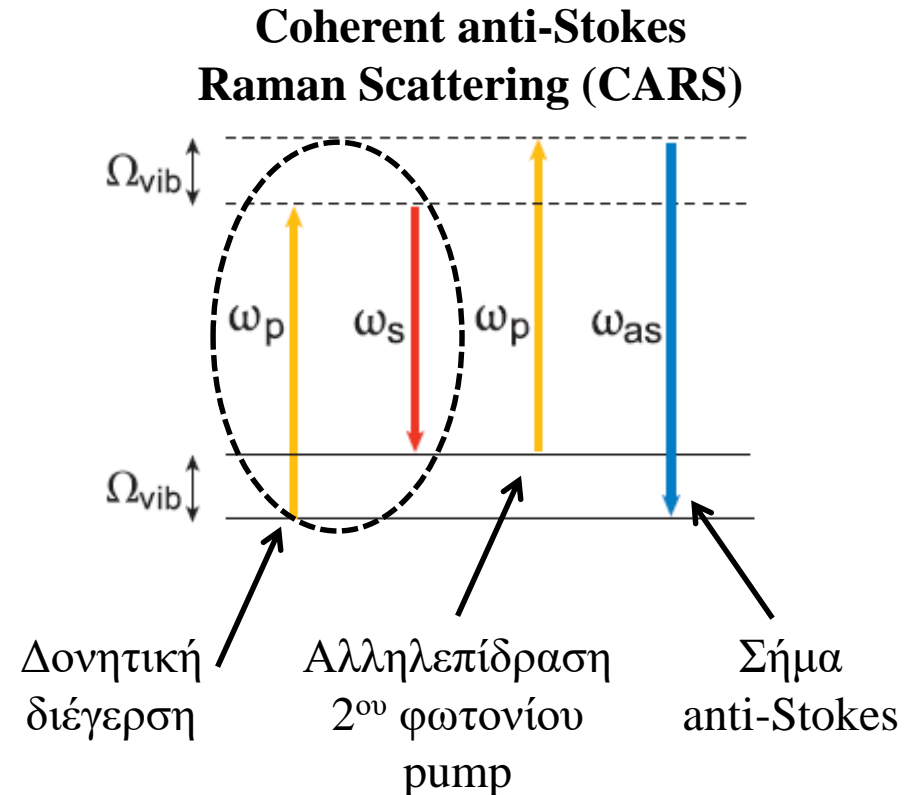
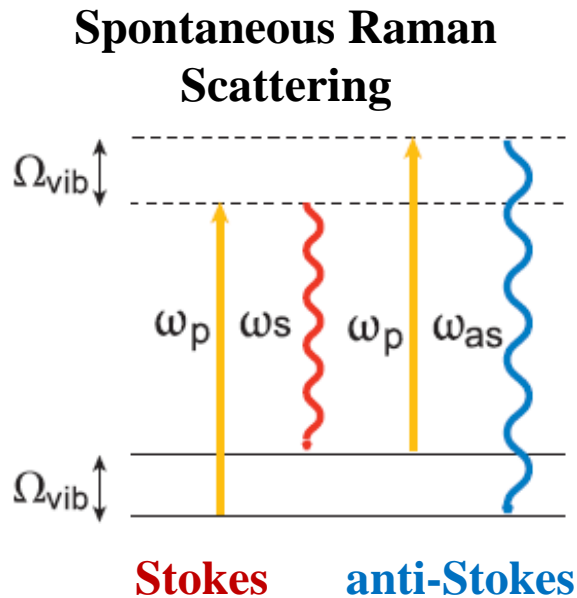
$$t_{max} = \frac{n}{(f_1 - f_2)}$$

που σημαίνει πως ο χρόνος που
μεσολαβεί μεταξύ δύο διαδοχικών
μεγίστων είναι $1/(f_1 - f_2)$ και άρα η
συχνότητα εμφάνισής τους είναι $f_1 - f_2$

Πώς συνδέονται όλα αυτά με τα μόρια;

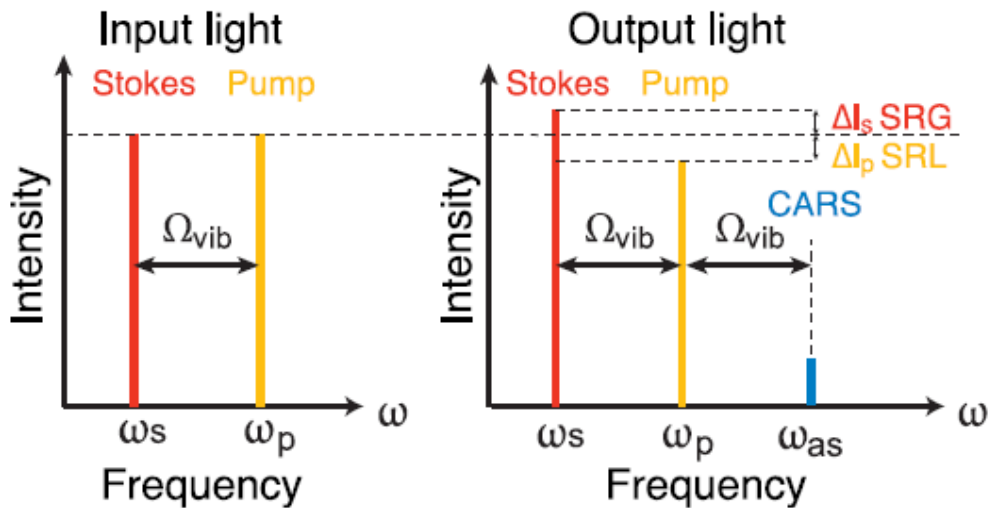
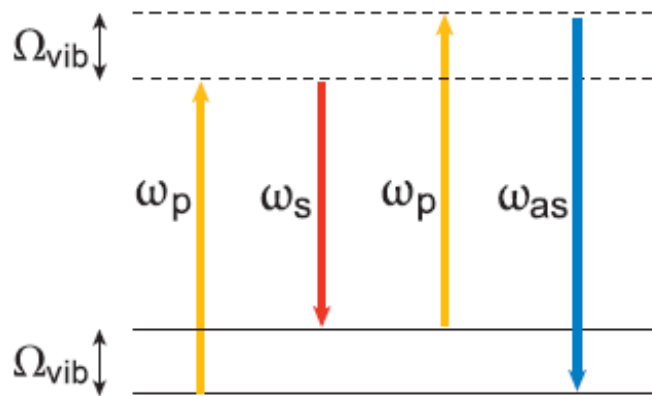


Αν φωτίσουμε το δείγμα ταυτόχρονα με δύο δέσμες και ρυθμίσουμε τις συχνότητες του φωτός έτσι ώστε το beat frequency $\omega_p - \omega_s$ να γίνει ίσο με Ω_{vib} τότε προκύπτει συντονισμός με αποτέλεσμα τη σύμφωνη παραγωγή φωτός σε συχνότητα $\omega_{\text{as}} = 2\omega_p - \omega_s$ που ονομάζεται σήμα CARS.



Coherent anti-Stokes Raman Scattering (CARS)

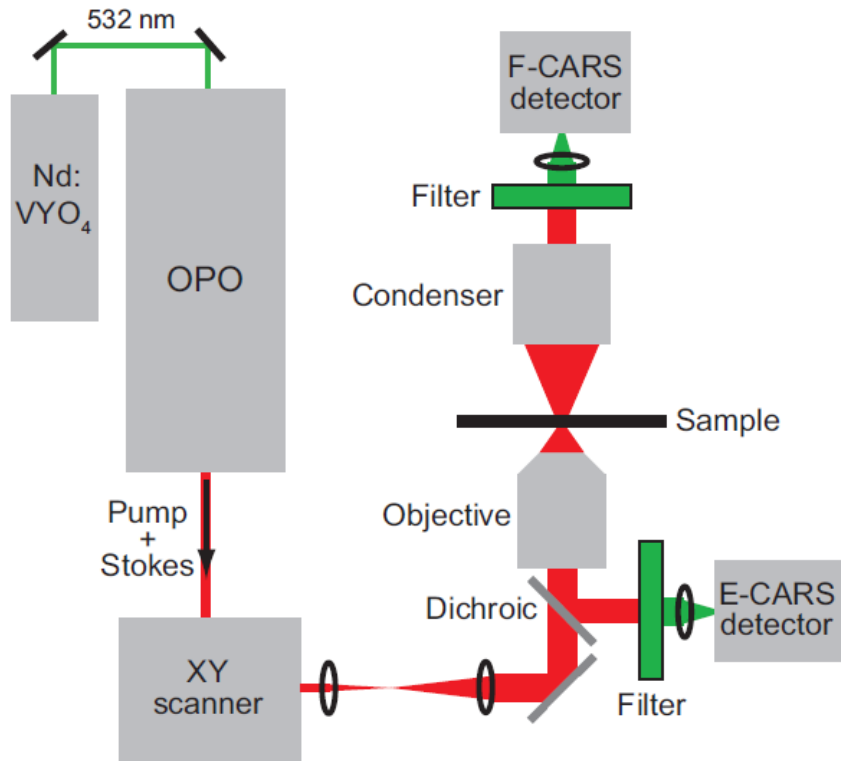
Coherent anti-Stokes Raman Scattering (CARS)



- Σε συνθήκες συντονισμού, το ασθενές σήμα Raman ενισχύεται εκθετικά λόγω της σύμφωνης εκπομπής πολλών μορίων (ενισχυτική συμβολή)
- Αρχικά, οι διεγείρουσες εντάσεις των δεσμών pump και Stokes είναι ίδιες
- Κατά τη διέγερση του μορίου σε υψηλότερο δονητικό επίπεδο, χάνεται ένα φωτόνιο pump και παράγεται ένα φωτόνιο Stokes χαμηλότερης ενέργειας
- Στην έξοδο, η ένταση της δέσμης Stokes αυξάνεται (Stimulated Raman Gain) ενώ της pump μειώνεται (Stimulated Raman Loss)
- Ταυτόχρονη αύξηση της έντασης της δέσμης CARS λόγω της αλληλεπίδρασης του δεύτερου pump φωτονίου

Το μικροσκόπιο CARS

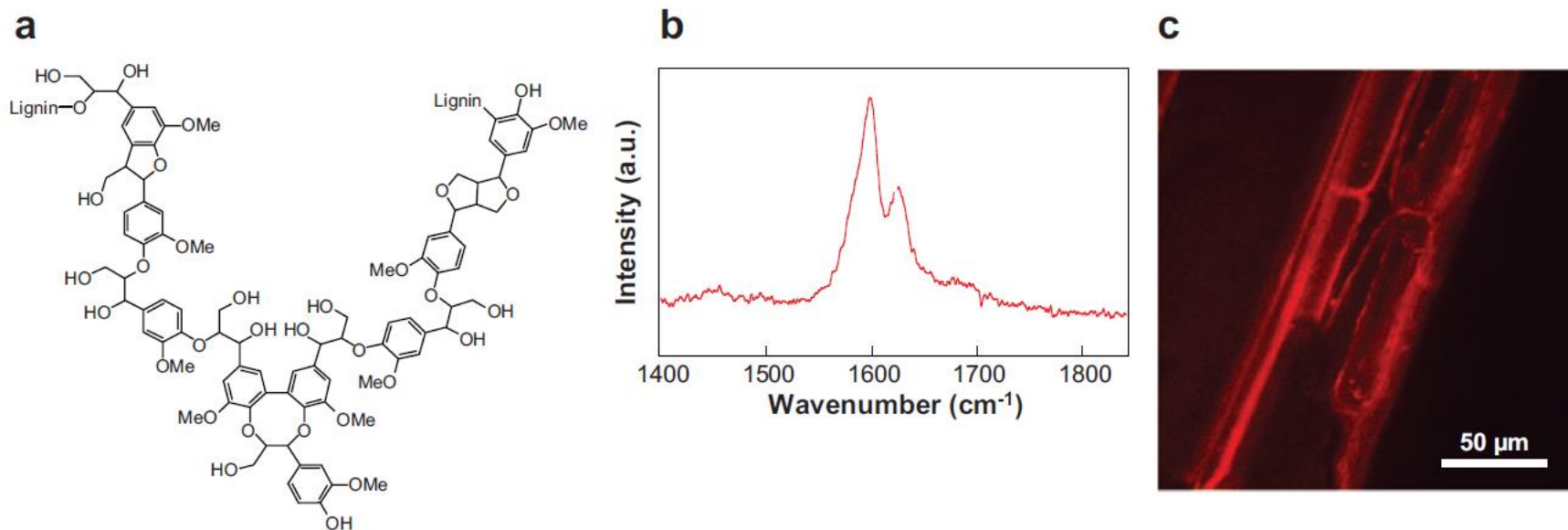
Τυπική διάταξη CARS με δύο ανιχνευτές



Parameter	Optimal Range
Pump wavelength range	780–980 nm
Stokes wavelength range	1000–1300 nm
Pulse duration	2–7 ps
Spectral bandwidth	3–5 cm ⁻¹
Pulse energy	0.1–1 nJ
Pulse repetition rate	50–100 MHz

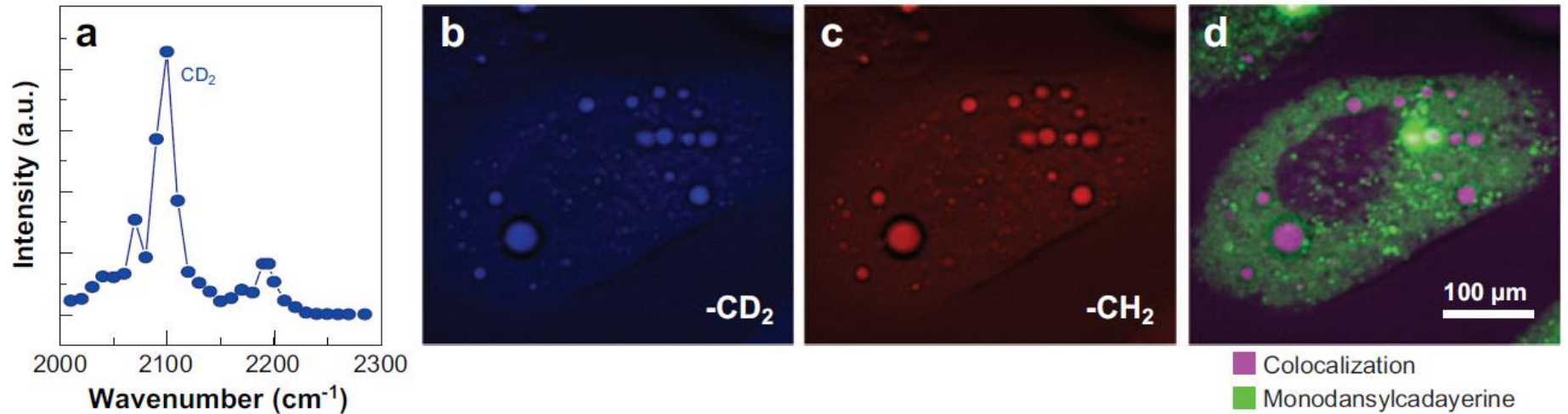
- Παρέχει απεικόνιση που βασίζεται στις μοριακές δονήσεις του δείγματος, μη απαιτώντας χρήση εξωτερικών παραγόντων αντίθεσης
- Είναι τάξεις μεγέθους πιο ευαίσθητο από ένα αντίστοιχο μικροσκόπιο αυθόρμητης σκέδασης Raman, επιτρέποντας απεικόνιση σε πραγματικό χρόνο με σχετικά μικρές ενέργειες διέγερσης
- Επειδή το φαινόμενο είναι μη-γραμμικό, δεν απαιτείται pinhole για την απόκτηση οπτικών τομών καθώς και 3-Δ ανακατασκευής του δείγματος
- Το anti-Stokes σήμα προκύπτει σε μήκη κύματος μικρότερα από τη δέσμη pump και Stokes, συνεπώς μπορεί εύκολα να διαχωριστεί από το μονοφωτονικά διεγειρόμενο φθορισμό
- Το βάθος απεικόνισης στον ιστό φτάνει τα ~0.4 mm για υπέρυθρα μήκη κύματος
- Επειδή η διαδικασία CARS προκύπτει στη θεμελιώδη ηλεκτρονιακή στάθμη, η φωτοκαταστροφή του δείγματος ελαχιστοποιείται, επιτρέποντας μεγάλα χρονικά διαστήματα παρατήρησης

Απεικόνιση κυτταρικών τοιχωμάτων



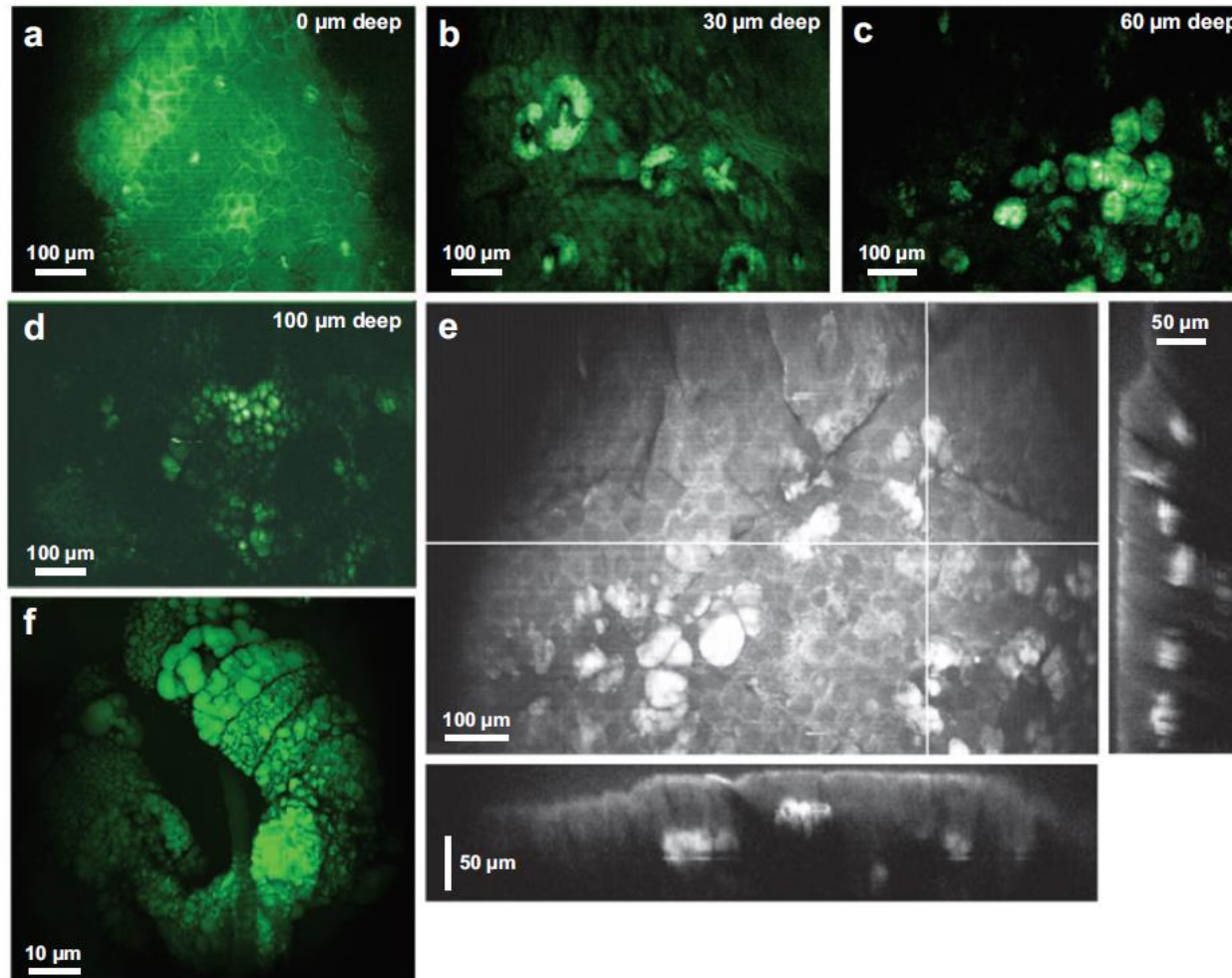
(a) Chemical structure of the lignin polymer. (b) Raman spectrum of lignin, with prominent bands near 1600 cm⁻¹ arising from the aryl ring stretching vibrations. (c) Coherent anti-Stokes Raman scattering microscope image at 1600 cm⁻¹ showing the distribution of lignin in the cell walls surrounding the plant cells in corn stover.

Απεικόνιση λιπιδίων σε κύτταρα



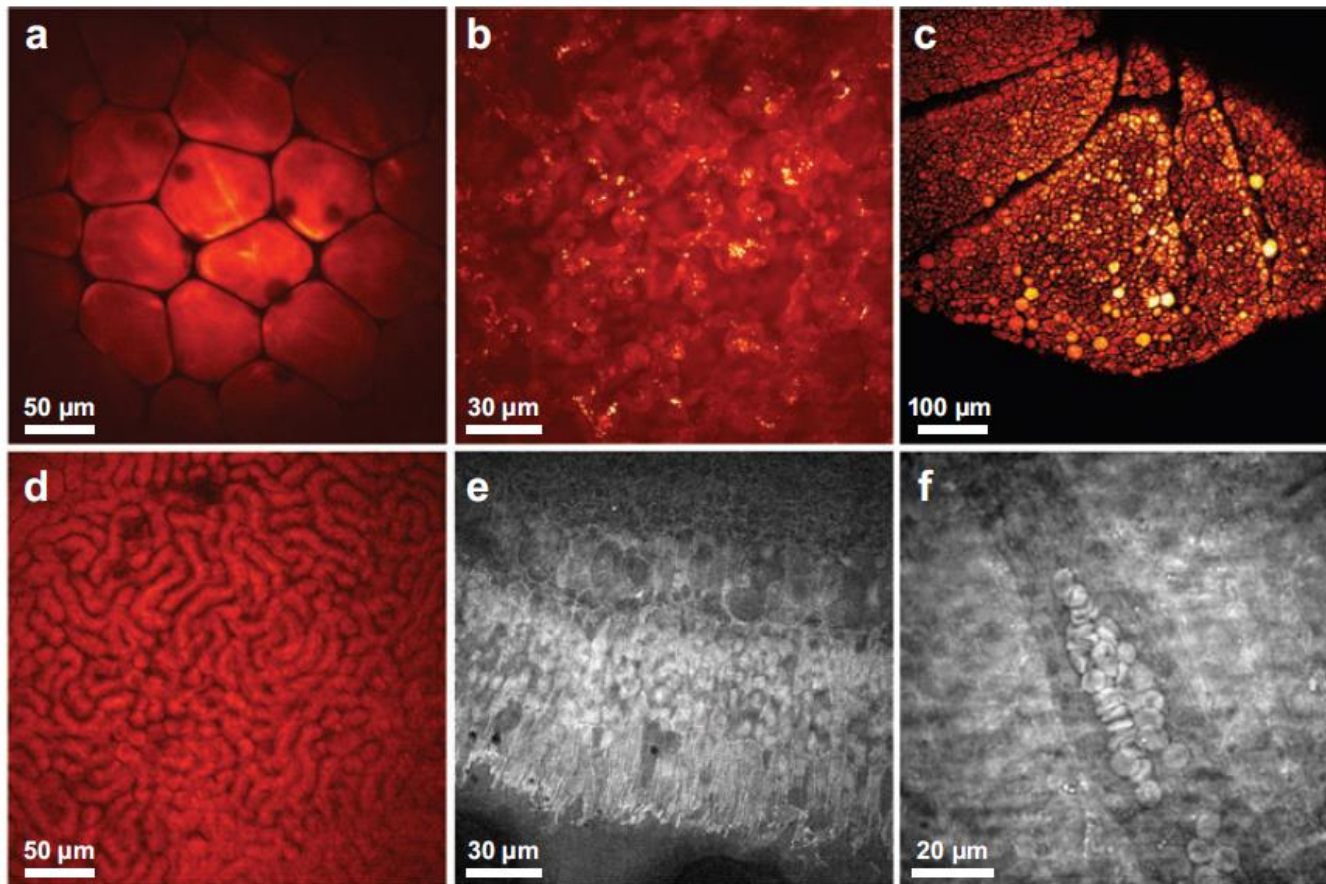
Lipid metabolism studied with coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy. (a) The CARS spectrum of deuterated oleic acid. (b-d) Rat hepatocyte cells were incubated with both eicosapentaenoic acid and deuterated oleic acid. (b) CARS image taken at the CD_2 symmetric stretching vibration at 2090 cm^{-1} . (c) CARS image taken at the CH_2 symmetric stretching vibration at 2845 cm^{-1} . (d) Composite image of panels b and c, showing colocalization along with two-photon fluorescence from monodansylcadaverine, a label for degradative lysozymes.

In-vivo απεικόνιση δέρματος ποντικού (lipid band)



a) Σήμα από το περίγραμμα των κερατινοκυττάρων λόγω λιπιδικών στιβάδων, b) Σήμα από τους σμηγματογόνους αδένες σε βάθος 30 μm , c) Λιποκύτταρα σε βάθος 60 μm , d) Υποδόριο λίπος αποτελούμενο από μικρά λιποκύτταρα σε βάθος 100 μm , e) Προβολές μέγιστου σήματος Z-stack 60 εικόνων

Απεικόνιση διαφόρων τύπων ιστών με CH2 contrast



a) Λευκός λιπώδης ιστός από την κοιλιά ποντικού, b) Ιστός από πνεύμονα ποντικού. Το σήμα παράγεται κυρίως από τα κυψελιδικά κύτταρα, τα κύτταρα Clara καθώς και τα μακροφάγα. c) Επιφάνεια νεφρού ποντικού καλυμμένη με λιποκύτταρα, d) Νεφρικά σωληνάρια δείγματος νεφρού ποντικού σε βάθος 40 μm , e) Διατομή αμφιβληστροειδούς από βοοειδές. Διακρίνονται με ευκρίνεια τα πρώτα στρώματα του ιστού. f) Ανθρώπινος αμφιβληστροειδής. Διακρίνεται αγγείο το οποίο περιέχει μεγάλο αριθμό ερυθροκυττάρων.

Ποια ερωτήματα πρέπει να μπορούμε να απαντάμε;



- Τι είναι η αυθόρμητη σκέδαση Raman και σε τι διαφέρει από τη σκέδαση Rayleigh;
- Τι δείχνει ένα φάσμα Raman και ποιες είναι οι πιο σημαντικές κορυφές βιολογικού ενδιαφέροντος;
- Ποια τα πλεονεκτήματα και ποια τα μειονεκτήματα της απόκτησης φασμάτων αυθόρμητης σκέδασης Raman; Γιατί η τεχνική αυτή δεν είναι η πλέον κατάλληλη για απεικόνιση;
- Τι είναι και πως προκύπτουν τα διακροτήματα; Τι ονομάζεται beat frequency;
- Πως προκύπτει το φαινόμενο CARS; Τι είναι το SRG και SRL;
- Ποια είναι τα βασικά πλεονεκτήματα της μικροσκοπίας CARS και ποιες είναι οι τυπικές εφαρμογές της στη βιολογία;