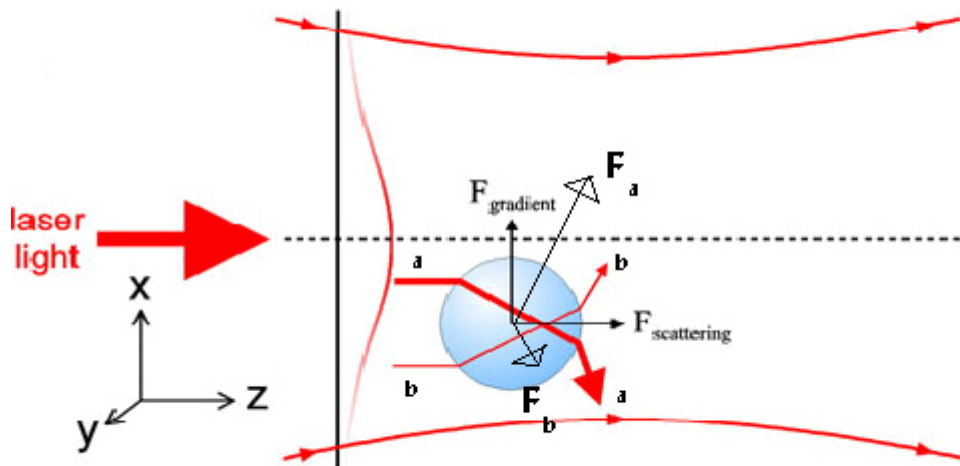




Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών
Επιστημών

“Οπτική παγίδευση και βιολογικές εφαρμογές”



ΜΠΕΛΕΣΙΩΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΜΑΚΡΟΠΟΥΛΟΥ ΜΥΡΣΙΝΗ

Αναπλ. Καθηγήτρια, ΣΕΜΦΕ, Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ, 2015

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
SUMMARY	6
The sixth and final chapter will talk about the prospects for development of optical trapping using sophisticated units such as the reverse microscope as well as the disadvantages and the advantages of this development.	
1. Εισαγωγή	6
2. Βασικές Θεωρητικές Αρχές	9
2.1 Πίεση ακτινοβολίας	9
2.2 Αλληλεπίδραση δέσμης laser με υπό παγίδευση σωματίδια	11
2.2.1. Ώθηση των σωματιδίων στον οπτικό άξονα	11
2.2.2. Δημιουργία δυνάμεων ενάντια στην πίεση ακτινοβολίας και οπτική παγίδευση σωματιδίου	12
2.3. Διαφορετικές θεωρητικές προσεγγίσεις της οπτικής παγίδευσης, ανάλογα με το μέγεθος των σωματιδίων - στόχων	15
2.3.1. Σωματίδια Mie	15
2.3.2. Σωματίδια Rayleigh	15
2.4. Περιγραφή της οπτικής παγίδας με το ηλεκτρομαγνητικό μοντέλο	16
2.4.1. Δύναμη Σκέδασης	16
2.4.2. Δύναμη Βαθμίδας	17
3. Οπτικές λαβίδες και Βιολογία	21
3.1. Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας laser με βιολογικά υλικά	21
3.2 Βιολογικές εφαρμογές	21
3.2.1. Μελέτη του DNA	22
3.2.2. Αποκοπή και μετακίνηση μέρους των χρωμοσωμάτων	23
3.2.3. Μελέτη σπερματοζωαρίων και τεχνητή γονιμοποίηση	25
3.2.4 Μελέτη της ελαστικότητας των ερυθροκυττάρων	26
3.2.5.Μελέτη της επίθεσης του ανοσοποιητικού συστήματος σε καρκινικά κύτταρα	28
3.2.6. Άλλες εφαρμογές	29
4. Περιγραφή μιας κλασσικής διάταξης οπτικής παγίδευσης	33
4.1. Πηγές laser	33
4.2. Οπτικό μικροσκόπιο και άλλα οπτικά συστήματα	35
4.3. Σύστημα ανίχνευσης και καταγραφής της εικόνας	37
4.4. Περιγραφή της διάταξης οπτικής παγίδευσης στο εργαστήριο του ΕΜΠ	38
4.4.1. Πηγή laser	39
4.4.2. Οπτικά και άλλα μέρη της διάταξης	39
4.4.3. Γωμετρία της διάταξης	40
4.4.4. Αποτελέσματα και σχολιασμός	40
5. Τεχνικές βαθμονόμησης της οπτικής παγίδευσης	43
5.1. Μέθοδος διαφυγής (<i>escape force method</i>)	43
5.2 Μέθοδος της ακαμψίας της παγίδας (<i>trap stiffness</i>)	45
5.3 Βαθμονόμηση με βάση τη θερμική κίνηση Brown	46
5.4 Μέθοδος της διηλεκτροφόρησης	48
5.4.1. Σωματίδια σε ηλεκτρομαγνητικό πεδίο	48
5.4.2 Το φαινόμενο της διηλεκτροφόρησης	51
5.4.3 Πειραματικά αποτελέσματα με χρήση της διηλεκτροφόρησης	54
6. Εξελίξεις και προοπτικές της οπτικής παγίδευσης	57
ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	59

Χρήσιμες ηλεκτρονικές διευθύνσεις.....61

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στον Τομέα Φυσικής της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, με επιβλέπουσα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δρ. Μυρσίνη Μακροπούλου.

Στην παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε με την μια μορφή οπτικής παγίδας, η οποία είναι γνωστή ως **οπτικές λαβίδες (optical tweezers)**. Συγκεκριμένα στο πρώτο κεφάλαιο θα παραθέσουμε μια γενική και ευκόλως κατανοητή περιγραφή του φαινομένου της οπτικής παγίδευσης καθώς επίσης θα αναφερθούμε γενικά στους τομείς στους οποίους χρησιμοποιείται το φαινόμενο αυτό.

Στο δεύτερο κεφάλαιο παρατίθενται βασικές θεωρητικές αρχές απαραίτητες για την κατανόηση της φύσης και της μορφής των δυνάμεων που καθιστούν δυνατή την ύπαρξη μιας οπτικής παγίδας. Στο πρώτο μέρος του κεφαλαίου αυτού θα εξηγήσουμε το φαινόμενο αυτό με φαινόμενα απλής γεωμετρικής οπτικής (**σκέδαση, ανάκλαση, διάθλαση κλπ**) το οποίο βρίσκει εφαρμογή σε υποπαγίδευση σωματίδια των οποίων το μέγεθος είναι μεγαλύτερο από το μήκος κύματος της δέσμης laser που χρησιμοποιούμε (**Σωματίδια Mie**). Στο δεύτερο μέρος του κεφαλαίου αυτού θα περιγράψουμε το φαινόμενο της οπτικής παγίδας με το ηλεκτρομαγνητικό μοντέλο για σωματίδια μικρότερα από το μήκος κύματος της δέσμης laser (**Σωματίδια Rayleigh**).

Στο τρίτο κεφάλαιο θα παρουσιάσουμε την αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας του laser με τα βιολογικά μόρια και θα πούμε για τις πιο γνωστές εφαρμογές της οπτικής παγίδευσης στην βιολογία και στην ιατρική και θα διαπιστώσουμε ποσο σημαντική είναι αυτή η εξέλιξη στους τομείς αυτούς.

Στο τέταρτο κεφάλαιο θα αναλύσουμε ένα προς ένα τα μέρη από τα οποία αποτελείται μία διάταξη οπτικής παγίδευσης και θα αναφέρουμε τα χαρακτηριστικά που θα πρέπει να έχει κάθε τμήμα ξεχωριστά έτσι ώστε να έχουμε το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα οπτικής παγίδευσης. Τέλος θα περιγράψουμε την δική μας εργαστηριακή διάταξη που στήθηκε στο εργαστήριο του τομέα φυσικής της σχολής και θα παραθέσουμε τα αποτελέσματα των πειραμάτων που παραγματοποιήθηκαν καθώς και τα συμπεράσματα από αυτά.

Στο πέμπτο κεφάλαιο θα ασχοληθούμε με τον προσδιορισμό των επαγόμενων δυνάμεων κατά την οπτική παγίδευση. Στην αρχή θα αναφέρουμε τις ευρέως γνωστές μεθόδους βαθμονόμησης μιας διάταξης οπτικής παγίδευσης. Η βαθμονόμηση πραγματοποιείται πάντα κατά την κατασκευή μιας καινούριας διάταξης για τον προσδιορισμό των επαγόμενων δυνάμεων ως συνάρτηση της ισχύος του laser. Κυρίως θα επικεντρωθούμε στην μέθοδο της διηλεκτροφόρησης και θα παρουσιάσουμε και κάποια πειράματα που έχουν παραγματοποιηθεί στα εργαστήρια όπου η βαθμονόμηση έγινε με την μέθοδο αυτή.

Στο έκτο και τελευταίο κεφάλαιο θα μιλήσουμε για τις προοπτικές εξέλιξης της οπτικής παγίδευσης με την χρήση εξελιγμένων οργάνων όπως είναι το ανάστροφο μικροσκόπιο καθώς επίσης τα μειονεκτήματα και τα πλεονεκτήματα της εξέλιξης αυτής.

SUMMARY

This diplomatic work carried out in the field of Faculty of Applied Mathematical and Physical Sciences of the National Metsovian Polytechnics School, supervised by the Assistant Professor Dr. Mirsini Makropoulou.

In this work we will be working on a form of optical trap, which is known as optical tweezers (optical open). In particular, the first chapter will give a general and more comprehensive description of the phenomenon of optical trapping as well as mentioned in general in the areas in which is used as an illustration of this phenomenon.

In the second section basic theoretical principles necessary for the understanding of the nature and form of the forces which make possible the existence of an optical trap, are listed. In the first part of this chapter we will explain the phenomenon with apparently simple geometric optical (scatter, reflection, refraction etc) which finds application in sub trapping particles whose size is larger than the wavelength of the laser beam used (Mie particles). In the second part of this chapter we will describe the phenomenon of optical trap with the electromagnetic model for particles smaller than the wavelength of the laser beam (particles Rayleigh).

In the third section we will present the interaction of the radiation of the laser with the biological molecules and would refer to the most well-known applications of optical trapping in biology and in medicine and we will see significant amount is this development in these areas.

In the fourth section we will analyze one by one the parties from which a device optical trapping consists of and we will address the characteristics that each part separately should have, so that we have the best possible result optical trapping. Finally, we will describe our own laboratory provision that has been set up in the laboratory of school of physics and will vastly monitor the experiments that have been conducted and the conclusions from them.

The fifth chapter will deal with the determination of resulted forces during the optical trapping. At the beginning we will cite the widely known calibration methods of optical trapping. The calibration takes place always during the construction of a new layout for the determination of resulted forces as a function of the power of the laser. Mainly we will focus on the method of di-electrophoresis and we will present some experiments which have been performed in the laboratories where the calibration was done by this method.

The sixth and final chapter will talk about the prospects for development of optical trapping using sophisticated units such as the reverse microscope as well as the disadvantages and the advantages of this development.

1. Εισαγωγή

Οι τεχνικές της οπτικής παγίδευσης και του μικρο-χειρισμού των ηλεκτρικά ουδέτερων σωματιδίων ή μορίων με δέσμη laser, παρέχουν τα μοναδικά μέσα ώστε να ελεγχθεί η δυναμική των μικρών μορίων. Αυτές οι νέες πειραματικές μέθοδοι έχουν διαδραματίσει έναν επαναστατικό ρόλο στους τομείς των φυσικών και βιολογικών επιστημών. Στην εργασία αυτή γίνεται μια ανασκόπηση των αρχικών εξελίξεων στον σχετικό επιστημονικό πεδίο, που οδήγησε στην επίτευξη της ψύξης και της παγίδευσης ατόμων στην ατομική φυσική και στην πρώτη χρήση των οπτικών παγίδων στη βιολογία. Εξετάζονται επίσης μερικά περαιτέρω σημαντικά επιτεύγματα αυτής της γρήγορα αναπτυσσόμενης μεθόδου.

Η τεχνική της οπτικής παγίδευσης και του χειρισμού μικρο-σωματιδίων με δέσμη laser είναι βασισμένη στις δυνάμεις πίεσης της ακτινοβολίας. Αυτές είναι δυνάμεις που προκύπτουν από την μεταβολή της ορμής του ίδιου του φωτός. Πριν από το 1987, μόνο στην αστρονομία είχε εξηγηθεί το φαινόμενο αυτό, στην οποία οι εντάσεις του φωτός και οι αποστάσεις είναι τεράστιες, δηλαδή είχε εξηγηθεί ότι λόγω της πίεσης της ακτινοβολίας από τον ήλιο, η ουρά των κομητών κατευθυνόταν ακτινικά προς τα έξω και προς τον ήλιο. Με τα laser, εντούτοις, κάποιος μπορεί να καταστήσει αυτές τις δυνάμεις αρκετά μεγάλες έτσι ώστε να επιταχύνει, να επιβραδύνει, να εκτρέψει, να καθοδηγήσει και να παγιδεύσει τα μικρά μόρια. Αυτό είναι μια άμεση συνέπεια των υψηλών εντάσεων και της πολύ μεγάλης βαθμωτής μεταβολής της εντάσεως των συνεχών και σύμφωνων δεσμών φωτός. Οι τεχνικές χειρισμού με laser ισχύουν για σωματίδια, των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται από μερικά νανόμετρα έως μερικές δεκάδες μικρόμετρα, όπως άτομα, μεγάλα μόρια, μικρές διηλεκτρικές σφαίρες, ακόμη και για βιολογικά μόρια όπως οι ιοί, τα βακτήρια, ζωντανά κύτταρα, υποκυτταρικά οργανίδια, γονίδια κ.α. Η χρήση των τεχνικών παγίδευσης και χειρισμού laser δίνει έναν αξιοπρόσεκτο βαθμό ελέγχου της κίνησης των μικρών μορίων, η οποία ασκεί σημαντική επίδραση σε πολλούς από τους τομείς στους οποίους τα μικρά μόρια διαδραματίζουν έναν ρόλο.

Στην ατομική φυσική, παραδείγματος χάριν, είναι τώρα δυνατό να ψυχθούν οπτικά τα άτομα, να καταγραφούν εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες (ένα μέρος ενός microkelvin) και να τα παγιδέψει κανείς οπτικά στις υψηλές πυκνότητες. Η διαθεσιμότητα των μεγάλων αριθμών ψυχρών ατόμων που κινούνται με ταχύτητες τόσο χαμηλές, όπως 1 cm/s, και με μήκος κύματος deBroglie συγκρίσιμο με το μήκος κύματος του φωτός, έχει ανοίξει ένα ευρύ φάσμα νέων δυνατοτήτων. Με τις τεχνικές αυτές, έχει βρεθεί πως είναι δυνατόν να βελτιωθεί πολύ η ακρίβεια των ατομικών ρολογιών. Οι νέοι τύποι παρεμβαλλόμενων ατόμων έχουν αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας τα ψυχρά άτομα με τη δυνατότητα για ποιο ακριβείς μετρήσεις, όπως η μέτρηση της επιτάχυνσης της βαρύτητας, με μεγάλη αύξηση στην ακρίβεια. Ένας νέος τομέας της οπτικής παγίδευσης ατόμων που αναπτύσσεται, βασίζεται στους νέους τύπους φακών, διαχωριστών δεσμών, και ατομικών καθρεφτών. Οι αρκετά χαμηλές θερμοκρασίες και οι αρκετά υψηλές πυκνότητες των παγιδευμένων ατόμων που έχουν επιτευχθεί για να παρατηρήσουν τη συμπύκνωση Bose-Einstein ενός ατομικού ατμού, χρησιμεύουν στο να διαμορφώσουν μια νέα συνεπή κβαντική κατάσταση που έχει κατά ένα μεγάλο μέρος πολλές ανεξερεύνητες ιδιότητες. Αυτό το νέο συμπύκνωμα, εντούτοις, χρησιμοποιήθηκε ήδη το 1996 από τον καθηγητή του MIT Wolfgang Ketterle και την ομάδα του για να παραγάγει μια συνεχή δέσμη ατόμων σε αυτό που είναι ουσιαστικά το πρώτο ατομικό laser.

Τα φορτισμένα σωματίδια είναι πολύ πιο εύκολο να τα ελέγξουμε, διότι τα ηλεκτρικά και τα μαγνητικά πεδία μπορούν να ασκούν αρκετά ισχυρές δυνάμεις σε αυτά. Αντίθετα, το να μπορέσουμε να διαχειριστούμε ηλεκτρικά ουδέτερα σωματίδια ατομικού μεγέθους είναι μια τρομερή πρόκληση από τεχνική άποψη. Πράγματι, πάνω από μισό αιώνα οι επιστήμονες έχουν εφαρμόσει ηλεκτρομαγνητικές δυνάμεις για να κινήσουν από απόσταση φορτισμένα σωματίδια όπως ηλεκτρόνια και ιόντα. Αλλά μόνο τα τελευταία χρόνια, οι ερευνητές κατάφεραν να κινήσουν ουδέτερα σωματίδια σε επιθυμητές αποστάσεις.

Πιο συγκεκριμένα, οι ερευνητές έχουν αναπτύξει συσκευές που χρησιμοποιούν laser για να παγιδεύσουν και να οδηγήσουν σωματίδια μεγέθους από εκατοντάδες νανόμετρα έως μερικά μικρόμετρα με εκπληκτικό έλεγχο απάνω τους. Με τη χρήση κατάλληλης συχνότητας laser στην κατεύθυνση κίνησης ατόμων και μορίων επιτυγχάνεται η επιβράδυνσή τους (laser cooling).

Στην πραγματικότητα οι προσπάθειες για την επιβράδυνση ατόμων και μορίων συντελούνταν παράλληλα με τη βελτίωση και την εξέλιξη των τεχνικών της οπτικής παγίδευσης στο σωματιδιακό επίπεδο. Η δουλειά του **A.Ashkin** έπαιξε καθοριστικό ρόλο στις εξελίξεις αυτές. Μετά την οπτική παγίδευση μέσω δυο αντιδιαμετρικά τοποθετημένων δεσμών* δημιούργησε την πρώτη οπτική παγίδα μοναδικής δέσμης, όπου το σωματίδιο ισορροπεί όταν η πίεση ακτινοβολίας μιας κάθετα στο οριζόντιο επίπεδο δέσμης laser αντισταθμίζει τη δύναμη της βαρύτητάς του. Η παγίδα αυτή επιτρέπει και την εύκολη μετατόπιση του παγιδευμένου σωματιδίου στο χώρο. Οι πειραματικές παρατηρήσεις του A. Ashkin, και ιδιαίτερα οι επισημάνσεις του για την ύπαρξη δυνάμεων βαθμίδας, οδήγησαν τελικά στην δημιουργία της **οπτικής παγίδας βαθμίδας μοναδικής δέσμης (single beam gradient optical trap)**, η σταθερότητα της οποίας είναι ανεξάρτητη της βαρύτητας. Η ισχυρή εστίαση μιας δέσμης laser, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση των δυνάμεων βαθμίδας, οι οποίες αντιτίθενται στην προς τα εμπρός ώθηση των σωματιδίων από την πίεση της ακτινοβολίας και μπορούν υπό ορισμένες προϋποθέσεις να οδηγήσουν στην σταθερή παγίδευσή τους. Το μεγάλο πλεονέκτημα της χρήσης μιας μόνο δέσμης είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν οπτική «τσιμπίδα» για να κατευθύνουμε με μεγάλη ακρίβεια μικροσκοπικά σωματίδια.

* Αποτελείται από δύο πανομοιότυπες οπτικές δέσμες τοποθετημένες έτσι ώστε η ώθηση στο σωματίδιο από τη μία να εξισορροπείται με την αντίστοιχη της άλλης.

2. Βασικές Θεωρητικές Αργές

2.1 Πίεση ακτινοβολίας

Το βασικό χαρακτηριστικό το οποίο εκμεταλλευόμαστε, για να γίνει εφικτή η παγίδευση σωματιδίων με φως, είναι το γεγονός ότι το φως ως ηλεκτρομαγνητικό κύμα ασκεί πίεση στις επιφάνειες στις οποίες προσπίπτει. Κάθε ηλεκτρομαγνητικό κύμα, κατά τη διάδοσή του σ' ένα μέσο μεταφέρει ενέργεια και ορμή. Η ροή ενέργειας ανά μονάδα επιφάνειας ενός ηλεκτρομαγνητικού κύματος, δίνεται από το διάνυσμα Poynting $S = E \times H$. Η ροή της ενέργειας ενός επίπεδου κύματος για γραμμικά μέσα είναι κάθετη στις συνιστώσες του ηλεκτρικού και του μαγνητικού πεδίου E, H και συμβαίνει στην κατεύθυνση διάδοσης του κύματος. Σύμφωνα με τη θεωρία της σχετικότητας, η ενέργεια και η ορμή ενός ηλεκτρομαγνητικού κύματος συνδέονται με τη σχέση $E = p \cdot c$, όπου p η ορμή των φωτονίων και c η ταχύτητα του φωτός. Μεταβολή στην ορμή ενός ηλεκτρομαγνητικού κύματος και επομένως και στην ενέργεια συνεπάγεται σύμφωνα με τον **2^ο Νόμο του Νεύτωνα** ($\vec{F} = \frac{d\vec{p}}{dt}$) την

εμφάνιση μιας δύναμης. Αυτήν ακριβώς τη δύναμη, που αντιστοιχεί στην πίεση της ακτινοβολίας, είναι που εκμεταλλευόμαστε για την πλήρη ακινητοποίηση σωματιδίου με φως. Σύμφωνα με τα παραπάνω, το μέτρο της δύναμης που ασκείται από την ακτινοβολία ενός επίπεδου κύματος δίνεται από την σχέση:

$$F = \frac{1}{c} (dE / dt) = \frac{P}{c} \quad (2.1)$$

όπου \tilde{P} η ισχύς της ακτινοβολίας και για επιφάνεια πρόσπτωσης S η πίεση ακτινοβολίας ορίζεται ως δύναμη ανά επιφάνεια $\tilde{P} = \vec{F} / \vec{S}$. Παράλληλα η ένταση της ακτινοβολίας I ορίζεται ως η ισχύς ανά μονάδα επιφάνειας, $I = P / S$. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η πίεση της ακτινοβολίας που ασκείται σε διεπιφάνεια είναι

$$\tilde{P} = I / c \quad (2.2)$$

Για ένα μέσο με δείκτη διάθλασης n , όπου η ταχύτητα διάδοσης u του κύματος έχει ελαττωθεί στην τιμή $u = c / n$ σε σχέση με την ταχύτητα c του φωτός στο κενό, οι σχέσεις (2.1), (2.2) παίρνουν τη μορφή

$$F = n \cdot P / c \quad (2.3)$$

$$\tilde{P} = n \cdot I / c \quad (2.4)$$

Ο απλούστερος τρόπος για να περιγράψουμε τις δυνάμεις που επάγονται στο σωματίδιο κατά την οπτική παγίδευση, είναι με τη χρήση της απλής οπτικής. Αυτή βέβαια η προσέγγιση είναι έγκυρη μόνο όταν το μέγεθος του σωματιδίου είναι αρκετά μεγαλύτερο από το μήκος κύματος του χρησιμοποιούμενου φωτός laser, όπως θα δείξουμε στη συνέχεια.

Κάθε δέσμη (τα φωτόνια δηλαδή που ταξιδεύουν στη συγκεκριμένη κατεύθυνση) «μεταφέρει» ένα συγκεκριμένο ποσό ορμής, p , το οποίο είναι ανάλογο της ενέργειάς της E και του δείκτη διάθλασης, n_m , του περιβάλλοντος μέσα στο οποίο βρίσκεται:

$$p = n_m E / c \quad (2.5)$$

Που είναι αντίστοιχη με αυτήν για το κύμα (2.4): $\tilde{P} = n \cdot I / c$
 Όταν η δέσμη χτυπά στην επιφάνεια μεταξύ δύο διηλεκτρικών μέσων με δείκτες διάθλασης n_m (για το περιβάλλον) και n_p (για το σωματίδιο, αφού θεωρούμε ότι αυτό αποτελεί το δεύτερο μέσο, το οποίο συναντά η δέσμη του laser), κάποιο κλάσμα της ενέργειας ανακλάται. Ας υποθέσουμε ότι $n_p > n_m$ και ότι $n_p / n_m \approx 1$, που είναι και η κατεξοχήν περίπτωση για βιολογικά σωματίδια μέσα σε διάλυμα νερού. Το κλάσμα της ενέργειας που ανακλάται, R , δίνεται από τις εξισώσεις Fresnel και είναι περίπου ίσο με $R=10^{-3}$.

Η ορμή της ανακλώμενης δέσμης δίνεται από τη σχέση:

$$p_{refl} = n_m R E / c \quad (2.6)$$

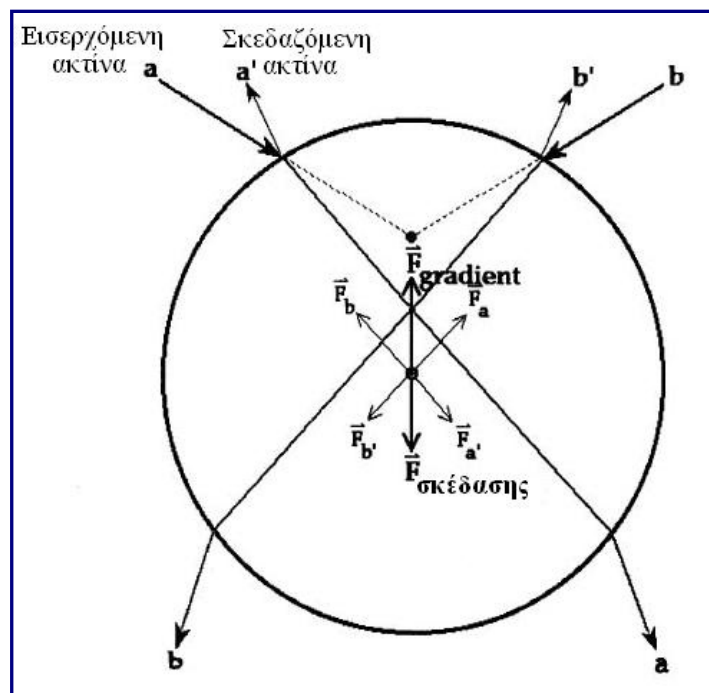
και η ορμή της διαδιδόμενης δέσμης από τη σχέση:

$$p_{trans} = n_p (1 - R) E / c \quad (2.7)$$

Η αρχική προσπίπτουσα ορμή,

$$p_{incid} = n_m E / c \quad (2.8)$$

θα πρέπει να διατηρείται πάνω στη συνοριακή επιφάνεια.



Σχήμα 2. 1. Η προσπίπτουσα (εισερχόμενη) δέσμη a πέφτει πάνω στο σωματίδιο. Ένα μέρος της ανακλάται και ένα μέρος της διαδίδεται. Η αλλαγή στην ορμή επάγει λόγω του δεύτερου νόμου του Νεύτωνα μία δύναμη πάνω στο σωματίδιο.

Η διαφορά ορμής μεταξύ της προσπίπτουσας δέσμης και της ανακλώμενης και διαδιδόμενης δέσμης,

$$\Delta p = p_{\text{incid}} + p_{\text{refl}} + p_{\text{trans}} \quad (2.9)$$

ασκείται στην επιφάνεια (το σωματίδιο), το οποίο δέχεται τελικά μία δύναμη F σύμφωνα με το δεύτερο νόμο του Νεύτωνα και η οποία υπολογίζεται από την αντικατάσταση των (2.6), (2.7) και (2.8) στην εξίσωση (2.9) :

$$F = \frac{\Delta p}{\Delta t} = \frac{n_m \Delta E}{c \Delta t} = \frac{n_m Q P}{c} \quad (2.10)$$

όπου P είναι η προσπίπτουσα ισχύς της δέσμης του laser και Q είναι ένας παράγοντας που περιγράφει το ποσό της ορμής που μεταφέρθηκε τελικά ($Q=2$ για την πλήρη ανάκλαση και $Q=1$ για την πλήρη απορρόφηση).

Αν τώρα διαιρέσουμε και τα δύο μέλη της εξίσωσης (2.10) με την επιφάνεια του σωματιδίου πάνω στην οποία προσπίπτει η δέσμη του laser, θα πάρουμε την πίεση που μπορεί να ασκήσει το φως πάνω σε ένα σωματίδιο:

$$P = \frac{F}{S} = \frac{n_m Q P}{Sc} = \frac{n_m Q}{c} I \quad (2.11)$$

όπου I η ένταση της δέσμης του laser.

Αν ξέρουμε δηλαδή την ένταση της δέσμης laser και τον δείκτη διάθλασης του περιβάλλοντος χώρου, μπορούμε να έχουμε μία πρώτη εκτίμηση της δύναμης και συνεπαγόμενα της πίεσης ακτινοβολίας που μπορεί να ασκήσει η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία πάνω σε ένα σωματίδιο.

2.2 Αλληλεπίδραση δέσμης laser με υπό παγίδευση σωματίδια

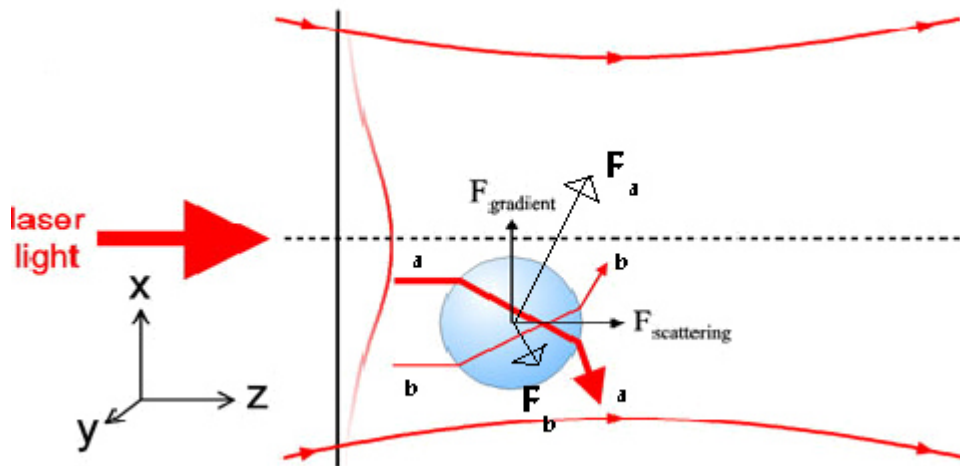
Η θεωρητική ερμηνεία του φαινομένου μπορεί να γίνει με διάφορα μοντέλα με βάση την γεωμετρική οπτική ή την ηλεκτρομαγνητική θεωρία και εξαρτάται από το μέγεθος του σωματιδίου στόχου. Όμως, σε μια πρώτη προσέγγιση, η κατανόηση του φαινομένου προκύπτει αβίαστα με χρήση βασικών αρχών της γεωμετρικής οπτικής και της μηχανικής.

Το μοντέλο αυτής της προσέγγισης έχει ως εξής: Θεωρούμε μια δέσμη laser η οποία προσπίπτει σε ένα σφαιρικό σωματίδιο στόχο όπως στο σχήμα 2.2. Η δέσμη laser θεωρούμε ότι έχει ένα γκαουσιανό προφίλ κατανομής έντασης και το σωματίδιο είναι πλευρικά εκτός του οπτικού άξονα της δέσμης. Αυτό που παρατηρείται σε πρώτη φάση είναι η ώθηση του σωματιδίου προς τον οπτικό άξονα της δέσμης και αυτό γίνεται πιο εύκολα εφικτό όταν έχουμε μια αρκετά εστιασμένη δέσμη (με αντικειμενικό φακό αριθμητικού ανοίγματος $N.A. > 1$).

2.2.1. Ώθηση των σωματιδίων στον οπτικό άξονα

Για να αντιληφθούμε τον μηχανισμό, ο οποίος ωθεί τα σωματίδια - στόχους προς τον οπτικό άξονα, λαμβάνουμε αρχικά υπ' όψη ότι τα περισσότερα είδη τέτοιων σωματιδίων είναι μερικώς διαπερατά από το φως και έχουν δείκτη διάθλασης μεγαλύτερο του περιβάλλοντος μέσου τους. Το σφαιρικό σωματίδιο διαθλά με τέτοιο τρόπο την εισερχόμενη δέσμη, ώστε να την εστιάζει, λειτουργώντας ως ένας συγκλίνοντας φακός. Η αλλαγή όμως της διεύθυνσης διάδοσης του φωτός λόγω της διάθλασης, έχει ως αποτέλεσμα την μεταφορά ορμής από το ηλεκτρομαγνητικό κύμα στο περιβάλλον του και τελικώς την εμφάνιση δυνάμεων. Ας θεωρήσουμε δύο

ακτίνες φωτός που εισέρχονται στη σφαίρα διαθλώμενες όπως στο σχήμα 2.2 (αγνοούμε την ανάκλαση σε πρώτη προσέγγιση). Λόγω της αλλαγής στην διεύθυνση διάδοσης του φωτός, επάγεται μεταβολή στην ορμή του. Η αρχή διατήρησης της ορμής για το σύστημα έχει ως αποτέλεσμα να μεταφέρεται ορμή στην σφαίρα και κατά συνέπεια να εμφανίζονται οι δυνάμεις \vec{F}_a , \vec{F}_b των οποίων οι κατευθύνσεις είναι τέτοιες ώστε να διατηρείται η συνολική ορμή του συστήματος. Όμως η ακτίνα a προέρχεται από το κεντρικό κομμάτι της γκαουσιανής δέσμης, όπου η ένταση του φωτός είναι εκθετικά μεγαλύτερη από την περιοχή στο άκρο της δέσμης από όπου προέρχεται η ακτίνα b. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η \vec{F}_a , να είναι μεγαλύτερη από την \vec{F}_b και έτσι το σφαιρίδιο να ωθείται προς το κέντρο του οπτικού άξονα. Με τη σφαίρα πλέον στον οπτικό άξονα, αυτό που παρατηρείται είναι μια εμφανιζόμενη πίεση ακτινοβολίας που την ωθεί εμπρός.



Σχήμα 2. 2. Δυνάμεις από μια διαθλώμενη σε σφαιρική επιφάνεια δέσμη laser.

Για να επιτευχθεί παγίδευση ενός τέτοιου σωματιδίου από μια και μόνο δέσμη laser, πρέπει με κάποιο τρόπο να εμφανιστούν δυνάμεις που θα αντισταθούν στην προς τα εμπρός πίεση ακτινοβολίας και να επιφέρουν συνθήκες ισορροπίας στο αντικείμενο.

2.2.2. Δημιουργία δυνάμεων ενάντια στην πίεση ακτινοβολίας και οπτική παγίδευση σωματιδίου

Η δημιουργία δυνάμεων που να αντιστέκονται στην πίεση ακτινοβολίας και να δημιουργούν τις κατάλληλες συνθήκες για να επιτευχθεί η οπτική παγίδευση του σωματιδίου - στόχου προκαλείται με την όσο το δυνατό καλύτερη εστίαση της δέσμης laser. Πειραματικά αυτό επιτυγχάνεται με την εστίαση που προκαλεί στο φως ο αντικειμενικός φακός ενός μικροσκοπίου.

Η πίεση ακτινοβολίας της δέσμης λοιπόν ωθεί το στόχο εμπρός και είναι ανάλογη της έντασης της δέσμης του φωτός. Από την άλλη πλευρά η εστίαση του φωτός από τον αντικειμενικό του μικροσκοπίου έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση των λεγόμενων **δυνάμεων βαθμίδας (gradient forces)**, (σχήμα 2.2) και οι οποίες είναι ανάλογες της μεταβολής του ηλεκτρικού πεδίου στο χώρο. Οι δυνάμεις αυτές είναι τελικά υπεύθυνες για την ύπαρξη της ίδιας της οπτικής παγίδας, αφού κάτω από

συνθήκες ισχυρής εστίασης του φωτός αντισταθμίζουν πλήρως την προς τα εμπρός ώθηση των σωματιδίων από την πίεση της ακτινοβολίας, με αποτέλεσμα την οπτική παγίδευση τους. Για απλότητα υποθέτουμε εδώ ότι η μεταβολή του ηλεκτρικού πεδίου συμβαίνει μόνο κατά τον άξονα z , δηλαδή μόνο στην κατεύθυνση διάδοσης του φωτός. Έτσι

$$F_{gradient} = p \cdot dE / dz \quad (2.12)$$

Όπου p η διπολική ροπή που επάγεται στο υπό παγίδευση σωματίδιο. Για να υπερνικήσουν δυνάμεις όπως οι $F_{gradient}$ την πίεση ακτινοβολίας, την δύναμη από το

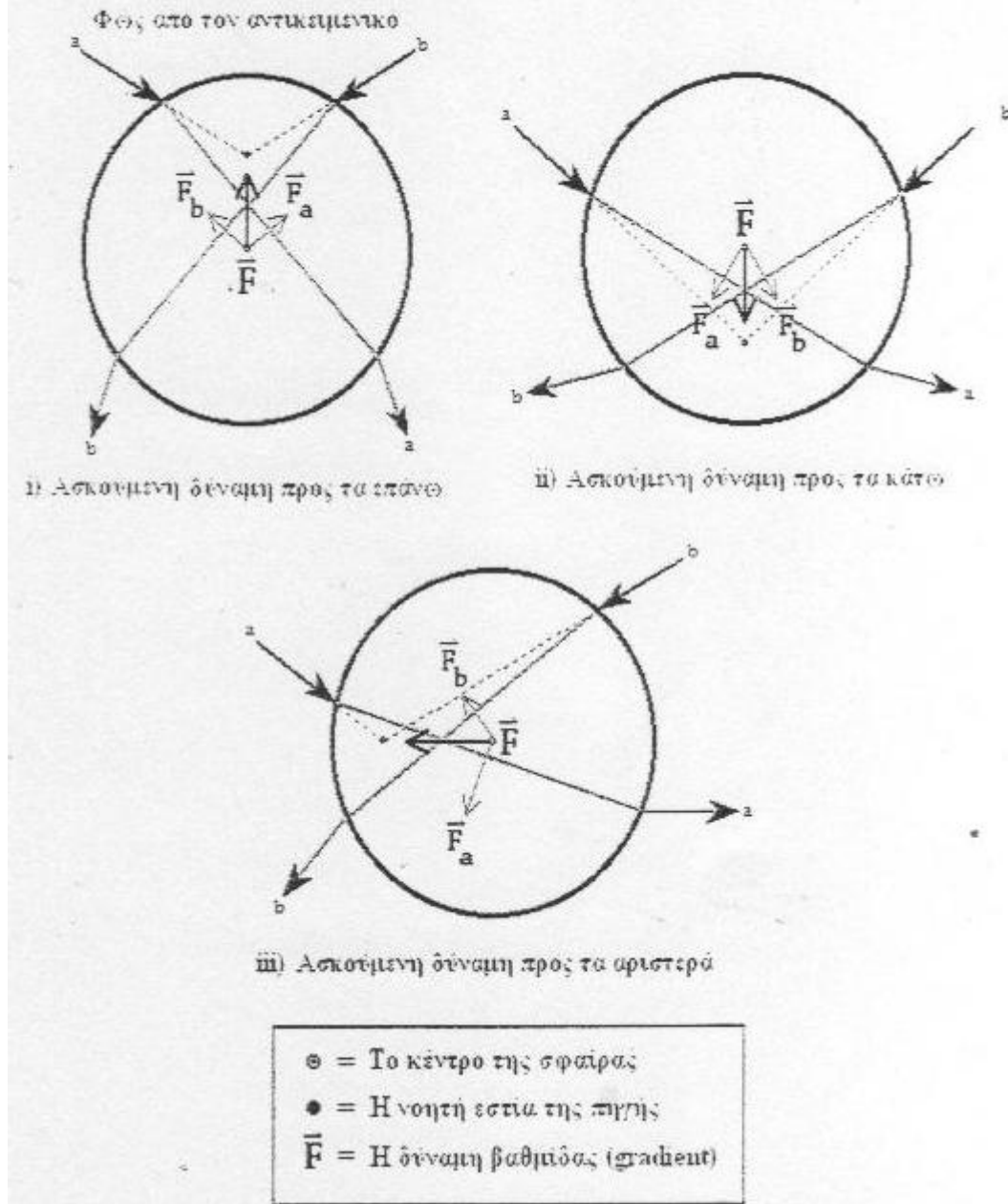
φως προς τα εμπρός το μέγεθος της οποίας ρυθμίζεται κατά βούληση με τη μεταβολή της έντασης της δέσμης laser εξωτερικά, θα πρέπει η βαθμίδα dE/dz να είναι η μεγαλύτερη δυνατή. Κάτι τέτοιο είναι δυνατό μόνο με αντικειμενικούς πολύ μεγάλης εστίασης δηλαδή με το μέγιστο **αριθμητικό άνοιγμα (numerical aperture)**.

Μια απλή ποιοτική περιγραφή για το πώς επιτυγχάνεται η οπτική παγίδευση ενός σφαιρικού σωματιδίου από μια ισχυρά εστιαζόμενη δέσμη φωτός, μπορεί να δοθεί εύκολα για άλλη μια φορά με βάση το μοντέλο των οπτικών ακτίνων. Πιο συγκεκριμένα στο σχήμα 2.2 παρουσιάζονται δυο ακτίνες μιας δέσμης laser, οι οποίες στο σχήμα αυτό εστιάζονται από ένα αντικειμενικό φακό και στη συνέχεια διαθλώνται στην διεπιφάνεια ενός σφαιριδίου. Αν αγνοήσουμε την ανάκλαση των ακτίνων αυτών στη διεπιφάνεια οι ισχυρά εστιασμένες ακτίνες, εισέρχονται στη σφαίρα διαθλώμενες. Η διάθλασή τους στη διεπιφάνεια αέρα –σφαιριδίου, έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω εστίαση τους. όπως έχει προαναφερθεί, η διάθλαση των ακτίνων έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της ορμής του διαδιδόμενου στη σφαίρα φωτός, και άρα την εμφάνιση δυνάμεων. Στο σχήμα 2.3 απεικονίζονται οι δυνάμεις αυτές για τις διάφορες περιπτώσεις της σχετικής θέσης της εστίας της δέσμης ως προς το κέντρο του σφαιριδίου. Η ισχυρή εστίαση των ακτίνων έχει ως αποτέλεσμα σε κάθε περίπτωση την εμφάνιση μιας συνισταμένης δύναμης βαθμίδας η οποία ωθεί το κέντρο της σφαίρας προς την εστία της δέσμης. Η δύναμη βαθμίδας δρα ως δύναμη επαναφοράς. Εάν η δύναμη αυτή γίνει μεγαλύτερη ή ίση της πίεσης της ακτινοβολίας, η οποία προέρχεται από την ανάκλαση του φωτός στη σφαίρα, που ωθεί το σωματίδιο εμπρός, επιτυγχάνεται η οπτική παγίδευση του. Το μέγεθος της συνισταμένης δύναμης βαθμίδας $F_{gradient}$ όπως φαίνεται και από τη σχέση (2.12) είναι ανάλογο της

βαθμίδας του πεδίου, η οποία με τη σειρά της είναι ανάλογη με την εστίαση της δέσμης. Επομένως μόνο στην περίπτωση μεγάλης εστίασης των ακτίνων που συνιστούν την οπτική δέσμη η δύναμη βαθμίδας $F_{gradient}$ μπορεί να εξισορροπήσει

την F_{scat} και να δημιουργηθεί παγίδα. Το σημείο ισορροπίας της παγιδευμένης σφαίρας είναι το σημείο στο οποίο η δύναμη βαθμίδας αντισταθμίζει πλήρως την δύναμη προώθησης F_{scat} και τη βαρύτητα.

ΤΟ ΣΦΑΙΡΙΔΙΟ ΕΛΚΕΤΑΙ ΠΡΟΣ
ΤΗΝ ΕΣΤΙΑ ΤΟΥ LASER



Σχήμα 2.3. Ποιοτική απεικόνιση της παγίδευσης ενός διηλεκτρικού σφαιριδίου. Η διάθλαση ενός τυπικού ζεύγους ακτίνων a και b που συνιστούν την οπτική δέσμη έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση των δυνάμεων F_a και F_b , των οποίων το διανυσματικό άθροισμα δίνει πάντα μια δύναμη επαφοράς για αξονικές και εγκάρσιες μετατοπίσεις του σφαιριδίου από το σημείο ισορροπίας της παγίδευσης.

2.3. Διαφορετικές θεωρητικές προσεγγίσεις της οπτικής παγίδευσης, ανάλογα με το μέγεθος των σωματιδίων - στόχων

Ενώ στην προηγούμενη παράγραφο περιγράφηκε η οπτική παγίδα με βάση απλές αρχές της γεωμετρικής οπτικής, στην πραγματικότητα το ποια θα είναι η θεωρητική προσέγγιση για την περιγραφή της οπτικής παγίδας εξαρτάται από το μέγεθος του σωματιδίου - στόχου. Αν οι διαστάσεις των υπό παγίδευση σωματιδίων είναι πολύ μεγαλύτερες του μήκους κύματος του φωτός, τότε μιλάμε για **σωματίδια Mie**, ενώ στην περίπτωση που οι διαστάσεις των σωματιδίων είναι της τάξης μεγέθους ή και μικρότερες του μήκους κύματος της ακτινοβολίας παγίδευσης, μιλάμε για **σωματίδια Rayleigh**. Τα βασικά χαρακτηριστικά των δύο αυτών κατηγοριών καθώς και οι λόγοι για τους οποίους επιβάλλεται διαφορετική θεωρητική προσέγγιση, αναφέρονται στις επόμενες δύο υπο-παραγράφους.

2.3.1. Σωματίδια Mie

Αντικείμενα των οποίων το μέγεθος είναι πολύ μεγαλύτερο από το μήκος κύματος του φωτός ονομάζονται **σωματίδια Mie**, διότι η καταλληλότερη θεωρία σκέδασης για την μελέτη τους είναι η θεωρία σκέδασης Mie. Χρησιμοποιώντας laser στο ορατό φάσμα της ακτινοβολίας, τα σωματίδια ακτίνας $r > 2\mu\text{m}$, περίπου, ανήκουν στην κατηγορία αυτή και σε τέτοιου είδους σωματίδια μπορεί κανείς να σκεφθεί με όρους απλής απορρόφησης ή ανάκλασης του φωτός. Όλο το κυματικό μέτωπο προσπίπτει στο σωματίδιο - στόχο και μπορεί να μεταφέρει σ' αυτό όλη του την ορμή (για τέλεια απορροφητικούς στόχους) ή έως και το διπλάσιο της ορμής του (για τέλεια ανακλαστικούς στόχους). Αυτό έχει ως συνέπεια την εισαγωγή ενός αδιάστατου παράγοντα Q στις σχέσεις (2.3) και (2.4) που παίρνει τις τιμές 1 και 2 αντίστοιχα:

$$F = Q \cdot n \cdot P / c$$

$$\tilde{P} = Q \cdot n \cdot I / c$$

Το σημαντικό είναι ότι, λόγω του μεγάλου μεγέθους των θεωρούμενων σωματιδίων ως προς το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, κατά την αλληλεπίδραση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας με το σωματίδιο, μπορούμε να αγνοήσουμε τα κυματικά χαρακτηριστικά του φωτός. Αυτό σημαίνει ότι το φαινόμενο μπορεί να ερμηνευθεί θεωρητικά με αρχές γεωμετρικής οπτικής, δηλαδή με απλούς όρους ανάκλασης και διάθλασης των οπτικών ακτίνων που συνιστούν την εισερχόμενη δέσμη φωτός.

2.3.2. Σωματίδια Rayleigh

Στην περίπτωση που το μέγεθος των προς παγίδευση αντικειμένων είναι πολύ μικρότερο του μήκους κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, μιλάμε για **σωματίδια Rayleigh** (χρησιμοποιώντας laser στο ορατό φάσμα της ακτινοβολίας, τα σωματίδια ακτίνας $r < 40\text{nm}$, περίπου, ανήκουν στην κατηγορία αυτή). Τέτοια είναι συνήθως μόρια και μακρομόρια και δρουν σαν αντένα. Σωματίδια αυτού του είδους αλληλεπιδρούν με το φως ως ηλεκτρικά δίπολα. Η βασική τους διαφορά από τα

σωματίδια **Mie** έγκειται στο γεγονός ότι δεν έχουμε απορρόφηση ή ανάκλαση του φωτός, αλλά σκέδαση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η σκέδαση είναι αυτή που καθορίζει τη μεταβολή της ορμής του προσπίπτοντος φωτός και άρα τις επαγόμενες στο σωματίδιο δυνάμεις. Η ποσοτικοποίηση των παραπάνω απαιτεί τη χρήση της ηλεκτρομαγνητικής θεωρίας και είναι μια αρκετά περίπλοκη διαδικασία.

2.4. Περιγραφή της οπτικής παγίδας με το ηλεκτρομαγνητικό μοντέλο

Για σωματίδια λοιπόν μικρότερα από το μήκος κύματος της δέσμης laser, η προσέγγιση με βάση τη γεωμετρική οπτική είναι λιγότερο ικανοποιητική. Σε αυτήν την περίπτωση είναι προτιμότερο να αναπτυχθεί ένα ηλεκτρομαγνητικό μοντέλο για τον υπολογισμό των επαγόμενων από το φως δυνάμεων. Μια τέτοια προσέγγιση παίρνει υπ' όψιν της την κυματική φύση του φωτός. Ένα απλό μοντέλο τέτοιου είδους έχει ως εξής.

Θεωρούμε μια γκαουσιανή κατανομή ηλεκτρομαγνητικού πεδίου, η οποία διαδίδεται σε ένα ισοτροπικό, γραμμικό, μη μαγνητικό, μη αγώγιμο ομογενές μέσο και η οποία προσπίπτει σε μια γραμμική, ισοτροπική, μη μαγνητική, με πεπερασμένη ηλεκτρική αγωγιμότητα σφαίρα ακτίνας r . Στην περίπτωση της σφαίρας αυτής ακτίνας \mathbf{r} η οποία βρίσκεται μέσα στο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο και ταυτόχρονα έχουμε και την προσπίπτουσα ακτινοβολία laser τότε στην σφαίρα αυτή ασκούνται δυο δυνάμεις **α) η δύναμη σκέδασης** η οποία οφείλεται στην πίεση της ακτινοβολίας του laser και **β) η δύναμη βαθμίδας** η οποία οφείλεται στην παρουσία του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου. Η παρουσία των δύο αυτών δυνάμεων είναι απαραίτητη για την επίτευξη της οπτικής παγίδευσης, στην συνέχεια θα αποδώσουμε όσο γίνεται πιο λεπτομερώς με μαθηματικές εξισώσεις το μέτρο και την φύση κάθε δύναμης ξεχωριστά.

2.4.1. Δύναμη Σκέδασης

Μια από τις δύο ασκούμενες δυνάμεις, όπως είδαμε, είναι η δύναμη σκέδασης την οποία προκαλεί η πίεση ακτινοβολίας στο σωματίδιο. Η ακτινοβολία επίσης απορροφάται και επανεκπέμπεται από το σωματίδιο. Έτσι προκύπτουν δύο ωθήσεις πάνω στο σωματίδιο. Μια στην κατεύθυνση της διάδοσης της δέσμης laser και μια στην αντίθετη κατεύθυνση από αυτήν των εκπεμπόμενων φωτονίων. Εφ' όσον όμως η εκπομπή φωτονίων συμβαίνει ισοτροπικά, το αποτέλεσμα είναι να δρα στο σωματίδιο μια μόνο δύναμη, αυτή στην κατεύθυνση της προσπίπτουσας δέσμης. Το μέτρο αυτής της δύναμης δίνεται από τον τύπο:

$$F_{scat} = n_m \cdot \frac{\sigma \langle S \rangle}{c} \quad (2.13)$$

όπου n_m είναι ο δείκτης διάθλασης του περιβάλλοντος μέσου, $\langle S \rangle = \frac{1}{2} c \cdot \epsilon_0 \cdot E_0^2$ η μέση τιμή του διανύσματος Poynting, c η ταχύτητα του φωτός και σ η ενεργός διατομή του σωματιδίου, η οποία δίνεται από τον τύπο:

$$\sigma = \frac{8}{3}\pi \cdot (k \cdot r)^4 \cdot r^2 \cdot \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2}\right)^2 \quad (2.14)$$

όπου r η ακτίνα του σωματιδίου, n ο δείκτης διάθλασης του σωματιδίου και k το κυματάνυσμα του χρησιμοποιούμενου φωτός. Απο την θεωρία των κεραιών μπορούμε να γράψουμε την ισχύ του φωτός P σαν συνάρτηση της έντασης του φωτός I και της πόλωσης του σωματιδίου a :

$$P = I \left(\frac{8\pi^3}{3\varepsilon_0}\right) a^2 \quad (2.15)$$

μέσο της σχέσης των Clausius- Massotti:

$$a = 3\varepsilon_0 \left\{ \frac{\varepsilon - 1}{V(\varepsilon + 2)} \right\} \quad (2.16)$$

όπου V είναι ο όγκος ενός μόνο σκεδάζοντος μορίου. Και με $V=(4/3)\pi r^3$ για σφαιρικό σωματίδιο, επίσης γνωρίζοντας οτι για μη μαγνητικά υλικά ισχύει $\varepsilon = m = \frac{n_p}{n_m}$ με n_p το δείκτη διάθλασης του σωματιδίου και n_m το δείκτη διάθλασης του περιβάλλοντος μέσου προκύπτει:

$$P = I \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2}\right)^2 \quad (2.17)$$

Οπότε για την δύναμη σκέδασης, παραλείποντας τον παράγοντα Q , παίρνουμε:

$$F_{scat} = \frac{I}{c} \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2}\right)^2 n_m \quad (2.18)$$

Αυτή η σχέση ισχύει για σωματίδια διηλεκτρικά με μέγεθος μικρότερο από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και μας δίνει το μέτρο της δύναμης σκέδασης που ασκείται.

2.4.2. Δύναμη Βαθμίδας

Η δεύτερη δύναμη που προκύπτει κατά την οπτική παγίδευση είναι η δύναμη βαθμίδας. Αυτή η δύναμη είναι η δύναμη Lorentz που δρα στο δίπολο και προκαλείται από το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο. Ένα στατικό δίπολο αποτελείται από δύο αντίθετα φορτία. Αν αυτά τώρα ταλαντώνονται το ένα προς το άλλο, το δίπολο ονομάζεται δυναμικό. Η δύναμη βαθμίδας που ασκείται στο δίπολο είναι:

$$F(\vec{r}, t) = [\vec{p}(\vec{r}, t) \cdot \nabla] \cdot \vec{E}(\vec{r}, t) \quad (2.19)$$

όπου p η επαγόμενη διπολική ροπή $\vec{p}(\vec{r}, t) = a \cdot \vec{E}(\vec{r}, t)$, a είναι η πολωσιμότητα και $\vec{E}(\vec{r}, t)$ είναι το ηλεκτρικό πεδίο του φωτός της δέσμης laser. Με βάση την ταυτότητα

$\nabla \cdot \vec{E}^2 = 2(\vec{E} \cdot \nabla) \cdot \vec{E} + 2\vec{E} \times (\nabla \times \vec{E})$ και την εξίσωση του Maxwell $\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t}$, η δύναμη γίνεται:

$$\vec{F}(\vec{r}, t) = \frac{1}{2} a \left[\nabla \cdot \vec{E}(\vec{r}, t)^2 - 2\vec{E} \times \left(-\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \right) \right] \quad (2.20)$$

Όμως η μέση τιμή της δύναμης βαθμίδας που ασκείται τελικά στο σωματίδιο υπολογίζεται, αν αντικαταστήσουμε στον τύπο την μέση τιμή του ηλεκτρικού πεδίου,

$\langle \vec{E}(\vec{r}, t)^2 \rangle_T = \frac{1}{2} |\vec{E}(\vec{r})|^2$ (δεδομένου ότι $\left\langle \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \right\rangle_T = 0$). Επομένως η δύναμη είναι:

$$\vec{F}(\vec{r}) = \langle \vec{F}(\vec{r}, t) \rangle_T = \frac{1}{2} a \nabla \langle \vec{E}(\vec{r}, t)^2 \rangle = \frac{1}{4} a \nabla |\vec{E}(\vec{r})|^2 \quad (2.21)$$

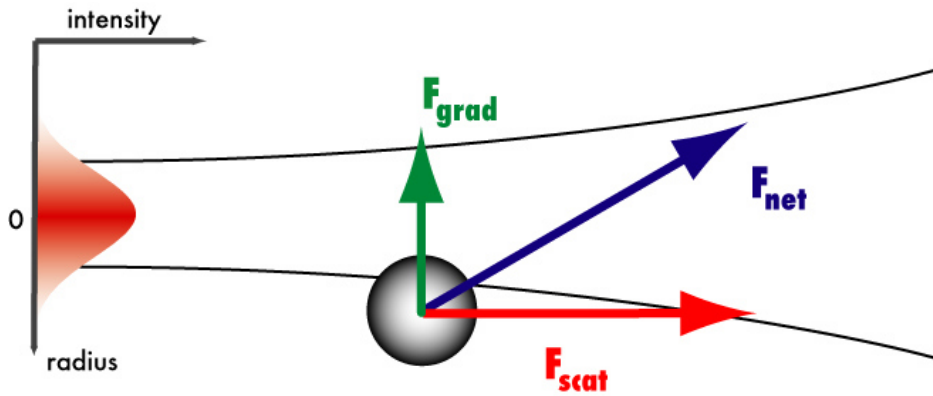
Η ένταση του φωτός, όμως, συνδέεται με το ηλεκτρικό πεδίο σύμφωνα με τον τύπο $I(\vec{r}) = \frac{n_m \epsilon_0 c}{2} |\vec{E}(\vec{r})|^2$. Άρα η δύναμη βαθμίδας σε σχέση με την ένταση της δέσμης είναι:

$$\vec{F}(\vec{r}, t) = \frac{1}{2n_m \epsilon_0 c} a \nabla \cdot I(\vec{r}) \quad (2.22)$$

Τώρα για σφαιρικό σωματίδιο Rayleigh, με πόλωση a , η δύναμη βαθμίδας F_{grad} , δίνεται από τη σχέση (Ashkin 1986):

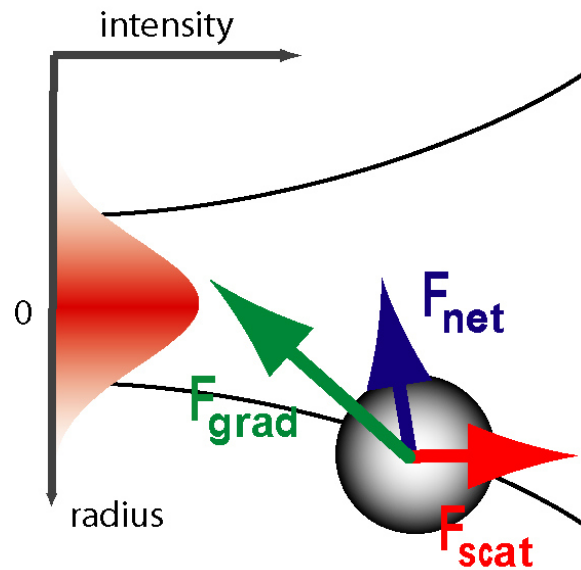
$$F_{grad} = -\frac{n_m}{2} a \nabla E^2 = -\frac{n_m^3 r^3}{2} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \nabla E^2 \quad (2.23)$$

Η κατεύθυνση της δύναμης βαθμίδας είναι προς την περιοχή υψηλότερης συγκέντρωσης της έντασης της δέσμης laser, στην περίπτωση που η δέσμη έχει γκαουσιανό προφίλ κατανομής και προς την εστία, στην περίπτωση που η δέσμη είναι ισχυρά εστιασμένη.



Σχήμα 2.4. Άλλη μια σχηματική αναπαράσταση των δυνάμεων βαθμίδας και σκέδασης.

Σε ένα σωματίδιο απομακρυσμένο από τον άξονα διάδοσης της δέσμης ασκείται η δύναμη βαθμίδας η οποία δρα ως δύναμη επαναφοράς προς τον άξονα διάδοσης (βλέπε σχήμα 2.4). Λόγω της μικρής καμπυλότητας της δέσμης, η συνιστώσα της δύναμης βαθμίδας που είναι παράλληλη με τη δέσμη μπορεί να αγνοηθεί. Η δύναμη σκέδασης λόγω της πίεσης ακτινοβολίας σπρώχνει το σωματίδιο προς την διεύθυνση διάδοσης του φωτός. Για την παγίδευση των σωματιδίων, λοιπόν, απαιτείται μια δέσμη laser με ισχυρή εστίαση έτσι ώστε οι δυνάμεις σκέδασης να υπερνικούνται.



Σχήμα 2.5. Άλλη μια σχηματική αναπαράσταση των δυνάμεων βαθμίδας και σκέδασης στην προσέγγιση Rayleigh.

Το σχήμα 2.5 δείχνει τις δυνάμεις που δημιουργούνται στην προσέγγιση Rayleigh για μια πολύ καλά εστιασμένη δέσμη laser. Σε μια ισχυρά εστιασμένη δέσμη, η δύναμη βαθμίδας έχει δύο συνιστώσες. Η μια έχει φορά αντίθετη στη φορά του διανύσματος Poynting (η οποία δεν είναι πλέον αμελητέα) και η άλλη κάθετη σε αυτό. Η αντίθετη συνιστώσα εμποδίζει το σωματίδιο να κινηθεί στη διεύθυνση διάδοσης του φωτός. Η συνολική δύναμη \vec{F}_{net} δρα ως δύναμη επαναφοράς προς την κατεύθυνση εστίασης της δέσμης. Έτσι λοιπόν επιτυγχάνεται η παγίδευση του σωματιδίου.

Ανάγοντας το παραπάνω σε μορφή εξισώσεων, για να έχουμε τώρα οπτική παγίδευση, στη θέση της μέγιστης τιμής της βαθμίδας της έντασης του πεδίου αξονικά (που είναι για $z = \frac{\pi w_0^2}{\lambda\sqrt{3}}$), θα πρέπει το πηλίκο R (Ratio) της δύναμης F από τη βαθμίδα του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου προς την αντίστοιχη από τη σκέδαση να είναι μεγαλύτερο ή ίσο της μονάδας. Θεωρούμε μια Gaussian δέσμη:

$$E^2 = E_0 \exp\left\{\frac{-2r^2}{w_0^2}\right\} \quad (2.24)$$

με εστιακή κηλίδα w_0 , στην παραπάνω αξονική απόσταση z για ένταση που δίνεται από τη σχέση:

$$I_0 = \frac{cE_0^2}{4\pi} \quad (2.25)$$

Τότε ο λόγος R δίνεται μετά από λίγες αλγεβρικές πράξεις, (Ashkin 1986), από τη σχέση:

$$R = \frac{F_{grad}}{F_{scat}} = \frac{3\sqrt{3}}{64\pi^5} \frac{n_m^2}{\left(\frac{m^2-1}{m^2+2}\right)} \frac{\lambda^5}{r^3 w_0^2} \geq 1 \quad (2.26)$$

όπου λ είναι το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός, m ο ενεργός δείκτης διάθλασης, $m = \frac{n_p}{n_m}$, και r η ακτινική απόσταση.

Η εξίσωση αυτή ισχύει μόνο για την Rayleigh περιοχή όπου $2r \leq 0,2\lambda \cong 80nm$ και για δέσμη με Gaussian προφίλ.

3. Οπτικές λαβίδες και Βιολογία

3.1. Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας laser με βιολογικά υλικά

Όταν μια δέσμη laser πέσει σε βιολογικό υλικό (π.χ κύτταρα, ιστός), παρατηρείται έντονη αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας με το υλικό αυτό. Πιο συγκεκριμένα, ένα μέρος της ακτινοβολίας θα απορροφηθεί από το υλικό. Ένα άλλο μέρος της, αν το υλικό έχει μακροσκοπικές διαστάσεις, θα ανακλαστεί. Το μεγαλύτερο ποσοστό της προσπίπτουσας ακτινοβολίας συνήθως σκεδάζεται μιας και τα βιολογικά κύτταρα αποτελούν ένα έντονα σκεδαστικό μέσο. Μπορεί ακόμα το φως του laser να επάγει διάφορα άλλα φωτοχημικά φαινόμενα στο υλικό ενώ για μεγάλες εντάσεις μπορεί να προκαλέσει και τη φωτοχημική αποδόμησή του. Η απορρόφηση της ακτινοβολίας, προκαλεί τη διέγερση των μορίων του υλικού. Τα μόρια κατά την αποδιέγερση τους, όταν αυτή γίνεται με μη ακτινοβολητικό τρόπο, μπορούν να προκαλέσουν θέρμανση του υλικού. Στην περίπτωση ακτινοβολητικής αποδιέγερσης συνήθως προκαλούν φθορισμό.

Ο τρόπος με τον οποίο η δέσμη laser επηρεάζει το βιολογικό υλικό εξαρτάται από πολλές παραμέτρους. Το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (το οποίο καθορίζει το βαθμό απορρόφησης του φωτός από το βιολογικό υλικό), η ένταση της δέσμης laser, ο χρόνος έκθεσης στην ακτινοβολία, όλα αυτά παίζουν ουσιαστικό ρόλο αφού καθορίζουν το συνολικό ποσό ενέργειας το οποίο δέχεται το υλικό. Τέλος, όπως είναι φυσικό, το ποιες διεργασίες θα είναι κυρίαρχες κατά την αλληλεπίδραση του με το φως, εξαρτάται από το ίδιο το υλικό. Πιο συγκεκριμένα, το τι μήκος κύματος θα χρησιμοποιήσουμε για τη δέσμη εξαρτάται από την ιδιαίτερη σκοπιμότητα που έχει η εκάστοτε οπτική δέσμη. Έτσι για τις οπτικές λαβίδες, που είναι επιθυμητή όσο το δυνατό μικρότερη αλληλεπίδραση του φωτός με το υπό παγίδευση σωματίδιο, τα μήκη κύματος που επιλέγονται είναι τέτοια ώστε να ελαχιστοποιούν την απορρόφηση και οι εντάσεις της ακτινοβολίας είναι σχετικά χαμηλές. Αν πρόκειται για βιολογικά κύτταρα, κατάλληλα μήκη κύματος είναι αυτά στο κοντινό υπέρυθρο ώστε να μην υπάρχει σοβαρή απορρόφηση από το νερό που θα προκαλούσε έντονα θερμικά φαινόμενα.

Παράλληλα με τη χρήση μιας δέσμης laser ως οπτικής λαβίδας μπορούμε να εισάγουμε στην διάταξη επιπλέον δέσμες laser με κατάλληλες ιδιότητες, για τη χρήση τους ως οπτικά εργαλεία χειρισμού, κοπής, διέγερσης κτλ σωματιδίων, γνωστών ως μικροδεσμών laser. Για τέτοιου είδους χρήση επιδιώκεται η πρόκληση διαφόρων φωτοχημικών φαινομένων ή το σπάσιμο χημικών δεσμών κτλ. Στην περίπτωση αυτή επιλέγονται παλμικά laser στο υπεριώδες ώστε οι εντάσεις της ακτινοβολίας να είναι μεγάλες και να μεγιστοποιείται η απορρόφηση από το βιολογικό δείγμα.

3.2 Βιολογικές εφαρμογές

Οι διατάξεις των οπτικών λαβίδων κύρια προορίζονται ως βιολογικά εργαλεία. Για να είναι δυνατή η χρήση της οπτικής παγίδας στις βιολογικές επιστήμες είναι απαραίτητη, όπως έχει προαναφερθεί, η ελαχιστοποίηση της αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας παγίδευσης με το εκάστοτε βιολογικό υλικό. Πειραματικές διαδικασίες έδειξαν ότι με κατάλληλη εκλογή μήκους κύματος (στο κοντινό υπέρυθρο), είναι δυνατόν κύτταρα τα οποία βρίσκονται μέσα σε οπτική παγίδα να διαιρεθούν. Η δυνατότητα διαίρεσης του κυττάρου υπό καθεστώς οπτικής "ομηρίας" είναι μια σοβαρή ένδειξη ότι τελικά δεν υπάρχουν αξιοσημείωτες επιπτώσεις στο κύτταρο από

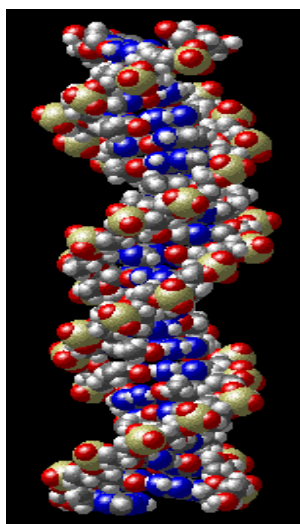
την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Η τυχόν επιπτώσεις που μπορεί να προκαλούνται στα κύτταρα από την αλληλεπίδρασή τους με την ακτινοβολία εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες (φύση του ίδιου του κυττάρου, χρόνος έκθεσης κ.α.) και αποτελεί αντικείμενο μελέτης πολλών επιστημονικών ομάδων.

Η σύζευξη της οπτικής λαβίδας με μια μικροδέσμη (microbeam) στην ίδια πειραματική διάταξη ανοίγει νέους πειραματικούς δρόμους. Πιο συγκεκριμένα με κατάλληλη επιλογή οπτικής μικροδέσμης (π.χ. laser στο UV) μπορεί να μελετηθεί η ακτινοβολητική καταστροφή κυττάρων που έχουν επιλεγεί/ακίνητοποιηθεί προηγουμένως με την οπτική λαβίδα. Μπορούν επίσης να γίνουν πειράματα κοπής και χειρισμού υποκυτταρικών οργανιδίων σε μεγάλα κύτταρα ή μικροοργανισμούς με ταυτόχρονη μελέτη των συνεπειών σε αυτά.

Ακόμη, μια από τις σημαντικές βιολογικές εφαρμογές των οπτικών λαβίδων είναι η μελέτη των λεγόμενων μοριακών μηχανών (molecular motors). Πρόκειται για μηχανο-ένζυμα τα οποία αλληλεπιδρούν με άλλα υποκυτταρικά οργανίδια, δημιουργώντας δυνάμεις υπεύθυνες για την κίνηση του ίδιου του κυττάρου, την δραστηριότητα των μυών, την κινητικότητα οργανιδίων στο κύτταρο κ.α. Στη βιοϊατρική έγινε δυνατή η μελέτη της κινητικότητας σπερματοζωαρίων και επιλεγμένη με οπτικό τρόπο γονιμοποίηση ωαρίων.

Παρακάτω θα παραθέσουμε μερικές από τις πιο σημαντικές εφαρμογές των οπτικών λαβίδων στην βιολογία και στην ιατρική. Τα στοιχεία που παραθέτουμε είναι από την διπλωματική εργασία του κ. Δ. Περάκη, (ΕΜΠ, 2004), καθώς και η βιβλιογραφία που παρατίθεται αναλυτικά.

3.2.1. Μελέτη του DNA

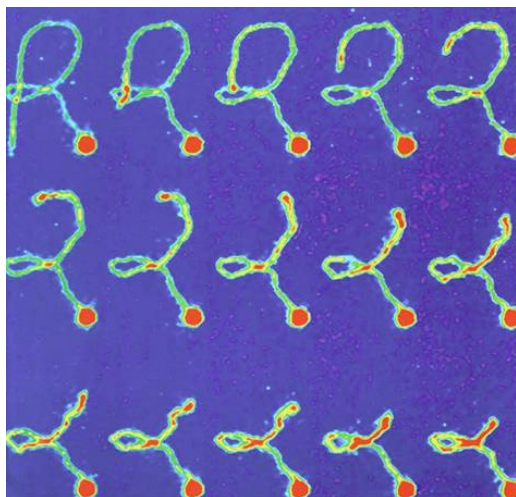


Η «οπτική τσιμπίδα» μας επέτρεψε να εξερευνήσουμε βαθύτερα τη φυσική που κρύβεται πίσω στο DNA. Οι έρευνες είναι κατά κύριο λόγο προσανατολισμένες τη περίοδο αυτή στη μελέτη της δράσης του DNA μέσα στο κύτταρο (Rowell, 2002).

Μία βασική μέθοδος είναι η προσκόλληση, με χημικό συνήθως τρόπο, μίας διηλεκτρικής μικρο-σφαίρας στο ένα άκρο του DNA ενώ παράλληλα το άλλο άκρο κρατιέται σταθερό (π.χ. με τη βοήθεια ενός πλακιδίου). Παγιδεύοντας το σφαιρίδιο με

τη δέσμη του laser, αρχίζουμε σιγά-σιγά να μετακινούμε τη δέσμη μας, αναγκάζοντας έτσι το μακρομόριο του DNA να αρχίζει να ξετυλίγεται. Βρίσκοντας την δύναμη που επάγει το ίδιο το μόριο προς την σφαίρα, καθώς επίσης μελετώντας και τον τρόπο με τον οποίο το μακρομόριο

ξανατυλίγεται (όπως χαρακτηριστικά μπορούμε να δούμε και στις διαδοχικές φωτογραφίες στο σχήμα 3.1) μπορούμε να κατανοήσουμε βασικά στοιχεία του βιομορίου (Perkins et al, 1994). Ένας καλύτερος τρόπος είναι όταν η μικρο-σφαίρα συγκρατείται από τη δέσμη του laser ενώ παράλληλα ασκείται ένα ηλεκτρικό πεδίο. Αλλάζοντας την πολικότητα του ηλεκτροστατικού αυτού πεδίου μπορούμε να μελετήσουμε τον τρόπο περιστροφής του μακρομορίου μέσα στο διάλυμα που το περιβάλλει και το κατά πόσο μόρια του DNA συσσωματώνονται μερικές φορές ή όχι.



Σχήμα 3.1. Διαδοχικές φωτογραφίες από το τεχνητό ζετύλιγμα του μακρομορίου του DNA. Η μία άκρη του μορίου έχει συγκρατηθεί σταθερή με τη βοήθεια ενός πλακιδίου, ενώ η διηλεκτρική μικροσφαίρα που έχει προσκολληθεί με χημικό τρόπο στο άλλο άκρο του DNA μετακινείται κατά βούληση μέσω ενός laser. Με τον τρόπο αυτό, μελετά κανείς τις ελαστικές και όχι μόνο ιδιότητες του DNA.

3.2.2. Αποκοπή και μετακίνηση μέρους των χρωμοσωμάτων

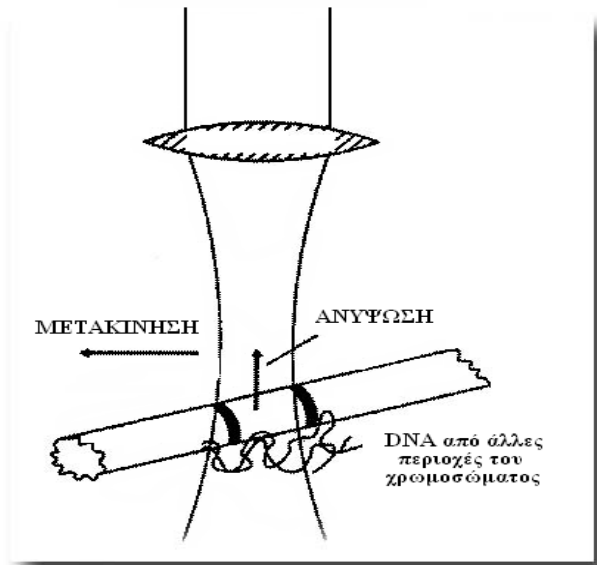
Η επέμβαση σε γονιδιακό επίπεδο είναι ένα πολύ αμφιλεγόμενο όσο και δυναμικό ζήτημα προς συζήτηση στις μέρες μας, από το οποίο δεν θα μπορούσε να απουσιάζει βέβαια η μέθοδος της οπτικής παγίδευσης βιοδομών που παρουσιάζουμε εδώ (Schütze και Lahr, 1999). Δεδομένου ότι, στην οπτική παγίδευση διακρίνουμε τα εξής δύο πολύ βασικά χαρακτηριστικά:

- a) Την προσέγγιση του εσωτερικού μιας περιοχής χωρίς τη διάρρηξη των τοιχωμάτων που την περιβάλλουν.
- b) Το χειρισμό βιοδομών σε μικρομετρική κλίμακα χωρίς να επάγεται βλάβη ή καταστροφή αυτών,

Καταλήγουμε ότι η οπτική παγίδευση είναι μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος στον χώρο της ιατρικής.

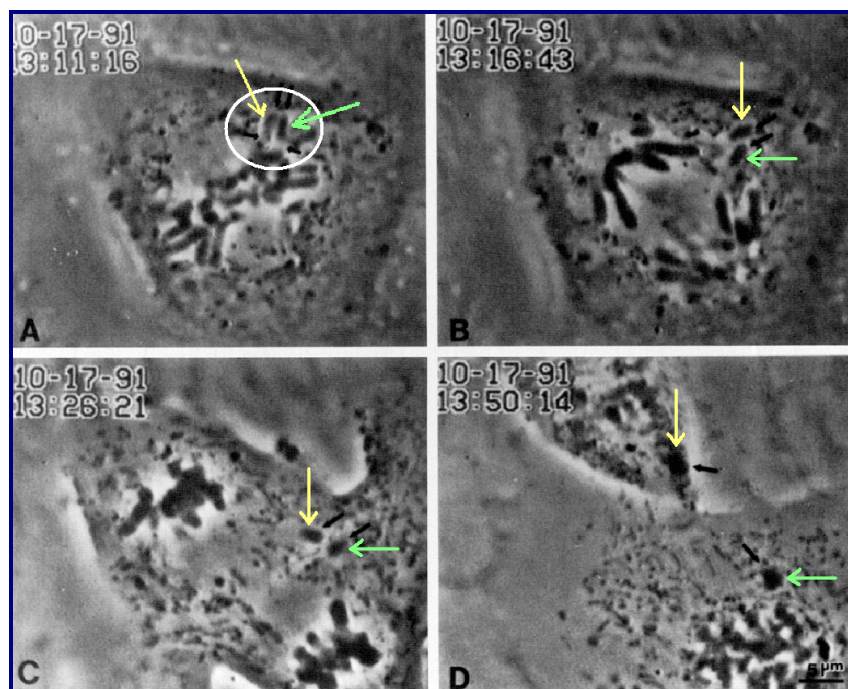
Για παράδειγμα, γνωρίζουμε ότι είναι μια πολύ δύσκολη και χρονοβόρα η έρευνα για την ταυτοποίηση του γονιδίου που ευθύνεται για μια συγκεκριμένη ασθένεια. Αυτή η γνώση όμως είναι πολύ σημαντική για αυτούς που μελετούν εναλλακτικές θεραπείες και μπορεί τελικά να συμβάλλει στην ολοκληρωτική εξάλειψη της ασθένειας. Έτσι, για τη νόσο του Huntington, χρειάστηκαν περίπου 15 χρόνια σκληρής δουλειάς ώστε να προσδιορισθεί το υπεύθυνο για την ασθένεια γονίδιο, και στη λίστα περιμένουν ακόμη 600 περίπου ασθένειες προς γονιδιακή ταυτοποίηση.

Ένας λόγος της αργοπορίας αυτής είναι ότι πολλές φορές χρειάζεται να εξερευνηθεί όλο το γονιδίωμα. Απομόνωση μίας στενής περιοχής του χρωμοσώματος, γύρω από τη θέση που εντοπίζεται η ασθένεια, μέσω της αποκοπής του κατά τη διαδικασία της μετάφρασης, μπορεί να επιταχύνει κατά πολύ την όλη διαδικασία. Για αυτό η μέθοδος της «μικρο- ανατομής» κερδίζει έδαφος στο χώρο της κυτταρο-γενετικής και μοριακής γενετικής.



Σχήμα 3.2. Μικροχειρισμοί μέσα στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Το κατάλληλο μέρος του χρωμοσώματος απομονώνεται, μετακινείται και είτε εξετάζεται είτε αποκόπεται. (Schutze και Lahr 1999)

Η όλη διαδικασία γίνεται ευκολότερα κατανοητή μέσω του σχήματος 3.2, όπου φαίνεται πώς μία μικρο-δέσμη laser μπορεί να συνδυαστεί με μία οπτική τσιμπίδα για την αποκοπή του μέρους του χρωμοσώματος που θέλουμε και την μετέπειτα απομόνωση του αποκομμένου μέρους χωρίς μηχανική επαφή (Liang et al, 1994).



Σχήμα 3.3. Αποκοπή και μικροχειρισμός χρωμοσωμάτων σε ζωντανά επιθηλιακά κύτταρα από τον πνεύμονα σαλαμάνδρας. Η οπτική παγίδευση και αποδόμηση έχει ανοίξει νέους ορίζοντες στην γενετική (Liang et al, 1993).

Σε ένα συγκεκριμένο πείραμα που πραγματοποιήθηκε από πολλούς επιφανείς επιστήμονες του χώρου (Liang et al, 1993), χρησιμοποιήθηκε ένα παλμικό laser στα

532 nm σαν οπτικό ψαλίδι και ένα Nd-YAG laser στα 1064 nm σαν οπτική λαβίδα. Αυτά τα δύο συνδυάστηκαν αποτελεσματικά για να αποκόψουν και να χειριστούν χρωμοσώματα σε ζωντανά επιθηλιακά κύτταρα από τον πνεύμονα σαλαμάνδρας. Φωτογραφίες από αυτό το πείραμα παρουσιάζονται στο σχήμα 3.3. Αυτό το πρωταρχικό πείραμα έδειξε ότι τμήματα χρωμοσωμάτων, τα οποία αποκόπηκαν με το παλμικό laser, μπορούσαν εύκολα να μετακινηθούν και να περιστραφούν υπό την επίδραση της οπτικής δύναμης, ανεξάρτητα από το μέγεθός τους, όταν βρίσκονταν στην περιφέρεια του άξονα των χρωμοσωμάτων σε μίτωση.

Επίσης σε άλλα πειράματα μελετήθηκαν αναλυτικότερα οι τέσσερις φάσεις της κυτταρικής διαίρεσης, όπως επίσης και η σημασία κάποιων γονιδίων σε αυτές.

3.2.3. Μελέτη σπερματοζωαρίων και τεχνητή γονιμοποίηση

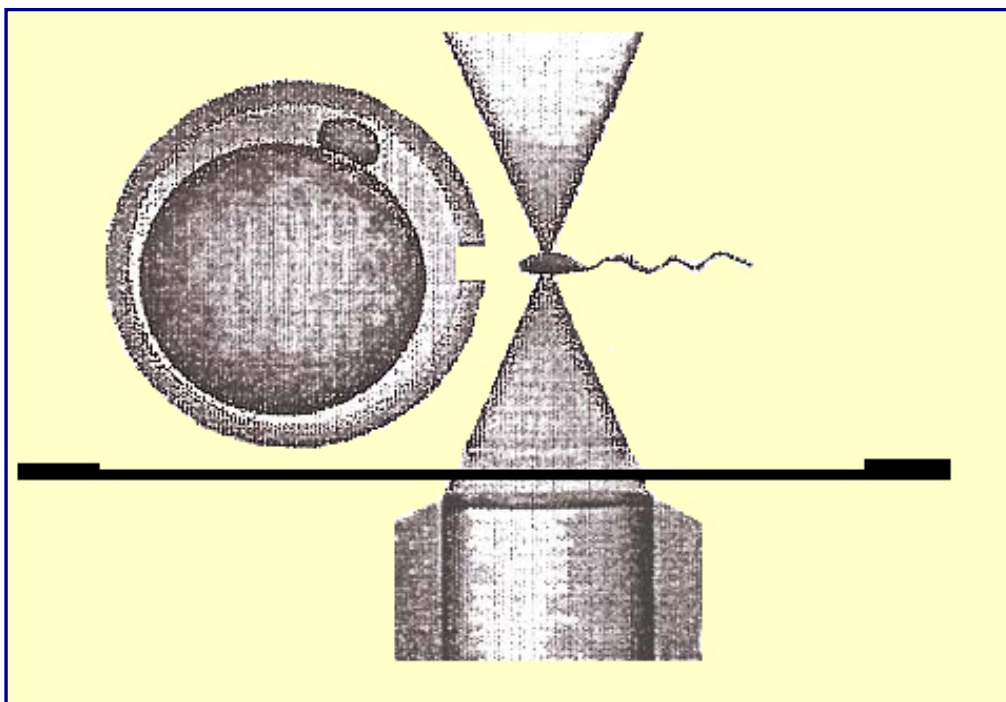
Οι οπτικές λαβίδες μπορούν να παγιδέψουν και πολύ κινητικά κύτταρα. Μερικοί επιστήμονες από το Irvine (Berns, 1998), κατάφεραν πρώτοι να απομονώσουν σπερματοζωάρια και να τα οδηγήσουν κατά βούληση. Κατάφεραν να μελετήσουν τις δυνάμεις «κολυμβήσεως» (swimming forces) που ασκεί το σπερματοζωάριο, καθώς οδεύει προς το ωάριο, παγιδεύοντας πρώτα το σπερματοζωάριο με τη δέσμη laser και μετά σταδιακά μειώνοντας την ισχύ της δέσμης. Καθορίζοντας την τιμή της ισχύος για την οποία αυτό δραπετεύει από την παγίδα και έχοντας πρώτα βαθμονομήσει το σύστημα, βρίσκουμε εύκολα την αντίστοιχη δύναμη. Με αυτό τον τρόπο έγινε δυνατή η συσχέτιση μεταξύ της δύναμης «κολυμβήσεως», της ταχύτητας και της τροχιάς που αυτό ακολουθεί (Clement-Sengewald et al, 1996).

Για παράδειγμα, μια τέτοια μελέτη έδειξε ότι τα σπερματοζωάρια, τα οποία οδεύουν σε τροχιές ζικ-ζακ, κολυμπούν με μεγαλύτερη δύναμη από αυτά που ακολουθούν ευθεία τροχιά. Για αυτό τα πρώτα φτάνουν πιο εύκολα στο ωάριο για να το γονιμοποιήσουν από ότι τα δεύτερα, που ορίζουν κατά κάποιο τρόπο ένα είδος αντρικής υπογονιμότητας.

Σε ένα μεγάλο ποσοστό περιπτώσεων, το πρόβλημα της ανθρώπινης υπογονιμότητας μπορεί να ξεπεραστεί πραγματοποιώντας μία σύντηξη μεταξύ του σπερματοζωαρίου και του ωαρίου για γονιμοποίηση έξω από τη μήτρα (*in vitro* fertilization, IVF).

Τις περισσότερες φορές, το πρόβλημα ακόμη και σε αυτήν την τεχνική είναι απλώς μηχανικό, καθώς το ωάριο περιβάλλεται από ένα υγρό αρκετά μεγάλου ιξώδους (*zona pellucida*), το οποίο δεν μπορεί να διαπεραστεί εύκολα από το σπερματοζωάριο. Σε άλλες περιπτώσεις το πρόβλημα μπορεί να είναι η μειωμένη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, τα οποία είτε δεν φτάνουν στο ωάριο, είτε δεν μπορούν να εισχωρήσουν σε αυτό.

Χρησιμοποιώντας ένα παλμικό laser εστιασμένης δέσμης κατάλληλης συχνότητας, μπορεί να δημιουργηθεί μία «τρύπα» μικρομετρικών διαστάσεων, στον περιβάλλοντα χώρο του ωαρίου, δηλαδή στη *zona pellucida*. Τα σπερματοζωάρια πια δεν συναντούν το εμπόδιο αυτού του αδιαπέραστου περιβλήματος και μπορούν να προσεγγίσουν τη μεμβράνη του ωαρίου ευκολότερα. Εκεί μπορεί να πραγματοποιηθεί η φυσιολογική διαδικασία της γονιμοποίησης. Για να αυξηθούν οι πιθανότητες ώστε το σπερματοζωάριο να εισχωρήσει μέσα από αυτή την τεχνητή τρύπα, μπορούμε να το «πιάσουμε» με μία οπτική λαβίδα και να το κατευθύνουμε εμείς προς το μέρος της. Η παραπάνω διαδικασία (που περιγράφεται παραστατικά στο σχήμα 3.4) αποτελεί μία καινοτομική μέθοδο γονιμοποίησης χωρίς επαφή, καθώς δεν χρησιμοποιούνται μικρομηχανικά εργαλεία.



Σχήμα 3.4. Σχηματική απεικόνιση του τρόπου με τον οποίο είναι δυνατή πρώτα η αποδόμηση ενός πολύ μικρού μέρους της μεμβράνης που καλύπτει το ωάριο και η μετέπειτα παγίδευση ενός σπερματοζωαρίου και εμφύτευσή του μέσα στο ωάριο. Η οπτική παγίδα προσπαθεί να βοηθήσει και στο χώρο της τεχνητής γονιμοποίησης με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα.

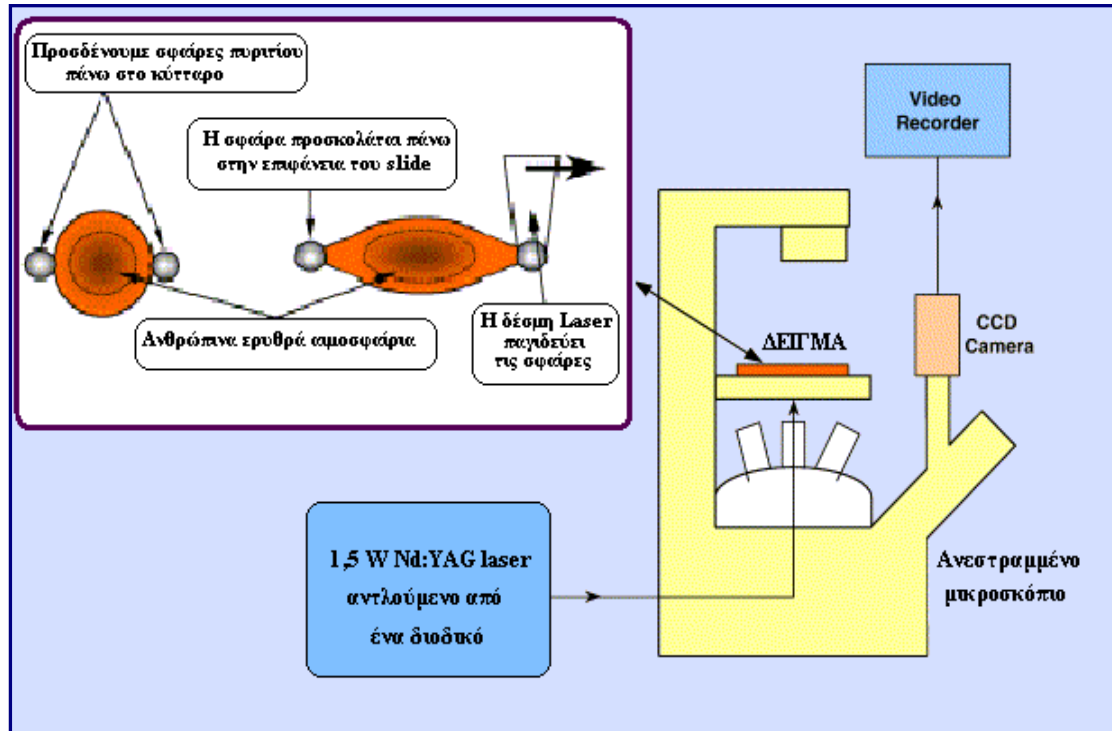
Σε πιο απλές περιπτώσεις, όπου απλώς τα σπερματοζωάρια δεν είναι τόσο κινητικά, μπορεί να γίνει κάποια υποβοήθηση σε αυτά με τη χρήση οπτικής λαβίδας.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πιθανότητα σύλληψης με την νέα αυτή μέθοδο, η οποία ονομάζεται «διάτρηση ζώνης με laser» (Laser zona drilling), αυξήθηκε από 33% που ήταν στις κλασσικές μεθόδους γονιμοποίησης έξω από τη μήτρα (IVF), σε 58%, για χαμηλές πυκνότητες σπέρματος (Greulich, 1999).

3.2.4 Μελέτη της ελαστικότητας των ερυθροκυττάρων

Τα ερυθροκύτταρα, οι μεταφορείς του οξυγόνου στον οργανισμό, μπορούν να παραμορφωθούν αν χρειαστεί να περάσουν μέσα από πολύ στενά τριχοειδή αγγεία. Για αυτό η ελαστικότητα του ερυθροκυττάρου αποτελεί μία ζωτικής σημασίας ιδιότητα τόσο για τα κύτταρα όσο και για τον οργανισμό που πρέπει να τροφοδοτήσουν με οξυγόνο. Όταν τα ερυθροκύτταρα είναι αρκετά άκαμπτα, παρεμποδίζεται η διόδός τους μέσα από πολύ λεπτά αγγεία και έχουμε κακή αιμάτωση με καταστροφικά επαγόμενα αποτελέσματα.

Η μελέτη του φαινομένου της ελαστικότητας του ερυθροκυττάρου με κλασσικές τεχνικές, όπως το «φιλτράρισμα των ερυθροκυττάρων» ή «η μέθοδος του ροοσκοπίου», είναι αρκετά δύσκολη καθώς τα ερυθροκύτταρα πρέπει να κρατηθούν μηχανικά σε μία ορισμένη θέση.



Σχήμα 3.5. Στο συγκεκριμένο σχήμα μελετάται η γραμμική παραμόρφωση των ερυθροκυττάρων, με μια διαφορετική τεχνική από την προηγούμενη. Μικροσφαιρίδια πυριτίου προσκολλούνται στις δύο άκρες του κυττάρου και έπειτα, το ένα πακτώνεται με τη χρήση ενός πλακιδίου ενώ το άλλο παγιδεύεται και μετακινείται από το laser. Μετακινώντας το αξονικά μετρούνται οι επαγόμενες δυνάμεις και η ελαστική παραμόρφωση του κυττάρου (Dao et al, 2003).

Με τις οπτικές λαβίδες, η κατάσταση γίνεται πιο απλή καθιστώντας εφικτή την ανάλυση 50 ερυθροκυττάρων την ώρα και τη μελέτη των ελαστικών ιδιοτήτων τους σε βάθος (Grover, 2000), (Lim et al, 2004). Η μέθοδος έχει ως εξής:

Τρεις δέσμες laser παγιδεύουν ένα ερυθροκύτταρο, του οποίου το σχήμα όπως γνωρίζουμε είναι ένας δίσκος ελαφρώς πιεσμένος στο κέντρο. Οι δύο από αυτές τις δέσμες συγκρατούν σταθερά τα δύο άκρα του δίσκου, ενώ η τρίτη δέσμη σπρώχνει το κέντρο αυτού προς τα κάτω, παραμορφώνοντας το κύτταρο χονδρικά σε σχήμα «V». Αφού επιτύχουμε την παραμόρφωση που θέλουμε, τότε κλείνουμε όλες τις δέσμες ταυτόχρονα και καταγράφουμε σε video τη διαδικασία χαλάρωσης του κυττάρου. Από την καταγεγραμμένη ακολουθία εικόνων μπορούμε να υπολογίσουμε τον χρόνο $T_{1/2}$ που απαιτείται έτσι ώστε να εκπληρωθεί κατά το ήμισυ η πλήρης χαλάρωση αυτού (Greulich, 1999).

Κάνοντας ένα γράφημα της γωνίας με την οποία το σχήματος «V» ερυθροκύτταρο ανοίγει ως προς το χρόνο, και μετά κάνοντας προσαρμογή της καμπύλης με εκθετική συνάρτηση μπορούμε και υπολογίζουμε το χρόνο $T_{1/2}$. Από πειράματα με τις

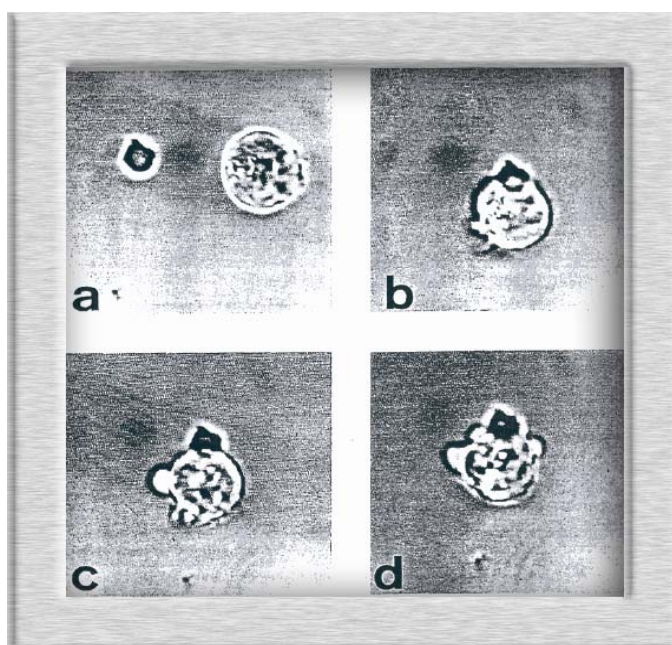
κλασσικές τεχνικές, γνωρίζουμε τη σχέση μεταξύ του χρόνου αυτού και της αντίστοιχης ελαστικότητας του κυττάρου.

Παρόμοια χρήση των οπτικών τσιμπιδών για επίτευξη διαταραχής στο σύστημα και μετέπειτα μελέτη της χαλάρωσης αυτού (βλέπε και στο σχήμα 3.5), απαντάται σε πάρα πολλές μελέτες στις βιοεπιστήμες (όπως είδαμε και στη μελέτη του μακρομορίου του DNA), καθώς η προσπάθεια επίτευξης ευσταθούς ισορροπίας μαρτυράει πολλές ιδιότητες του συστήματος.

3.2.5. Μελέτη της επίθεσης του ανοσοποιητικού συστήματος σε καρκινικά κύτταρα

Οι Seeger et al., το 1991 περιέγραψαν πρώτοι, με τη βοήθεια του φαινομένου της οπτικής λαβίδας, την επίθεση ενός κυττάρου του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου πάνω σε καρκινικό κύτταρο, κατά τα πρώτα δευτερόλεπτα της επαφής (Seeger et al, 1991).

Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως το CTL (Cytotoxic T Lymphocytes) και το NK (Natural Killer), υπάρχουν μέσα στον οργανισμό μας και ψάχνουν για σημάδια εμφάνισης καρκίνου σε υγιή κύτταρα. Το CTL δημιουργεί πεπτιδικό δεσμό με το μόριο MHC₁ (Major Histocompatibility Complex- Μορια του Μειζοντος Συμπλεγματος Ιστοσυμβατότητας) του εκάστοτε κυττάρου, και αν αυτό του φανεί κατά κάποιο τρόπο άγνωστο, τότε χτυπά το αντίστοιχο κύτταρο προσπαθώντας να το καταστρέψει. Αν ο πεπτιδικός δεσμός δεν είναι εφικτός, τότε αναλαμβάνουν δράση τα NK κύτταρα για την επιβίωση και προφύλαξη του οργανισμού. Για την καλύτερη κατανόηση του θέματος όμως, είναι απαραίτητη η in vitro επαφή των κυττάρων CTL και NK με καρκινικά κύτταρα πάνω στο κατάλληλο



υπόστρωμα, και η μελέτη των επαγόμενων δυνάμεων (Greulich, 1999).

Σχήμα 3.6. Παρακολούθηση της επίθεσης ενός NK κυττάρου (Natural Killer) του ανοσοποιητικού συστήματός μας, πάνω σε ένα καρκινικό κύτταρο. Με την οπτική παγίδευση επιτυγχάνεται η in vitro παρακολούθηση της όλης διαδικασίας από τα πρώτα στάδια εξέλιξης του φαινομένου (Seeger et al, 1991).

Η κλασική μέθοδος της ανάμιξης των κυττάρων μέσω φυγοκέντρησης «θολώνει» λίγο τα πρώτα λεπτά της επαφής και επομένως και της επίθεσης. Εδώ, η οπτική λαβίδα μπορεί να επιτύχει επαφή με εύκολο και «ήπιο» τρόπο. Κατά τα γνωστά, παγιδεύουμε *in vitro* ένα NK κύτταρο και το σπρώχνουμε (οδηγούμε) ώστε να έρθει δίπλα στο στόχο, π.χ. σε ένα καρκινικό κύτταρο. Με τον τρόπο αυτό πυροδοτούμε τη διαδικασία ταυτοποίησης και επίθεσης.

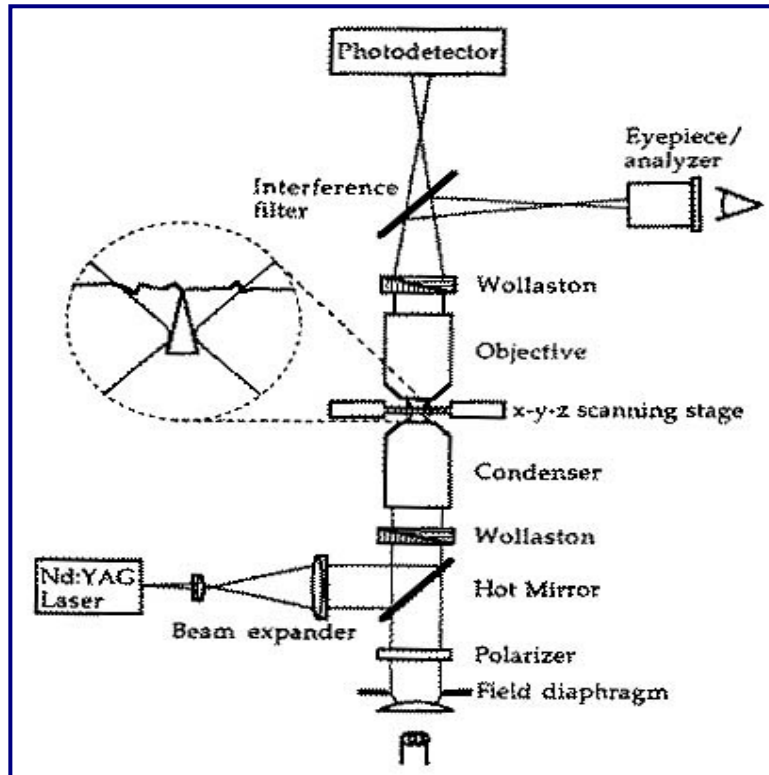
Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε και στις τέσσερις αυτές διαδοχικές φωτογραφίες του πειράματος στο σχήμα 3.6, το NK κύτταρο (μικρός μαύρος κύκλος) επιτίθεται στο στόχο, ο οποίος με τη σειρά του αλλάζει σε μορφολογία και η μεμβράνη του διαταράσσεται.

Τα πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι στην αρχή (40-50 sec) επικρατεί μία διαδικασία όπου φαινομενικά δεν παρατηρείται καμία αλλαγή, καθώς λαμβάνουν μέρος οι βιοχημικές αντιδράσεις. Μετά αρχίζει μία «περιοδική» διαδικασία επίθεσης και ανάδρασης. Ο ακριβής μηχανισμός πίσω από αυτό δεν είναι αποδεδειγμένος αλλά οι επιστήμονες συγκλίνουν στο ότι ο στόχος αντιδρά με την επιδιόρθωση των ζημιών και συνεπακόλουθα το επιτιθέμενο κύτταρο αυξάνει την προσπάθεια εξόντωσης αυτού. *Αν αυτό είναι όντως σωστό, θα αντιληφθούμε αρκετά βαθύτερα την ανοσοποιητική αντίδραση του οργανισμού στον καρκίνο και ίσως μας οδηγήσει σε νέους τρόπους προσέγγισης και θεραπείας του καρκίνου.*

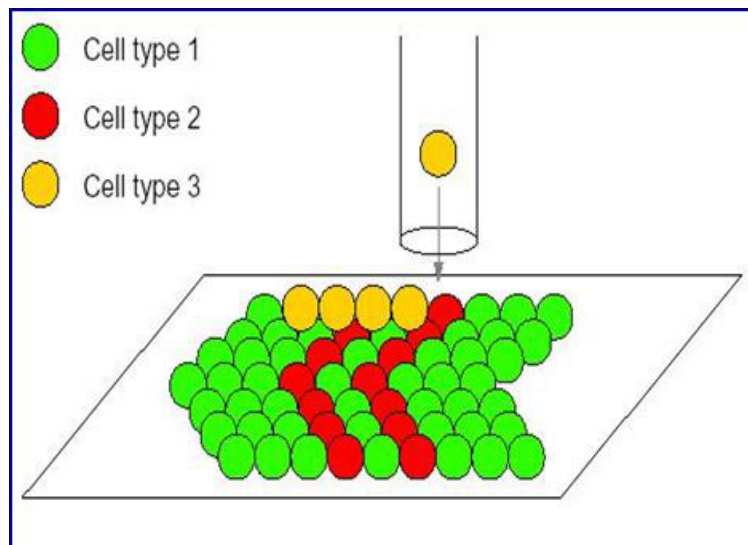
3.2.6. Άλλες εφαρμογές

Πολύ περιληπτικά θα παρουσιάσουμε τέλος, κάποιες από τις ακόμη πολύ βασικές εφαρμογές και μελέτες στις οποίες βρίσκει χρήση το φαινόμενο της οπτικής παγίδευσης και χειρισμού μέσω των οπτικών τσιμπιδών.

- ✓ Είναι δυνατός ο διαχωρισμός διαφορετικών κυττάρων ή βακτηριδίων σε διαφορετικά δοχεία για περαιτέρω μελέτη.
- ✓ Δημιουργία ενός νέου και καινοτομικού μικροσκοπίου σάρωσης δύναμης (scanning-force microscope) (Ghislain και Webb 1993), (Stark et al 2003). Μία παγιδευμένη οπτικά γυάλινη βελόνα αποτελεί το στοιχείο που νιώθει τις επαγόμενες δυνάμεις.
- ✓ Η εκτόπισή της γίνεται αντιληπτή από την χρήση της εμπρόσθιας σκεδαζόμενης ακτινοβολίας του υπό χρήση laser. Η μέθοδος αυτή βελτιώνει την ευαισθησία της απεικόνισης, ιδιαίτερα για μαλακά δείγματα μέσα σε υδάτινο περιβάλλον.
- ✓ Οι επαγόμενες δυνάμεις από το laser μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να οδηγήσουν και να εναποθέσουν σωματίδια διαμέτρου 0,1μm έως 10μm πάνω σε στέρεες επιφάνειες, μια διαδικασία που ονομάζεται «άμεση αποτύπωση καθοδηγούμενη από laser» (laser-guided direct writing), (Odde και Renn 1999).



Σχήμα 3.7. Μικροσκόπιο σάρωσης δύναμης που κάνει χρήση του φαινομένου της οπτικής παγίδευσης για την αύξηση της ευαισθησίας του.

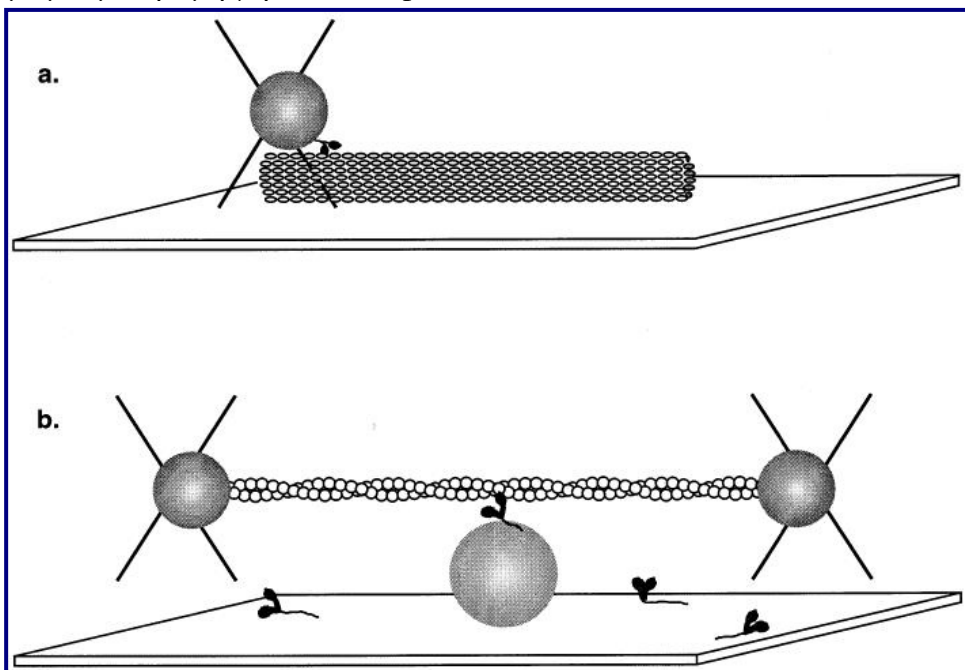


Σχήμα 3.8. Η είσοδος των οπτικών τσιμπίδων έφερε επανάσταση και στον τομέα των υλικών και της μικροηλεκτρονικής. Μεμονωμένα μόρια κατάλληλων υλικών επιστρώνονται ένα προς ένα πάνω σε κατάλληλα υποστρώματα για την κατασκευή τέλειων μικροκυκλωμάτων (Odde και Renn 1999).

Σχεδόν κάθε υλικό, συμπεριλαμβανομένων των βιολογικών και των ηλεκτρονικών, μπορεί να το χειριστεί κανείς και να το εναποθέσει πάνω σε

επιφάνειες με ακρίβεια της τάξεως των μικρομέτρων (Misawa και Juodkazis 1999). Εφαρμογές του οπτικού μικροχειρισμού έχουμε στην υβριδική κατασκευή βιολογικών-ηλεκτρονικών διατάξεων, στη δόμηση των νευρώνων σε «biochip», στον τρισδιάστατο σχεδιασμό κυττάρων για ιστομηχανική (tissue engineering) καθώς και στη χρήση του ως καινοτομικού εργαλείου στη βασική έρευνα.

- ✓ Μηχανική και κινητική μελέτη πρωτεϊνών σε μόνο-μοριακό επίπεδο. Σε ένα τυπικό πείραμα με οπτικές λαβίδες (βλέπε εικόνα 18), ένα νήμα ακτίνης συνδέεται στα δύο του άκρα με δυο μικρό-σφαιρίδια τα οποία με τη σειρά τους συγκρατούνται από δύο οπτικές τσιμπίδες (Mechta 1998). Μόρια μυοσίνης κρατούνται σταθερά σε ένα σημείο και προσπαθούν να τραβήξουν προς το μέρος τους το μόριο της ακτίνης. Η επαγόμενη δύναμη καθώς και η μετακίνησή της ανιχνεύονται με μία οπτική παγίδα διπλής δέσμης. Από τέτοια πειράματα βρήκαμε ότι η μέγιστη εφικτή δύναμη είναι περίπου 5,9pN με μία μέση τιμή γύρω στα 2,1pN.



Σχήμα 3.9. Ένα νήμα ακτίνης συνδέεται στα δύο του άκρα με δυο μικρό-σφαιρίδια τα οποία με τη σειρά τους συγκρατούνται από δύο οπτικές τσιμπίδες. Μόρια μυοσίνης κρατούνται σταθερά σε ένα σημείο και προσπαθούν να τραβήξουν προς το μέρος τους το μόριο της ακτίνης. Η επαγόμενη δύναμη καθώς και η μετακίνησή της ανιχνεύονται με μία οπτική παγίδα διπλής δέσμης. Με τη διεξαγωγή τέτοιων πειραμάτων βρέθηκε ότι η μέγιστη εφικτή δύναμη είναι περίπου 5,9pN με μία μέση τιμή γύρω στα 2,1pN (Mechta, 1998).

Τέτοια πειράματα απαντούν σε μία πληθώρα ερωτήσεων, όπως το μέγεθος των δυνάμεων που αναπτύσσονται από διάφορα υπό-τεμάχια της μυοσίνης και για διαφορετικές δομές της ακτίνης.

4. Περιγραφή μιας κλασσικής διάταξης οπτικής παγίδευσης

Στην ενότητα αυτή της εργασίας θα κάνουμε μια αναδρομή στα επιμέρους στάδια για την ανάπτυξη μιας διάταξης οπτικής παγίδευσης. Για την παρουσίαση της συμβατικής διάταξης οπτικής παγίδευσης παίρνουμε πολλά στοιχεία από τη μονογραφία του Greulich «Micromanipulation by light in Biology and Medicine» του 1999, όπως έχει καταγραφεί και στην διπλωματική εργασία του διπλωματούχου της ΣΕΜΦΕ του ΕΜΠ, κ. Δ. Περάκη, το 2004.

Στη συνέχεια, θα αναλύσουμε και θα αξιολογήσουμε και τη δική μας προσπάθεια για ανάπτυξη μιας εξαιρετικά απλής εργαστηριακής διάταξης, με χρήση οπτικών υλικών μικρής αξίας και φακών «στον αέρα», δηλαδή χωρίς χρήση οπτικού μικροσκοπίου. Η ιδέα ήταν να αναπτύξουμε μια διάταξη οπτικής παγίδευσης προσιτή σε φοιτητές λειτουργικά και οικονομικά, ώστε να αποτελέσει τη βάση για μια εργαστηριακή άσκηση σε προπτυχιακό επίπεδο. Πριν από αυτό το στάδιο, θα δείξουμε τα βασικά στοιχεία μιας ερευνητικής διάταξης οπτικής παγίδευσης με χρήση συμβατικού, ορθού οπτικού μικροσκοπίου, το οποίο φυσικά ανεβάζει το κόστος κατά πολύ, ενώ επίσης θα δούμε πολύ επιφανειακά την σημερινή μορφή μιας διάταξης οπτικής παγίδευσης με την χρήση αυτή τη φορά ενός αντεστραμμένου μικροσκοπίου.

Στην συνέχεια θα πρέπει επίσης να περιγράψουμε συνοπτικά τα βασικά μέρη της διάταξης μιας οπτικής παγίδας:

- α) Πηγές laser,
- β) Οπτικά συστήματα εστίασης της δέσμης laser,
- γ) Σύστημα ανίχνευσης και καταγραφής της εικόνας,
- δ) Τρόποι βαθμονόμησης της διάταξης.

4.1. Πηγές laser

Οι πηγές laser που χρησιμοποιούνται στην οπτική παγίδευση διαφέρουν από τις αντίστοιχες που χρησιμοποιούνται στην ιατρική και την βιολογία για να κάνουν τομές σε ιστούς ή να αποδομήσουν βιολογικές δομές, τόσο σε διάρκεια και ένταση όσο και στο μήκος κύματος εκπομπής. Έτσι, ενώ τα οπτικά νυστέρια laser χρησιμοποιούν στενούς παλμούς μικρής ή μεγάλης έντασης (ανάλογα την εφαρμογή), οι οπτικές τσιμπίδες κάνουν χρήση ενός laser συνεχούς λειτουργίας και χαμηλής ισχύος. Επίσης το προς παγίδευση υλικό πρέπει να είναι διάφανο στο μήκος κύματος του laser, ώστε η δέσμη να το διαπερνά χωρίς να απορροφούνται από το δείγμα μεγάλα ποσά ενέργειας, τα οποία μετατρέπόμενα σε θερμότητα είναι ικανά να το καταστρέψουν ή να επάγουν ανεπιθύμητα φωτοχημικά φαινόμενα.

Οι οπτικές τσιμπίδες χρησιμοποιούν συνήθως μήκος κύματος μεταξύ 0,6 και 1,1 μm , όπου εκεί βρίσκεται και το λεγόμενο «οπτικό παράθυρο» μικρής απορρόφησης για τα περισσότερα βιολογικά υλικά. Αυτό όμως δεν είναι απόλυτο και μπορεί να τροποποιείται για την εκάστοτε εφαρμογή και για το προς μελέτη αντικείμενο. Η ισχύς του laser κυμαίνεται από 25 έως 500 mW σε μια εστιακή κηλίδα από 0,5 έως 1 μm . Τέτοιες δέσμες επάγουν δυνάμεις της τάξεως των μερικών pN, ικανές να παγιδεύσουν ή/και να μετακινήσουν διάφορα κύτταρα και βιομόρια.

Οι φωτεινές εντάσεις που εκπέμπονται από τα συνεχούς δέσμης laser της κατηγορίας αυτής δεν είναι συνήθως ικανές να δημιουργήσουν πολυφωτονικά φαινόμενα. Για αυτό, σε αντίθεση με τα ισχυρότερα παλμικά laser, η βασική

παράμετρος για τα φωτοεπαγόμενα φαινόμενα που μας αφορούν είναι το μήκος κύματος λειτουργίας του laser και με αυτό θα ασχοληθούμε στη συνέχεια.

Ο παράγοντας «μήκος κύματος προσπίπτουσας ακτινοβολίας» διαδραματίζει αρκετά σοβαρό ρόλο που εξαρτάται κυρίως από το υλικό το οποίο θέλουμε να παγιδέψουμε και το βάθος στο οποίο θέλουμε να φτάσουμε. Παραθέτουμε παρακάτω κάποια στοιχεία που πρέπει οπωσδήποτε να γνωρίζουμε για την επιλογή του σωστού μήκους κύματος (Greulich 1999):

- Στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος οι κύριοι απορροφητές είναι το DNA (περίπου 260nm) και οι πρωτεΐνες (230-300 nm). Γενικά η απορρόφηση στο υπεριώδες είναι παρόμοια για τα περισσότερα είδη ιστών.
- Στα ορατά μήκη κύματος μπορεί να υπάρχουν διάφοροι παράγοντες απορρόφησης (NAD, NADH, χρωροφύλλη, αιμοσφαιρίνη). Εδώ η απορρόφηση πραγματοποιείται κυρίως από τους ιστούς.
- Στο υπέρυθρο φάσμα, στην απορρόφηση του φωτός από τα βιολογικά υλικά υπερτερεί η απορρόφηση της ακτινοβολίας από τα μόρια του νερού. Ο συντελεστής απορρόφησης είναι σχετικά χαμηλός στα 1000 nm, ενώ αυξάνει πάρα πολύ όσο προσεγγίζουμε σε $\lambda = 3000$ nm.

Από τα παραπάνω βλέπουμε ότι τα laser υπεριώδους και μέσου υπέρυθρου είναι κατάλληλα για φωτοαποδόμηση και τομή ιστών (παραδείγματα είδαμε στις εφαρμογές), τα laser κοντινού υπέρυθρου και κατά κύριο λόγο το laser Nd:YAG είναι κατάλληλα και για οπτική παγίδευση, ενώ τα laser στο ορατό φάσμα μπορούν να εξυπηρετήσουν και τα δύο φαινόμενα, αν και ίσως με λίγο μικρότερη απόδοση.

Στην συνέχεια, θα ασχοληθούμε με τα φωτοθερμικά φαινόμενα που παρουσιάζονται κατά την χρήση των laser συνεχούς λειτουργίας.

Όπως είναι αναμενόμενο, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα laser για οπτική παγίδευση, του οποίου το μήκος κύματος να ταυτίζεται με το μήκος απορρόφησης του προς παγίδευση υλικού. Ο λόγος είναι ότι τα ποσά θερμότητας που θα προκύψουν από την αλληλεπίδραση του laser με τις βιοδομές και θα απορροφηθούν από αυτές, θα είναι πολύ μεγάλα και θα καταστρέψουν το δείγμα.

Η θερμική επίδραση των laser στο βιολογικό υλικό είναι μια σύνθετη διαδικασία, ως αποτέλεσμα τριών ευδιάκριτων φαινομένων: 1) μετατροπή του φωτός σε θερμότητα, 2) μεταφορά της θερμότητας, και 3) αντίδραση του ιστού, η οποία συσχετίζεται με τη θερμοκρασία και το χρόνο θέρμανσης (σχήμα 1). Αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί στην αλλοίωση ή στην καταστροφή τμήματος του ιστού. Οι παράγοντες που καθορίζουν το φωτοεπαγόμενο αποτέλεσμα είναι οι παράμετροι του laser (μήκος κύματος, ισχύς, χρόνος και τρόπος εκπομπής, κατανομή της δέσμης) και οι παράμετροι του ιστού (οπτικοί συντελεστές, θερμική αγωγιμότητα, ελαστικότητα).

Επιγραμματικά, τα φωτοθερμικά αποτελέσματα στους ιστούς και σε έναν βαθμό σε βιοδομές μικρομετρικών διαστάσεων, π.χ. κύτταρα, διέπονται από τις παρακάτω παραμέτρους:

- Μόνο η απορροφούμενη ενέργεια μπορεί να μετατραπεί σε θερμότητα.
- Όταν χρησιμοποιούμε βιολογικά υλικά, συνήθως μέρος της ενέργειας αυτής χρησιμοποιείται για το μοριακό διαχωρισμό και για άλλες φωτοχημικές διαδικασίες.
- Κατά την απορρόφηση, η θερμότητα που αναπτύσσεται αρχίζει να διαχέεται προς το περιβάλλον. Κατά τη χρησιμοποίηση laser συνεχούς λειτουργίας, επέρχεται μια ισορροπία μεταξύ της απορροφούμενης και της διαχεόμενης θερμότητας. Το σημείο αυτό στο οποίο θα εμφανιστεί η ισορροπία αυτή,

εξαρτάται από τη θερμική αγωγιμότητα των υλικών που χρησιμοποιούνται (τόσο δηλαδή του δείγματος όσο και του περιβάλλοντος μέσα στο οποίο βρίσκεται).

Για μη έμβια στερεά υλικά, τα οποία μπορούν να απορροφήσουν πρακτικά όλο το προσπίπτον φως και να μετατρέψουν όλη την απορροφούμενη ενέργεια σε θερμότητα, η αύξηση της θερμοκρασίας T δίνεται από τη σχέση:

$$T = \frac{(1-R)W}{(\pi r K)} \quad (4.1)$$

όπου R είναι η ανακλαστικότητα του υλικού, W η ισχύς του laser, r η ακτίνα της δέσμης και K η θερμική αγωγιμότητα του υλικού.

Για τα βιολογικά υλικά το θέμα είναι πιο περίπλοκο, καθώς δεν γνωρίζουμε το ποσό της απορροφούμενης ενέργειας από το υλικό. Βέβαια, έχουν γίνει πολλές έρευνες μέχρι σήμερα και σε πολλές περιπτώσεις μπορούμε να υπολογίσουμε το ποσοστό της απορροφούμενης ενέργειας προσεγγιστικά.

4.2. Οπτικό μικροσκόπιο και άλλα οπτικά συστήματα

Στην οπτική παγίδευση χρησιμοποιούνται συνήθως είτε τα κλασσικά μικροσκόπια που γνωρίζουμε όλοι μας, είτε μικροσκόπια φθορισμού για πειράματα παράλληλης μέτρησης και καταγραφής του εκπεμπόμενου φωτός από διάφορα κατάλληλα σωματίδια ή χρωστικές, είτε τέλος ανεστραμμένα μικροσκόπια, τα οποία είναι και τα πιο δημοφιλή, αφού κάνουν χρήση λιγότερων φακών. Σε όλα τα παραπάνω χρησιμοποιούνται αντικειμενικοί φακοί με αρκετά μεγάλο αριθμητικό άνοιγμα ($N.A. > 1,2$) και οι οποίοι είναι κυρίως καταδυτικοί φακοί, εμβαπτιζόμενοι μέσα σε ειδικό λάδι που ταιριάζει τους δείκτες διάθλασης εκατέρωθεν.

Για την εστίαση της δέσμης laser και την επίτευξη οπτικής παγίδευσης χρησιμοποιήθηκε σε πολλές διατάξεις ένα συμβατικό οπτικό μικροσκόπιο, το λεγόμενο και σύνθετο μικροσκόπιο. Επειδή το πιο σημαντικό τμήμα του σύνθετου μικροσκοπίου είναι το οπτικό σύστημα, δηλαδή ένα σύστημα από φακούς κατάλληλα διευθετημένους, οι ιδιότητες του οργάνου ταυτίζονται κατά κύριο λόγο με τις ιδιότητες των φακών που σχετίζονται με το φαινόμενο της διάθλασης του φωτός.

Οπτικό σύστημα: Το οπτικό τμήμα αποτελείται από ένα ομοαξονικό σύστημα 2 συγκλινόντων φακών, που αποτελούν τον αντικειμενικό και τον προσοφθάλμιο φακό. Ο πρώτος έχει μικρή εστιακή απόσταση. Το αντικείμενο τοποθετείται λίγο πέρα από την εστία του φακού και έτσι σχηματίζεται είδωλο πραγματικό και ανεστραμμένο. Ο δεύτερος είναι ο φακός με τον οποίο ο παρατηρητής βλέπει το αντικείμενο και χρησιμεύει για να μεγεθύνει την πραγματική εικόνα που δίνει ο αντικειμενικός. Η απόσταση μεταξύ των δύο φακών πρέπει να είναι μεγαλύτερη από το άθροισμα των εστιακών τους αποστάσεων, ώστε το είδωλο του αντικειμενικού να σχηματίζεται ανάμεσα στο οπτικό κέντρο και την κύρια εστία του προσοφθάλμιου. Κατά συνέπεια προκύπτει φανταστικό είδωλο του πρώτου ειδώλου.

Σημαντικός οπτικός συντελεστής της διακριτικής ικανότητας του οργάνου είναι το **αριθμητικό άνοιγμα**. Ως αριθμητικό άνοιγμα ορίζεται η σχέση: $A = \eta \eta \mu \alpha$, όπου η ο δείκτης διάθλασης του μέσου και α το $\frac{1}{2}$ της γωνίας που σχηματίζεται μεταξύ των ακραίων ακτίνων που εισέρχονται στον αντικειμενικό φακό και προέρχονται από το αντικείμενο. Εξάλλου, **διακριτική ικανότητα** οπτικού οργάνου είναι η ελάχιστη απόσταση ανάμεσα σε δύο σημεία που τα

είδωλα τους διακρίνονται ξεχωρισμένα μεταξύ τους. Αυτή είναι ανάλογη με το μήκος κύματος της χρησιμοποιούμενης ακτινοβολίας (λ) και αντίστροφη με το αριθμητικό άνοιγμα του φακού, σύμφωνα με τη σχέση $d = \lambda/A = \lambda/\eta$ ημα. Κατά συνέπεια, όσο μικραίνει το μήκος κύματος και όσο μεγαλώνει το αριθμητικό άνοιγμα, τόσο ελαχιστοποιείται το d , δηλαδή τόσο αυξάνεται η διακριτική ικανότητα. Από τη σχέση $A = \eta$ ημα φαίνεται ότι δεν μπορεί η αύξηση του αριθμητικού ανοίγματος να είναι απεριόριστη γιατί: 1) η αύξηση του ημίτονου της γωνίας δεν μπορεί να υπερβεί τη μονάδα, ενώ ο δείκτης διάθλασης προσδιορίζεται στην οριακή τιμή 1,4. Με βάση τις παραπάνω προϋποθέσεις, η σχέση για τη διακριτική ικανότητα απλοποιείται στην $d = 0,61\lambda$. Δηλαδή η διακριτική ικανότητα εξισώνεται περίπου με το μισό του μήκους κύματος της χρησιμοποιούμενης ακτινοβολίας. Επομένως για το μικρότερο μήκος κύματος του ορατού φάσματος που βρίσκεται στα 4000 Å (μονοχρωματικό ιώδες) η διακριτική ικανότητα δεν μπορεί να ξεπεράσει την τιμή 2000 Å. Για το λευκό σύνθετο φως, υπολογίζεται γύρω στα 2500 Å. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι το οπτικό μικροσκόπιο έχει πεπερασμένες δυνατότητες εστίασης/μεγέθυνσης. Κατά συνέπεια η μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα των οργάνων μικροσκοπίας εξασφαλίζεται με τη χρησιμοποίηση άλλων ακτινοβολιών με μικρότερο μήκος κύματος (π.χ. υπεριώδες, δέσμη ηλεκτρονίων κτλ). Η προϋπόθεση για την καλή λειτουργία του μικροσκοπίου, είναι η κατά το δυνατόν ευθύγραμμη διαδρομή, χωρίς εκτροπή, της φωτεινής δέσμης από κάποιο σημείο του αντικειμένου ως τον αντικειμενικό φακό. Αυτό σημαίνει ότι ο συμπυκνωτής, το περιβάλλον του αντικειμένου και ο αντικειμενικός φακός έχουν περίπου τον ίδιο δείκτη διάθλασης. Η διόδος των ακτίνων μέσα από στρώμα αέρα αυξάνει την εκτροπή των ακτίνων και εξασθενεί το είδωλο. Γι' αυτό κάθε υλικό παρατηρείται μέσα σε σταγόνες νερού. Στην περίπτωση φακών μεγάλης ισχύος (μικρή εστιακή απόσταση, μικρή περιοχή οπτικού πεδίου) χρησιμοποιείται υγρό καταδύσεως με μεγάλο δείκτη διάθλασης, το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ αντικειμένου (δείγμα) και αντικειμενικού, ώστε να περιορίζεται η εκτροπή των ακτίνων (αύξηση διακριτικής ικανότητας). Η αποτελεσματικότητα του μικροσκοπίου αυξάνει περαιτέρω με τη χρήση κατάλληλων φίλτρων. Όπως είπαμε, το σύστημα των δύο φακών δίνει την μεγέθυνση του προς εξέταση αντικειμένου, η ολική μεγέθυνση δε δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$M_{total} = M_{objective} \cdot M_{eyepiece} = \frac{L}{f_{objective}} - \left(1 + \frac{25cm}{f_{eyepiece}} \right) \quad (4.2)$$

Όπου L είναι το μήκος του σωλήνα του μικροσκοπίου, $M_{objective}$ η μεγέθυνση του αντικειμενικού φακού, $M_{eyepiece}$ η μεγέθυνση του προσοφθάλμιου φακού, $f_{objective}$ και $f_{eyepiece}$ οι εστιακές αποστάσεις του αντικειμενικού και προσοφθάλμιου φακού αντίστοιχα, ενώ 25 cm είναι η απόσταση στην οποία απεικονίζεται το είδωλο με τη σωστή τοποθέτηση του μεγεθυντικού φακού και κατασκευάζεται έτσι ώστε να συμπίπτει με τη βέλτιστη απόσταση ευκρινούς οράσεως του ανθρώπινου ματιού που είναι τα 25 cm. Επίσης στην οπτική παγίδευση εκτός από την μεγέθυνση άλλος ένας σημαντικός όρος στην λειτουργία του μικροσκοπίου είναι η διακριτική του ικανότητα, η οποία καθορίζεται αποκλειστικά από την εστιακή απόσταση $f_{objective}$.

Φακοί, κάτοπτρα και φίλτρα: Για την χρήση των εξωτερικών του μικροσκοπίου φακών ή των καθρεφτών που θα χρησιμοποιήσουμε κάθε φορά, θα πρέπει να είμαστε βέβαιοι ότι ανταποκρίνονται στο μήκος κύματος που χρησιμοποιούμε τη δεδομένη

στιγμή. Αν αυτό δεν συμβεί, θα έχει ως αποτέλεσμα, εκτός από το ότι το πείραμα δεν θα έχει επιτυχία, να ρισκάρουμε ταυτόχρονα την καταστροφή κάποιων στοιχείων της διάταξης μας. Οι φακοί χρησιμοποιούνται για την καλύτερη δυνατή εστίαση της δέσμης, ώστε να μπορούμε να πετύχουμε καλύτερη παγίδευση και πιο γρήγορα, οι καθρέφτες από την άλλη χρησιμεύουν στο να καθοδηγήσουμε την δέσμη στο αντικείμενο.

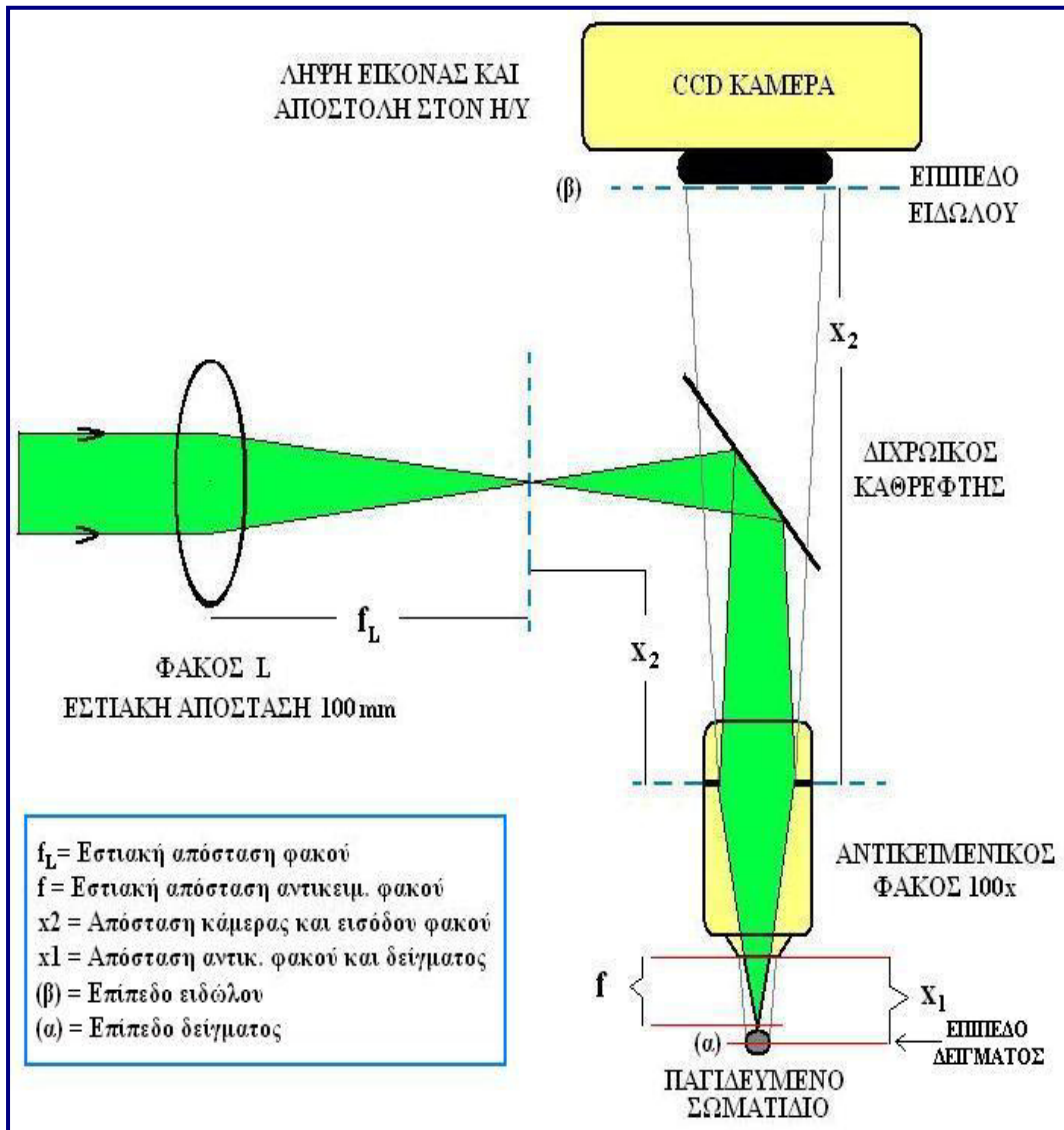
Όταν δουλεύουμε στο μικροσκόπιο, ιδιαίτερα όταν βλέπουμε μέσα από τον προσοφθάλμιο φακό με τα ίδια μας τα μάτια, απαιτείται η χρήση κατάλληλων φίλτρων. Τα φίλτρα επιλέγονται ώστε να αποκόβουν τελείως (ή σχεδόν τελείως) το μήκος κύματος του laser που χρησιμοποιείται. Τέλος, πολλές φορές γίνεται χρήση και φίλτρων για την προστασία της κάμερας καταγραφής της εικόνας του μικροσκοπίου (π.χ. CCD κάμερα), αν το φως που επιστρέφει από το δείγμα είναι αρκετά έντονο σε συγκεκριμένα μήκη κύματος.

Στην περίπτωση που γίνεται χρήση μηκών κύματος στο υπέρυθρο ή υπεριώδες φάσμα που δεν είναι ορατά, χρησιμοποιούνται οι λεγόμενοι φωτοφράχτες (shutters), οι οποίοι είναι κατάλληλα πλακίδια που έχουν ως σκοπό να αποκόβουν τη δέσμη, όταν αυτή δεν χρησιμοποιείται.

4.3. Σύστημα ανίχνευσης και καταγραφής της εικόνας

Ένα σημαντικό τμήμα μιας διάταξης οπτικής παγίδευσης είναι το σύστημα ανίχνευσης, το οποίο αποτελείται συνήθως από μια συσκευή καταγραφής τύπου CCD, η οποία με την σειρά της είναι συνδεδεμένη με έναν υπολογιστή στον οποίο απεικονίζεται το δείγμα και στον οποίο γίνεται η επεξεργασία. Στον τομέα αυτό επίσης η γκάμα επιλογής είναι πολύ μεγάλη και αυτό που πρέπει να πετύχουμε είναι η καλύτερη δυνατή σχέση ποιότητας-κόστους. Μια πολύ καλή και οικονομική λύση είναι η χρήση μιας ασπρόμαυρης κάμερας με την χρήση βέβαια διάφορων ψευδοχρωμάτων. Η αμέσως επόμενη λύση η οποία χρησιμοποιείται και στα εργαστήρια του Τομέα Φυσικής του ΕΜΠ είναι η χρήση CCD κάμερας που δουλεύει καλύτερα στο ερυθρό. Όλες οι κάμερες συνοδεύονται και από το αντίστοιχο λογισμικό και το αντίστοιχο πρόγραμμα απεικόνισης, διαχείρισης και επεξεργασίας των εικόνων και των βίντεο. Μέσο αυτού μπορεί κίολας να επιτευχθεί ακριβής μέτρηση μικρομετρικών αποστάσεων μέσα στο προς εξέταση δείγμα.

Παρακάτω, στο σχήμα 4.1 φαίνονται τα μέρη της διάταξης οπτικής παγίδευσης που είχε αναπτυχθεί στις αρχές της δεκαετίας του 2000 στο εργαστήριο «Ανάπτυξη Laser και εφαρμογές του» του Τομέα Φυσικής του ΕΜΠ, όπως παρουσιάστηκαν σχηματικά στη διπλωματική εργασία του Δημ. Περράκη (2004).



Σχήμα 4.1. Σχηματικό διάγραμμα των σημαντικότερων οπτικών στοιχείων για την άριστη απεικόνιση και τη βέλτιστη απόδοση στη διάταξη οπτικής παγίδευσης. Η απόσταση του φακού L από τον αντικειμενικό φακό ($x_2 + f_L$) μεταβάλλεται έτσι, ώστε να συμπίπτει το επίπεδο εστίασης του laser και αυτό του μικροσκοπίου, όπως επίσης και να επιτυγχάνεται πλήρης κάλυψη του αντικειμενικού φακού από το φως του laser.

4.4. Περιγραφή της διάταξης οπτικής παγίδευσης στο εργαστήριο του ΕΜΠ

Όπως αναφέραμε και σε προηγούμενη παράγραφο, στην εργασία αυτή κάνουμε μια αναδρομή στα στάδια από τα οποία πέρασε το επίτευμα της οπτικής παγίδευσης, καταλήγοντας στην παρουσίαση μιας απλής εργαστηριακής διάταξης. Αυτό που επιδιώξαμε, στα πλαίσια αυτής της εργασίας, ήταν να κατασκευάσουμε μια απλή σχετικά διάταξη οπτικής παγίδευσης και με πολύ μικρό κόστος, ώστε να μπορεί να αποτελέσει άσκηση που απευθύνεται σε προπτυχιακούς φοιτητές. Δηλαδή φτιάξαμε μια διάταξη χωρίς την χρήση μικροσκοπίου, αλλά με την χρήση απλών οπτικών (φακών κ.λ.π.) στον «αέρα» και με την χρήση μιας πηγής laser μικρής αξίας. Παρακάτω περιγράφουμε περιληπτικά τα βασικά μέρη αυτής της διάταξης.

4.4.1. Πηγή laser

Ως πηγή φωτός χρησιμοποιήσαμε ένα laser He-Ne, το οποίο εκπέμπει στα 632 nm. Η ισχύς του laser θεωρητικά, σύμφωνα με την εταιρεία κατασκευής, ήταν περίπου 4,5 mW, βέβαια την περίοδο που κατασκευάστηκε. Μετά από μετρήσεις που έγιναν, διαπιστώθηκε ότι η ισχύς του κυμαίνεται μεταξύ 1,3 mW και 1,8 mW, όμως παρατηρήθηκαν και απώλειες στα ενδιάμεσα οπτικά (και έτσι πραγματικά έχουμε στον αντικειμενικό φακό ισχύ μεταξύ 0,7 mW και 0,9 mW), μία ισχύς που, παρ' όλο που είναι πολύ μικρή, κατάφερε να δώσει οπτική παγίδευση έστω και αρκετά εξασθενημένη. Η επιλογή του συγκεκριμένου laser έγινε βάσει δύο σημαντικών παραγόντων:

- ✓ Το laser He-Ne αποτελεί μία πολύ οικονομική λύση, όπου αυτός ήταν και ο στόχος, δηλαδή να σχεδιάσουμε μια όσο το δυνατόν πιο φτηνή διάταξη.
- ✓ Το συγκεκριμένο laser He-Ne εκπέμπει στο ορατό φάσμα του φωτός και αυτό είναι πολύ σημαντικό για την παρακολούθηση της πορείας της δέσμης, τόσο κατά την ευθυγράμμιση όσο και κατά την παγίδευση, χωρίς να χρειαστεί να χρησιμοποιήσουμε μια άλλη βοηθητική δέσμη, όπως συμβαίνει στις περιπτώσεις που η δέσμη δεν είναι στο ορατό.

Η δέσμη εξέρχεται από το laser με διάμετρο ίση περίπου με 2mm, την οποία και θεωρούμε σταθερή (παράλληλη δέσμη) για τις μικρές αποστάσεις που έχει να διανύσει η δέσμη μας.

4.4.2. Οπτικά και άλλα μέρη της διάταξης

Όπως μπορούμε να δούμε και από την παραπάνω σχηματική απεικόνιση (σχήμα 4.1), στα οπτικά μέρη της διάταξης περιλαμβάνονται τα εξής:

A) Ένας συγλίνοντας φακός εστιακής απόστασης 10cm, η χρησιμότητα του οποίου είναι ότι με την μετακίνησή του επιτυγχάνουμε να συμπέσει το επίπεδο εστίασης του laser και του μικροσκοπίου καθώς επίσης να επιτυγχάνεται πλήρης κάλυψη του αντικειμενικού φακού για αποδοτικότερη οπτική παγίδευση.

B) Ένας διχρωϊκός καθρέφτης, οι ιδιότητες του οποίου είναι να ανακλά πλήρως την δέσμη του laser, αλλά ταυτόχρονα να επιτρέπει την διέλευση του φωτός της λυχνίας που φωτίζει το δείγμα.

Γ) Ένας αντικειμενικός φακός με μεγέθυνση X100, καταδυτικός, ο ρόλος του οποίου είναι να εστιάζει την δέσμη για να πετύχουμε την παγίδευση των σωματιδίων αλλά ταυτόχρονα να μεγενθύνει το δείγμα ώστε να μπορούμε να παρακολουθήσουμε την όλη διαδικασία παγίδευσης και το δείγμα μέσα από την χρήση μιας κάμερας.

Η διάταξη περιλαμβάνει επίσης τα εξής:

A) Μια CCD κάμερα, η οποία συνδέεται με υπολογιστή για την καταγραφή της εικόνας της οπτικής παγίδευσης. Η κάμερα είναι εφοδιασμένη με φίλτρο για να κόβει την ακτινοβολία του laser για την προστασία της.

B) Μια λυχνία, η οποία είναι τοποθετημένη κάτω από το δείγμα, ώστε να το φωτίζει για να είναι ορατό από την κάμερα.

Γ) Μια βάση, η οποία κινείται πάνω στους άξονες (χ, ψ) και πάνω στην οποία τοποθετούμε το δείγμα

Δ) Τέλος, μια βάση πάνω στην οποία τοποθετούμε τον αντικειμενικό φακό και η οποία κινείται και στους τρεις άξονες (χ, ψ, ζ) , ώστε να εστιάζουμε στο δείγμα.

4.4.3. Γωμετρία της διάταξης

Όπως είπαμε παραπάνω, για να έχουμε όσο το δυνατόν καλύτερο αποτέλεσμα θα πρέπει να καλύψουμε το άνοιγμα του αντικειμενικού φακού όσο γίνεται πιο πολύ με την δέσμη, αυτό θα προσπαθήσουμε να το εξηγήσουμε παρακάτω.

Αυτό εξαρτάται από τη θέση του συγκλίνοντα φακού L (στη δική μας διάταξη με εστιακή απόσταση $f_L=100$ mm ή 10 cm). Η δέσμη που εξέρχεται από το laser έχει διάμετρο 2 mm και ο αντικειμενικός μας φακός έχει εύρος (διάμετρο) 6 mm. Οπότε, θα πρέπει να ανοίξει η δέσμη τουλάχιστον κατά ένα παράγοντα ίσο με $\times 3$ ή τουλάχιστον περίπου τόσο. Αν υποθέσουμε ότι η απόσταση μεταξύ του φακού L και του αντικειμενικού φακού του μικροσκοπίου είναι ίση με x τότε θα έπρεπε αυτή να είναι ίση με:

$$x = 4 \cdot f_L = 4 \cdot 100\text{mm} = 400\text{mm} = 40\text{cm} \quad (4.3)$$

Στην περίπτωση που θα χρησιμοποιούσαμε αποκλίνοντα φακό L, τότε η αντίστοιχη απόσταση θα ήταν μόνο:

$$x = 2 \cdot f_L = 2 \cdot 100\text{mm} = 20\text{mm} = 2\text{cm} \quad (4.4)$$

και αυτός είναι και ο λόγος που σε αρκετά πειράματα ο φακός L είναι το τελευταίο οπτικό στοιχείο πριν από την είσοδο της δέσμης στο μικροσκόπιο.

Στη διάταξή μας η απόσταση μεταξύ του αντικειμενικού φακού και της κάμερας είναι ίση με 260 mm. Έτσι λοιπόν, αν θέλουμε μια πολύ καλή εστίαση στην οθόνη της κάμερας θα πρέπει ο φακός L να τοποθετηθεί σε απόσταση:

$$x_2 + f_L = (260 + 100)\text{mm} = 360\text{mm} \quad (4.5)$$

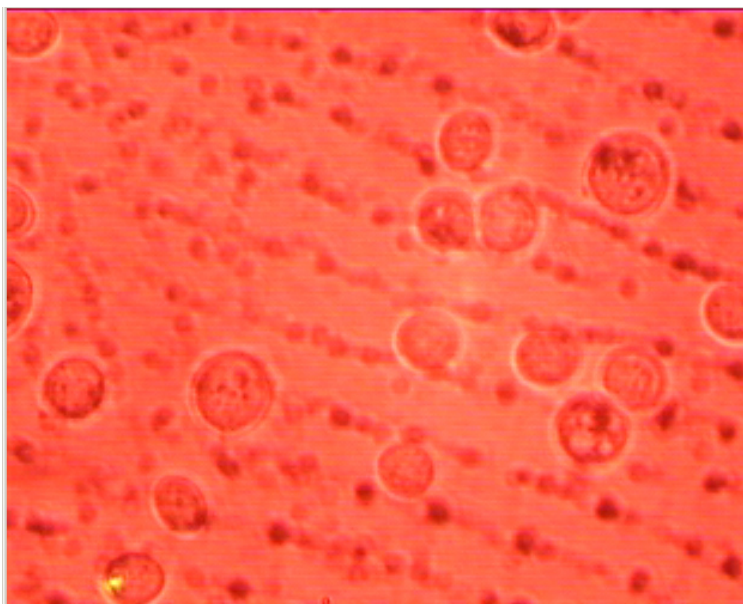
Από την άλλη, αν θέλουμε να έχουμε πλήρη κάλυψη της διαμέτρου του φακού, θα πρέπει να τοποθετηθεί στην απόσταση των 400 mm που υπολογίστηκε προηγουμένως.

Επειδή όμως μας ενδιαφέρει περισσότερο το να έχουμε πολύ καλή εστίαση στην κάμερα, για την λήψη ξεκάθαρων και ευκρινών φωτογραφιών και βίντεο θέτουμε τελικά τον φακό L στην απόσταση των 360 mm. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να μην έχουμε την αποδοτικότερη δυνατή οπτική παγίδευση, αλλά από την άλλη έχουμε μηδαμινές απώλειες της δέσμης κατά το πέρασμά της από τον αντικειμενικό και επίσης αρκετά καλή ταύτιση της εστίασης του laser και της κάμερας.

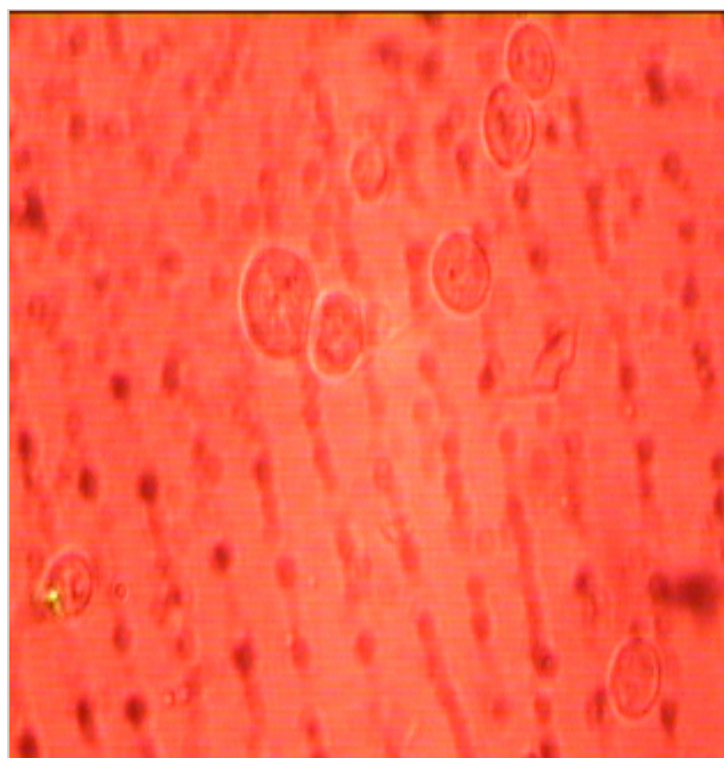
4.4.4. Αποτελέσματα και σχολιασμός

Μετά από την θεωρητική μελέτη και την πειραματική προσπάθεια για την ολοκλήρωση της διάταξης, πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα στο εργαστήριο. Η προσπάθεια για την ευθυγράμμιση των οπτικών της διάταξης ήταν κοπιώδης, αλλά καταφέραμε να δούμε και να καταγράψουμε το φαινόμενο της οπτικής παγίδευσης. Όπως αναμενόταν, η παγίδευση δεν ήταν ισχυρή και αυτό είναι λογικό καθώς το laser που χρησιμοποιήσαμε δεν είχε την κατάλληλη ισχύ ώστε να

έχουμε ισχυρή παγίδευση. Παρακάτω παραθέτουμε μερικές ενδεικτικές εικόνες από την προσπάθεια αυτή (σχήματα 4.2 – 4.3).



Σχήμα 4.2. Απεικόνιση οπτικής παγίδευσης κυττάρων μαγιάς με laser He-Ne



Σχήμα 4.3. Άλλη μια εικόνα οπτικής παγίδευσης κυττάρων μαγιάς με laser He-Ne

Στις δύο παραπάνω εικόνες παρατηρούμε την παγίδευση δυο σωματιδίων (κύτταρα μαγιάς) από την δέσμη laser (κιτρινωπή βούλα στα σχήματα 4.2 και 4.3). Τα μαύρα στίγματα που φαίνονται στην εικόνα οφείλονται κυρίως στην κάμερα και στο φίλτρο που έχει για να ανακόπτει την ακτινοβολία από το laser, με στόχο την προστασία της κάμερας.

Σύμφωνα με τα προηγούμενα αποτελέσματα, είδαμε ότι πετύχαμε να υλοποιήσουμε στο εργαστήριο το φαινόμενο της οπτικής παγίδευσης με μια απλή και προπαντός οικονομική διάταξη, η οποία ενδείκνυται για καθαρά εκπαιδευτικούς σκοπούς, αν και δεν έχουμε την δυνατότητα να κάνουμε με αυτήν πολλά προχωρημένα πειράματα. Σήμερα, στα πλαίσια της εξελισσόμενης ερευνητικής προσπάθειας στον τομέα αυτόν, χρησιμοποιούνται πιο πολύπλοκες διατάξεις οπτικής παγίδευσης, οι οποίες έχουν μεγαλύτερες δυνατότητες από την άποψη της επίτευξης ισχυρής παγίδας, ή της ταυτόχρονης παγίδευσης περισσοτέρων της μιας μικροδομών κ.λ.π..

Χαρακτηριστικό των διατάξεων αυτών είναι η χρήση μικροσκοπίων, τα οποία είναι σχεδιασμένα με τέτοιο τρόπο, ώστε να έχουμε την μικρότερη δυνατή απώλεια στην ένταση της δέσμης και βέβαια στην χρήση πιο ισχυρών δεσμών laser και διαφορετικών τύπων laser. Βέβαια, αυτές οι διατάξεις έχουν πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα. Το βασικότερο πλεονέκτημα είναι ότι παίρνουμε πολύ καλύτερα αποτελέσματα και πιο αξιόπιστα, αλλά το βασικότερο μειονέκτημα είναι το υψηλό κόστος τους.

Ένα άλλο βασικό πλεονέκτημα των διατάξεων αυτών είναι ότι μας δίνεται η δυνατότητα να κάνουμε βαθμονόμηση, η οποία είναι το A και το Ω στο φαινόμενο της οπτικής παγίδευσης, καθώς μπορούμε να υπολογίσουμε τις δυνάμεις που αναπτύσσονται στα υπό παγίδευση σωματίδια κάθε φορά. Παρακάτω θα κάνουμε μια σύντομη αναφορά για τις υπάρχουσες μέχρι σήμερα τεχνικές βαθμονόμησης, όπως παρουσιάστηκαν στη διδακτορική διατριβή της Ε.-Χ. Παπαγιάκουμου (2005).

5. Τεχνικές βαθμονόμησης της οπτικής παγίδευσης

5.1. Μέθοδος διαφυγής (*escape force method*)

Στις περισσότερες εφαρμογές, οι οπτικές δυνάμεις βαθμονομούνται έναντι των δυνάμεων ιξώδους που ασκούνται από τη ροή που προκαλείται στο υγρό περιβάλλον του σωματιδίου. Η δύναμη λόγω ιξώδους που ασκείται σε ένα ακίνητο σωματίδιο είναι $\vec{F} = \beta \vec{v}$, όπου το β παίζει το ρόλο συντελεστή τριβής και \vec{v} είναι η ταχύτητα του υγρού. Για σφαίρα ακτίνας a , το β δίνεται από το Νόμο του Stokes: $\beta = 6\pi\eta a$, όπου η είναι ο συντελεστής ιξώδους του υγρού (για το νερό $\eta = 0,001025 \text{ N}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$). Για παράδειγμα, η δύναμη ιξώδους σε μια σφαίρα ακτίνας $1 \mu\text{m}$ σε ροή νερού με ταχύτητα $v = 10 \mu\text{m/s}$ θα είναι $F = 0,193 \text{ pN}$. Ο Νόμος του Stokes βέβαια δεν ισχύει όταν υπάρχουν στο υγρό δίνες. Αυτό συμβαίνει όταν ο αδιάστατος αριθμός *Reynolds*, ο οποίος καθορίζει αυτό ακριβώς το πράγμα, είναι μεγαλύτερος του 1200. Ο αριθμός *Reynolds*, Re , δίνεται από τη σχέση $Re = \nu a \rho / \eta$, όπου ρ είναι η πυκνότητα του υγρού. Οι τυπικές διαστάσεις των σωματιδίων στην οπτική παγίδευση είναι μερικά μικρόμετρα και η πυκνότητά τους είναι της τάξης αυτής του νερού, $\sim 1 \text{ gr/cm}^3$. Για το παραπάνω σωματίδιο, ο αριθμός *Reynolds* που προκύπτει είναι $Re = 10^{-5}$, οπότε είναι προφανές ότι η τιμή αυτή είναι πολύ μακριά από το όριο για τυρβώδη ροή.

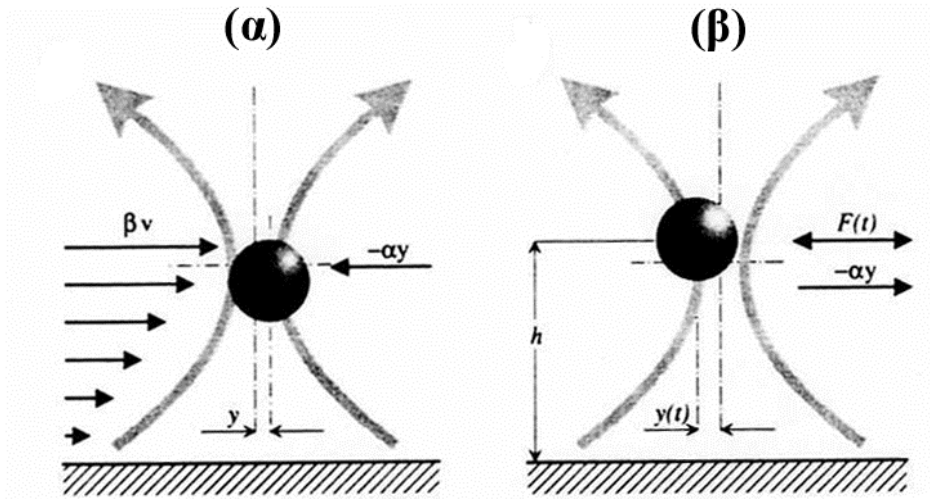
Η μέγιστη δύναμη, ή δύναμη διαφυγής, μετριέται με έναν από τους ακόλουθους τρόπους (Σχήμα 5.1):

➤ Χρησιμοποιώντας ένα θάλαμο ροής, το υγρό ρέει προς μια ακίνητη, παγιδευμένη σφαίρα με προκαθορισμένη ισχύ laser, με συνεχώς αυξανόμενη ταχύτητα μέχρι το σωματίδιο μόλις να διαφύγει της οπτικής παγίδας (Σχήμα 5.1α). Η ταχύτητα του σωματιδίου εκείνη τη στιγμή θεωρείται ίση κατά μέτρο με την ταχύτητα του υγρού, η οποία μετριέται παρακολουθώντας την τροχιά του σωματιδίου αμέσως μετά τη διαφυγή του από την παγίδα, ή την τροχιά ενός άλλου σωματιδίου που βρίσκεται στο πεδίο ροής και στο ίδιο εστιακό επίπεδο με το σωματίδιο που ήταν παγιδευμένο. Επαναλαμβάνοντας το πείραμα για διάφορες τιμές ισχύος του laser παίρνουμε μια καμπύλη βαθμονόμησης που συσχετίζει την ασκούμενη δύναμη με την ισχύ του laser. Αυτή η τεχνική απαιτεί μόνο βιντεοσκόπηση της διαδικασίας και έναν θάλαμο ροής συνδεδεμένο με μια αντλία που θα δημιουργεί ροή με μεταβαλλόμενες ταχύτητες, αλλά έχει κάποια μειονεκτήματα. Η παγίδευση συμβαίνει συχνά κοντά στα τοιχώματα του θαλάμου, με αποτέλεσμα η δύναμη συνάφειας που αναπτύσσεται λόγω του τοιχώματος να τείνει να σπρώξει το παγιδευμένο σωματίδιο προς την καλυπτρίδα, εκτός του εστιακού επιπέδου. Έτσι η μετρούμενη δύναμη μπορεί να διαφέρει από την πραγματική δύναμη στο εστιακό επίπεδο. Ακόμη, με τις μεθόδους βιντεοσκόπησης μόνο μικρές ταχύτητες σωματιδίων μπορούν να μετρηθούν ($\sim 20 \mu\text{m/s}$), άρα και μικρές δυνάμεις (Svoboda and Block 1994). Τέλος, με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται μόνο η εγκάρσια συνιστώσα της οπτικής δύναμης.

➤ Η αντικειμενοφόρος πλάκα στην οποία είναι τοποθετημένο το δείγμα κινείται με την κίνηση της πλατφόρμας του μικροσκοπίου και μετριέται η ταχύτητα της πλατφόρμας στην οποία διαφεύγει το παγιδευμένο σωματίδιο (Σχήμα 5.1β). Σε αυτήν την περίπτωση χρειάζεται μια μηχανοκίνητη πλατφόρμα. Το κύριο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι η δύναμη σ' αυτήν την περίπτωση πρέπει να διορθώνεται με βάση το πόσο κοντά στην καλυπτρίδα βρίσκεται το σωματίδιο, φαινόμενο το οποίο μπορεί να επηρεάσει σημαντικά το αποτέλεσμα όταν η απόσταση από την

επιφάνεια είναι συγκρίσιμη με την ακτίνα του σωματιδίου. Ο συντελεστής β για μια σφαίρα ακτίνας a της οποίας το κέντρο βρίσκεται σε απόσταση h από την επιφάνεια της καλυπτρίδας είναι (Happel and Brenner, 1991):

$$\beta = \frac{6\pi\eta a}{\left[1 - \frac{9}{16}(\alpha/h) + \frac{1}{8}(\alpha/h)^3 - \frac{45}{256}(\alpha/h)^4 - \frac{1}{16}(\alpha/h)^5\right]} \quad (5.1)$$



Σχήμα 5.1. Βαθμονόμηση οπτικής παγίδας με τη μέθοδο της διαφυγής. Στο σχήμα η δέσμη laser (τα γκρι τόξα δείχνουν τα όρια αυτής) διαδίδεται από κάτω μέσω της καλυπτρίδας, όπως συμβαίνει σε ένα ανεστραμμένο μικροσκόπιο, και εστιάζεται σε ένα στενό μέρος, του οποίου το κέντρο καθορίζεται από τις διακεκομμένες γραμμές. (α) Η σφαίρα και ο θάλαμος του δείγματος κρατούνται σταθεροί ενώ προκαλείται ροή του υγρού μέσου. Η δύναμη ιζώδους που ασκείται στο σωματίδιο εξισορροπείται από την οπτική δύναμη. Σημειώνουμε δε, ότι οι δυνάμεις συνάφειας είναι τέτοιες ώστε να σπρώχνουν το σωματίδιο προς την καλυπτρίδα (αριστερά τόξα: πεδίο συνάφειας). (β) Η σφαίρα κρατείται σταθερή ενώ κινείται ο θάλαμος του δείγματος, έτσι ώστε η σφαίρα να δέχεται μια δύναμη $F(t)$. Εδώ η δύναμη σκέδασης σπρώχνει το σωματίδιο πέρα από την εστία προς την κατεύθυνση διάδοσης της δέσμης. Μεταβλητές: h , απόσταση από την καλυπτρίδα, $y(t)$, εγκάρσια θέση της σφαίρας σε σχέση με τη θέση παγίδευσης, $F(t)$, η δύναμη που εφαρμόζεται στη σφαίρα, $-\alpha y(t)$ η εγκάρσια δύναμη επαναφοράς λόγω της οπτικής παγίδας.

- Κινούμε την οπτική παγίδα ενώ το υγρό μέσον παραμένει στατικό και καταγράφεται η ταχύτητα στην οποία το σωματίδιο διαφεύγει. Αυτή η μέθοδος είναι στην ουσία ισοδύναμη με τη δεύτερη που παρουσιάσαμε, απλά με κατάλληλες διατάξεις οδήγησης της δέσμης, μπορούν να επιτευχθούν μεγαλύτερες ταχύτητες άρα και να μετρηθούν μεγαλύτερες δυνάμεις.
- Σε κάποιες περιπτώσεις, μπορεί να βαθμονομηθεί και η αξονική συνιστώσα της οπτικής δύναμης έναντι της δύναμης της βαρύτητας, με τη μέθοδο διαφυγής. Αυτή η προσέγγιση είναι χρήσιμη για σωματίδια που είναι αρκετά μεγάλα και μεγάλης πυκνότητας έτσι ώστε να μην φτάνουν σε μεγάλο ύψος h από την

καλυπτρίδα, $h=kT/w$, όπου k η σταθερά Boltzmann, T η θερμοκρασία και w το βάρος του σωματιδίου. Το κατώτερο όριο μεγέθους σωματιδίου για τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι 10 μm για σφαίρες πολυτυρένιου και 1 μm σφαίρες διοξειδίου του πυριτίου (silica).

Διάφοροι ερευνητές έχουν επιβεβαιώσει την αυστηρή αναλογία μεταξύ εγκάρσιας δύναμης και ισχύος της δέσμης laser (Block et al. 1989β, Sato et al. 1991). Για μικρές, όμως, δυνάμεις και μεγάλα σωματίδια η βαρυτική δύναμη θα έπρεπε να αλλάζει την αξονική θέση παγίδευσης των σωματιδίων με έναν τρόπο εξαρτώμενο από την ισχύ της δέσμης. Έτσι, στις μικρές τιμές ισχύος η εγκάρσια συνιστώσα της δύναμης παγίδευσης θα πρέπει να εξαρτάται με εκθετικό τρόπο από την ισχύ, με εκθέτη κατά τι μεγαλύτερο από τη μονάδα (Svoboda and Block, 1994).

5.2 Μέθοδος της ακαμψίας της παγίδας (*trap stiffness*)

Οι περισσότερες μετρήσεις της οπτικής δύναμης γίνονται με χρήση διαφόρων εκδοχών της μεθόδου διαφυγής που μόλις περιγράψαμε. Ωστόσο, η ευκολία, η καλή ευαισθησία και η ευελιξία μπορούν να επιτευχθούν όταν η δύναμη προσδιορίζεται σαν συνάρτηση της μετατόπισης από τη θέση παγίδευσης, δηλαδή αν υπολογιστεί η ακαμψία της παγίδας. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί το γεγονός ότι σαν μηχανικό ανάλογο της οπτικής λαβίδας μπορεί να θεωρηθεί ένα αντικείμενο (π.χ. ένα μικροσφαιρίδιο) που συνδέεται μέσω ενός ελατηρίου, για το οποίο θεωρούμε ότι όταν βρίσκεται στη θέση ισορροπίας, η σφαίρα βρίσκεται στο κέντρο της παγίδας. Στη θέση ισορροπίας του ελατηρίου, η συνισταμένη των δυνάμεων που δρουν στη σφαίρα είναι μηδέν, δηλαδή όλες οι δυνάμεις βρίσκονται σε ισορροπία. Όταν η σφαίρα, για κάποιο λόγο, κινηθεί λίγο πέρα από το κέντρο της δέσμης laser, μια δύναμη τείνει να την επαναφέρει στην αρχική θέση ισορροπίας. Για μικρές μετατοπίσεις από τη θέση ισορροπίας, η δύναμη F αυξάνει γραμμικά με την απομάκρυνση x ,

$$\vec{F} = -\kappa \cdot \vec{x} \quad (5.2)$$

όπου η σταθερά αναλογίας, κ , καλείται «ακαμψία» της παγίδας. Για ένα «άκαμπτο ελατήριο» απαιτείται μεγαλύτερη δύναμη για να κινηθεί η σφαίρα σε απόσταση x απ' ό,τι για ένα άλλο λιγότερο σκληρό. Με βάση την εξίσωση (5.2) η μέτρηση του συντελεστή κ μπορεί να γίνει τραβώντας τη σφαίρα σε κάποια απόσταση και μετρώντας τη δύναμη που απαιτείται για αυτήν την απομάκρυνση. Αυτή η διαδικασία όμως δεν είναι πολύ πρακτική, καθώς στην οπτική παγίδευση οι αποστάσεις είναι της τάξης των μερικών νανομέτρων ή και ακόμα μικρότερες, συνεπώς ο ακριβής υπολογισμός είναι δύσκολος. Η προσέγγιση του «εκκρεμούς» είναι απλούστερη: η σφαίρα διεγείρεται σε ταλάντωση από μια εξωτερική πηγή διέγερσης και συμπεριφέρεται σαν αρμονικός ταλαντωτής. Αντί να εφαρμόζει κανείς μια εξωτερική περιοδική δύναμη μπορεί επίσης να μεταβάλλει περιοδικά την ισχύ του laser (Wang et al. 1997). Η σφαίρα αρχίζει να ταλαντώνεται και η συχνότητα ταλάντωσης σχετίζεται με τη σταθερά επαναφοράς του ελατηρίου ή ακαμψία της παγίδας. Λόγω της ακαμψίας του ελατηρίου η κίνηση του εκκρεμούς υστερεί χρονικά σε σχέση με τη διέγερση. Η χρονική υστέρηση (μετατόπιση φάσης) είναι ένα μέτρο για την ακαμψία της παγίδας.

Η εξίσωση (5.2) δε λαμβάνει υπόψη το γεγονός ότι κατά τη διάρκεια της διαδικασίας βαθμονόμησης η σφαίρα κινείται με ταχύτητα dx/dt σε ένα υγρό ιξώδους η . Η εξίσωση (5.2) τροποποιημένη ώστε να λαμβάνει υπόψη κι αυτές τις παραμέτρους γίνεται (Gittes and Schmidt, 1998):

$$F(t) = -\kappa x(t) + 6\pi\eta r dx/dt \quad (5.3)$$

όπου r η ακτίνα της σφαίρας. Και αυτή η εξίσωση, όπως και στην περίπτωση της μεθόδου διαφυγής, ισχύει για μικρό αριθμό *Reynolds*, το οποίο, όπως είδαμε, ισχύει πρακτικά σε όλες τις εφαρμογές της οπτικής παγίδευσης. Αν υποθέσουμε ότι η σφαίρα διεγείρεται σε ταλάντωση από ένα ημιτονοειδές σήμα συχνότητας f και πλάτους A , τότε η χρονοεξαρτώμενη δύναμη που δέχεται σε μιγαδική αναπαράσταση θα είναι:

$$F(t) = 2\pi \cdot i \cdot f \cdot \eta \cdot A \cdot \exp(-2\pi \cdot i \cdot f \cdot t) \quad (5.4)$$

όπου i είναι η φανταστική μονάδα. Ο συνδυασμός των εξισώσεων (5.3) και (5.4) δίνει μια διαφορική εξίσωση, της οποίας λύση είναι η ακόλουθη:

$$x(t) = \left\{ A \cdot f / \sqrt{f_c^2 + f^2} \right\} \cdot \exp[i \cdot 2\pi \cdot f \cdot (t - \delta)] \quad (5.5)$$

όπου $x(t)$ είναι η θέση της σφαίρας στην παγίδα σε χρόνο t , f είναι η συχνότητα ταλάντωσης και f_c είναι η τιμή της συχνότητας στην οποία παύουμε να έχουμε περιοδική κίνηση ($f_c = \kappa / 2\pi\beta$, όπου $\beta = 6\pi\eta r$) και μπορεί να μετρηθεί μεταβάλλοντας τις συχνότητες διέγερσης (Greulich, 1999). Ο εκθετικός όρος στις εξισώσεις (5.4) και (5.5) είναι ο ίδιος εκτός από τον όρο δ που εμφανίζεται στην εξίσωση για το $x(t)$. Αυτό σημαίνει ότι η σφαίρα πραγματοποιεί τον ίδιο τύπο κίνησης με την αντικειμενοφόρο τράπεζα του μικροσκοπίου, αλλά υστερεί χρονικά. Αυτή η μετατόπιση φάσης προκύπτει (Greulich, 1999):

$$\delta = -\tan^{-1}(f/f_c) \quad (5.6)$$

Το δ μπορεί να υπολογιστεί από την παραπάνω σχέση. Τα $x(t)$ και $F(t)$ μπορούν να υπολογιστούν από τις εξισώσεις (5.5) και (5.4) αντίστοιχα, άρα και το κ , η ακαμψία της παγίδας, μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση (5.2).

Εφόσον έχει προσδιοριστεί η σταθερά κ σαν συνάρτηση της ισχύος του laser, μπορεί να υπολογιστεί η δύναμη που υφίσταται η σφαίρα από την οπτική παγίδα γνωρίζοντας την απομάκρυνση x από το κέντρο του οπτικού άξονα της παγίδας. Αυτό βέβαια απαιτεί ακριβείς μεθόδους εντοπισμού της θέσης του σωματιδίου, που μπορούν να επιτευχθούν μόνο με κατάλληλες φωτοδιόδους ή με τη χρήση ειδικών συμβολόμετρων.

5.3 Βαθμονόμηση με βάση τη θερμική κίνηση Brown

Στις δυο μεθόδους βαθμονόμησης που περιγράψαμε παραπάνω, η κίνηση της σφαίρας επάγεται από κάποια εξωτερική δύναμη. Εναλλακτικά μπορεί κανείς να εκμεταλλευτεί τη θερμική κίνηση Brown των σωματιδίων. Ένα σωματίδιο απομονωμένο στην οπτική παγίδα δέχεται τυχαίες δυνάμεις λόγω θερμικών διακυμάνσεων. Σε ένα σύνολο πολλών σωματιδίων, το κάθε ένα από αυτά ταλαντώνεται με διαφορετική συχνότητα. Αν κανείς μετρήσει το πλάτος των ταλαντώσεων των σωματιδίων σαν συνάρτηση της συχνότητας, με την προϋπόθεση ότι τα σωματίδια κινούνται σε αρμονικό δυναμικό ώστε να ισχύει το μηχανικό

ανάλογο μάζας-ελατηρίου, που περιγράψαμε παραπάνω, παίρνει το λεγόμενο φάσμα ισχύος του σωματιδίου. Η εξίσωση κίνησης του σωματιδίου και σε αυτήν την περίπτωση εκφράζεται από τη σχέση (5.3). Συνεπώς, και σε αυτή τη μέθοδο σκοπός είναι ο προσδιορισμός της σταθεράς του ελατηρίου της οπτικής παγίδας, κ .

Στην προκειμένη περίπτωση, η $F(t)$ στην εξίσωση (5.3) παριστάνει την τυχαία θερμική κίνηση η οποία έχει μία μέση τιμή ίση με το μηδέν και σταθερό φάσμα ισχύος

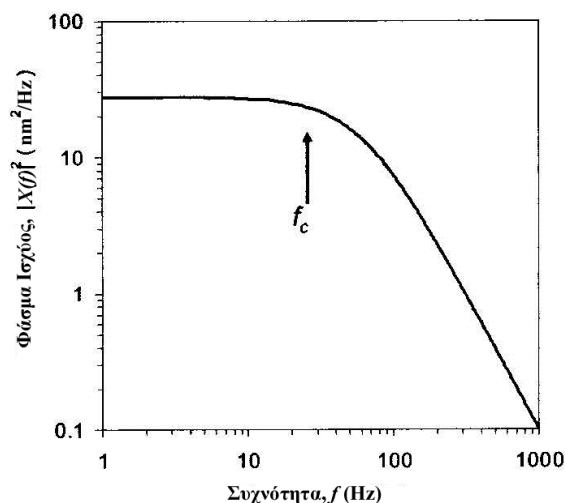
$$|F(f)|^2 = 4\beta k_B T \quad (5.7)$$

όπου k_B η σταθερά του Boltzmann, T η θερμοκρασία του δείγματος και $\beta = 6\pi\eta r$, ο παράγοντας ιξώδους. $F(f)$, είναι ο μετασχηματισμός Fourier της δύναμης $F(t)$ στο χώρο των συχνοτήτων. Το φάσμα ισχύος της κίνησης Brown που περιγράφεται από τη διαφορική εξίσωση (5.3), $S_x(f)$, δίνεται από τη σχέση:

$$S_x(f) = |X(f)|^2 = \frac{k_B T}{\beta\pi^2(f_c^2 + f^2)} \quad (5.8)$$

όπου $X(f)$, ο μετασχηματισμός Fourier της $x(t)$ και f_c δηλώνει την κρίσιμη τιμή της συχνότητας που είδαμε και παραπάνω και αναφέρεται και σαν συχνότητα γονάτου (corner frequency) από το σχήμα της καμπύλης του φάσματος ισχύος της θέσης της σφαίρας (Σχήμα 5.2). Η συχνότητα γονάτου, όπως ήδη έχουμε περιγράψει, συσχετίζεται με την σταθερά ακαμψίας, κ , της παγίδας. Από το σχήμα 5.2, όπου φαίνεται το ιδανικό φάσμα ισχύος για μια οπτικά παγιδευμένη σφαίρα, παρατηρούμε ότι οι διακυμάνσεις στη θέση της σφαίρας είναι περίπου σταθερές σε χαμηλές συχνότητες, λόγω της οπτικής παγίδευσης, μέχρι να φτάσουμε την f_c , όπου έχουμε απότομη αλλαγή στην κλίση της καμπύλης. Σε υψηλές συχνότητες το φάσμα ισχύος φθίνει σαν $1/f^2$ και αυτό είναι χαρακτηριστικό ελεύθερης διάχυσης των σωματιδίων.

Έτσι, η μέτρηση των διακυμάνσεων της θέσης της σφαίρας λόγω της θερμικής κίνησης μπορεί να μας δώσει τη σταθερά του ελατηρίου κ , η οποία μας επιτρέπει να προσδιορίσουμε τη δύναμη παγίδευσης από το νόμο του Hooke. Δηλαδή, η μέθοδος αυτή στην ουσία είναι ίδια με τη μέθοδο της ακαμψίας του ελατηρίου που περιγράψαμε παραπάνω, απλά χρησιμοποιεί, αντί για εξωτερική δύναμη διέγερσης, τη δύναμη λόγω θερμικής κίνησης Brown των σωματιδίων.



Σχήμα 5.2: Ιδανικό φάσμα ισχύος της θέσης μιας οπτικά παγιδευμένης σφαίρας. Το φάσμα ισχύος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του παράγοντα ακαμψίας της παγίδας.

Τέλος, είναι δυνατό να προσδιορίσουμε την ακαμψία της οπτικής παγίδας χρησιμοποιώντας την κατανομή Boltzmann για την απομάκρυνση της σφαίρας. Για

ένα αρμονικό δυναμικό, η κατανομή Boltzmann περιέχει τη σταθερά επαναφοράς. Πειραματικά, παίρνουμε, για παράδειγμα, 1000 σημεία-θέσεις της σφαίρας στην οπτική παγίδα και προσδιορίζουμε πόσο συχνά βρίσκεται η σφαίρα σε απόσταση x από το κέντρο της παγίδας. Από αυτήν την κατανομή μπορεί να προκύψει μια κατανομή της πιθανότητας $p(x)$, να βρεθεί η σφαίρα στη θέση x , και να υπολογιστεί ο παράγοντας ακαμψίας της παγίδας.

5.4 Μέθοδος της διηλεκτροφόρησης

Οι μέθοδοι που περιγράψαμε παραπάνω είναι αυτές που χρησιμοποιούνται ευρέως από διάφορα εργαστήρια παγκοσμίως για τη βαθμονόμηση διατάξεων οπτικής παγίδευσης. Παρόλα αυτά, καμιά από αυτές δε χαρακτηρίζεται ως γρήγορη και εύκολη μέθοδος. Η βαθμονόμηση μιας διάταξης με κάποια από τις παραπάνω μεθόδους δεν είναι και τόσο απλή και απαιτεί ειδικό και συχνά περίπλοκο εξοπλισμό. Αυτός είναι και ένας από τους κύριους λόγους που σε διεθνές επίπεδο πολλά ερευνητικά εργαστήρια ασχολούνται με την εισαγωγή καινούριων μεθόδων βαθμονόμησης σε μια προσπάθεια απλοποίησης της διαδικασίας. Μια τέτοια προσπάθεια είναι και αυτή του Kachynski και των συνεργατών του (2003), οι οποίοι εισήγαγαν μια καινούρια μέθοδο που έχει να κάνει με το διφωτονικό φθορισμό (two-photon-excited fluorescence). Και αυτή η μέθοδος όμως δεν είναι ιδιαίτερα πρακτική, καθώς απαιτεί η παγίδα laser να έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, όπως είναι η κίνηση του παγιδευμένου σωματιδίου σε κυκλικές τροχιές με χρήση γαλβανομετρικών κατόπτρων, με τα οποία η δέσμη του laser σαρώνει το επίπεδο x - y (Kachynski et al. 2003), πράγμα το οποίο δεν είναι καθόλου τετριμμένο για μια διάταξη οπτικής παγίδας.

Σήμερα αναφερόμαστε σε μια νέα μέθοδο, η οποία μέθοδος βασίζεται στο φαινόμενο της διηλεκτροφόρησης για τη μέτρηση οπτικά επαγόμενων δυνάμεων σε μικροσωματίδια και κύτταρα. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε πειραματικά στις αρχές της δεκαετίας του 2000 στο εργαστήριο «Ανάπτυξη Laser και Εφαρμογές» του ΕΜΠ, σε συνεργασία με Ρουμάνους ερευνητές από την Ιατρική Σχολή “Carol Davilla” του Βουκουρεστίου στο θεωρητικό υπόβαθρο, στα πλαίσια και της διδακτορικής διατριβής της Ε.-Χ. Παπαγιάκουμου. Στις παραγράφους που ακολουθούν θα περιγράψουμε το φαινόμενο της διηλεκτροφόρησης, με τις βασικές αρχές του και τον απαραίτητο φορμαλισμό, όπως αναφέρεται εκτενώς στην ανωτέρω διατριβή.

5.4.1. Σωματίδια σε ηλεκτρομαγνητικό πεδίο

Όταν ένα ηλεκτρικό πεδίο συνεχούς ρεύματος και ομοιόμορφης έντασης εφαρμοστεί σε ένα σωματίδιο που αιωρείται σε υδατικό διάλυμα, τα πιθανά φαινόμενα που θα εμφανιστούν είναι τουλάχιστον τρία:

1) Το σωματίδιο θα κινηθεί. Η παρατηρούμενη πλευρική κίνηση του σωματιδίου παρατηρείται εφόσον το σωματίδιο περιέχει ηλεκτρικό φορτίο Q στην επιφάνειά του (σε ουδέτερο pH, το φορτίο αυτό θα είναι αρνητικό για προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα, αρνητικό για το DNA και είτε αρνητικό είτε θετικό για τις πρωτεΐνες). Όταν το φορτισμένο σωματίδιο βρίσκεται μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο έντασης E , θα δέχεται μία δύναμη F ($F=Q \cdot E$), και η επαγόμενη κίνηση ονομάζεται *ηλεκτροφόρηση*. Το φαινόμενο αυτό είναι πολύ καλά γνωστό ήδη από το 1809 (Reuss,

1809) και για πολύ καιρό χρησιμοποιούνταν στην έρευνα των επιφανειακών ιδιοτήτων των κυττάρων (Coulter, 1920).

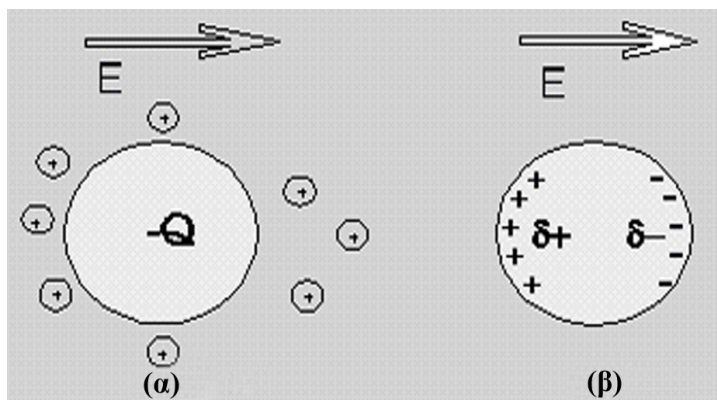
2) Το διπλό στρώμα ηλεκτρικών φορτίων που περιβάλλει το σωματίδιο διαταράσσεται. Όταν το σωματίδιο βρίσκεται να αιωρείται μέσα σε έναν ηλεκτρολύτη, όντας φορτισμένο θα τραβήξει κοντά του ιόντα αντίθετης ηλεκτρικής πολικότητας δημιουργώντας έτσι ένα διπλό στρώμα ηλεκτρικού φορτίου. Η συμμετρία του στρώματος αυτού θα διαταραχθεί στην παρουσία ενός ηλεκτρικού πεδίου (Hartley, 1935), όπως φαίνεται και στο σχήμα 5.3α.

3) Ηλεκτρικά φορτία εμφανίζονται στη διαχωριστική επιφάνεια μεταξύ του σωματιδίου και του διαλύματος. Κατά κανόνα οι ηλεκτρικές ιδιότητες του σωματιδίου διαφέρουν από αυτές του διαλύματος μέσα στο οποίο βρίσκεται (π.χ. η ηλεκτρική αγωγιμότητα και η διηλεκτρική σταθερά). Ως αποτέλεσμα αυτού του γεγονότος, και όπως πρώτος περιέγραψε ο Maxwell (Maxwell, 1891) και αργότερα επεξεργάστηκε ο Wagner (Wagner, 1914), το αποτέλεσμα ενός εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου θα είναι να επάγει ηλεκτρικά φορτία τα οποία θα εμφανίζονται στη συνοριακή επιφάνεια μεταξύ του σωματιδίου και του διαλύματος, και το οποίο φαίνεται αναλυτικά στο σχήμα 5.3β.

Τα δύο τελευταία φαινόμενα, η διατάραξη του διπλού στρώματος ηλεκτρικού φορτίου και η δημιουργία των συνοριακών φορτίων κατά Maxwell-Wagner, αποδίδουν στο σωματίδιο τις ιδιότητες ενός ηλεκτρικού διπόλου. Τα μεγέθη των επαγόμενων αυτών διπόλων είναι πολύ μεγάλα σε σύγκριση με αυτά που συνδέονται συνήθως με μοριακά είδη. Αυτό συμβαίνει γιατί, παρόλο που το μέγεθος των φορτίων που εμπλέκονται μπορεί να είναι μικρό, οι αποστάσεις μεταξύ των αντίθετα φορτισμένων πόλων είναι μεγάλες. Η σχέση που μας δίνει την επαγόμενη διπολική ροπή, \vec{p} , που προέρχεται από δύο αντίθετα φορτία τοποθετημένα σε αποστάσεις r_+ και r_- για το θετικό και το αρνητικό αντίστοιχα, είναι:

$$\vec{p} = (\delta_+) \vec{r}_+ - (\delta_-) \vec{r}_- = \delta q \cdot \vec{r} \quad (5.9)$$

όπου r είναι η ακτίνα του σωματιδίου και δ_+ , δ_- , η περίσσεια θετικού και αρνητικού φορτίου αντίστοιχα. Ακόμη κι όταν η διαφορά του φορτίου είναι ίση με ένα μόνο ηλεκτρονικό φορτίο τότε, για ένα κύτταρο με διάμετρο 5 μm , η διπολική ροπή θα ισούται με $2,5 \cdot 10^5$ debye, όταν η αντίστοιχη για τα μόρια του νερού ισούται με 1,84 debye, δηλαδή πέντε τάξεις μεγέθους μικρότερη.



Σχήμα 5.3: (α) Διαταραχή του διπλού στρώματος ηλεκτρικού φορτίου που προκαλείται από το πεδίο E . (β) Φορτία αλληλεπίδρασης που επάγονται στη διεπιφάνεια σωματιδίου-μέσου. Αυτά τα δύο φαινόμενα μπορούν να παράγουν μεγάλες διπολικές ροπές.

Εάν τώρα το πεδίο συνεχούς ρεύματος αντικατασταθεί από ένα εναλλασσόμενο ρεύματος, τότε λόγω της αδράνειας του σωματιδίου, τα φαινόμενα ηλεκτροφόρησης ασθενούν και σχεδόν εξαφανίζονται για συχνότητες πάνω από 1 kHz. Επίσης, οι διαταραχές του διπλού στρώματος ηλεκτρικού φορτίου έχουν πεπερασμένο χρόνο αφησυχασής και γίνονται αμελητέες πάνω από 50 kHz. Όμως, οι διπολικές ροπές που συνδέονται με την πόλωση κατά Maxwell-Wagner στην συνοριακή επιφάνεια, μπορούν και ασκούν την επίδρασή τους σε συχνότητες ακόμη και πάνω από 50 MHz (Wagner, 1914).

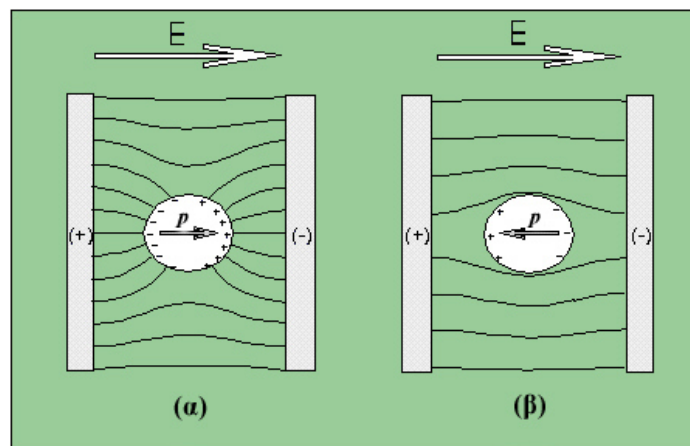
Για ένα σφαιρικό σωματίδιο ακτίνας r , το οποίο αιωρείται σε ένα διάλυμα με απόλυτη διηλεκτρική επιδεκτικότητα ϵ_m , μπορεί ναδειχτεί με βάση τις θεωρίες των Maxwell και Wagner ότι η διπολική ροπή που προκύπτει από τα επαγόμενα φορτία στη διεπιφάνεια σωματιδίου-μέσου δίνεται από τη σχέση:

$$\vec{p}(\vec{r}, \omega) = 4\pi\epsilon_m r^3 \left(\frac{\sigma_p^* - \sigma_m^*}{\sigma_p^* + 2\sigma_m^*} \right) E(\vec{r}) \quad (5.10)$$

όπου σ_p^* και σ_m^* είναι η μιγαδική αγωγιμότητα του σωματιδίου και του μέσου στο οποίο βρίσκεται, αντίστοιχα. Αυτές οι μιγαδικές αγωγιμότητες παίρνουν υπόψη τους ότι τόσο το σωματίδιο όσο και το διάλυμα παρουσιάζουν αγωγίμες (ενεργειακή απώλεια) και διηλεκτρικές (αποθήκευση ενέργειας πεδίου) ιδιότητες όταν εκτίθενται σε ηλεκτρικά πεδία, η τιμή τους δε δίνεται από τη σχέση:

$$\sigma^* = \sigma + i\omega\epsilon \quad (5.11)$$

όπου ω είναι η γωνιακή συχνότητα του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου ($=2\pi f$, f η συχνότητα του πεδίου), σ η αγωγιμότητα, ϵ η διηλεκτρική επιδεκτικότητα και i η φανταστική μονάδα, η οποία δείχνει ότι το ρεύμα της διηλεκτρικής μετατόπισης προηγείται του ρεύματος αγωγιμότητας κατά μία γωνία φάσης ίση με 90° . Το ρεύμα αγωγιμότητας καθορίζεται από το πραγματικό μέρος του σ^* , ενώ το φανταστικό μέρος προσδιορίζει το μέγεθος του ρεύματος διηλεκτρικής μετατόπισης. Στην εξίσωση (5.10) βλέπουμε ότι το μέγεθος και η πολικότητα της επαγόμενης διπολικής ροπής εξαρτάται με έναν περίπλοκο τρόπο από τη συχνότητα του εφαρμοζόμενου πεδίου και από τις σχετικές τιμές της αγωγιμότητας και της επιδεκτικότητας σωματιδίου και περιβάλλοντος μέσου. Έτσι, αν η πολωσιμότητα του σωματιδίου υπερέρχει αυτής του μέσου (δηλ. αν $|\sigma_p^*| > |\sigma_m^*|$) η κατανομή των επαγόμενων φορτίων παράγει μία διπολική ροπή που έχει την ίδια κατεύθυνση με το εφαρμοζόμενο πεδίο, όπως φαίνεται στο σχήμα 5.4α. Αν συμβαίνει το αντίθετο (δηλ. αν $|\sigma_p^*| < |\sigma_m^*|$), τότε η διπολική ροπή έχει αντίθετη κατεύθυνση με το εφαρμοζόμενο πεδίο (Σχήμα 5.4β).



Σχήμα 5.4: Κατανομή των ηλεκτρικών φορτίων που επάγονται στην επιφάνεια ενός σωματιδίου και κατεύθυνση της επαγόμενης διπολικής ροπής \vec{p} για την περίπτωση όπου: (α) η πολωσιμότητα του σωματιδίου υπερέχει αυτής του μέσου, και (β) το σωματίδιο πολώνεται λιγότερο σε σχέση με το περιβάλλον μέσον.

Η εμφάνιση των συνοριακών φορτίων (και κατά συνέπεια της επαγόμενης διπολικής ροπής) δεν πραγματοποιείται αυτόματα με την εφαρμογή του πεδίου, αλλά με εκθετικό ρυθμό χαρακτηριστικής σταθεράς χρόνου, τ , που δίνεται από τη σχέση

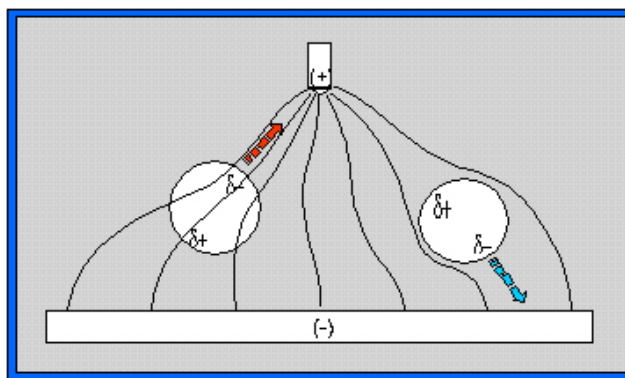
$$\tau = \left(\frac{\epsilon_p + 2\epsilon_m}{\sigma_p + 2\sigma_m} \right) \quad (5.12),$$

όπου ϵ_p η διηλεκτρική επιδεκτικότητα του σωματιδίου.

Οι εξισώσεις (5.10)-(5.12) μας δίνουν μία ολοκληρωμένη εικόνα του φαινομένου και περιγράφουν το μέγεθος, την πολωσιμότητα και το χρόνο απόκρισης της διπολικής ροπής, η οποία επάγεται σε ένα σωματίδιο μέσα σε ένα εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Παρέχουν δε τη βάση για την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλασσόμενα πεδία στον επιλεκτικό μικροχειρισμό βιομορίων, χρησιμοποιώντας φαινόμενα όπως η *διηλεκτροφόρηση* (dielectrophoresis), η *ηλεκτρο-περιστροφή* (electrorotation) ή τα *φαινόμενα οδεύοντος πεδίου* (traveling field effects).

5.4.2 Το φαινόμενο της διηλεκτροφόρησης

Με τον όρο *διηλεκτροφόρηση* (dielectrophoresis - DEP) ορίζεται η πλευρική κίνηση που προκαλείται σε σωματίδια σαν αποτέλεσμα της πόλωσης τους, η οποία επάγεται σε αυτά από ένα μη ομογενές ηλεκτρικό πεδίο. Το περισσότερο πολωμένο σωματίδιο κινείται προς την κατεύθυνση υψηλής έντασης πεδίου. Ο όρος εισήχθη από τον Herbert Ackland Pohl με σκοπό να διαχωρίσει το φαινόμενο που παρατήρησε, από αυτό της ηλεκτροφόρησης (Pohl, 1958, 1978).



Σχήμα 5.5: Δύο διαφορετικά σωματίδια σε ανομοιογενές ηλεκτρικό πεδίο. Το σωματίδιο στα αριστερά πολώνεται περισσότερο από το περιβάλλον μέσον και έλκεται προς το μέρος υψηλής έντασης πεδίου, ενώ το σωματίδιο με μικρή πολωσιμότητα στα δεξιά κατευθύνεται μακριά από την υψηλή ένταση πεδίου.

Αντίθετα με την ηλεκτροφόρηση, στο φαινόμενο αυτό δεν απαιτείται το σωματίδιο να είναι φορτισμένο. Η διηλεκτροφόρηση εξαρτάται από τη δύναμη που

δέχεται το σωματίδιο λόγω της πόλωσής του σε όλη του την έκταση, όταν βρίσκεται σε ανομοιογενές ηλεκτρικό πεδίο. Αυτή η δύναμη δημιουργείται από τον ακόλουθο μηχανισμό: οποιοδήποτε δίπολο (είτε επαγόμενο, είτε μόνιμο) αποτελείται, κατά τα γνωστά, από δύο ίσα σε μέγεθος και αντίθετα φορτία σε ορισμένη απόσταση μεταξύ τους. Το ηλεκτρικό πεδίο θα προκαλέσει την ευθυγράμμιση του διπόλου, ως ένα βαθμό, με αυτό. Επειδή το πεδίο είναι ανομοιογενές το ένα άκρο του διπόλου θα βρίσκεται σε ασθενέστερο πεδίο από το άλλο. Έτσι, προκύπτει μια διαφορά στο μέτρο της δύναμης που δέχονται τα ηλεκτρικά φορτία του διπόλου και τελικά η συνισταμένη δύναμη κινεί το δίπολο ή το σωματίδιο προς την κατεύθυνση της μεγαλύτερης έντασης του πεδίου. Ακόμη κι αν αλλάξουμε την κατεύθυνση του πεδίου, το σωματίδιο θα κινηθεί και πάλι προς την αρχική κατεύθυνση. Αυτό σημαίνει ότι στη διηλεκτροφόρηση συμβαίνει κίνηση προς μια κατεύθυνση είτε έχουμε συνεχές είτε εναλλασσόμενο πεδίο, σε αντίθεση με την ηλεκτροφόρηση. Στο σχήμα 5.5 αναπαρίσταται το πως ένα ανομοιογενές ηλεκτρικό πεδίο μπορεί να επηρεάσει ένα σωματίδιο μέσα σ' αυτό.

Η δύναμη διηλεκτροφόρησης, \vec{F} , μπορεί να προκύψει από τη χρονοεξαρτημένη εξίσωση δύναμης:

$$\vec{F} = \vec{p} \cdot \vec{\nabla} \vec{E} \quad (5.13),$$

όπου \vec{p} είναι η διπολική ροπή που έχει δημιουργηθεί στο σωματίδιο (σχέση (5.10)) και \vec{E} το ηλεκτρικό πεδίο. Η εξίσωση δείχνει ότι γενικά η δύναμη είναι μηδενική εκτός από εκείνες τις περιοχές όπου το πεδίο είναι μη ομογενές. Η σχέση (5.10) της διπολικής ροπής μπορεί επίσης να γραφτεί με την εξής μορφή:

$$\vec{p}(\vec{r}, \omega) = 4\pi\epsilon_m r^3 \left[\frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \right] \vec{E}(\vec{r}) \quad (5.14)$$

όπου ϵ_p^* και ϵ_m^* είναι οι μιγαδικές επιδεκτικότητες ή διηλεκτρικές σταθερές του σωματιδίου και του μέσου αντίστοιχα, με:

$$\epsilon^* = \epsilon - i(\sigma/\omega) \quad (5.15)$$

και ο παράγοντας f_{CM} , όπου:

$$f_{CM} = \left[\frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \right] \quad (5.16)$$

ονομάζεται παράγοντας των Clausius-Mossotti. Η δύναμη διηλεκτροφόρησης δίνεται από το πραγματικό μέρος της εξίσωσης (5.13) και η χρονική μέση τιμή της είναι:

$$\vec{F}(\omega) = 2\pi\epsilon_m r^3 \text{Re}(f_{CM}) \vec{\nabla} |E_{rms}|^2 \quad (5.17)$$

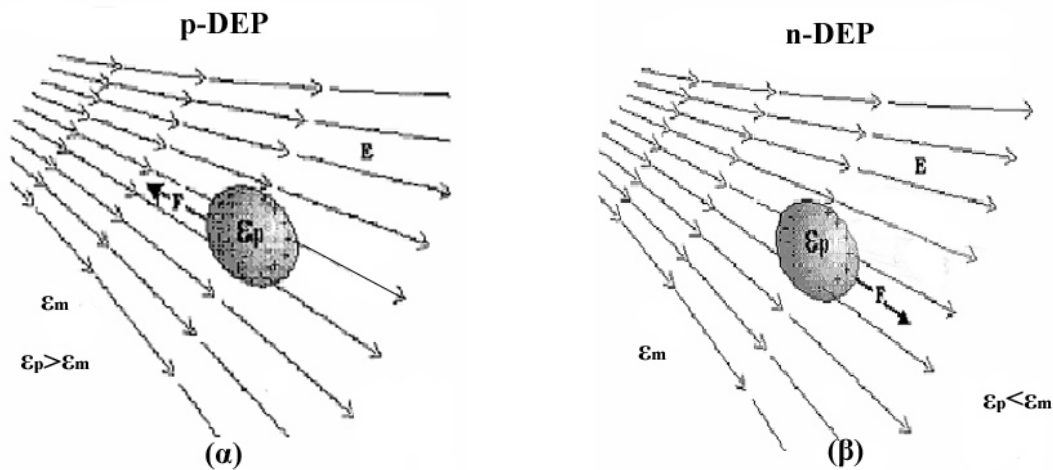
όπου E_{rms} είναι η χρονική μέση τιμή του ηλεκτρικού πεδίου. Από την εξίσωση αυτή βλέπουμε ότι η δύναμη διηλεκτροφόρησης εξαρτάται από τον όρο $\vec{\nabla} |E_{rms}|^2$ (έναν παράγοντα που σχετίζεται με τη γεωμετρία του ηλεκτρικού πεδίου) και από το πραγματικό μέρος του f_{CM} . Το πραγματικό μέρος του f_{CM} παίρνει τιμές $1 < \text{Re}(f_{CM}) <$

1/2 και αλλάζει σύμφωνα με τη συχνότητα του εφαρμοζόμενου πεδίου και την μιγαδική επιδεκτικότητα του μέσου. Όταν $\text{Re}(f_{CM}) > 0$ έχουμε θετική διηλεκτροφόρηση (p-DEP) και η δύναμη έχει κατεύθυνση προς τις περιοχές υψηλής έντασης του πεδίου, άρα το σωματίδιο κινείται προς τις άκρες των ηλεκτροδίων (Σχήμα 5.6α).

Το αντίθετο συμβαίνει όταν έχουμε $\text{Re}(f_{CM}) < 0$, δηλαδή αρνητική διηλεκτροφόρηση (n-DEP), οπότε η δύναμη έχει κατεύθυνση προς τις περιοχές χαμηλής έντασης πεδίου και τα σωματίδια κινούνται μακριά από τα άκρα των ηλεκτροδίων (Σχήμα 5.6β).

Το φαινόμενο είναι ανάλογο με ένα σώμα μέσα στο νερό. Αν η πυκνότητά του είναι μικρότερη από αυτή του νερού τότε ανεβαίνει προς την επιφάνεια και επιπλέει, αλλά αν είναι μεγαλύτερη τότε βυθίζεται υπό την επίδραση της δύναμης από το μη γραμμικό πεδίο κλίσεως της βαρύτητας. Αν δεν υπήρχε βαθμωτή κλίση στο βαρυτικό πεδίο, το σώμα ούτε θα επέπλεε ούτε θα βυθιζόταν.

Η θετική διηλεκτροφόρηση οδηγεί σε μία ελκτική δύναμη κρατώντας ενεργά



Σχήμα 5.6: Θετική (α) και αρνητική (β) διηλεκτροφόρηση. Το σωματίδιο κινείται προς υψηλή βαθμίδα πεδίου στη θετική και προς χαμηλή βαθμίδα πεδίου στην αρνητική διηλεκτροφόρηση.

το σωματίδιο σε περιοχές όπου έχουμε μέγιστο στη κλίση του H/M πεδίου, και συνήθως το σημείο αυτό είναι η οξεία άκρη ενός ηλεκτροδίου. Η αρνητική διηλεκτροφόρηση, σε αντίθεση, ασκεί μία απωστική δύναμη και από τη στιγμή που το σωματίδιο απωθηθεί προς περιοχές μηδενικής ή πολύ χαμηλής κλίσεως πεδίου, δεν θα υπάρξει πλέον καμία δύναμη που να επάγεται πάνω του (για αυτό χαρακτηρίζεται και ως παθητική σε αντίθεση με την θετική διηλεκτροφόρηση που είναι ενεργητική). Σε αυτό το σημείο, το σωματίδιο θα κινείται λόγω κίνησης Brown και από τις δυνάμεις ιξώδους λόγω της ροής του μέσου.

Η εξάρτηση του παράγοντα f_{CM} από τη συχνότητα καθιστά τη διηλεκτροφόρηση ισχυρό εργαλείο στο μικροχειρισμό σωματιδίων σε διάλυμα. Σαν μη-επεμβατική μέθοδος χρησιμοποιείται και αυτή σε ανάλογες βιοτεχνολογικές εφαρμογές με την οπτική παγίδευση, όπως ο διαχωρισμός και η συλλογή μικροοργανισμών (Markx et al., 1994 – Becker et al., 1995 – Schnelle et al., 1999). Επίσης χρησιμοποιείται στη βιομηχανία ημιαγωγών για την κατασκευή μικροηλεκτροδίων (Green et al., 1997).

5.4.3 Πειραματικά αποτελέσματα με χρήση της διηλεκτροφόρησης

Στα πλαίσια ερευνών που έγιναν στα εργαστήρια του Τομέα Φυσικής της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών (ΣΕΜΦΕ) του ΕΜΠ, κατά την εκπόνηση διδακτορικών και διπλωματικών εργασιών, πραγματοποιήθηκαν πειράματα οπτικής παγίδευσης με την χρήση οπτικού μικροσκοπίου, στα οποία συμμετείχα ως παρατηρητής και εκπαιδευτήκα στην τεχνική τους. Στη συνέχεια, θα αναφέρω εν συντομία ένα από αυτά τα πειράματα.

Διάταξη:

Η διάταξη περιλαμβάνει ένα laser He-Ne που εκπέμπει σε μήκος κύματος $\lambda = 632,8$ nm (στο κόκκινο), έναν φακό εστιακής απόστασης $f=10$ cm μπροστά από το laser και πριν το μικροσκόπιο (το αριθμητικό άνοιγμα του οποίου κυμαινόταν από $N.A=0,65-0,85$) και ένα μικροσκόπιο τύπου MOTIC F-11.25, ενώ τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με καταδυτικό αντικειμενικό φακό X100.

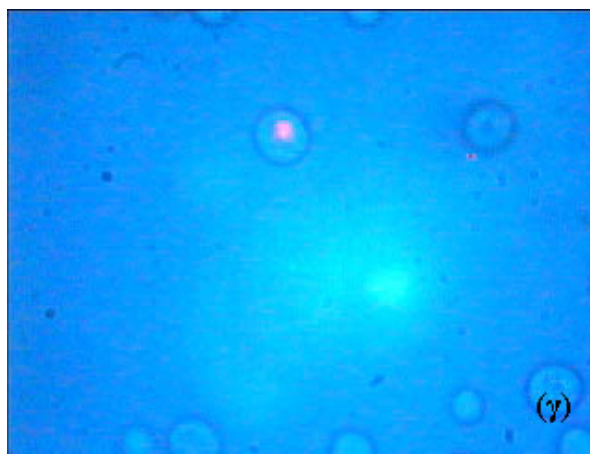
Τα χαρακτηριστικά της δέσμης του laser, τα οποία μετρήθηκαν στο εργαστήριο, είναι τα εξής:

A) διάμετρος δέσμης $\delta=2$ mm

B) ισχύς εξόδου του laser $I=10$ mW

Γ) ισχύς δέσμης στην έξοδο του αντικειμενικού φακού $I=8$ mW

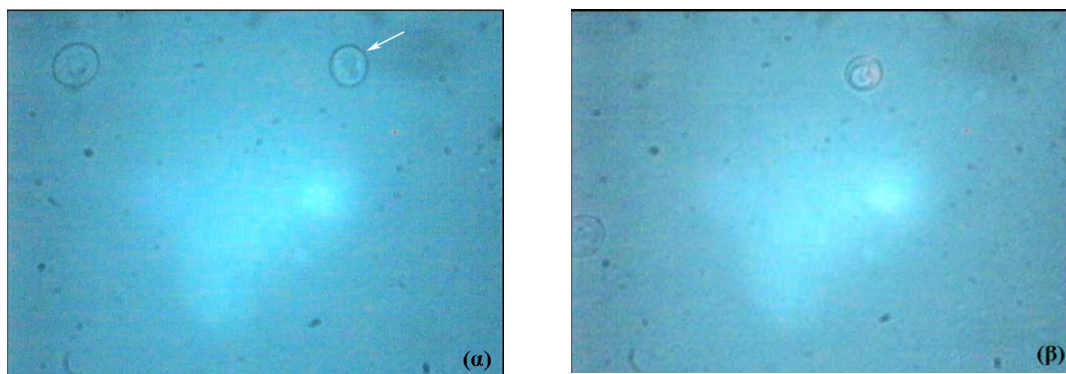
Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μαγιάς και παρακάτω θα δούμε εικόνες από την οπτική παγίδευση. Η βαθμονόμηση της διάταξης έγινε με την μέθοδο της διηλεκτροφόρησης που ανέφερα παραπάνω.



Σχήμα 5.7. Στιγμιότυπο από την παγίδευση ενός κυττάρου μαγιάς. Στην εικόνα μπορούμε να παρατηρήσουμε τη θέση του laser He-Ne και το παγιδευμένο κύτταρο. Το μπλε χρώμα της εικόνας οφείλεται στο φίλτρο αποκοπής του μήκους κύματος του laser, ενώ το έντονο φως που φαίνεται σχεδόν στο κέντρο είναι από το λευκό φως του μικροσκοπίου (σελ. 158, διδακτορική διατριβή της Ε.-Χ. Παπαγιάκουμου, ΕΜΠ, 2005).

Αξίζει να σημειωθεί ότι παρόλο που η τιμή της ισχύος της δέσμης του laser είναι μικρή, η παγίδα λειτούργησε αρκετά σταθερά, αλλά δεν δίνει πολλά περιθώρια για βαθμονόμηση της διάταξης μέσω της μεθόδου της διηλεκτροφόρησης, αφού δεν υπάρχουν πολλά περιθώρια να μεταβάλλει κανείς την ισχύ της δέσμης laser. Παρόλα

αυτά, στο εργαστήριο επιχειρήθηκε μια ενδεικτική βαθμονόμηση, με επιφύλαξη για το αποτέλεσμα μιας και το πλήθος των μετρήσεων ήταν πολύ μικρό.



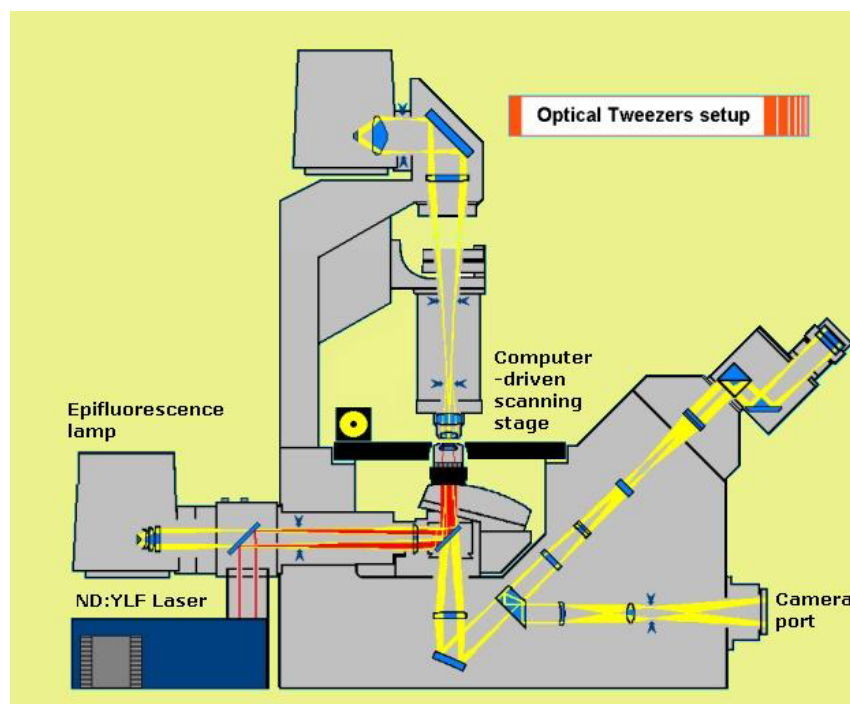
Σχήμα 5.8. Ακτινοβολήση παγιδευμένου κυττάρου μαγιάς με δέσμη laser Er:YAG. Στις εικόνες φαίνεται το κύτταρο (α) χωρίς την επίδραση του laser, (β) μετά από ακτινοβολήση με 10 παλμούς ενέργειας 0,2 mJ και διάρκειας 80 μ s (σελ. 164, διδακτορική διατριβή της Ε.-Χ. Παπαγιάκουμου, ΕΜΠ, 2005)..

6. Εξελίξεις και προοπτικές της οπτικής παγίδευσης

Στη εποχή που διανύουμε και μετά από την αλματώδη εξέλιξη της τεχνολογίας, είναι λογικό, λόγω αυτής της εξέλιξης, να επηρεαστεί θετικά και ο τομέας της οπτικής παγίδευσης. Στις εφαρμογές της οπτικής παγίδευσης στην Βιολογία συνέβαλλε αποφασιστικά η χρήση του «αντεστραμένου οπτικού μικροσκοπίου» (inverted microscope), αντί του συμβατικού ορθού οπτικού μικροσκοπίου. Στη συνέχεια θα αναφέρουμε μερικά στοιχεία για το θέμα αυτό.

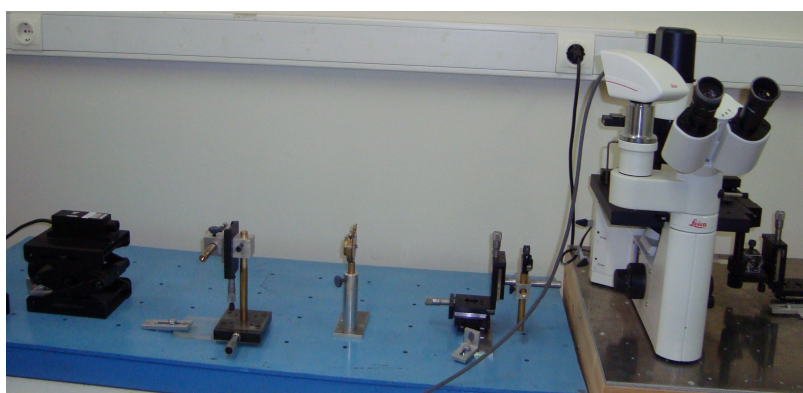
Όπως δείχνει και το όνομά του, τα μέρη ενός ανάστροφου μικροσκοπίου συσχετίζονται αντίστροφα με αυτά από ένα συμβατικό μικροσκόπιο. Η πηγή φωτός και ο συμπυκνωτής είναι στην κορυφή επάνω από τη βάση που τοποθετείται το δείγμα και στοχεύουν προς τα κάτω. Οι αντικειμενικοί φακοί και ο πυργίσκος τοποθετούνται κάτω από τη βάση και στοχεύουν προς τα επάνω. Τα μόνα πράγματα που είναι "τυποποιημένα" είναι ότι: (1) ένα δείγμα (όπως υπαγορεύεται από τους νόμους της βαρύτητας) τοποθετείται πάνω από τη βάση και (2) ο διοφθαλμικός ή προσοφθάλμιος σωλήνας δεν είναι ανάποδος, αλλά στην τυποποιημένη θέση που δείχνει σε μια συμβατική γωνία εξέτασης. Κατά συνέπεια, κάποιος εξετάζει το δείγμα μέσω του κατώτατου σημείου παρά από την κορυφή, χαρακτηριστικά μέσω ενός γυαλιού κάλυψης, όπως σε ένα συμβατικό μικροσκόπιο.

Παρακάτω ακολουθεί μια σχηματική αναπαράσταση από τη βιβλιογραφία, η οποία απεικονίζει την πορεία της δέσμης laser στο εσωτερικό ενός αντεστραμένου μικροσκοπίου, καθώς και ορισμένα στοιχεία από εργαστηριακή διάταξη που αναπτύχθηκε στον Τομέα Φυσικής του ΕΜΠ, στα πλαίσια της διατριβής της Ε. Σπυράτου (ΕΜΠ, 2010).



Σχήμα 6.1. Το εσωτερικό ενός αντεστραμένου μικροσκοπίου καθώς και οι πορείες που ακολουθούν οι δέσμες φωτός και laser.

Στα πλαίσια της διατριβής της Ε. Σπυράτου (ΕΜΠ, 2010), επιλέχθηκε για την ανάπτυξη του συστήματος οπτικής παγίδευσης ένα διοδικό laser και ένα ανάστροφο μικροσκόπιο τροποποιημένο κατάλληλα ώστε να παρεμβάλλεται στο εσωτερικό του μικροσκοπίου ο διχρωϊκός καθρέφτης. Στην διάταξη αυτή, η δέσμη καθώς εισέρχεται στον αντικειμενικό φακό εστιάζεται στο επίπεδο του αντικειμενικού φακού και όχι αυτό του δείγματος, καθώς ο αντικειμενικός φακός απλά σχηματίζει το είδωλο του σωματιδίου, το οποίο δεν βρίσκεται πάνω στην εστία του, αλλά σε απόσταση λίγο μεγαλύτερη από αυτήν. Για να πετύχουμε ισχυρή εστίαση και καλή τρισδιάστατη παγίδευση η δέσμη πρέπει να εστιαστεί στο ίδιο σχεδόν επίπεδο του δείγματος και η διάμετρος της να μεταβληθεί κατάλληλα έτσι ώστε να γεμίσει το αριθμητικό άνοιγμα του αντικειμενικού φακού, όπως περιγράψαμε. Με αυτό τον τρόπο η εστία της δέσμης σχηματίζεται στο εστιακό επίπεδο του αντικειμενικού φακού, το οποίο είναι και το επίπεδο του δείγματος, και έτσι γίνεται δυνατή η ταυτόχρονη παρατήρηση της δέσμης και του παγιδευμένου σωματιδίου.



Σχήμα 6.2. Φωτογραφία του συστήματος οπτικής παγίδευσης με ανάστροφο μικροσκόπιο, το οποίο αναπτύχθηκε στο εργαστήριο «Ανάπτυξη laser και εφαρμογές» στο ΕΜΠ.

Στα πλαίσια της έρευνας για την τεχνική της οπτικής παγίδευσης και τις εφαρμογές της στη Βιολογία και την Ιατρική, αναπτύχθηκαν περισσότερα του ενός συστήματα οπτικής παγίδευσης απλής ή και διπλής δέσμης (οπτική παγίδα-μικροδέσμη laser) στα εργαστήρια της ομάδας «Ανάπτυξης Laser και Εφαρμογών τους» του Τομέα Φυσικής της Σχολής Ε.Μ.Φ.Ε του Ε.Μ.Π. Για παράδειγμα, εκτός από αυτά που αναφέραμε στην εργασία αυτή, ένα σύστημα συνδυάζει διάταξη οπτικής παγίδας (απλού ορθού μικροσκοπίου) με laser He-Ne που εκπέμπει στα 632,8 nm και με διάταξη μικροδέσμης laser από ένα παλμικό laser N₂ με μήκος κύματος εκπομπής στα 337 nm. Ένα άλλο σύστημα συνδυάζει διάταξη οπτικής παγίδας με laser Nd:YAG που εκπέμπει στα 1064 nm με την ίδια διάταξη μικροδέσμης laser που χρησιμοποιήθηκε στο προηγούμενο σύστημα. Τα δύο αυτά συστήματα εφαρμόστηκαν σε κύτταρα μαγιάς, μικροσφαιρίδια PMMA (Poly-methyl-methacrylate) και στα φύκια *ectocarpus siliculosus* (ΚΟΤΣΙΦΑΚΗ ΔΟΜΝΑ, Διδακτορική Διατριβή, ΣΕΜΦΕ – ΕΜΠ, 2012).

ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Optical trap Guide, UCSD Modern Physics Lab, University of Virginia
2. Molloy J. , Padgett M. , Lights, action: Optical tweezers (2002) Contemporary Physics, volume 43, 241-258
3. Maia Neto, M. Nussenzveig ,Theory of Optical Tweezers (2004), Postal 68528
4. Ashkin A. et al, Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles, Optics Letters, Vol. 11, No 5, May 1986.
5. Ashkin A., J.M. Dziedzic. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria, Science, 235, 1517-1520, 1987.
6. Ashkin A., Optical trapping and manipulation of neutral particles using laser, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, (1997).
7. Ashkin A., Trapping of Atoms by Resonance Radiation Pressure, Physical Review Letters, Vol. 40, No 12, 1978.
8. Berns, M.W., Laser scissors and tweezers, Scientific American, 52-57, April 1998.
9. Green N. G., Numerical solution of the dielectrophoretic and traveling wave forces for interdigitated electrode arrays using the finite element method, J. of Electrostatics 56, 235-254, 2002.
10. Greulich, K.O., Micromanipulation by light in Biology and Medicine, Birkhauser Verlag, Basel. Boston, Berlin, 1999.
11. Grover, S.C. Gauthier, R. C. & Skirtach, A. G. Analysis of the behavior of erythrocytes in an optical trapping system, Optics Express 533, Vol. 7, No. 13, 18 December 2000
12. Liu et al, Evidence for localized cell heating induced by IR optical tweezers, Bioph. J. 68.5, 2137-2144, 1995.
13. Malagnino et al, Measurements of trapping efficiency and stiffness in optical tweezers, Opt. Commun. 214, 15-24, 2002.
14. Maxwell J. C., A Treatise on Electricity and Magnetism, 3rd. ed., Vol.1, Ch.ix, Clarendon Press, Oxford, (1891).
15. Mechta, D. A. Pullen, A. K. Spudich, A. J. Single molecule biochemistry using optical tweezers, FEBS Letters 430 23-27, (1998).
16. ΠΕΡΑΚΗΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ, «ΟΠΤΙΚΗ ΠΑΓΙΔΕΥΣΗ: μικροχειρισμός μικροδομών και προσδιορισμός των επαγόμενων δυνάμεων με δέσμη laser», Διπλωματική εργασία, ΣΕΜΦΕ – ΕΜΠ, Ιούνιος 2004.
17. ΠΑΠΑΓΙΑΚΟΥΜΟΥ ΕΙΡΗΝΗ-ΧΡΥΣΟΒΑΛΑΝΤΗ, «Διερεύνηση των φυσικών χαρακτηριστικών και του τρόπου διάδοσης σύμφωνης ακτινοβολίας για την κατανόηση των βασικών μηχανισμών οπτικής παγίδευσης», Διδακτορική διατριβή, ΣΕΜΦΕ – ΕΜΠ, Νοέμβριος 2005.
18. ΣΠΥΡΑΤΟΥ ΕΛΛΑΣ, «Φωτο-βιοφυσικές εφαρμογές των laser και ανάπτυξη μεθοδολογίας μικροχειρισμού νανοσωματιδίων με χρήση οπτικής παγίδας laser», Διδακτορική διατριβή, ΣΕΜΦΕ – ΕΜΠ, Νοέμβριος 2010.
19. ΚΟΤΣΙΦΑΚΗ ΔΟΜΝΑ, «Οπτική Παγίδα και Μικροχειρισμός Διηλεκτρικών Σωματιδίων και Βιολογικών Δειγμάτων Χρησιμοποιώντας Δέσμες Laser», Διδακτορική Διατριβή, ΣΕΜΦΕ – ΕΜΠ, 2012.
20. Rowell, D. N. The Double Helix Gets Trapped, 48, Biophotonics International (May 2002).
20. Schutze, K. Lahr, G. Use of laser technology for microdissection and isolation Application Note, 24, March 1999.
21. See-ger et al, Application of laser optical tweezers in immunology and molecular

- genetics, *Cytometry* 12, 497-504, 1991.
22. Sheetz P. Michael, *Laser tweezers in cell biology*, *Methods in cell biology series*, Vol. 55. Academic Press, 1998.
 23. Stark, W. R. Rubio-Siera, I. F. Thalhammer, S. Heckl, M. W. Combined nanomanipulation by atomic force microscopy and UV -laser ablation for chromosomal dissection, *Eur Biophys L*, 32: 33-39, (2003).
 24. Wagner K. W., *Archiv. Elektrotechnik* 2, S.371-389~ (1914).
 25. Williams C. Mark, *Optical tweezers: Measuring piconewton forces*, 2002.
 26. Y. Harada, T. Asakura, *Opt. Commun.* 124 529, 1996.
 27. Jones B. Thomas, *Basic theory of dielectrophoresis and electrorotation*. *IEEE Engineering in medicine and biology magazine*, November/December 2003.
 28. Liang et al. *Micromanipulation of Chromosome in PTK2 Cells Using Laser Microsurgery (Optical Scalpel) in Combination with Laser-Induced Optical Force (Optical Tweezers)*, *Experimental Cell Research* 204, 110-120 (1993).
 29. Liang, H. et al, *Directed Movement of Chromosome Arms and Fragments in Mitotic Newt Lung Cells Using Optical Scissors and Optical Tweezes*, *Experimental Cell Research* 213, 308-312 (1994).
 30. Lim C. T. et al, *Large deformation of living cells using laser traps*, *Acta Materialia*, 2004.
 31. Liu et al, *Evidence for localized cell heating induced by IR optical tweezers*, *Bioph. J.* 68.5, 2137-2144, 1995.
 32. Misawa, H. Juodkasis, S. *Photophysics and photochemistry of a laser manipulated microparticle*, *Prog. Polym. Sci.* 24 (1999).
 33. Odde J. D. & Renn, I. M. *Laser-guided direct writing for applications in biotechnology*, *Tibtech* (Vol 17), October 1999.
 34. Perkins, T. Smith, D. E. Chu, S. *Science* 64,819 (1994).
 35. Clement-Sengewald A. et al, *Fertilization of bovine oocytes induced solely with combined laser microbeam and optical tweezers*, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol. 13, No.3, pages 260D265, March 1996.
 36. Cui Li et al, *The dielectrophoretic levitation and separation of latex beads in microchips*, *Electrophoresis* 22, 3893-3901, 2001.
 37. Dao M. et al, *Mechanics of the human red blood cell deformed by optical Tweezers*, *Journal of the Mechanics and Physics Solids*, 51, 2259-2280, 2003.
 38. Fallman E. et al, *Optical tweezers based force measurement system for quantitating binding interactions: system design and application for the study of bacterial adhesion*, *Biosensors and Bioelectronics*, 2004.
 39. Fuhr R. Gunter and Reichle Christoph, *Living cells in opto-electrical cages*, *Trends in analytical chemistry*, vol. 19, no. 6, 2000.
 40. Ghislain, P. L. & Webb, W. W. *Scanning-force microscope based on an optical trap*, *Optics Letters*, Vol. 18, No. 19, October 1, 1993.
 41. Green N. G. et al, *Manipulation and trapping of sub-micron bioparticles using dielectrophoresis*, 1. *Biochem. Biophys. Methods* 35, 89-102, 1997a.
 42. Green N. G. and Morgan H., *Dielectrophoretic separation of nano-particles*, J. *Phys. D. Appl. Phys.* 30 (Rapid Communication) L41-L84, 1997b.
 43. Green N. G. and Morgan H., *Sereparation of submicrometre particles using a combination of dielectrophoretic and electrohydrodynamic forces*, *J. Phys. D. Appl. Phys.* 31 (Rapid Communication) L25-L30, 1998.
 44. Green N. G., *Mumerical solution of the dielectrophoretic and traveling wave*

- forces for interdigitated electrode arrays using the finite element method, J. of Electrostatics 56, 235-254, 2002.
45. Greulich, K.O., Micromanipulation by light in Biology and Medicine, Birkhauser Verlag, Basel. Boston, Berlin, 1999.
 46. Grover, S.C. Gauthier, R. C. & Skirtach, A. G. Analysis of the behavior of erythrocytes in an optical trapping system, Optics Express 533, Vol. 7, No. 13, 18 December 2000.

Χρήσιμες ηλεκτρονικές διευθύνσεις

1. <http://www.ipass.net/brianrodr/tweezers.html>
2. <http://www.stanford.edu/group/blocklab/Optical%20Tweezers%20Introduction.htm>
3. http://www.uni-leipzig.de/~pwm/kas/modul_opticalforces/theory.html
4. <http://www.uni-ulm.de/ilm/AdvancedMaterials/Presentation/Arefinopticaltweezers.pdf>
5. <http://electron9.phys.utk.edu/optics507/modules/m10/tweezers.htm>
6. <http://www.ibmm-microtech.co.uk/pages/science /basic.htm>
7. <http://atomsun.harvard.edu/~tweezer/>

8. <http://www.ibmln-lmicrotech.co.uklpa2es/science /basic.html>
9. <http://www.ibmm-microtech.co.uklpa2es/science /dep.htm>
10. <http://atomsun.harvard.edul--tweezer/>
11. <http://VvWYV.pages.drexel.edu/undergrad Irmg23/page9.html>