



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΝΑΤΣΗ ΔΗΜΗΤΡΑΣ

***ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ
LASER ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ ΜΕΣΩ ΤΗΣ
ΧΡΗΣΗΣ ΟΠΤΙΚΩΝ ΛΑΒΙΔΩΝ
(STUDY OF LASER RADIATION INTERACTION WITH
CELLS AND LIPOSOMES BY USING OPTICAL TWEEZERS)***

Ακαδημαϊκή Επιβλέπουσα: **ΜΑΚΡΟΠΟΥΛΟΥ ΜΥΡΣΙΝΗ**, Ομότιμη
Καθηγήτρια ΣΕΜΦΕ - ΕΜΠ,

Επιστημονική επίβλεψη: **ΣΠΥΡΑΤΟΥ ΕΛΛΑΣ**, Διδάσκουσα του Ν.
407.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μακροπούλου Μυρσίνη, Ομότιμη Καθηγήτρια ΕΜΠ

Γεώργιος Τσιγαρίδας, Επίκ. Καθηγ. ΣΕΜΦΕ, ΕΜΠ

Ευστάθιος Ευσταθόπουλος, Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής, ΕΚΠΑ

Αθήνα, Φεβρουάριος 2023

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω, την καθηγήτρια κ. Μακροπούλου Μυρσίνη, της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, ΕΜΠ που μέσα από τις γνώσεις της με έκανε να θέλω να ασχοληθώ με τον κλάδο της Ιατρικής Φυσικής και των laser .

Ευχαριστώ θερμά, επίσης, την Διδάκτορα κ. Σπυράτου Ελλάς για την πολύτιμη καθοδήγηση της σχετικά με την εισαγωγή μου στο λογισμικό COMSOL Multiphysics, και την στήριξη της σε όλη την διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας. Ιδιαίτερα την ευχαριστώ για τη δυνατότητα που μου παρείχε ώστε να εργαστώ και πειραματικά σε εργαστηριακές διατάξεις στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο "ΑΤΤΙΚΟ".

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για όλη την ψυχολογική και υλική υποστήριξη που μου προσέφεραν κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

.....

Δήμητρα Νάτση© (2023) Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. All rights Reserved. Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σ' αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οπτική παγίδευση αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο με εφαρμογές σε διάφορους τομείς όπως η ιατρική, η βιολογία, η μικροηλεκτρονική και η βιομηχανία. Το φαινόμενο της οπτικής παγίδευσης βασίζεται σε φαινόμενα πίεσης ακτινοβολίας και αποτελεί την ακινητοποίηση ενός σωματιδίου της τάξης των νανομέτρων (nm), όταν αυτό βρεθεί υπό την επίδραση μιας φωτεινής δέσμης. Επίσης, η οπτική παγίδευση είναι μια μη-επεμβατική μέθοδος, η οποία μας επιτρέπει τη παγίδευση και το χειρισμό νανοσωματιδίων με την χρήση μιας ισχυρά εστιασμένης δέσμης λέιζερ.

Σ' αυτήν τη διπλωματική εργασία έγινε προσπάθεια για σύγκριση των πειραματικών τιμών της εγκάρσιας συνιστώσας F_x και της αποδοτικότητας της οπτικής παγίδας λιποσωμάτων με τις τιμές που προκύπτουν από θεωρητική προσομοίωση μέσω του υπολογιστικού προγράμματος ComsolMultiphysics. Για τη μέτρηση των οπτικών δυνάμεων που ασκούνται στα λιποσώματα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διηλεκτροφόρησης. Με αυτόν τον τρόπο μετρήθηκαν οι οπτικές δυνάμεις σε λιποσώματα διαμέτρου 850 και 1250 nm για διάφορες τιμές της ισχύος του laser και προσδιορίστηκε η αποδοτικότητα της συμβατικής οπτικής παγίδας.

Αρχικά, στο Κεφάλαιο 1 γίνεται αναφορά στην οπτική παγίδευση θέτοντας τις βάσεις για την κατανόηση των φαινομένων και των εννοιών που θα ακολουθήσουν σε επόμενα κεφάλαια. Ακόμη, γίνεται αναφορά στο πλήθος των εφαρμογών στις οποίες θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί αυτή η διάταξη. Στο Κεφάλαιο 2 αναλύεται η διαδικασία για την ανάπτυξη πειραματικής διάταξης για την οπτική παγίδευση. Για την επίτευξη της οπτικής παγίδας χρησιμοποιήθηκε ένα διοδικό laser με μήκος κύματος εκπομπής στα 660 nm και ένα ανάστροφο μικροσκόπιο με αντικειμενικό φακό αριθμητικού ανοίγματος $NA=1,25$ και μεγέθυνσης 100X. Στη συνέχεια στο 3ο κεφάλαιο αναλύονται οι σημαντικές ιδιότητες των λιποσωμάτων και η χρήση τους για τη μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών. Σημαντικό ρόλο στη συμπεριφορά τους αυτή έχουν οι μηχανικές ιδιότητες των λιπιδικών μεμβρανών. Τέλος, στο Κεφάλαιο 4 περιγράφηκε η διαδικασία που ακολουθήθηκε στο COMSOL και στη συνέχεια έγινε παρουσίαση των αποτελεσμάτων που εξάχθηκαν για την εξάρτηση της αποδοτικότητας από 3 παραμέτρους. Αυτές οι παράμετροι είναι η ισχύς της δέσμης laser, η αδιάστατη παράμετρος $a=a/w_{\text{παγ}}$, (όπου a η ακτίνα του σωματιδίου και $w_{\text{παγ}}$ η ακτίνα της γκαουσιανής δέσμης laser) και η ακτίνα του λιποσώματος.

ABSTRACT

Optical trapping is an important tool with applications in various fields such as medicine, biology, microelectronics and industry. The phenomenon of optical trapping is based on phenomena of pressure of radiation and it constitutes of the immobilization of a particle, with size in the order of nanometers (nm), when this particle is situated under the influence of a laser beam. Also, optical trapping is a non-invasive method, which allows us to trap and manipulate nanoparticles using a highly focused laser beam.

In this thesis an attempt was made to compare the experimental values of the transverse component F_x and the efficiency of the liposome optical trap with the values obtained from theoretical simulation through the ComsolMultiphysics computer program. To measure the optical forces exerted on the liposomes, the dielectrophoresis method was used. In this way, the optical forces on liposomes with diameters of 850 and 1250 nm were measured for various values of the laser power and the efficiency of the conventional optical trap was calculated.

Initially, in Chapter 1 we made a short reference to the phenomena of optical tweezer, explaining the phenomena and the meanings that are used, in the following chapters. Furthermore, we made a reference to the variety of the applications that optical tweezers can be used. In Chapter 2 the procedure for developing an experimental setup for optical trapping is analyzed. To achieve the optical trap, a diode laser with an emission wavelength of 660 nm and an inverted microscope with an objective lens of numerical aperture $NA=1.25$ and 100X magnification were used. Then in the 3rd chapter the important properties of liposomes and their use for the transport of medicinal substances are analyzed. The mechanical properties of lipid membranes play an important role in their behavior. Finally, in Chapter 4 the procedure followed in COMSOL was described and then the results obtained for the dependence of efficiency on 3 parameters were presented. These parameters are the power of the laser beam, the dimensionless parameter $a=aw/w_0$, (where a is the radius of the particle and w_0 is the radius of the Gaussian laser beam) and the radius of the liposome.

Keywords: Optical tweezers, Optical trap, liposomes

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Σχήμα 1.1: Η κίνηση ενός κομήτη γύρω από τον Ήλιο και η φορά της ουράς του σε κάθε σημείο της τροχιάς. Παρατηρούμε ότι ενώ η ουρά θα έπρεπε ν' ακολουθεί την κίνηση του κομήτη, ωστόσο λόγω της ύπαρξης του Ηλίου ακολουθεί εντελώς αντίθετη φορά. Αξίζει επίσης να παρατηρηθεί ότι η ουρά αποτελείται από σωματίδια σε αέρια κατάσταση κι από πιο βαριά σωματίδια που δημιουργούν την «σκόνη»..... 15
- Σχήμα 1.2: Το σχεδιάγραμμα του Ashkin για την ερμηνεία των δυνάμεων που προκύπτουν όταν μια δέσμη ρυθμού TEM₀₀ προσπίπτει σε ένα σφαιρικό διηλεκτρικό σωματίδιο. Οι ακτίνες a και b διαθλώνται στο σωματίδιο και προκύπτουν η συνιστώσα βαθμίδας, F_{grad} , που οδηγεί το σωματίδιο στην περιοχή μεγαλύτερης έντασης και η συνιστώσα σκέδασης, F_{scat} , που το ωθεί στην διεύθυνση διάδοσης του φωτός. 16
- Σχήμα 1.3: Σχηματικό διάγραμμα της διάταξης των 6 αντιδιαμετρικών δεσμών laser, για την παγίδευση ατόμων σε αέρια κατάσταση με σκοπό τη ψύξη τους. 17
- Σχήμα 1.4: Χρονοδιάγραμμα με σημαντικά γεγονότα από εφαρμογές της οπτικής παγίδευσης..... 19
- Σχήμα 1.5: Εφαρμογή οπτικών δυνάμεων σαν αποτέλεσμα της πίεσης ακτινοβολίας 21
- Σχήμα 1.6: Στο αριστερό σχήμα τα μαύρα βέλη μας δείχνουν τις κατευθύνσεις των δύο συνιστωσών της οπτικής δύναμης. Η $F_{scattering}$ έχει κατεύθυνση όπως αυτή της δέσμης του laser, ενώ η $F_{gradient}$ έχει κατεύθυνση προς τον κεντρικό άξονα διάδοσης της δέσμης του laser. Το δεξιό σχήμα μας δείχνει ότι η δύναμη βαθμίδας ουσιαστικά κατευθύνει το σωματίδιο προς το μέρος με την υψηλότερη πυκνότητα, ενώ η F_{net} είναι η συνισταμένη των δύο δυνάμεων, δηλαδή η συνολική οπτική δύναμη 23
- Σχήμα 1.7: Ποιοτική παρουσίαση της παγίδευσης διηλεκτρικών σφαιρών. Η διάθλαση των ακτίνων a και b μας δίνει τις δυο δυνάμεις F_a και F_b . Η

συνισταμένη των δυο δυνάμεων F επαναφέρει το σωματίδιο στην εστία παγίδευσης, όταν αυτό έχει υποστεί αξονική ή και εγκάρσια μετατόπιση. 24

Σχήμα 1.8: Απεικόνιση παγίδευσης ενός διηλεκτρικού σωματιδίου..... 25

Σχήμα 1.9: Μια ακτίνα φωτός προσπίπτει στην επιφάνεια του σωματιδίου υπό γωνία θ . Φαίνονται οι διαδοχικές ανακλάσεις και διαθλάσεις της ακτίνας, και οι δυνάμεις, F_{scat} και F_{grad} που προκύπτουν από τη μεταβολή της ορμής της. Το κέντρο της σφαίρας βρίσκεται πιο πάνω από το σημείο εστίας f 27

Σχήμα 1.10: Σχηματική απεικόνιση των σκεδάσεων Rayleigh και Mie..... 30

Σχήμα 1.11: Η κλίμακα των σωματιδίων, τα οποία μπορούμε να χειριστούμε με οπτικές λαβίδες και κάποια τυπικά παραδείγματα από αυτά. Η κλίμακα δίνεται σε τιμές των μηκών κύματος του φωτός, το οποίο χρησιμοποιείται για την παγίδευση των σωματιδίων. 31

Σχήμα 1.12: Μέτρηση μηχανικών ιδιοτήτων του γενετικού υλικού με τη χρήση οπτικής παγίδευσης 33

Σχήμα 1.13: Απεικόνιση οπτικού διαχωρισμού. Τα σωματίδια που μας ενδιαφέρουν, τα διαχειριζόμαστε μέσω του φαινομένου της οπτικής παγίδευσης 34

Σχήμα 1.14: Το μόριο της κινησίνης είναι προσδεμένο σε μια πλαστική (latex) σφαίρα η οποία χειρίζεται με μια οπτική λαβίδα και τοποθετείται κοντά σε έναν μικροσωληνίσκο σταθεροποιημένο στην επιφάνεια της καλυπτρίδας. Καθώς προχωράει κατά μήκος του μικροσωληνίσκου «παρασέρνει» το σφαιρίδιο και το μετατοπίζει από τη θέση ισορροπίας της παγίδας. 35

Σχήμα 1.15: Υγιές ερυθρό αιμοσφαίριο (αριστερά) και αιμοσφαίριο προσβλεβλημένο από πλασμώδιο (δεξιά)..... 36

Σχήμα 1.16: Συμπίεση των ερυθρών αιμοσφαιρίων χρησιμοποιώντας οπτική παγίδευση 37

Σχήμα 1.17: ανάπτυξη νευρώνα. (Α) Φθορίζουσα απεικόνιση ενός νευρώνα που υπογραμμίζει τη μακροδομή του κώνου ανάπτυξης. (Προσαρμογή από Muñoz-Lasso et al., 2020). (Β) Καθοδήγηση νευρίτη από το Sema3A που απελευθερώνεται από ένα λιπόσωμα μεγέθους μικρομέτρου (από τους Pinato et al.,2012) (C) Αξονική ανάπτυξη μεταξύ ζευγών κυττάρων, τοποθετημένα σε γειτνίαση με οπτική παγίδευση: Η αριστερή στήλη δείχνει κύτταρα αμέσως μετά τον χειρισμό με οπτική παγίδευση, η μεσαία στήλη δείχνει αλληλεπιδράσεις και ανάπτυξη νευραξόνων (μπλε βέλη) μετά από 3 ημέρες in vitro και δεξιά στήλη μετά από 7 ημέρες in vitro.(από τους Clarke et al.,2008). 38

Σχήμα 1.18: Οπτική Παγίδευση σπερματοζωαρίου με σκοπό την μεταφορά του κοντά στο ωάριο για την τεχνητή του γονιμοποίηση. 39

Σχήμα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Φαίνονται τα μεγέθη και οι αποστάσεις που περιγράφηκαν στο κείμενο (εικόνα από Ελλάς Σπυράτου, Διδακτορική διατριβή ΕΜΠ, 2010).....43

Σχήμα 2.2: Το προφίλ της δέσμης στην έξοδο του laser ανιχνευμένο με μια πυροηλεκτρική κάμερα (α), και όπως καταγράφεται από την CCD κάμερα περνώντας από πράσινο φίλτρο που είναι ελάχιστο διαπερατό στο κόκκινο φως του laser. 44

Σχήμα 2.3: Απεικόνιση του εκκολαπτηρίου το οποίο χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων (τα πειράματα έγιναν στο νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟ)... 46

Σχήμα 2.4: κύτταρα μαγιάς όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο με μεγέθυνση x 100 στον αντικειμενικό φακό του μικροσκοπίου μετά από τη ρύθμιση της διάταξης για την οπτική παγίδευση 47

Σχήμα 2.5: κύτταρα siha όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο με μεγέθυνση x 100 στον αντικειμενικό φακό του μικροσκοπίου. 48

Σχήμα 2.6: κύτταρο siha τραχήλου της μήτρας όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο παγιδεύτηκε από τη δέσμη laser 660nm. 48

Σχήμα 2.7: Στιγμιότυπα από βίντεο καταγραφής παγίδευσης κυττάρων. Βλέπουμε το κύτταρο να μετακινείται a),b) ώσπου παγιδεύεται c),d) . Όταν το laser σβήνει, το παγιδευμένο κύτταρο αρχίζει και πάλι να μετακινείται e).	48
Σχήμα 2. 8: Εισαγωγή μείγματος κυττάρων- trypan blue με πιπέτα.	50
Σχήμα 2. 9: a) ένα ζωντανό καρκινικό κύτταρο που παγιδεύεται και b) κάτω από την φωτοθερμική επίδραση της παγίδας για ισχύ 100 mW, χρωματίζεται με το trypan blue c) πλέον έχει επέλθει ο κυτταρικός του θάνατος.	50
Σχήμα 3.1: Δομικά στοιχεία λιποσώματος.....	52
Σχήμα 3.2:Δομή φωσφολιπιδίου	52
Σχήμα 3.3: Σχηματικό διάγραμμα λιπιδικής διπλοστοιβάδας (A), και πως διαμορφώνεται το λιπόσωμα από τα φωσφολιπίδια (B)	53
Σχήμα 3.4: Σφαιρική δομή λιποσώματος.....	55
Σχήμα 3.5: Μέθοδοι παρασκευής λιποσωμάτων	56
Σχήμα 3.6: Χρήση των νανοσυστημάτων στη θεραπεία του καρκίνου	58
Σχήμα 4.1:Γεωμετρία παγιδευμένου σωματιδίου.....	61
Σχήμα 4.2: Στην εικόνα a) βλέπουμε την κυλινδρική γεωμετρία που έχει το PML ενώ στην b) φαίνεται πως περιβάλλει τη σφαίρα	63
Σχήμα 4. 3:Το meshing της γεωμετρίας.....	63
Σχήμα 4.4: Στιγμιότυπο από τη ρύθμιση της παραμέτρου της οποίας συναρτήσει αυτής θα υπολογιστεί η δύναμη F_x	66

Σχήμα 4.5: Πίνακας αποτελεσμάτων όπως εμφανίζεται στο πρόγραμμα COMSOL MULTIPHYSICS	67
Σχήμα 4. 6: Σχηματική αναπαράσταση της Σχήμα 4. 7: Φωτογραφία της διάταξης διάταξης των ηλεκτροδίων.....	70
Σχήμα 4.8: Αριστερά, δυο πλάκες είναι τοποθετημένες παράλληλα με την μεγαλύτερη διάσταση της κάθε μιας να είναι απέναντι στην άλλη. Έτσι, θεωρώντας την διάσταση αυτή πολύ μεγαλύτερη από τις άλλες δυο και αγνοώντας τις περιοχές κοντά στα άκρα, το πεδίο που δημιουργείται είναι ομοιογενές. Ενώ στα δεξιά οι δυο πλάκες είναι τοποθετημένες έτσι ώστε οι πλευρές που «αντικρίζονται» είναι στενές, ώστε δεν μπορούμε να αγνοήσουμε τις ανομοιογένειες που προκαλούνται. Έτσι το πεδίο ανάμεσά τους είναι ανομοιογενές.	70
Σχήμα 4. 9: φαίνεται το πως η φωτοευαισθητοποιός ουσία, του μπλε του μεθυλενίου κατανέμεται στο λιπόσωμα.	71
Σχήμα 4.10: Αποτελέσματα και γραφική παράσταση F-P για $R=0.425\mu\text{m}$ όπως προκύπτουν στο excel για τις τιμές του comsol.....	73
Σχήμα 4.11: Αποτελέσματα και γραφική παράσταση F-P για $R=0.5\mu\text{m}$ όπως προκύπτουν στο excel για τις τιμές του comsol.....	74
Σχήμα 4.12: Εγκάρσια συνιστώσα δύναμης σε σχέση με την ισχύ για λιποσώματα διαμέτρου 850nm (τετράγωνα) και για διάμετρο $d=1,25\mu\text{m}$ (κύκλοι) από το πείραμα.	75
Σχήμα 4.13: Γραφική παράσταση που εμφανίζει τις 2 ευθείες όπως προέκυψαν από τις τιμές των F_x από το comsol συναρτήσει του P για τις 2 τιμές του R.	76
Σχήμα 4.14: Ακτινική δύναμη διαφυγής για ισχύ 1W, $n_m=1,33$, ως συνάρτηση της αδιάστατης παραμέτρου a , για σχετικό δείκτη διάθλασης $m= 1,05$ για βιολογικά δείγματα, $m=1,16$ για πολυμερικά σφαιρίδια και $m=1,20$ για σφαίρες	

πολυστυρενίου. Η ευθεία γραμμή αντιστοιχεί στην προσέγγιση Rayleigh (τροποποιημένο από Nahmias & Odde, 2002)..... 77

Σχήμα 4.15: Δεδομένα από το comsol και γραφική παράσταση της F_x συναρτήσεως του $1/a$ για $P=1W$ 78

Σχήμα 4.16: Διάγραμμα της εγκάρσιας συνιστώσας της οπτικής δύναμης ως συνάρτηση της διαμέτρου των λιποσωμάτων από το πείραμα..... 79

Σχήμα 4.17: Δεδομένα από το comsol και γραφική παράσταση της F_x συναρτήσεως του R 79

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Βασικές αρχές και εφαρμογές της οπτικής παγίδευσης.....	14
1.1 Ορισμός της Οπτικής Παγίδευσης	14
1.2 Λίγα λόγια για την ιστορία της οπτικής παγίδευσης	14
1.3 Βασικές αρχές οπτικής παγίδευσης	19
1.3.1 Πίεση ακτινοβολίας.....	19
1.3.2 Είδη και ανάλυση οπτικών δυνάμεων	23
1.3.3 Ο ρόλος του μεγέθους του σωματιδίου	26
1.4 Εφαρμογές της οπτικής παγίδευσης.....	31
2. Ανάπτυξη πειραματικής διάταξης για την οπτική παγίδα.....	40
2.1 Οπτικός σχεδιασμός	40
2.2 Πειραματική διάταξη.....	44
2.3 Παρατήρηση της παγίδας σε κύτταρα μαγιάς και καρκινικά κύτταρα <i>siha</i> .	45
2.3.1 Καλλιέργεια της Κυτταρικής Σειράς.....	45
2.3.2 Φωτογραφίες από το πρόγραμμα LEICA στον Η/Υ	47
2.3.3 Μέθοδος χρώσης κυττάρων με Trypan Blue	49
3. Λιποσώματα και οι εφαρμογές τους	51
3.1 Εισαγωγή στα λιποσώματα	51
3.1.1 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα Λιποσωμάτων	54
3.1.2 Είδη λιποσωμάτων.....	54
3.2 Εφαρμογές των λιποσωμάτων.....	56
3.3 Φάσεις μετάβασης των λιποσωμάτων	59
4. Μελέτη της οπτικής παγίδας λιποσωμάτων με χρήση του ComsolMultiphysics και σύγκριση αποτελεσμάτων με τα αντίστοιχα πειραματικά	60
4.1 Περιγραφή COMSOL.....	60
4.2 Περιγραφή διαδικασίας	66
4.3 Βαθμονόμηση οπτικής παγίδας διοδικού laser με τη μέθοδο της διηλεκτροφόρησης για λιποσώματα	68
4.3.1 Εισαγωγή.....	68

4.3.2 Το φαινόμενο της διηλεκτροφόρησης.....	68
4.3.3 Βαθμονόμηση οπτικής παγίδας διοδικού laser με τη μέθοδο της διηλεκτροφόρησης	69
4.3.3.1 Πειραματική διάταξη	69
4.3.3.2 Παρασκευή λιποσωμάτων	71
4.4 Παρουσίαση Αποτελεσμάτων / Συμπερασμάτων.....	72
4.4.1 Εξάρτηση από την ισχύ P και υπολογισμός αποδοτικότητας	73
4.4.1.1 Για $R=0,425\mu\text{m}$	73
4.4.1.2 Για $R=0,5\mu\text{m}$	74
4.4.1.3 Σύγκριση με τις πειραματικές αποδοτικότητες.....	74
4.4.2 Μελέτη της F_x για μεταβολή της αδιάστατης παραμέτρου a	77
4.4.3 Μελέτη της F_x για μεταβολή του R	78
Συμπεράσματα και προοπτικές.....	80
Βιβλιογραφία.....	82

1. Βασικές αρχές και εφαρμογές της οπτικής παγίδευσης

1.1 Ορισμός της Οπτικής Παγίδευσης

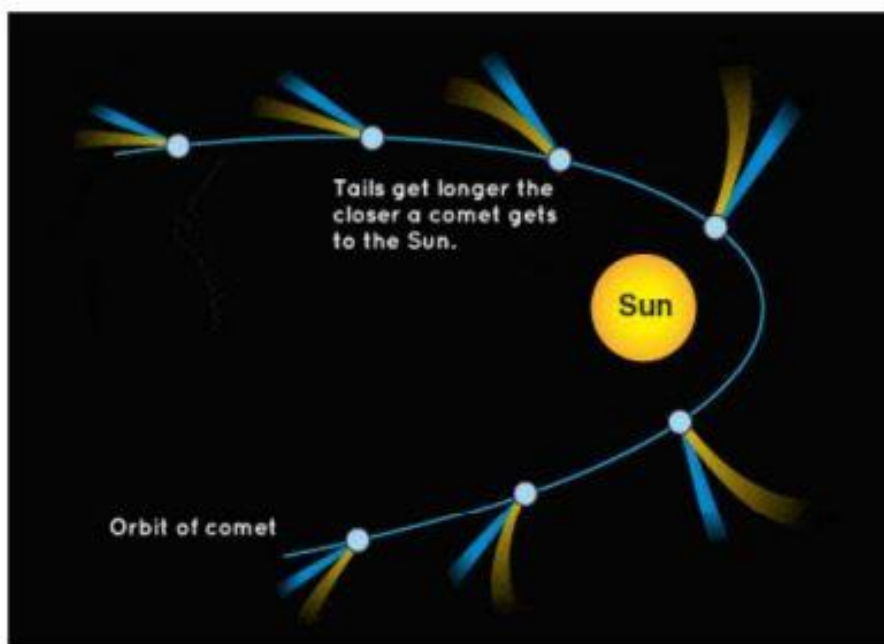
Ο όρος οπτική παγίδα ή οπτική λαβίδα (optical trapping ή optical tweezers στα αγγλικά, αντίστοιχα) αναφέρεται σε μία μη-επεμβατική τεχνική για τον χειρισμό ή ακόμα και την ακινητοποίηση μικροσκοπικών σωματιδίων. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί μία ή περισσότερες δέσμες laser όπου, μετά από την αλληλεπίδραση με την ύλη, λόγω μεταβολής στην πίεση ακτινοβολίας εμφανίζονται οπτικές δυνάμεις σκέδασης και βαθμίδας. Οι δυνάμεις βαθμίδας ωθούν και συγκρατούν το μικροσωματίδιο προς το κέντρο της δέσμης και είναι της τάξεως μερικών piconewtons. Για το φαινόμενο της οπτικής παγίδευσης χρησιμοποιείται ο όρος 'οπτική λαβίδα' (optical tweezers), ανοίγοντας το δρόμο για την ανάπτυξη πολλών εφαρμογών μικροχειρισμού σωματιδίων, ιδιαίτερα στους τομείς της ιατρικής, της βιολογίας και της μικροηλεκτρονικής.

1.2 Λίγα λόγια για την ιστορία της οπτικής παγίδευσης

Η οπτική παγίδα έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πολυάριθμες μελέτες στις φυσικές επιστήμες. Η χρήση οπτικής παγίδας σε σωματίδια τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Φυσικής το 1997 και η εφαρμογή της οπτικής παγίδευσης σε βιολογικά συστήματα τιμήθηκε με το Νόμπελ Φυσικής του 2018 και πάλι. (Xin et al., 2020)

Η πρώτη καταγεγραμμένη παρατήρηση ότι το φως έχει τη δυνατότητα να ασκεί δυνάμεις στην επιφάνεια σωματιδίων έγινε από τον Johannes Kepler, καθώς παρατηρούσε και μελετούσε τους κομήτες. Ήταν εκείνος που το 1619 εισήγαγε την έννοια της πίεσης ακτινοβολίας, στην προσπάθειά του να εξηγήσει το γεγονός ότι οι ουρές των κομητών είχαν διεύθυνση αντίθετη εκείνης του ήλιου (Nieminen et

al.,2007). Συνεχιστής αυτής της θεωρίας σχετικά με την πίεση ακτινοβολίας και ένα από τους πρωτοπόρους της εξήγησης του ζεύγους δυνάμεων ήταν ο John Michell, ο οποίος προσπάθησε να μετρήσει ποσοτικά την πίεση ακτινοβολίας, γύρω στο 18ο αιώνα. Η έννοια της πίεσης ακτινοβολίας εισήχθη θεωρητικά και εξηγήθηκε με μαθηματικό τρόπο από τον James Clerk Maxwell. Η ηλεκτρομαγνητική θεωρία του Maxwell μπόρεσε να προβλέψει την δημιουργία δυνάμεων στην επιφάνεια σωματιδίων, εξαιτίας της μεταβολής της ορμής των φωτονίων της προσπίπτουσας, στο σωματίδιο, ακτινοβολίας.

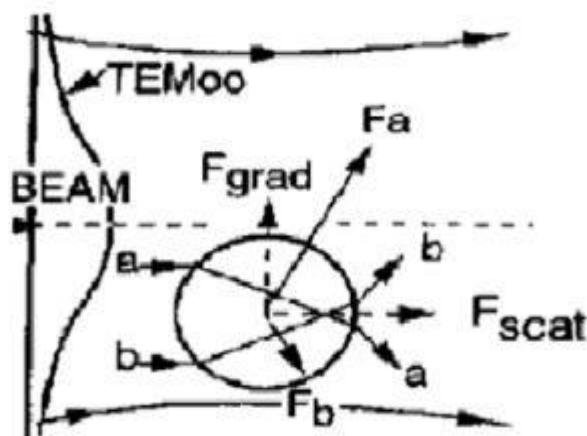


Σχήμα 1.1: Η κίνηση ενός κομήτη γύρω από τον Ήλιο και η φορά της ουράς του σε κάθε σημείο της τροχιάς. Παρατηρούμε ότι ενώ η ουρά θα έπρεπε ν' ακολουθεί την κίνηση του κομήτη, ωστόσο λόγω της ύπαρξης του Ηλίου ακολουθεί εντελώς αντίθετη φορά. Αξίζει επίσης να παρατηρηθεί ότι η ουρά αποτελείται από σωματίδια σε αέρια κατάσταση κι από πιο βαριά σωματίδια που δημιουργούν την «σκόνη». (εικόνα από www.esa.int, "Comet's Orbit")

Παρόλο που υπήρχε η θεωρία πάνω στην πίεση ακτινοβολίας, η πρώτη πειραματική επιβεβαίωση δόθηκε από τους Ledebew και Nichols & Hull στις αρχές του 20ου αιώνα. Ακόμα και μετά την πειραματική επιβεβαίωση, το φαινόμενο της πίεσης της ακτινοβολίας δεν μπορούσε να βρει πρακτικές, τεχνολογικές εφαρμογές. Αυτό συνέβαινε, κατά κύριο λόγο, εξαιτίας του γεγονότος ότι οι δυνάμεις που

αναπτύσσονται λόγω της πίεσης της ακτινοβολίας είναι πολύ ασθενείς (της τάξης των pN) (Nieminen et al.,2007).

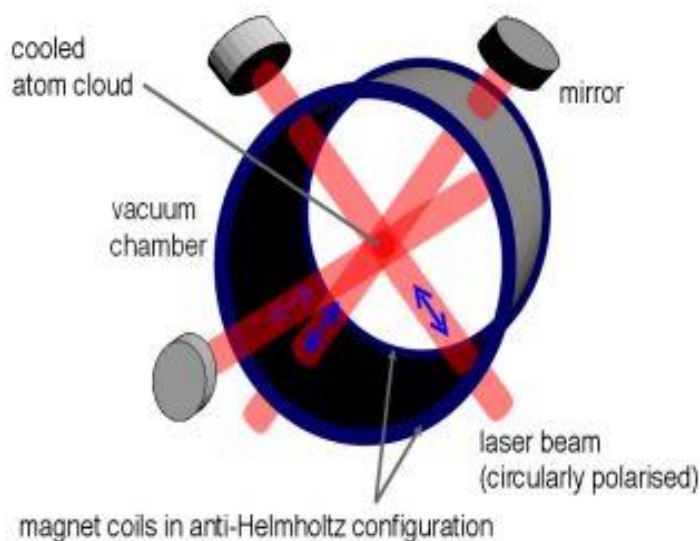
Η πρώτη εφαρμογή της οπτικής παγίδευσης ήρθε το 1969 από τον Arthur Ashkin, ο οποίος παγίδευσε μικρά σωματίδια με τη χρήση μίας απλής δέσμης laser (Ashkin,1970). Στη συνέχεια, μαζί με τους συνεργάτες του, προχώρησε τα πειράματα παγιδεύοντας μικροσωματίδια σε αέρια και υγρά, χρησιμοποιώντας μία διάταξη από δύο δέσμες laser συνεχούς λειτουργίας τοποθετημένες αντιδιαμετρικά (Ashkin,2000- Ashkin & Dziedzic,1973). Ο πλήρης επιστημονικός όρος για την οπτική παγίδευση είναι οπτική παγίδα δύναμης βαθμίδας μονής δέσμης κι οφείλεται στα πρώτα πειράματα που είχε κάνει ο A. Ashkin κι οι συνεργάτες του (Ashkin et al.,1986). Ταυτόχρονα με τη μετακίνηση των σωματιδίων στη διεύθυνση του laser παρατηρήθηκε και μια άλλη δύναμη, κάθετη σε αυτήν τη διεύθυνση, η οποία ωθούσε τα σωματίδια προς την περιοχή μεγαλύτερης έντασης στο κέντρο της δέσμης, η δύναμη βαθμίδας. Ο Ashkin έδειξε ότι και αυτή η δύναμη όπως και η αξονική που κάνει τα σωματίδια να οδηγούνται από το φως, προκύπτουν από την ανάκλαση και διάθλαση των ακτίνων του φωτός στην επιφάνεια του σωματιδίου.



Σχήμα 1.2: Το σχεδιάγραμμα του Ashkin για την ερμηνεία των δυνάμεων που προκύπτουν όταν μια δέσμη ρυθμού TEM₀₀ προσπίπτει σε ένα σφαιρικό διηλεκτρικό σωματίδιο. Οι ακτίνες a και b διαθλώνται στο σωματίδιο και προκύπτουν η συνιστώσα βαθμίδας, F_{grad} , που οδηγεί το σωματίδιο στην περιοχή μεγαλύτερης έντασης και η συνιστώσα σκέδασης, F_{scat} , που το ωθεί στην διεύθυνση διάδοσης του φωτός. (εικόνα από Ashkin 1986)

Επίσης, ήθελαν να χρησιμοποιήσουν την οπτική παγίδευση σε βιολογικά δείγματα, όπως κύτταρα και μικροοργανισμούς χωρίς να προκαλούνται βλάβες στο υλικό

(Ashkin et al.,1987). Ο A. Ashkin μαζί με τον J. M. Dziedzic κατάφεραν να παγιδεύσουν ιούς και βακτήρια, δημιουργώντας οπτική παγίδευση με laser ιόντων Αργού Ar^+ . Εκείνη την περίοδο, ο S. Chu, ένας από τους συνεργάτες του A. Ashkin, μαζί με δική του επιστημονική ομάδα κατασκεύασαν μία διάταξη με 6 δέσμες, τοποθετημένες ανά ζεύγος αντιδιαμετρικά. Ο στόχος τους ήταν η παγίδευση ατόμων σε τρεις διαστάσεις με αποτέλεσμα την επιβράδυνσή τους, άρα και ψύξη της αέριας κατάστασης στην οποία βρίσκονταν τα άτομα. Η ονομασία που δόθηκε σ' αυτήν την τεχνική ήταν "Doppler cooling". Έτσι οι S. Chu, C. Cohen-Tannoudji και W. Phillips έλαβαν το βραβείο Nobel Φυσικής, το 1997, λόγω του επιτυχημένου αποτελέσματος της «Ανάπτυξης μεθόδων επιβράδυνσης και παγίδευσης ατόμων με δέσμη laser»(Chu et al.,1985- Press Release). Η παγίδα όμως δεν ήταν τόσο ισχυρή ώστε να μπορεί να συγκρατεί τα άτομα για αρκετή ώρα. Η εξέλιξη αυτής της τεχνικής πραγματοποιήθηκε από μία άλλη ομάδα και η διαφοροποίηση ήταν στη προσθήκη δύο πηνίων με σκοπό την εμφάνιση μαγνητικού πεδίου με φορά αντίθετη απ' αυτήν της βαρύτητας, κάνοντας την παγίδα πιο ισχυρή (Phillips & Metcalf, 1987)



Σχήμα 1.3: Σχηματικό διάγραμμα της διάταξης των 6 αντιδιαμετρικών δεσμών laser, για την παγίδευση ατόμων σε αέρια κατάσταση με σκοπό τη ψύξη τους. (εικόνα από Oder Zeichner, "An experimental setup of a magneto-optical trap")

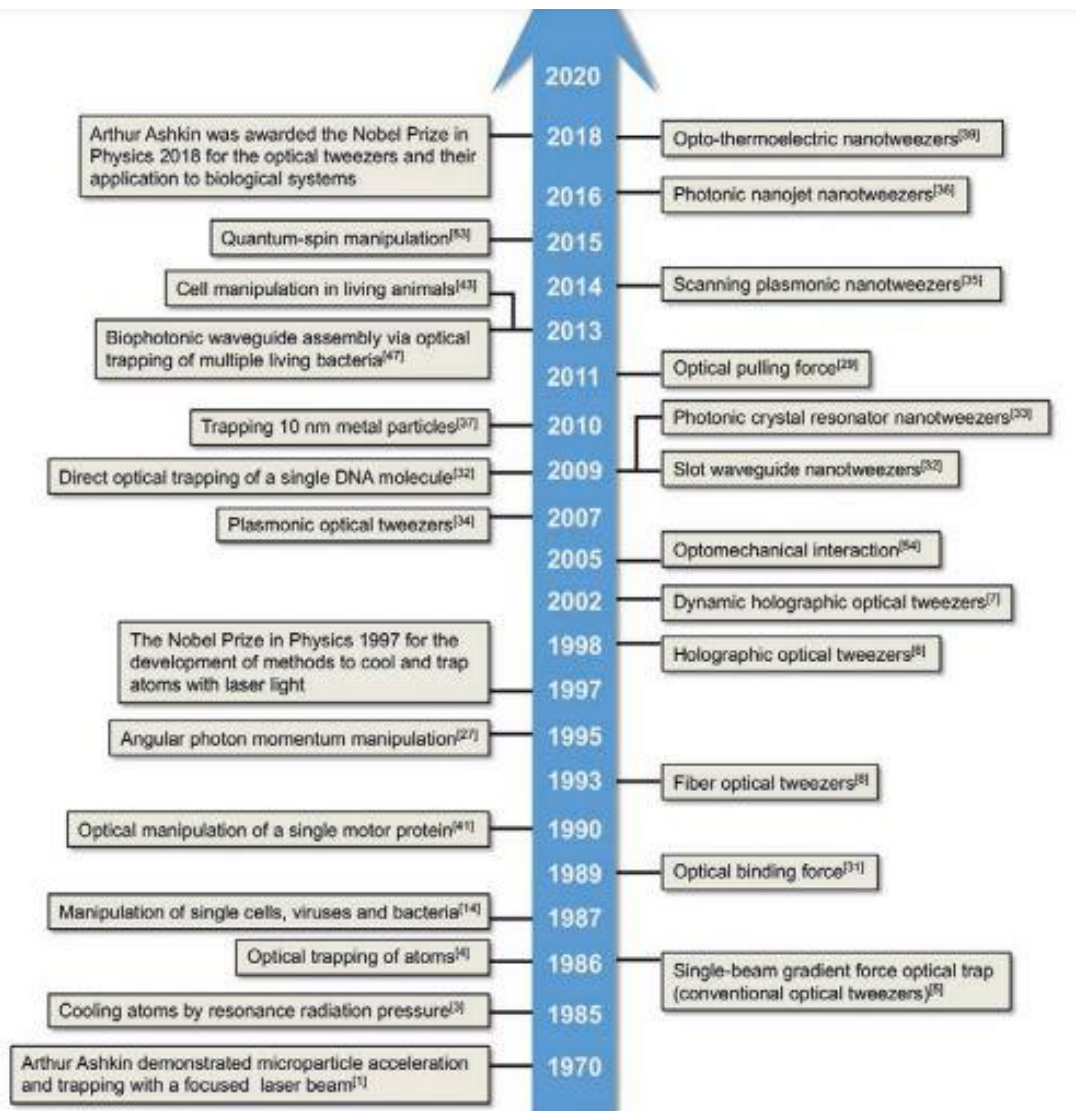
Η προσπάθεια παγίδευσης και μικροχειρισμού σωματιδίων συνεχίστηκε, με αποτέλεσμα να παγιδευτούν κύτταρα από τον Ashkin (Ashkin, 1997). Η αρχική ιδέα του Ashkin ήταν ότι παρόλο που οι δυνάμεις που προκύπτουν από την πίεση της

ακτινοβολίας ήταν μικρές, η μετατόπιση και ο χειρισμός μικρών σωματιδίων απαιτούσαν κι αυτά μικρές δυνάμεις.

Το 1993, ο A. Constable κι οι συνεργάτες του δημιούργησαν μία νέα διάταξη οπτικής παγίδευσης χρησιμοποιώντας μονότροπες οπτικές ίνες. Οι δέσμες laser οδηγούνταν πλέον μέσω οπτικών ινών, κάτι που προσέδιδε περισσότερη ελευθερία που ήταν σημαντική, όπως η μετακίνηση του δείγματος για τροποποίηση, καθώς κι η αφαίρεση ή η προσθήκη διαφόρων οργάνων από τη διάταξη οπτικής παγίδας. (Constable et al., 1993)

Το 2005, οι V. Garcés-Chávez, K. Dholakia και G. C. Spalding παρουσίασαν μία νέα διάταξη που μπορούσε να παγιδεύσει μαζικά μικροσωματίδια με περιοδικότητα και τα οποία απείχαν σταθερή απόσταση μεταξύ τους. Η διάταξη αυτή ονομάστηκε «Οπτική παγίδευση χωρίς φακούς» και χρησιμοποιούσε ένα ημικυκλικό πρίσμα κι ένα οπτικό φράγμα Ronchi (Garcés-Chávez et al., 2005)

Το 2008, ο M. Kreysing κι οι συνεργάτες του παρουσίασαν μία νέα διάταξη οπτικής παγίδευσης, η οποία χρησιμοποιούσε πάλι δύο οπτικές ίνες τοποθετημένες αντιδιαμετρικά, μόνο που σ' αυτήν την περίπτωση η μία εκ των δύο ινών ήταν πολύτροπη, εν αντιθέσει με το καθιερωμένο μοντέλο που χρησιμοποιούσε μόνο μονότροπες ίνες. Το αποτέλεσμα ήταν η δυνατότητα περιστροφής των παγιδευμένων μικροσωματιδίων γύρω από τον άξονα που διαπερνά τις οπτικές ίνες (Kreysing et al., 2008).



Σχήμα 1.4: Χρονοδιάγραμμα με σημαντικά γεγονότα από εφαρμογές της οπτικής παγίδευσης (εικόνα από Xin et al., 2020)

1.3 Βασικές αρχές οπτικής παγίδευσης

1.3.1 Πίεση ακτινοβολίας

Για να μπορέσουμε να αναλύσουμε το φαινόμενο της πίεσης ακτινοβολίας στην οπτική παγίδευση, αλλά και για να εξηγήσουμε στις επόμενες ενότητες τα είδη των οπτικών δυνάμεων που ασκούνται στο παγιδευμένο σωματίδιο, θα χρησιμοποιήσουμε μια περιγραφή με στοιχεία από τον κλασικό ηλεκτρομαγνητισμό και την κβαντομηχανική.

Η ακτινοβολία laser, που μας ενδιαφέρει στην μελέτη αυτή είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και μπορούμε να την εξετάσουμε είτε από την κυματική είτε από την σωματιδιακή της φύση, που δεν είναι άλλη από τα φωτόνια, τον φορέα της ηλεκτρομαγνητικής δύναμης. Το φωτόνιο είναι το κβάντο της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας κι η ενέργειά του δίνεται από την σχέση :

$$E = h\nu = \hbar\omega \quad (1.1)$$

όπου h η σταθερά του Planck και ν η συχνότητα του φωτονίου.

Κάθε φωτόνιο όμως, έχει κι ορμή p . Η σχέση που συνδέει την ορμή του φωτονίου με την ενέργειά του είναι :

$$E = pc \Rightarrow p = \frac{E}{c} \quad (1.2)$$

Η παραπάνω σχέση αφορά την ορμή των φωτονίων στο κενό. Εάν το μέσο στο οποίο διαδίδονται τα φωτόνια έχει δείκτη διάθλασης n , τότε η σχέση (1.2) τροποποιείται ως εξής:

$$p = \frac{nE}{c} \quad (1.3)$$

διότι η ταχύτητα των φωτονίων εντός του συγκεκριμένου μέσου δεν είναι c , όπου c η ταχύτητα στο κενό, αλλά $u = c/n$.

Όταν μία δέσμη φωτονίων που ταξιδεύει εντός ενός μέσου με δείκτη διάθλασης n_1 πέσει πάνω σε επιφάνεια με δείκτη διάθλασης n_2 (όπου $n_2 > n_1$), τότε ένα μέρος της δέσμης θ' ανακλαστεί κι ένα θα διέλθει.

Σύμφωνα, με τις εξισώσεις Fresnel μπορούμε να υπολογίσουμε τους συντελεστές ανάκλασης R και διάδοσης T . (Ashkin and Dziedzic, 1973)

Χρησιμοποιώντας τη σχέση (1.3) λέμε ότι η ορμή της προσπίπτουσας δέσμης είναι

$$p = n_1 E / c \quad \text{κι αντίστοιχα της ανακλώμενης} \quad p_R = n_1 R E / c$$

και της διαδιδόμενης $p_T = n_1 (1 - R) E / c$

Λόγω της αρχής διατήρησης της ορμής, η ορμή θα πρέπει να διατηρείται πάνω στη διεπιφάνεια, άρα θα ισχύει

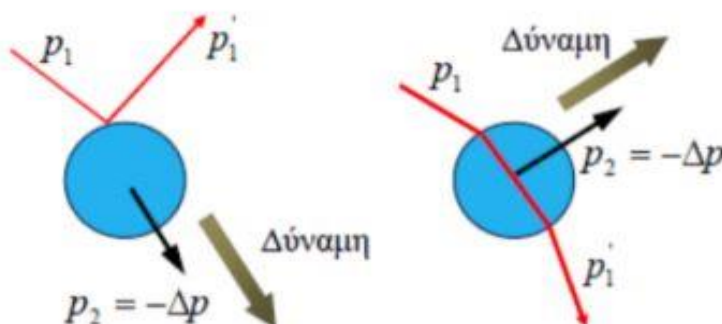
$$p = p_T - p_R \quad (1.4)$$

Επειδή, όμως, πάντοτε ένα ποσοστό της ενέργειας της προσπίπτουσας δέσμης απορροφάται από το υλικό μέσα στο οποίο η αρχική δέσμη θα διαδοθεί, ακόμα κι αν είναι πολύ μικρό, η σχέση (1.4) τροποποιείται σε

$$p = p_T - p_R + \Delta p \Rightarrow \Delta p = p + p_R - p_T \quad (1.5)$$

Σύμφωνα με τον 2ο νόμο του Newton, η μεταβολή της ορμής Δp θα ασκήσει μία δύναμη F πάνω στην επιφάνεια, η οποία μπορεί να υπολογιστεί από την σχέση

$$F = \frac{\Delta p}{\Delta t} \quad (1.6)$$



Σχήμα 1.5: Εφαρμογή οπτικών δυνάμεων σαν αποτέλεσμα της πίεσης ακτινοβολίας (εικόνα από Δόμνα Κοτσιφάκη, Διδακτορική διατριβή 2012)

Λαμβάνοντας υπόψη τη σχέση (1.3) η προηγούμενη σχέση μπορεί να γραφεί ως

$$F = \frac{n_1 \Delta E}{c \Delta t} \quad (1.7)$$

Γνωρίζοντας δε, ότι η ισχύς είναι $P = \Delta E / \Delta t$, η σχέση (1.7) γράφεται ως

$$F = \frac{n_1 P_{abs}}{c} \quad (1.8)$$

όπου P_{abs} η ισχύς της δέσμης που απορροφήθηκε.

Τροποποιώντας την σχέση (1.8) προσθέτοντας έναν συντελεστή Q που περιγράφει το ποσό της ορμής (ενέργειας) που απορροφήθηκε, η σχέση (1.8) μπορεί να γραφεί ως

$$F = \frac{n_1 Q P}{c} \quad (1.9)$$

όπου P η ισχύς της αρχικής δέσμης.

Ο συντελεστής ποιότητας Q είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας, διότι μέσω αυτού μπορούμε να κρίνουμε την απόδοση μίας οπτικής παγίδας. Στη βιβλιογραφία απαντάται ως "quality factor Q " ή "effective quality factor of optical trap Q ". Το Q παίρνει τιμές μικρότερες της μονάδας, με $Q=1$ όταν έχουμε πλήρη απορρόφηση.

Τέλος, διαιρώντας και τα δύο μέλη της σχέσης (1.9) με το εμβαδόν της επιφάνειας που προσπίπτει η δέσμη, έχουμε

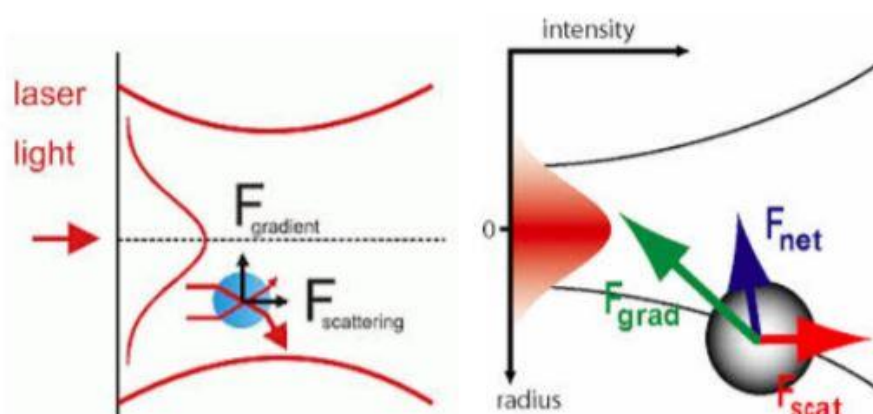
$$P_{press} = \frac{n_1 Q I}{c} \quad (1.10)$$

όπου P_{press} η πίεση της ακτινοβολίας πάνω στην επιφάνεια και I η ένταση της δέσμης, στη δική μας περίπτωση του laser.

1.3.2 Είδη και ανάλυση οπτικών δυνάμεων

Η οπτική δύναμη για να γίνει κατανοητή, μπορεί ν' αναλυθεί σε δύο συνιστώσες: η μία να είναι παράλληλη στον άξονα διάδοσης του φωτός και η άλλη να είναι παράλληλη στη διεύθυνση της χωρικής βαθμίδας του φωτός, δηλαδή του ηλεκτρικού πεδίου.

Η πρώτη αναφέρεται ως δύναμη σκέδασης κι η δεύτερη ως δύναμη βαθμίδας, όπως έχει καθιερωθεί από τους θεμελιωτές της οπτικής παγίδευσης. (Ashkin, 1970- Gordon, 1973)



Σχήμα 1.6: Στο αριστερό σχήμα τα μαύρα βέλη μας δείχνουν τις κατευθύνσεις των δύο συνιστωσών της οπτικής δύναμης. Η $F_{\text{scattering}}$ έχει κατεύθυνση όπως αυτή της δέσμης του laser, ενώ η F_{gradient} έχει κατεύθυνση προς τον κεντρικό άξονα διάδοσης της δέσμης του laser. Το δεξιό σχήμα μας δείχνει ότι η δύναμη βαθμίδας ουσιαστικά κατευθύνει το σωματίδιο προς το μέρος με την υψηλότερη πυκνότητα, ενώ η F_{net} είναι η συνισταμένη των δύο δυνάμεων, δηλαδή η συνολική οπτική δύναμη. (Web.stanford.edu, "Optical Tweezers Introduction" - Soft Matter Physics Division, University Leipzig, "The forces arising in the Rayleigh regime for such a tightly focused laser beam")

Η δύναμη βαθμίδας δημιουργείται λόγω της έντονης βαθμίδας πεδίου που αναπτύσσεται σε μια περιοχή, κοντά στην εστία της δέσμης του laser. Κάθε

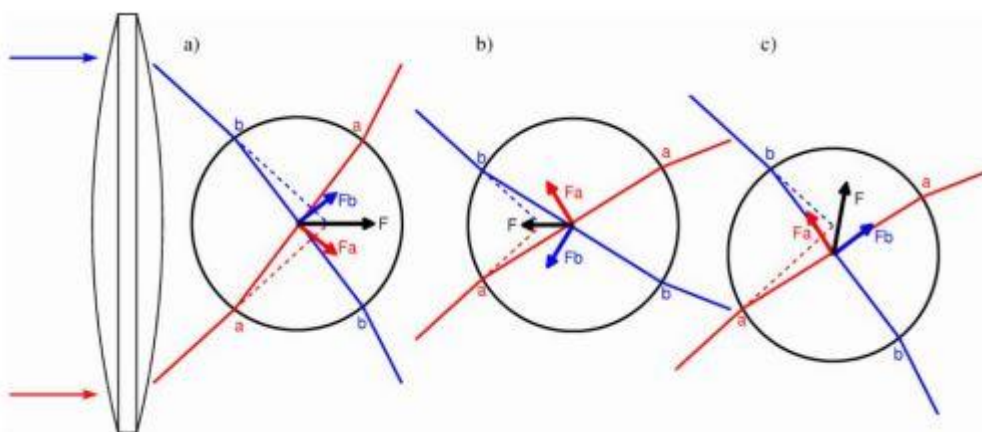
ηλεκτρομαγνητικό κύμα, όπως είναι και το φως στη δική μας περίπτωση, δημιουργεί πόλωση σε κάθε υλικό το οποίο βρίσκεται μέσα σε αυτό (Griffith,2012).

Η κατεύθυνση της δύναμης βαθμίδας είναι προς την εστία της δέσμης του laser, όταν ο δείκτης διάθλασης του σωματιδίου είναι μεγαλύτερος από εκείνον του περιβάλλοντος υλικού. Σε αντίθετη περίπτωση, όταν δηλαδή ο δείκτης διάθλασης του σωματιδίου προς παγίδευση είναι μικρότερος από εκείνον του περιβάλλοντος μέσου, η δύναμη βαθμίδας έχει την τάση να οδηγεί το σωματίδιο που επιθυμούμε να παγιδεύσουμε, σε σημεία όπου η βαθμίδα του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου είναι ασθενέστερη(Zhang,2004- Gauthier,2005).

Η δύναμη βαθμίδας είναι ανάλογη με την πολωσιμότητα και τη βαθμίδα της έντασης του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου, όπως φαίνεται και από τη σχέση που την ορίζει:

$$\vec{F}_{grad} = \frac{\alpha}{2} \nabla |\vec{E}|^2 \quad (1.11)$$

Η συγκεκριμένη σχέση ισχύει για σωματίδια πολύ μικρότερα από το μήκος κύματος της δέσμης laser.



Σχήμα 1.7: Ποιοτική παρουσίαση της παγίδευσης διηλεκτρικών σφαιρών. Η διάθλαση των ακτίνων a και b μας δίνει τις δυο δυνάμεις Fa και Fb. Η συνισταμένη των δυο δυνάμεων F επαναφέρει το σωματίδιο στην εστία παγίδευσης, όταν αυτό έχει υποστεί αξονική ή και εγκάρσια μετατόπιση.

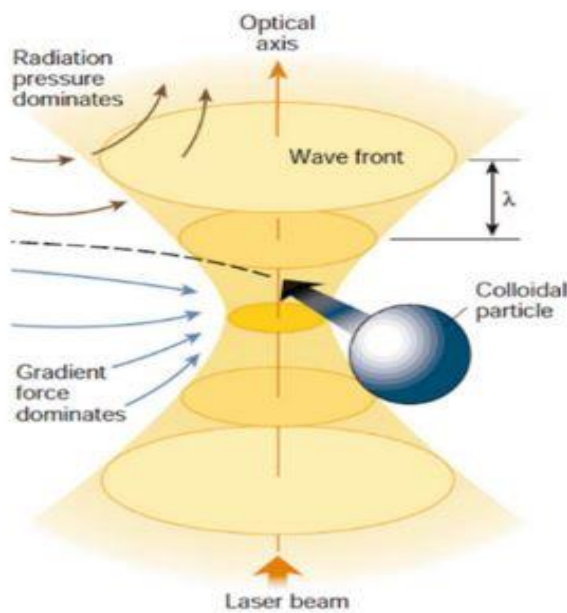
Για να έχουμε μια σταθερή οπτική παγίδα είναι αναγκαίο η δύναμη βαθμίδας να είναι μεγαλύτερη κατά μέτρο από τη δύναμη σκέδασης. Με αυτόν τον τρόπο, η δύναμη που ασκείται στο σωματίδιο στη φορά της διεύθυνσης της δέσμης, δηλαδή η δύναμη

σκέδασης F υπερνικάται από τη δύναμη βαθμίδας F_{grad} που τραβά το σωματίδιο στην περιοχή της εστίας της δέσμης. Αποτέλεσμα αυτού είναι το σωματίδιο να μένει σταθερό και ακινητοποιημένο στην εστία της δέσμης του laser.

Η δύναμη βαθμίδας συμπεριφέρεται σαν δύναμη επαναφοράς, όταν μετατοπίσουμε ένα ήδη παγιδευμένο σωματίδιο. Σε περίπτωση που μετακινήσουμε κάποιο σωματίδιο από το σταθερό σημείο παγίδευσης του και εφόσον η οπτική παγίδα είναι σταθερή, τότε η δύναμη βαθμίδας θα τείνει να το επαναφέρει στο σημείο παγίδευσης (Nieminen et al., 2007- Molloy et al., 2002). Η δύναμη επαναφοράς περιγράφεται από τη σχέση:

$$\vec{F} = -k\vec{x} \quad (1.12)$$

όπου x η μετατόπιση του σωματιδίου μακριά από το σημείο παγίδευσης και k ο συντελεστής ακαμψίας της οπτικής παγίδας. Αυτός ο συντελεστής αποτελεί το μέτρο σύγκρισης μεταξύ των οπτικών παγίδων για τον προσδιορισμό της ισχύος τους.



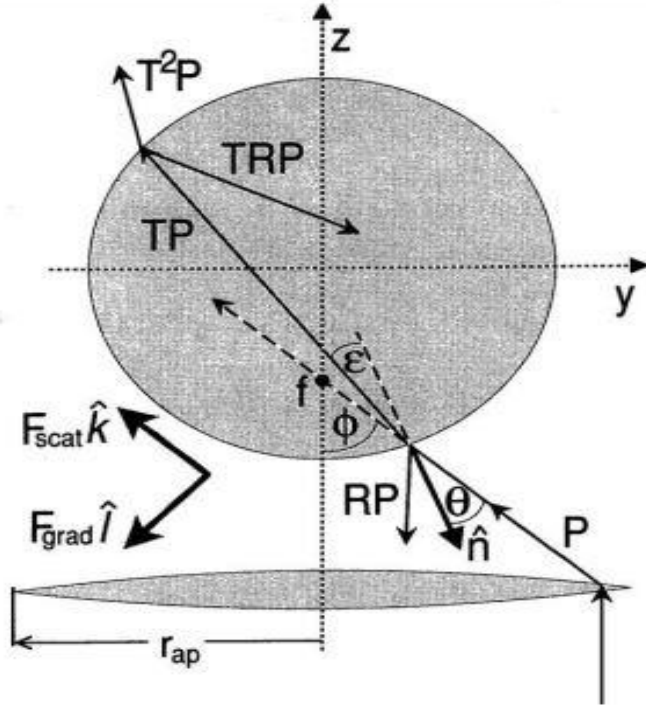
Σχήμα 1.8: Απεικόνιση παγίδευσης ενός διηλεκτρικού σωματιδίου.

1.3.3 Ο ρόλος του μεγέθους του σωματιδίου

Για να υπολογίσουμε τις συνιστώσες της οπτικής δύναμης, δηλαδή τη δύναμη σκέδασης $F_{\text{scattering}}$ και τη δύναμη βαθμίδας F_{gradient} , θα πρέπει να λάβουμε υπόψη μας και μία άλλη παράμετρο. Η παράμετρος αυτή είναι η σχέση μεταξύ του μεγέθους του σωματιδίου στο οποίο προσπίπτει η δέσμη και του μήκους κύματος της προσπίπτουσας δέσμης. Σε αυτήν την περίπτωση, υπάγονται δύο κατηγορίες. Η προσέγγιση Mie ή σκέδαση Mie και η προσέγγιση Rayleigh ή σκέδαση Rayleigh. Θα αναλύσουμε τις δύο παραπάνω προσεγγίσεις προϋποθέτοντας ότι το εξεταζόμενο σωματίδιο είναι σφαιρικό κι έχει ακτίνα r .

1^η περίπτωση

Στην περίπτωση που το σωματίδιο είναι πολύ μεγαλύτερο από το μήκος κύματος της δέσμης λ , δηλαδή $r \gg \lambda$, μπορούμε να προσεγγίσουμε το πρόβλημα μέσω της γεωμετρικής οπτικής ή της προσέγγισης Mie παίρνοντας καλά αποτελέσματα. Η θεωρία Mie, ουσιαστικά αποτελεί ένα σύνολο λύσεων των εξισώσεων του Maxwell οι οποίες έχουν την μορφή απείρων σειρών. Η αρχή διατήρησης της ορμής των φωτονίων της προσπίπτουσας στα σωματίδια ακτινοβολίας, εφαρμόζεται σε αυτή την περίπτωση με μεγάλη επιτυχία. Καθώς η ακτινοβολία προσπίπτει πάνω στο σωματίδιο, ένα μέρος της ανακλάται προκαλώντας μια δύναμη πάνω στο σωματίδιο, που το αναγκάζει να μετατοπιστεί προς την κατεύθυνση διάδοσης της φωτεινής δέσμης. Η κυματική φύση του φωτός δεν λαμβάνεται υπόψη σε αυτή την περίπτωση και άρα σχετικά φαινόμενα όπως η περίθλαση θεωρούνται αμελητέα. Στο παρακάτω σχήμα μια ακτίνα προσπίπτει στην επιφάνεια σφαίρας υπό γωνία θ και ένα ποσό της ισχύος της, PR , ανακλάται ενώ το υπόλοιπο, PT , εισέρχεται στο σωματίδιο, όπου P είναι η ισχύς του laser και T και R οι συντελεστές Fresnel για τη διάδοση και ανάκλαση αντίστοιχα. Από αυτό ένα μέρος ανακλάται στο εσωτερικό του σωματιδίου και το υπόλοιπο PT^2 εξέρχεται από αυτό και ούτω καθεξής. Η συνολική δύναμη από αυτήν την ακτίνα είναι το άθροισμα της συνεισφοράς των εξερχόμενων ακτίνων, $PR, PT^2, PT^2R, PT^2R^2, \dots, PT^2R^n$ (Ashkin, 1992)



Σχήμα 1.9: Μια ακτίνα φωτός προσπίπτει στην επιφάνεια του σωματιδίου υπό γωνία θ . Φαίνονται οι διαδοχικές ανακλάσεις και διαθλάσεις της ακτίνας, και οι δυνάμεις, F_{scat} και F_{grad} που προκύπτουν από τη μεταβολή της ορμής της. Το κέντρο της σφαίρας βρίσκεται πιο πάνω από το σημείο εστίας f . (Ashkin 1992)

Λαμβάνοντας υπόψη τους συντελεστές Fresnel, R για το ανακλώμενο κύμα και T για το διαθλώμενο κύμα, καθώς επίσης τη γωνία πρόσπτωσης θ και τη γωνία διάθλασης r , ο Ashkin υπολόγισε τις δύο συνιστώσες της δύναμης βάσει της γεωμετρικής οπτικής, την F_z στην αξονική διεύθυνση διάδοσης και την F_y στην εγκάρσια διεύθυνση διάδοσης.

$$F_z = F_{scat} = \frac{n_{env}P}{c} \left\{ 1 + R \cos 2\theta - \frac{T^2 [\cos(2\theta - 2r) + R \cos 2\theta]}{1 + R^2 + 2R \cos 2r} \right\} \quad (1.13)$$

$$F_y = F_{grad} = \frac{n_{env}P}{c} \left\{ R \sin 2\theta - \frac{T^2 [\sin(2\theta - 2r) + R \sin 2\theta]}{1 + R^2 + 2R \cos 2r} \right\} \quad (1.14)$$

όπου n_{env} ο δείκτης διάθλασης του μέσου που περιβάλλει το σκεδαστή (π.χ. σωματίδιο), P η ισχύς της προσπίπτουσας δέσμης και c η ταχύτητα του φωτός στο κενό. Παρατηρούμε ότι τόσο η δύναμη σκέδασης όσο κι η δύναμη βαθμίδας εξαρτώνται από την πόλωση της δέσμης του laser, αφού οι συντελεστές Fresnel R και T είναι διαφορετικοί για s-πολωμένη και p πολωμένη δέσμη, αντίστοιχα.

2^η περίπτωση

Αν το προς παγίδευση σωματίδιο, έχει διαστάσεις συγκρίσιμες με το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, δηλαδή για $r \sim \lambda$ καμία από τις 2 προσεγγίσεις Rayleigh ή Mie δεν δίνει ακριβή αποτελέσματα. Σε αυτή τη περίπτωση χρησιμοποιείται ο τανυστής τάσης Maxwell.

Οι οπτικές δυνάμεις προκύπτουν όπως αναφέρθηκε από μεταβολές της ορμής όταν μια δέσμη σκεδάζεται από ένα σωματίδιο. Σύμφωνα με την ηλεκτρομαγνητική θεωρία η συνολική δύναμη που δρα σε ένα σωματίδιο όγκου V και επιφάνειας S υπολογίζεται με τη βοήθεια του τανυστή τάσης του Maxwell, T , ως εξής (Griffiths 2004, κεφ7, ελληνική μετάφραση):

$$\mathbf{F} = \oint_S \vec{T} d\mathbf{a} - \epsilon_0 \mu_0 \frac{d}{dt} \int_V \mathbf{S} d\tau$$

όπου S το διάνυσμα Poynting, $d\mathbf{a} = \eta d\mathbf{a}$ το στοιχειώδες εμβαδό και η το κάθετο διάνυσμα σε αυτό και $d\tau$ ο στοιχειώδης όγκος. Στην στατική περίπτωση και παίρνοντας τη μέση χρονική τιμή της δύναμης, ο δεύτερος όρος της προηγούμενης σχέσης μηδενίζεται και η δύναμη υπολογίζεται με τον τύπο:

$$\langle \mathbf{F} \rangle = \left\langle \int_S \vec{T} d\mathbf{a} \right\rangle$$

με τον τανυστή τάσης του Maxwell να ισούται με

$$T_{ij} = \epsilon_0 (E_i E_j - \frac{1}{2} \delta_{ij} E^2) + \frac{1}{\mu_0} (B_i B_j - \frac{1}{2} \delta_{ij} B^2)$$

όπου E και B το ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο αντίστοιχα και οι δείκτες i και j αντιστοιχούν στις συντεταγμένες x , y και z .

Αυτό το πρόβλημα ανάγεται στην εύρεση λύσης των εξισώσεων Maxwell και της εφαρμογής των κατάλληλων συνοριακών συνθηκών στην επιφάνεια του σωματιδίου που παγιδεύεται, για το προσπίπτον, σκεδαζόμενο και εσωτερικό πεδίο. Η πιο διαδεδομένη λύση σε αυτό το πρόβλημα είναι αυτή του Mie (θεωρία σκέδασης Lorentz-Mie) που περιγράφει την σκέδαση ενός επίπεδου κύματος από ένα σφαιρικό σωματίδιο. Ο τανυστής τάσης ουσιαστικά εκφράζει την δύναμη ανά μονάδα εμβαδού που ασκείται σε μια στοιχειώδη επιφάνεια, κάτι το οποίο ισοδυναμεί με πίεση.

Ο Gouesbet και οι συναδέλφοι του (Gouesbet et al., 1988), επέκτειναν την θεωρία Lorentz-Mie, για να υπολογίσουν την σκέδαση μιας γκαουσιανής δέσμης από σωματίδιο ανεξάρτητου μεγέθους. Η δύναμη στην περίπτωση που εφαρμόζεται μια τέτοια θεωρία δίνεται γενικά από τον τύπο (Nahmias & Odde, 2002):

$$\mathbf{F}(\mathbf{r}) = \frac{n_m}{c} \frac{2P}{\pi w_0^2} [\bar{x}C_{pr,x}(\mathbf{r}) + \bar{y}C_{pr,y}(\mathbf{r}) + \bar{z}C_{pr,z}(\mathbf{r})]$$

όπου οι συντελεστές, $C_{pr,x}, C_{pr,y}$, και $C_{pr,z}$, είναι οι διατομές για την πίεση ακτινοβολίας (Gouesbet et al., 1988)

3^η περίπτωση

Η προσέγγιση Rayleigh αφορά πολύ μικρά σωματίδια σε σχέση με το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. ($r \ll \lambda$) Το σωματίδιο στην περίπτωση αυτή θεωρείται ως ένα σημειακό δίπολο που επάγεται από το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο. Οι συνιστώσες της οπτικής δύναμης μπορούν να διαχωριστούν εύκολα, δείχνοντας μας μάλιστα τη σχέση του μήκους κύματος με τη δύναμη σκέδασης. Όσο πιο μεγάλο είναι το μήκος κύματος τόσο πολύ μικρότερη είναι η δύναμη σκέδασης, εφόσον

$$F_{scat} \sim 1/\lambda^4 \quad \text{και}$$

$$\vec{F}_{scat} = \frac{n_{env} \sigma \langle \vec{S} \rangle}{c} = \frac{n_{env} \sigma I_0}{c} \quad (1.15)$$

$$\sigma = \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 \quad (1.16)$$

όπου,

σ η διατομή σκέδασης της δέσμης,

$\langle S \rangle$ η μέση τιμή του διανύσματος Poynting,

I_0 η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας,

n_{env} ο δείκτης διάθλασης του περιβάλλοντος χώρου,

c η ταχύτητα του φωτός στο κενό,

λ το μήκος κύματος της ακτινοβολίας

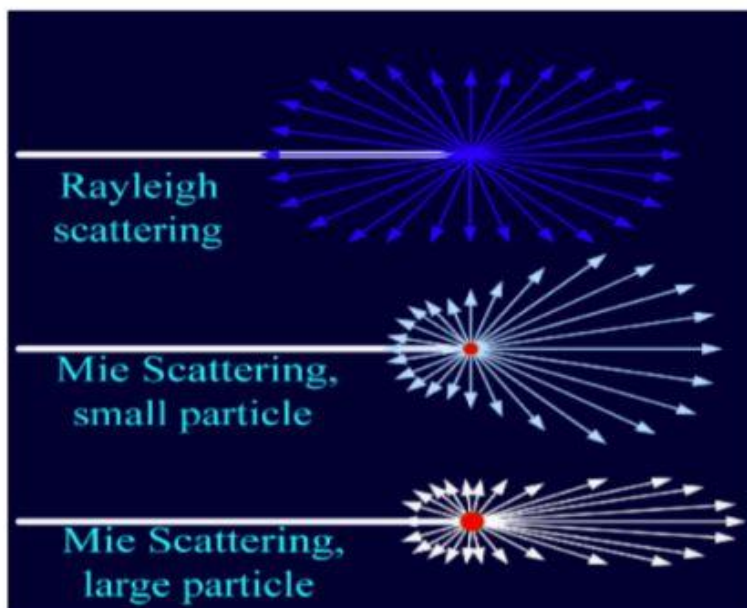
$m = n_p/n_{env}$ το κλάσμα του δείκτη διάθλασης του σωματιδίου προς τον δείκτη διάθλασης του περιβάλλοντος μέσου (Kerker,1969- Ashkin et al.,1986)

Όσο για τον υπολογισμό της δύναμης βαθμίδας χρησιμοποιήθηκε η σχέση (1.11)

$$\vec{F}_{grad} = \frac{\alpha}{2} \nabla |\vec{E}|^2 \quad (1.11)$$

$$\alpha = n_{env}^2 r^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \quad (1.17)$$

όπου α η πολωσιμότητα του σωματιδίου (Novotny,1997- Ashkin et al.,1986)



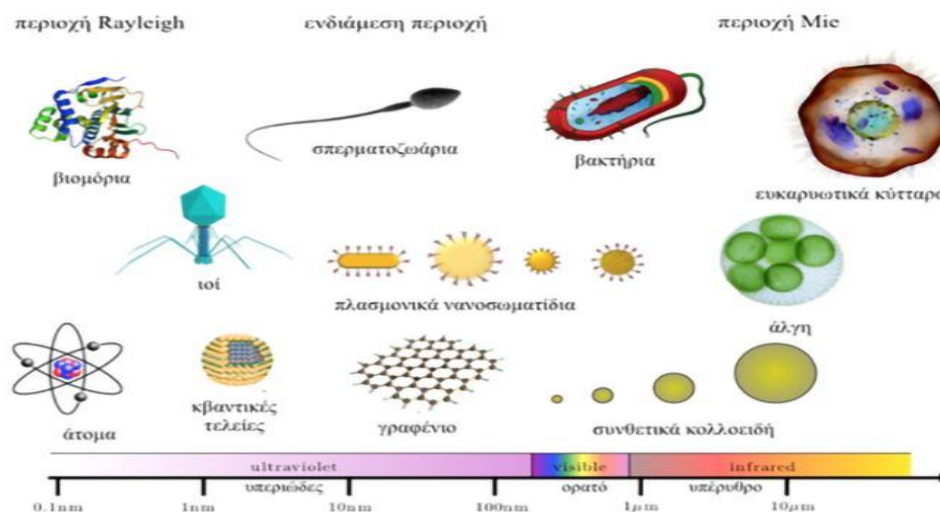
Σχήμα 1.10: Σχηματική απεικόνιση των σκεδάσεων Rayleigh και Mie

Μια αυξημένη ισχύς laser θα είχε ως αποτέλεσμα μια πολύ μεγάλη αύξηση στη δύναμη σκέδασης, με αποτέλεσμα η παγίδευση να μην είναι σταθερή και το σωματίδιο να παρασύρεται από αυτήν, κατά τη διεύθυνση διάδοσης της δέσμης.

Στην περίπτωση που το μέγεθος του σωματιδίου είναι αρκετά μικρότερο από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, το κύμα μπορεί να παρασύρει το σωματίδιο, χωρίς η δύναμη βαθμίδας να είναι σε θέση να το συγκρατήσει στην περιοχή της εστίασης, εξαιτίας του μικρού του μεγέθους. Αντίθετα, σωματίδια με μέγεθος συγκρίσιμο ή μεγαλύτερο του μήκους κύματος δεν μπορούν να παρασυρθούν από αυτό, δημιουργώντας κατάλληλες συνθήκες για την επιτυχία της οπτικής παγίδευσης. Τέλος, η δύναμη βαθμίδας είναι ανάλογη του παράγοντα r^3 για διηλεκτρικά σωματίδια.

1.4 Εφαρμογές της οπτικής παγίδευσης

Η οπτική παγίδευση είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο που βρίσκει εφαρμογές σε πολλούς τομείς της επιστήμης, από τη βιολογία και την ιατρική, μέχρι τη μικροηλεκτρονική και τη χημεία. Ο μικροχειρισμός και ο προσδιορισμός των μηχανικών ιδιοτήτων της ύλης, τόσο για μεταλλικά όσο και για διηλεκτρικά υλικά, ήταν πολύ χρήσιμος σε επιστήμες όπως η χημεία και η βιολογία, ώστε να μπορέσουν να μελετηθούν ιδιότητες που πρωτίτερα ήταν αδύνατον.

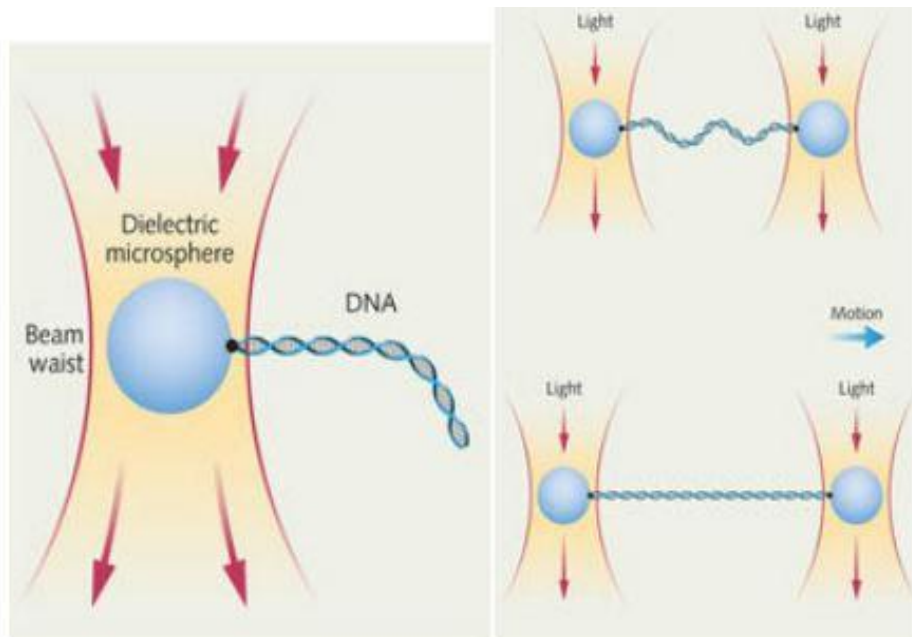


Σχήμα 1.11: Η κλίμακα των σωματιδίων, τα οποία μπορούμε να χειριστούμε με οπτικές λαβίδες και κάποια τυπικά παραδείγματα από αυτά. Η κλίμακα δίνεται σε τιμές των μηκών κύματος του φωτός, το οποίο χρησιμοποιείται για την παγίδευση των σωματιδίων (Jones, 2016).

Οι οπτικές λαβίδες έχουν αποδειχθεί ιδανικό εργαλείο για τη μελέτη της δυναμικής των λεγόμενων *μοριακών μηχανών* (molecular machines), ένα παράδειγμα των οποίων είναι το μόριο της μυοσίνης. Μια μοριακή μηχανή λειτουργεί χάρη στη χημική ενέργεια που απελευθερώνεται από υδρόλυση τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), η οποία τελικά μετασχηματίζεται σε μια κίνηση των νημάτων ακτίνης και μυοσίνης που καθορίζει τη συστολή μυών. Έχει μελετηθεί ο μηχανισμός της μυϊκής συστολής εξετάζοντας την λειτουργία της μυοσίνης και της ακτίνης και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης (Dholakia et al., 2007). Τα πρώτα πειράματα προς αυτήν την κατεύθυνση πραγματοποιήθηκαν στα μέσα της δεκαετίας του 1990 (Jones, 2016).

Επίσης, ένας πολύ ενδιαφέρον τομέας της ιατρικής όπου βρίσκει εφαρμογή η οπτική λαβίδα είναι η μελέτη των κυττάρων δολοφόνων. Μια πολύ σύντομη περιγραφή της διαδικασίας είναι ότι με την βοήθεια της δέσμης laser γίνεται παγίδευση κυττάρων-δολοφόνων και στη συνέχεια τα κύτταρα αυτά έρχονται σε επαφή με κύτταρα-στόχους με σκοπό την μελέτη του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς και την αλλαγή στην μορφολογία των κυττάρων που έρχονται σε επαφή με τέτοιου είδους κύτταρα. (Seeger et al.,1991 – Glass et al.,2017)

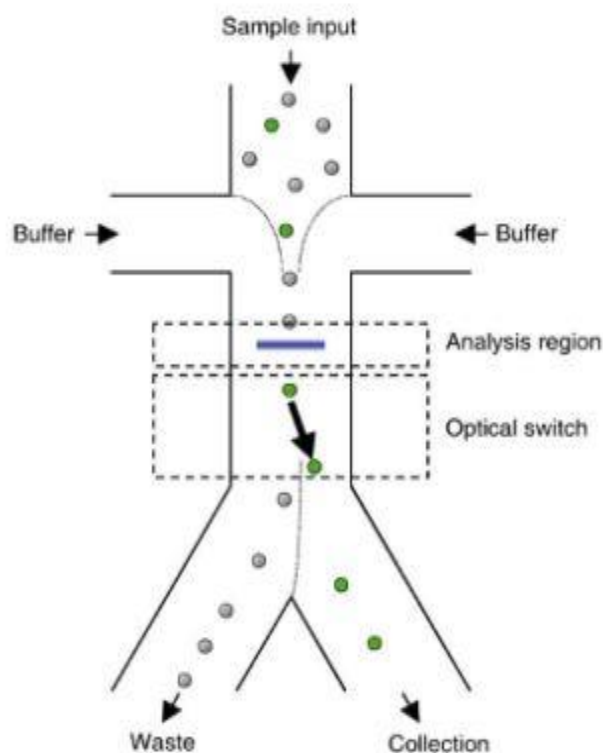
Με την ανάπτυξη διατάξεων οπτικής παγίδευσης, δόθηκε η δυνατότητα μελέτης των μηχανικών ιδιοτήτων του γενετικού υλικού. Τα δύο ελεύθερα άκρα του γενετικού υλικού (DNA) αποτελούνται από αζωτούχες βάσεις, οι οποίες είναι αρνητικά φορτισμένες. Με χημικούς τρόπους προσδένονται πάνω σε σωματίδια-σφαίρες, τα οποία με τη σειρά τους παγιδεύονται σε δύο διαφορετικές οπτικές παγίδες. Αφού βεβαιωθούμε ότι τα σωματίδια είναι καλά παγιδευμένα, δηλαδή έχουμε σταθερά σημεία παγίδευσης, τότε ξεκινάμε και αποκρύνουμε το ένα σε σχέση με το άλλο. Το μόριο του DNA αρχίζει τότε να επιμηκύνεται και να εφελκύεται, καθώς η απομάκρυνση των δύο σφαιρών γίνεται όλο και μεγαλύτερη. Έτσι, με κατάλληλο χειρισμό των παγίδων, δίνεται η δυνατότητα μέτρησης της αντοχής του DNA, με σκοπό την μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου καθώς και την αλληλουχία των βάσεων του γενετικού υλικού (Stevenson et al.,2010- Smith et al.,1996- Raghunathan et al.,2011).



Σχήμα 1.12: Μέτρηση μηχανικών ιδιοτήτων του γενετικού υλικού με τη χρήση οπτικής παγίδευσης(εικόνα από Stevenson et al.,2010)

Μια άλλη εφαρμογή της οπτικής παγίδευσης είναι ο οπτικός διαχωρισμός (optical sorting ή optical micromanipulation)(Marchington et al.,2008- Dholakia et al.,2007). Το μέγεθος καθώς και το υλικό από το οποίο αποτελείται το σωματίδιο προς παγίδευση παίζουν καθοριστικό ρόλο για την παγίδευσή του. Για να επιτευχθεί μια σταθερή οπτική παγίδευση, τα χαρακτηριστικά του σωματιδίου χρειάζεται να συνδυαστούν κατάλληλα με τις ιδιότητες της δέσμης του laser. Μια συγκεκριμένη ακτινοβολία επιδρά διαφορετικά πάνω σ' ένα σωματίδιο, ασκώντας μεγαλύτερη ή μικρότερη δύναμη σε αυτό, ανάλογα με τις οπτικές ιδιότητές του. Εφόσον, η οπτική παγίδευση μπορεί να επέμβει σ' ένα δείγμα ανέπαφα, μπορούμε να διαχωρίσουμε σωματίδια με διαφορετικά χαρακτηριστικά και να τα διαχειριστούμε χρησιμοποιώντας μια φωτεινή ακτινοβολία. Ο οπτικός διαχωρισμός μπορεί να γίνει με μία ή με δύο δέσμες laser, ενώ η χρήση αισθητήρων είναι απαραίτητη. Αυτή η εφαρμογή του φαινομένου της οπτικής παγίδευσης, βρίσκει εφαρμογές στην ιατρική και τη βιολογία, αλλά και στη βιομηχανία των υλικών. Όσον αφορά τον τομέα της βιολογίας, μέσω του οπτικού διαχωρισμού δίνεται η δυνατότητα διαχώρισης των συστατικών του αίματος και διαχείρισής τους, ακόμα και διαχωρισμού κυττάρων (Li et al.,2013), προσφέροντας την ικανότητα ταυτοποίησης βιολογικών υλικών και ανίχνευσης ασθενειών. Έτσι, το φαινόμενο της οπτικής παγίδευσης έδωσε τη δυνατότητα να συλλέγουμε υλικά, χωρίς την επέμβαση κάποιου εργαλείου με μικρό

κόστος και μεγάλη διακριτική ικανότητα, αφού η φύση του φωτός μπορεί να ξεχωρίσει ακόμα και πολύ μικρές διαφορές μεταξύ των σωματιδίων με τα οποία έρχεται σε επαφή. Υπάρχουν πολλές κατηγορίες κυττάρων που είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός τους με σκοπό την μελέτη τους, όπως για παράδειγμα ο διαχωρισμός καρκινικών και υγιών κυττάρων, ο διαχωρισμός των κυττάρων του αίματος κτλ.

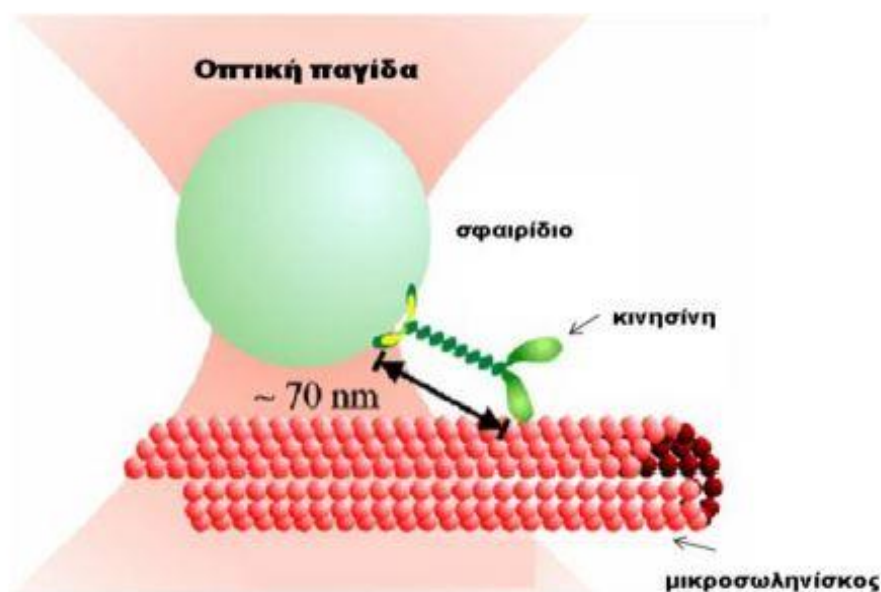


Σχήμα 1.13: Απεικόνιση οπτικού διαχωρισμού. Τα σωματίδια που μας ενδιαφέρουν, τα διαχειριζόμαστε μέσω του φαινομένου της οπτικής παγίδευσης (Dholakia et al.,2007)

Ακόμη, με τον οπτικό χειρισμό μικρών σωματιδίων, μπορούμε ακόμα και να μεταφέρουμε φάρμακα ή γενικά άλλες χημικές ουσίες και να τις τοποθετήσουμε επιλεκτικά πάνω σε κύτταρα (McGloin&Reid,2010). Με αυτό τον τρόπο, δίνεται η δυνατότητα διαχείρισης βιολογικών μορίων που δεν ήταν εύκολο να διαχειριστούν πρωτύτερα, ενώ ταυτόχρονα οι ουσίες μπορούν είτε να μελετηθούν στο εργαστήριο *in vitro*, είτε να εισαχθούν σε ζωντανό οργανισμό *in vivo*. Εκτός όμως από τις πολλαπλές βιολογικές εφαρμογές, η οπτική παγίδευση μπορεί να χρησιμοποιηθεί και

στον τομέα της μικροηλεκτρονικής, όπου με τη βοήθεια μιας δέσμης laser, δίνεται η δυνατότητα μετακίνησης και διαχειρισμού σωματιδίων πολύ μικρών διαστάσεων.

Βέβαια, σημαντική είναι η συνεισφορά της παγίδευσης στη μελέτη των βιοφυσικών διεργασιών όπως η παραγωγή δύναμης από βιομοριακούς κινητήρες ή από άλλα βιολογικά πολυμερή, λειτουργώντας ως αισθητήρας δυνάμεων μεμονωμένων μορίων (single molecule force transducer). Τα βιολογικά πολυμερή προς μελέτη, όπως το DNA και οι πρωτεΐνες, καθότι είναι πολύ μικρά συνδέονται συνήθως με μια σφαίρα πολυστυρενίου ή latex, που λειτουργούν σαν χερούλια για τον χειρισμό των πρώτων. Η παγίδευση γίνεται στα σφαιρίδια και όχι απευθείας στο βιολογικό υλικό επιτυγχάνοντας μεγαλύτερη σταθερότητα και λιγότερη βλάβη από το φως. Με αυτό τον τρόπο έχει μελετηθεί η κίνηση της κινησίνης κατά μήκος ενός μικροσωληνίσκου (Svoboda et al., 1994) Το μόριο της κινησίνης είναι προσδεμένο σε μια πλαστική (latex) σφαίρα, την οποία χειρίζεται κανείς με μια οπτική λαβίδα και τοποθετείται κοντά σε έναν μικροσωληνίσκο σταθεροποιημένο στην επιφάνεια της καλυπτρίδας.

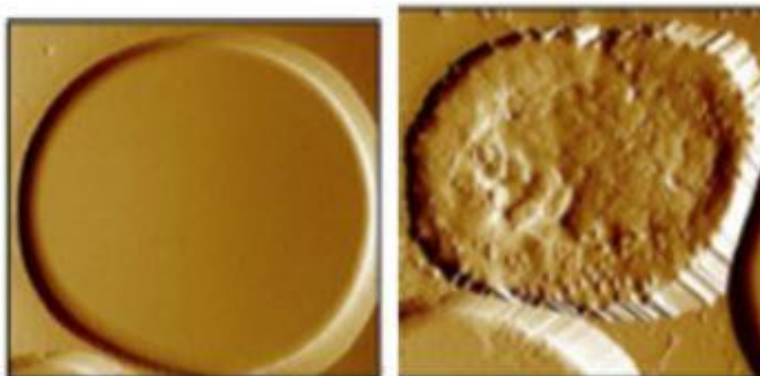


Σχήμα 1.14: Το μόριο της κινησίνης είναι προσδεμένο σε μια πλαστική (latex) σφαίρα η οποία χειρίζεται με μια οπτική λαβίδα και τοποθετείται κοντά σε έναν μικροσωληνίσκο σταθεροποιημένο στην επιφάνεια της καλυπτρίδας. Καθώς προχωράει κατά μήκος του μικροσωληνίσκου «παρασέρνει» το σφαιρίδιο και το μετατοπίζει από τη θέση ισορροπίας της παγίδας. (εικόνα από Τσουνάι Ε., Διπλωματική Εργασία)

Όταν η κινησίνη αλληλεπιδρά με τον μικροσωληνίσκο, το σφαιρίδιο μετακινείται ανάλογα, επηρεαζόμενο από την κίνηση της. Με την κατάλληλη βαθμονόμηση θέσεως και δυνάμεων του συστήματος της παγίδας, οι μετατοπίσεις του σφαιριδίου από την θέση ισορροπίας της παγίδας της τάξεως των μερικών νανομέτρων και οι δυνάμεις, της τάξεως των pN που παράγονται μπορούν να μετρηθούν.

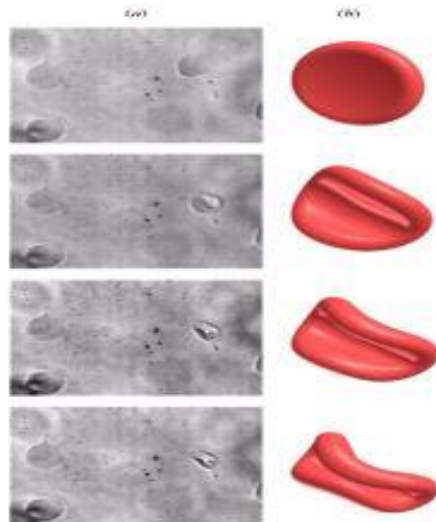
Άλλη εφαρμογή της οπτικής παγίδευσης στο χώρο της ιατρικής είναι η χρήση τους για την διάγνωση του βακτηρίου του πλασμωδίου, το οποίο ευθύνεται για την πρόκληση ελονοσίας. Το βακτήριο μεταφέρεται μέσω μολυσμένων κουνουπιών και μπορεί να βρίσκεται μέσα στον οργανισμό, χωρίς να υπάρχουν συμπτώματα της ελονοσίας ή να μπορεί να διαγνωσθεί η ασθένεια με άλλο τρόπο. Το πλασμώδιο προσβάλλει τα ερυθρά αιμοσφαίρια, αλλάζοντάς τους τις μηχανικές ιδιότητες και κάνοντάς τα πιο άκαμπτα.

Με την οπτική παγίδευση, προκαλείται η παραμόρφωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και προσδιορίζεται η παρουσία ή μη του πλασμωδίου. Στην περίπτωση που η φωτεινή ακτινοβολία μπορεί να τα αναδιπλώσει κατά μήκος του πεπλατυσμένου επιπέδου τους, έχουμε απουσία του βακτηρίου, ενώ όταν αυτά είναι τελείως άκαμπτα, έχουμε την προσβολή του οργανισμού από πλασμώδιο, το οποίο μπορεί να εξελιχθεί σε ελονοσία.



Σχήμα 1.15: Υγιές ερυθρό αιμοσφαίριο (αριστερά) και αιμοσφαίριο προσβλεβημένο από πλασμώδιο (δεξιά)(Ang et al.,2006)

Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται η πίεση που ασκεί η ακτινοβολία στα ερυθρά αιμοσφαίρια, με αποτέλεσμα να τα αναδιπλώνει, δίνοντας τη δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου για τη διάγνωση της ελονοσίας.



Σχήμα 1.16: Συμπίεση των ερυθρών αιμοσφαιρίων χρησιμοποιώντας οπτική παγίδευση(εικόνα από Ghosh et al.,2006)

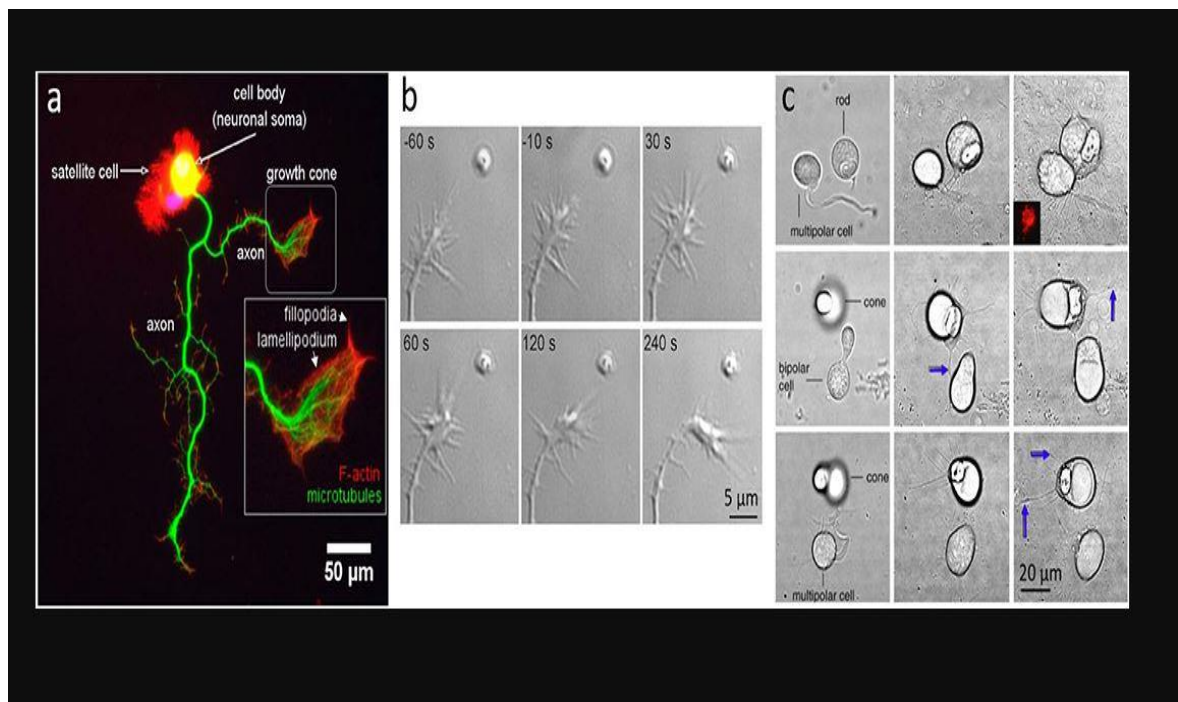
Η μέθοδος αυτή αποτελεί έναν εύκολο, φθηνό και άμεσο τρόπο για την πρόωρη διάγνωση της ελονοσίας, τη στιγμή που άλλες μεθόδους αποτυγχάνουν και τα φάρμακα για την καταπολέμηση της ασθένειας είναι πολύ ακριβά. (Ang et al.,2006- Rancourt-Grenier et al.,2010)

Στη βιβλιογραφία έχουν καταγραφεί και κλινικές εφαρμογές σχετικά με την διάγνωση και θεραπεία ασθενειών όπως για παράδειγμα το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Βέβαια τέτοιου είδους μελέτες δεν γίνονται αποκλειστικά με τη χρήση οπτικής παγίδας αλλά σε συνδυασμό με άλλες διατάξεις όπως το οπτικό νυστέρι. (Greulich,2007)

Όπως συζητήθηκε μέχρι τώρα , η οπτική παγίδευση έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό εργαλείο για τον οπτικό χειρισμό και την ανίχνευση διαφανών αντικειμένων σε κλίμακα μικρο- και νανομέτρων. Αυτές οι δυνατότητες είναι ιδιαίτερα κερδοφόρες για την έρευνα στη βιολογία, όπου απαιτείται ελάχιστη διαταραχή των βιολογικών συστημάτων και η απεικόνιση, η ποσοτικοποίηση των ιδιοτήτων και της δυναμικής είναι πολύτιμη.

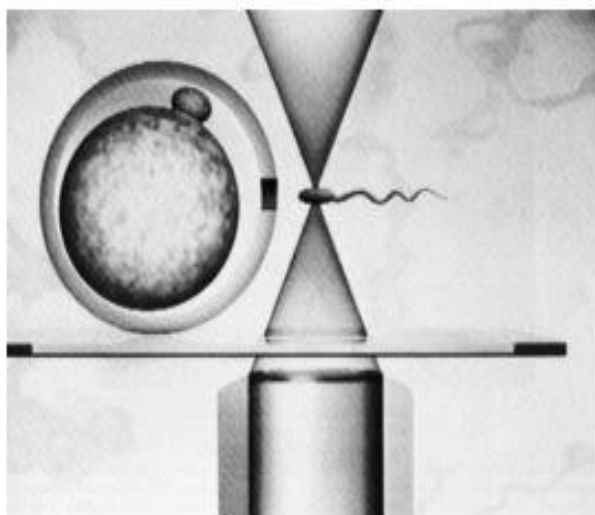
Σε αυτό το σημείο , θα επικεντρώσουμε τη συζήτησή μας στο πώς η οπτική παγίδευση μπορεί να εφαρμοστεί στους νευρώνες και ποιες πολύτιμες πληροφορίες έχει φέρει η οπτική παγίδευση στην έρευνα της νευροεπιστήμης.

Οι νευρώνες έχουν μέγεθος σωμάτων που κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 10 και 30 μm , κουμπιά συνάψεων με διάμετρο λίγων μικρών και υποδοχείς μεμβράνης μεγέθους περίπου 5 nm (σχήμα 1. a). Σε αυτές τις κλίμακες μεγέθους, η οπτική παγίδευση είναι ένα ιδανικό εργαλείο τόσο για άμεσο χειρισμό ολοκληρωτων νευρώνων είτε για έμμεση ανίχνευση συνάψεων και υποδοχέων χρησιμοποιώντας βοηθητικά σωματίδια.(Lenton et al.,2020)



Σχήμα 1.17: ανάπτυξη νευρώνα. (A) Φθορίζουσα απεικόνιση ενός νευρώνα που υπογραμμίζει τη μακροδομή του κώνου ανάπτυξης. (Προσαρμογή από Muñoz-Lasso et al., 2020). (B) Καθοδήγηση νευρίτη από το Sema3A που απελευθερώνεται από ένα λιπόσωμα μεγέθους μικρομέτρου (από τους Pinato et al.,2012) (C) Αξονική ανάπτυξη μεταξύ ζευγών κυττάρων, τοποθετημένα σε γειννίαση με οπτική παγίδευση: Η αριστερή στήλη δείχνει κύτταρα αμέσως μετά τον χειρισμό με οπτική παγίδευση, η μεσαία στήλη δείχνει αλληλεπιδράσεις και ανάπτυξη νευραξόνων (μπλε βέλη) μετά από 3 ημέρες in vitro και δεξιά στήλη μετά από 7 ημέρες in vitro.(από τους Clarke et al.,2008)(εικόνα από Lenton et al.,2020).

Αξίζει, τέλος, να αναφερθούν οι έρευνες που έχουν γίνει για την *in vitro* γονιμοποίηση, στις οποίες συνδυάζεται ένα laser υπεριώδους μήκους κύματος για την διάνοιξη μιας μικρής περιοχής στην ζώνη pellucida του ωαρίου, και μιας οπτικής παγίδας για την μεταφορά ενός σπερματοζωαρίου σε αυτή (Ashkin, 1997)



Σχήμα 1.18: Οπτική Παγίδευση σπερματοζωαρίου με σκοπό την μεταφορά του κοντά στο ωάριο για την τεχνητή του γονιμοποίηση. (εικόνα από Clement et al., 1996)

Σε όλες τις εφαρμογές της οπτικής παγίδευσης που αναφέρθηκαν προηγουμένως, ο τρόπος παγίδευσης γίνεται με τη χρήση μικροσφαιριδίων γυαλιού ή πολυστυρενίου ακόμα και σιλικόνης. Το βιολογικό δείγμα προσκολλάτε μέσω βιοχημικών διεργασιών συνήθως και από τις δυο πλευρές του με τα μικροσφαιρίδια, τα οποία παγιδεύονται με τη χρήση διπλής οπτικής παγίδας. Αυτό γίνεται για διάφορους λόγους. Αρχικά, λειτουργούν σαν λαβές σε πολύ μικρά δείγματα όπως DNA και γίνεται καλύτερη και πιο ισχυρή παγίδευση των μικροσφαιριδίων. Μέσω της κίνησης των μικροσφαιριδίων μπορεί να εντοπιστεί οποιαδήποτε κίνηση από το βιολογικό δείγμα και ο λόγος είναι ότι υπάρχει μεγάλη ακρίβεια στη θέση των σφαιριδίων μέσα στην παγίδα. Επιπλέον μέσω των μικροσφαιριδίων γίνεται ακριβής βαθμονόμηση της οπτικής παγίδας. (Moffitt et al., 2008)

2. Ανάπτυξη πειραματικής διάταξης για την οπτική παγίδα

Στην αρχή της διπλωματικής έγινε προσπάθεια για την ανάπτυξη της διάταξης έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί ένα πείραμα οπτικής παγίδευσης. Για τον σκοπό αυτό χρειαζόταν η κατάλληλη ευθυγράμμιση. Στο παρόν κεφάλαιο θα δούμε τους παράγοντες που επηρεάζουν μία διάταξη οπτικής παγίδας, τις βασικές σχέσεις που συνδέουν τα μεγέθη που εμπλέκονται στον σχεδιασμό καθώς και τη σχηματική αναπαράσταση της διάταξης.

2.1 Οπτικός σχεδιασμός

Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας για την ανάπτυξη του συστήματος οπτικής παγίδευσης χρησιμοποιήθηκε ένα διοδικό laser που εκπέμπει στα 660nm και ένα ανάστροφο μικροσκόπιο. Το μικροσκόπιο είναι κατάλληλα τροποποιημένο ώστε στο εσωτερικό του να παρεμβάλλεται ο κατάλληλος διχρωϊκός καθρέφτης.

Η δέσμη του διοδικού laser έχει σχεδόν ορθογώνιο προφίλ με διάσταση 3X5 mm στην έξοδο της, ενώ το άνοιγμα του αντικειμενικού φακού του μικροσκοπίου με μεγέθυνση 100x έχει διάμετρο 6 mm. Οπότε χρειάζεται μια διεύρυνση της δέσμης κατά έναν παράγοντα περίπου 1,5. Γενικά η διάμετρος της δέσμης είναι μικρότερη από αυτή του αντικειμενικού φακού και για να διευρυνθεί η δέσμη χρησιμοποιείται ένα τηλεσκοπικό σύστημα αποτελούμενο από δυο επιπεδόκυρτους φακούς. Για αυτόν το σκοπό εδώ χρησιμοποιήθηκε ένα τηλεσκοπικό σύστημα αποτελούμενο από ένα ζεύγος επιπεδόκυρτων φακών L_1 και L_2 , όπως φαίνεται στο σχήμα 2.1. Η επιλογή της εστιακής απόστασης των δυο φακών, f_1 και f_2 αντίστοιχα, είναι κρίσιμη για τη σωστή διεύρυνση και εστίαση της δέσμης στον αντικειμενικό φακό του μικροσκοπίου. Το εστιακό σημείο F του φακού L_1 πρέπει να βρίσκεται στο επίπεδο απεικόνισης του δείγματος στον αντικειμενικό φακό και του φακού L_2 . Το δευτερεύον εστιακό επίπεδο του L_2 πρέπει να είναι κοντά στο πρωτεύον κύριο κέντρο P του αντικειμενικού φακού. Η διάμετρος της δέσμης D_2 στο επίπεδο σύζευξης του φακού L_2 δίνεται από τη σχέση:

$$D_2 = D_1 \frac{d - f_1}{|f_1|} \quad (2.1)$$

όπου D_1 είναι η αρχική διάμετρος της δέσμης κοντά στο φακό L_1 , d είναι η απόσταση των δυο φακών. Όλες οι αποστάσεις μετρήθηκαν από τα πρωτεύοντα κύρια σημεία των φακών. Το φανταστικό είδωλο του σημείου εστίασης F , στο φακό L_2 σχηματίζεται σε απόσταση l από τον αντικειμενικό φακό του μικροσκοπίου (σχήμα 2.1). Επειδή η απόσταση μεταξύ του πρωτεύοντος κύριου σημείου P του αντικειμενικού και του L_2 φακού είναι ίση με f_2 , η εξίσωση του φακού L_2 παίρνει τη μορφή:

$$\frac{1}{f_2} = \frac{1}{d-f_1} - \frac{1}{l-f_2} \quad (2.2)$$

Η διάμετρος της δέσμης D στο επίπεδο του αντικειμενικού φακού είναι:

$$D = \frac{D_2}{1 - \frac{f_2}{l}} \quad (2.3)$$

Συνδυάζοντας τις παραπάνω εξισώσεις προκύπτει η εξίσωση του λόγου των διαμέτρων D και D_1 :

$$\frac{f_2}{|f_1|} = \frac{D}{D_1} \quad (2.4)$$

Με τη διάμετρο D δεδομένη επιλέγεται η απόσταση των φακών από την σχέση (2.3), ενώ η διάμετρος D καθορίζεται από το άνοιγμα του αντικειμενικού φακού σύμφωνα με τη σχέση :

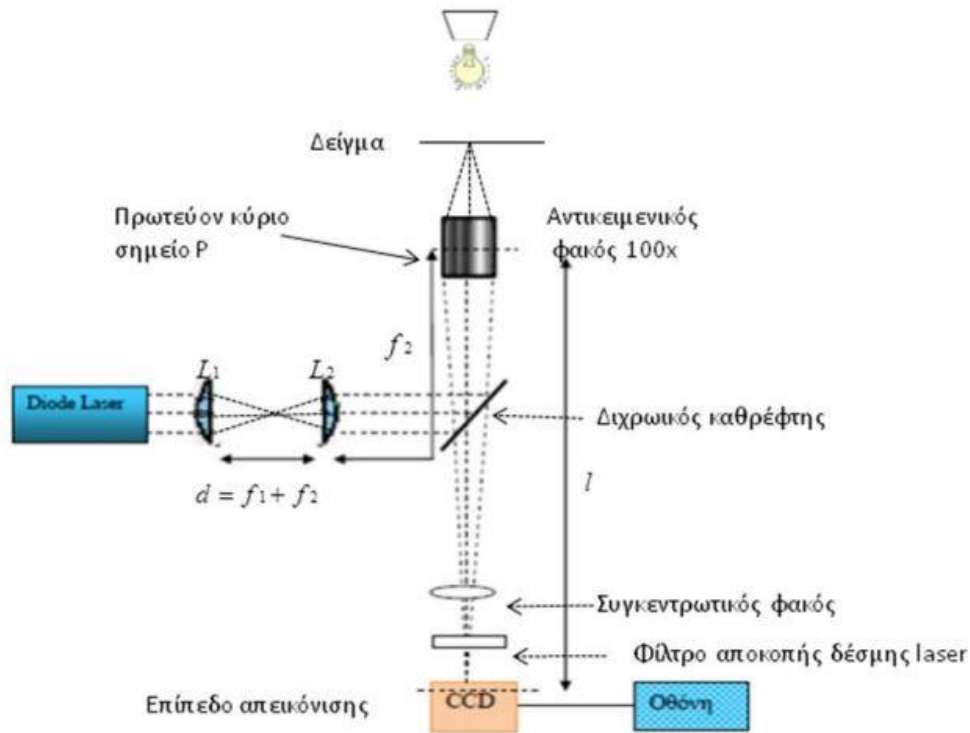
$$D = \frac{2NAf_3}{n} \quad (2.5)$$

όπου f_3 η εστιακή απόσταση του αντικειμενικού φακού και NA το αριθμητικό του άνοιγμα.

Από την εξίσωση (2.4) είναι φανερό ότι η διάμετρος της δέσμης στην είσοδο του αντικειμενικού δεν εξαρτάται από την θέση του L_1 , επομένως η εστιασμένη δέσμη μετά τον αντικειμενικό μπορεί να μετακινηθεί χωρίς να επηρεάζεται ο βαθμός που γεμίζει η δέσμη το άνοιγμα του φακού, ούτε οι συνθήκες παγίδευσης για οποιαδήποτε θέση στο x - y επίπεδο της εστίασης της δέσμης.

Η επιλογή της απόστασης f_2 καθορίζει και την απόσταση του φακού L_2 από τον αντικειμενικό φακό. Υπολογίζοντας την εστιακή απόσταση f_1 από την σχέση (2.4) μπορεί κανείς να υπολογίσει την απόσταση d των φακών L_1 και L_2 από την εξίσωση (2.1). Πρέπει να σημειωθεί ότι η τιμή f_1 μπορεί να είναι αρνητική ή θετική αναλόγως με το είδος του φακού που επιλέγουμε. Το μήκος l είναι περίπου ίσο με την απόσταση του αντικειμενικού από το επίπεδο απεικόνισης του δείγματος στην CCD κάμερα. Σύμφωνα με τις διαστάσεις της δέσμης που χρησιμοποιήθηκε, ο λόγος των εστιακών αποστάσεων f_1 και f_2 θα πρέπει να είναι περίπου 1,5. Το πρωτεύον κύριο κέντρο P του αντικειμενικού φακού βρίσκεται σε απόσταση περίπου 1,8mm από τη κάτω επιφάνεια του κυλινδρικού στηρίγματος του αντικειμενικού φακού. Επιλέχθηκαν λοιπόν οι συγκλίνοντες φακοί με εστιακές αποστάσεις $f_1=20\text{cm}$ και $f_2=30\text{cm}$ αντίστοιχα και τοποθετήθηκαν κατάλληλα σύμφωνα με τις αποστάσεις του σχήματος 2.1.

Το laser και ο φακός L_1 μπορούν να μετακινηθούν ως μια ενιαία μονάδα, κάθετα στο επίπεδο του οπτικού άξονα διάδοσης της δέσμης, μέσα στον αντικειμενικό προκαλώντας την μετακίνηση του σημείου εστίασης της δέσμης εντός του επιπέδου του αντικειμενικού φακού κατά μια ανάλογη ποσότητα, ενώ ο βαθμός μεταβολής της διαμέτρου του είναι ίσος με το λόγο της εστιακής απόστασης του αντικειμενικού και του φακού L_2 . Επίσης, αν είναι επιθυμητό, το παραπάνω σύστημα έχει την ικανότητα να μετακινείται παράλληλα με την πορεία της δέσμης μέσα στο μικροσκόπιο οδηγώντας σε μια αντίστοιχη μετατόπιση του σημείου εστίασης της δέσμης μακριά από το επίπεδο του αντικειμενικού φακού χωρίς να αλλάζει η διάμετρος της δέσμης στο άνοιγμα του αντικειμενικού.

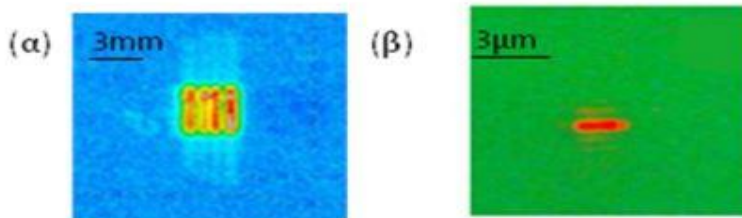


Σχήμα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Φαίνονται τα μεγέθη και οι αποστάσεις που περιγράφηκαν στο κείμενο (εικόνα από Ελλάδα Σπυράτου, Διδακτορική διατριβή ΕΜΠ, 2010)

Η δέσμη αφού διευρύνεται από το σύστημα των τηλεσκοπικών φακών ανακλάται από τον διχρωϊκό καθρέφτη και εισέρχεται στον αντικειμενικό του μικροσκοπίου. Στη συνέχεια το φως από το δείγμα συγκεντρώνεται από τον αντικειμενικό, διέρχεται από τον διχρωϊκό, εστιάζεται από τον προσοφθάλμιο φακό και η εικόνα σχηματίζεται στην περιοχή του CCD (Charged Coupled Device) της κάμερας. Για την προστασία της CCD κάμερας από το ποσοστό της δέσμης του laser που διέρχεται από τον διχρωϊκό χρησιμοποιείται ένα φίλτρο αποκοπής του μήκους κύματος της δέσμης, το οποίο τοποθετείται στο εσωτερικό της CCD κάμερας. Τέλος, η παρατήρηση της εικόνας και η επεξεργασία της γίνεται από κατάλληλο λογισμικό προγράμματος της Leica σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.

2.2 Πειραματική διάταξη

Ως laser παγίδευσης χρησιμοποιήθηκε ένα διοδικό laser με μήκος κύματος εκπομπής στα 660nm (MRL-660, Changchun New Industries Optoelectronics Tech. Co. Ltd). Η διάταξη του laser είναι μικρή σε διαστάσεις (80x30x30 mm), οικονομική και αερόψυκτη με πολλαπλές οπτικές κοιλότητες (multicavity laser) και μέγιστη τιμή ισχύος 100mW. Σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά του κατασκευαστή η δέσμη έχει σχεδόν ορθογώνιο προφίλ, γραμμική πόλωση, σχεδόν μηδενικό εγκάρσιο ρυθμό TEM₀₀ και παράγοντα ποιότητας δέσμης $M^2 \approx 15$. Στο σχήμα 2.2 φαίνεται το προφίλ της δέσμης όπως καταγράφηκε από μια πυροηλεκτρική κάμερα καθώς εξέρχεται από το laser (σχήμα 2.2(α)) και όπως φαίνεται στην κάμερα CCD με πράσινο φίλτρο πριν από αυτήν (σχήμα 2.2(β)). Τα πολλαπλά μικρότερα προφίλ ελλειπτικού σχήματος με μέγιστη κατανομή ενέργειας στο κέντρο τους, πιθανόν λόγω των πολλαπλών οπτικών κοιλότητων, στο σύνολό τους σχηματίζουν ένα περίπου ορθογώνιο προφίλ.



Σχήμα 2.2: Το προφίλ της δέσμης στην έξοδο του laser ανιχνευμένο με μια πυροηλεκτρική κάμερα (α), και όπως καταγράφεται από την CCD κάμερα περνώντας από πράσινο φίλτρο που είναι ελάχιστο διαπερατό στο κόκκινο φως του laser.

Χρησιμοποιήθηκε ένα ανάστροφο μικροσκόπιο (Leica DMIL), το εσωτερικό του οποίου τροποποιήθηκε ώστε να εισαχθεί σε αυτόν ένας διχρωικός καθρέφτης. Ο διχρωικός καθρέφτης είναι ειδικά κατασκευασμένος για να ανακλά σε ποσοστό 99,5% το μήκος κύματος του διοδικού laser για γωνία πρόσπτωσης 45°, ενώ είναι διαπερατός στα άλλα μήκη κύματος. Ο αντικειμενικό φακός του μικροσκοπίου που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα παγίδευσης είναι ελαιοκαταδυστικός μεγέθυνσης 100x και αριθμητικού ανοίγματος NA=1,25. Επίσης, ο φακός αυτός είναι ισχυρά αχρωματικός (Leica, Hi Plan) και αποτελείται στην ουσία από ένα σύστημα πολλαπλών φακών παρέχοντας ισχυρή εστίαση της δέσμης, αλλά παράλληλα παρουσιάζει μεγάλες απώλειες ισχύος, περίπου 70% της ισχύος της δέσμης που εισέρχεται σε αυτόν.

Για την προστασία της κάμερας χρησιμοποιήθηκαν ως φίλτρα δυο απλά πράσινα γυαλιά, τα οποία αποκόβουν ικανοποιητικά ένα μέρος της ακτινοβολίας laser, επιτρέποντας έτσι την ταυτόχρονη παρατήρηση της δέσμης παγίδευσης και του δείγματος. Το δείγμα τοποθετήθηκε σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα και καλύφθηκε από μια πολύ λεπτή καλυπτρίδα και ύστερα τοποθετήθηκε στην αντικειμενοφόρο τράπεζα του μικροσκοπίου. Το μικροσκόπιο έχει τη δυνατότητα παρατήρησης του δείγματος και από τον προσοφθάλμιο φακό μέσω της χειροκίνητης μετακίνησης ενός μοχλού.

2.3 Παρατήρηση της παγίδας σε κύτταρα μαγιάς και καρκινικά κύτταρα siha

Ύστερα από την ευθυγράμμιση της διάταξης δοκιμάστηκε παγίδευση σε κύτταρα μαγιάς και καρκινικά κύτταρα. Η παγίδευση είναι εφικτή και στις τρεις διαστάσεις και με προσεχτικές κινήσεις της τράπεζας του μικροσκοπίου επιτυγχάνεται μετακίνηση στο x-y επίπεδο, ενώ με μικρά βήματα εστίασης ή απεστίασης η παγίδα μετακινείται κατά z.

2.3.1 Καλλιέργεια της Κυτταρικής Σειράς

Για να διατηρηθούν τα κύτταρα Siha που είναι καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας αναπτύχθηκαν κυτταρικές καλλιέργειες. Τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία κάτω από -130°C , κατά προτίμηση σε υγρό ατμό αζώτου, μέχρι να είναι έτοιμα για χρήση. Στη συνέχεια, αποψύχθηκε το φιαλίδιο με απαλή ανάδευση σε λουτρό νερού 37°C έτσι, ώστε να εξασφαλιστεί το υψηλότερο επίπεδο βιωσιμότητας. Ωστόσο, για να μειωθεί η πιθανότητα μόλυνσης, κρατήθηκε ο δακτύλιος O και το καπάκι έξω από το νερό. Ενώ παράλληλα η απόψυξη πρέπει να είναι γρήγορη (περίπου 2 λεπτά).

Μόλις ξεπαγώσει το περιεχόμενο, αφαιρούμε το φιαλίδιο από το λουτρό νερού και απολυμαίνουμε βυθίζοντας ή ψεκάζοντας με 70% αιθανόλη. Όλες οι εργασίες από αυτό το σημείο και μετά εκτελούνταν υπό αυστηρά άσηπτες συνθήκες. Τα περιεχόμενα του φιαλιδίου μεταφέρθηκαν σε φιάλη καλλιέργειας ιστού 75 cm^2 και αραιώθηκαν με το συνιστώμενο πλήρες μέσο καλλιέργειας. Ήταν σημαντικό ωστόσο να αποφευχθεί η υπερβολική αλκαλικότητα του μέσου κατά την ανάκτηση των κυττάρων. Από τον κατασκευαστή προτεινόταν πριν από την προσθήκη του περιεχομένου του φιαλιδίου, το δοχείο καλλιέργειας που περιέχει το μέσο ανάπτυξης

να τοποθετηθεί στο εκκολαπτήριο για τουλάχιστον 15 λεπτά, ώστε να μπορέσει το μέσο να φθάσει στο κανονικό του pH (7.0-7.6). Μετά, η καλλιέργεια επώαστηκε στους 37°C στον θάλαμο επώασης (incubator) σε κορεσμένες συνθήκες υγρασίας και παρουσία 5% CO₂.



Σχήμα 2.3: Απεικόνιση του εκκολαπτηρίου το οποίο χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων (τα πειράματα έγιναν στο νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟ).

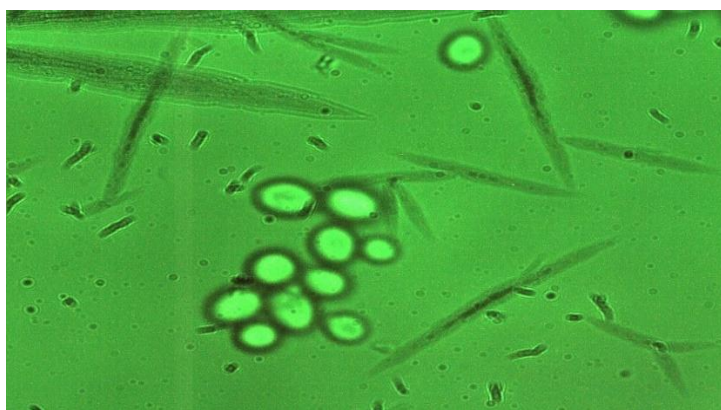
Σε περίπτωση που επιθυμούσαμε να αφαιρεθεί αμέσως ο κρυοπροστατευτικός παράγοντας ή να ληφθεί ένα πιο συμπυκνωμένο εναιώρημα κυττάρων, το εναιώρημα των κυττάρων θα έπρεπε να φυγοκεντρηθεί σε επιτάχυνση περίπου 125 xg για 5 έως 10 λεπτά. Έπειτα, να απορριφθεί το υπερκείμενο υγρό και να γίνει

επαναιώρηση των κυττάρων με φρέσκο μέσο ανάπτυξης στο λόγο αραιώσης που συνιστάται στις οδηγίες.

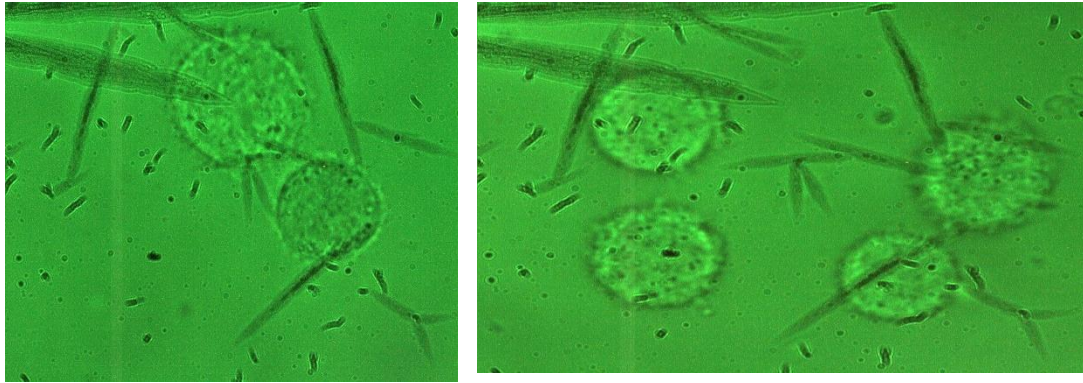
Εν συνεχεία, αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία της απόψυξης, τα κύτταρα ήταν έτοιμα να μπουν σε διαδικασία καλλιέργειας. Έπειτα προσθέσαμε 2,0 έως 3,0 ml διαλύματος Trypsin-EDTA στη φιάλη και παρατηρήθηκαν τα κύτταρα κάτω από ανεστραμμένο μικροσκόπιο μέχρι να διασκορπιστεί το κυτταρικό στρώμα (συνήθως εντός 5 έως 15 λεπτών). Για να αποφευχθεί η συσσώρευση, δεν χτυπήθηκε ούτε ανακαινίστηκε η φιάλη και αναμενόταν να αποσπαστούν τα κύτταρα. Τα κύτταρα που είναι δύσκολο να αποσπαστούν μπορούν να τοποθετηθούν στους 37°C για να διευκολυνθεί η διασπορά τους. Στη συνέχεια, προστέθηκε 6,0 έως 8,0 ml πλήρους μέσου ανάπτυξης (DMSO 5% (v/v)) και κύτταρα με ήπια διοχέτευση και εισήχθησαν οι κατάλληλες ποσότητες του εναιωρήματος κυττάρων στα νέα δοχεία καλλιέργειας. Τέλος, οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37°C.

2.3.2 Φωτογραφίες από το πρόγραμμα LEICA στον H/Y

Στο εργαστήριο παρατηρήσαμε μέσω της ccd κάμερας που συνδέεται με τον υπολογιστή τις παρακάτω εικόνες για κύτταρα μαγιάς και κύτταρα siha τραχήλου της μήτρας. Το πράσινο χρώμα οφείλεται στα φίλτρα που έχουν τοποθετηθεί για την αποκοπή της δέσμης από την CCD κάμερα.



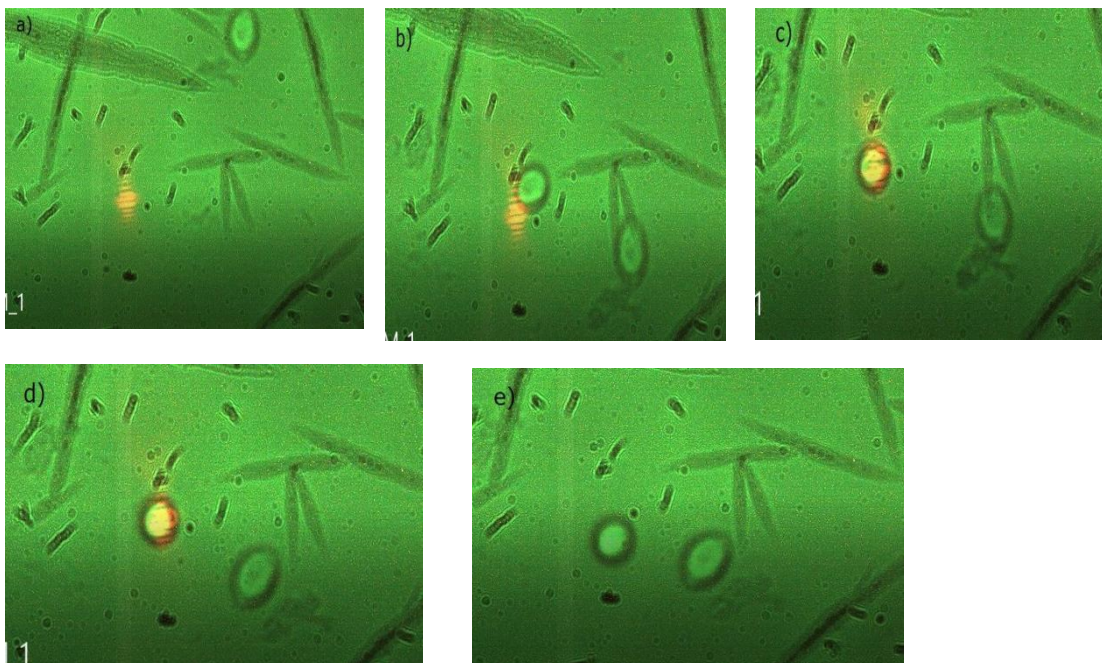
Σχήμα 2.4: κύτταρα μαγιάς όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο με μεγέθυνση x 100 στον αντικειμενικό φακό του μικροσκοπίου μετά από τη ρύθμιση της διάταξης για την οπτική παγίδευση



Σχήμα 2.5: κύτταρα siha όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο με μεγέθυνση x 100 στον αντικειμενικό φακό του μικροσκοπίου.



Σχήμα 2.6: κύτταρο siha τραχήλου της μήτρας όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο παγιδεύτηκε από τη δέσμη laser 660nm.



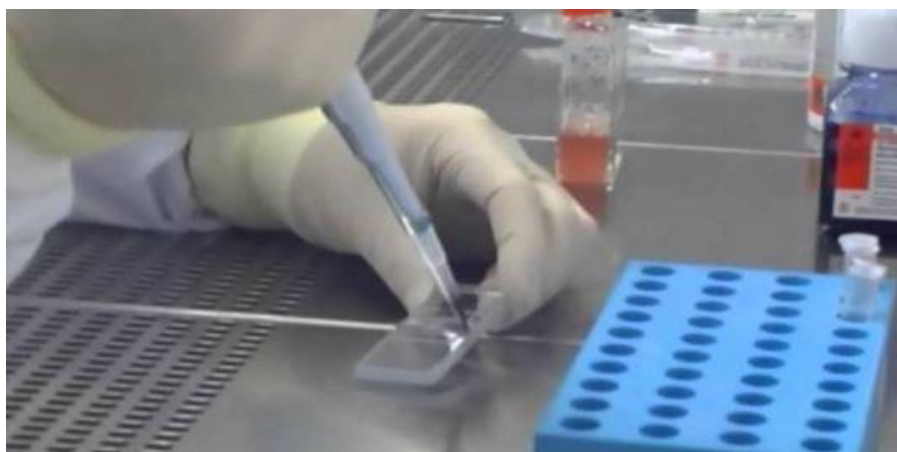
Σχήμα 2.7: Στιγμιότυπα από βίντεο καταγραφής παγίδευσης κυττάρων. Βλέπουμε το κύτταρο να μετακινείται a),b) ώσπου παγιδεύεται c),d) . Όταν το laser σβήνει, το παγιδευμένο κύτταρο αρχίζει και πάλι να μετακινείται e).

2.3.3 Μέθοδος χρώσης κυττάρων με Trypan Blue

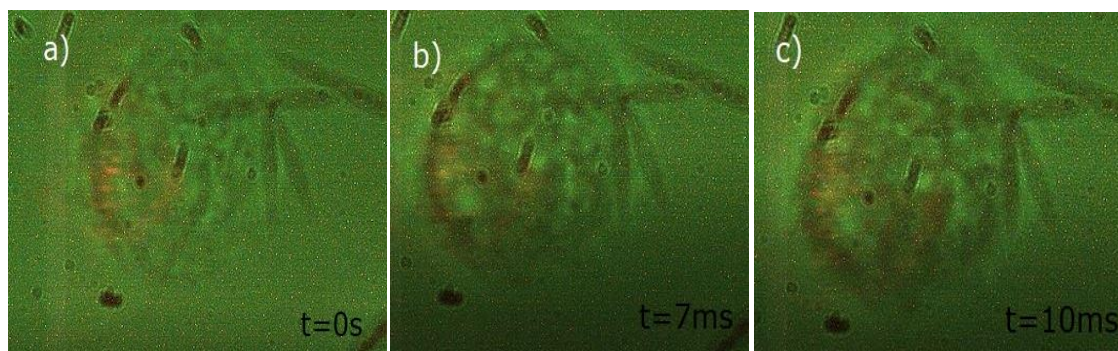
Το Trypan Blue είναι μία από τις χρωστικές που χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό της ζωτικότητας των κυττάρων. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός πως τα ζωντανά-βιώσιμα κύτταρα δεν απορροφούν συγκεκριμένες βαφές, ενώ αντίθετα τα νεκρά-μη βιώσιμα κύτταρα επιτρέπουν τη διέλευση της ουσίας μέσω της μεμβράνης. Έτσι, η χρώση κάνει ευκολότερη την απεικόνιση της μορφολογίας τους και μπορούμε να δούμε πότε έχει επέλθει κυτταρικός θάνατος. Κατά την μέθοδο αυτή, παρασκευάζεται ένα εναιώρημα κυττάρων με την ίδια διαδικασία, όπως γίνεται και στην καλλιέργεια, δηλαδή σηκώνοντας τα κύτταρα που πρέπει να μελετηθούν με τη βοήθεια της τρυψίνης. Έπειτα, το εναιώρημα μεταφέρεται σε Trypan Blue περιεκτικότητας 0,4 % ανά 0,5 ml θρεπτικού υλικού σε δοκιμαστικό σωλήνα, πραγματοποιείται ανάδευση και το νέο μείγμα παραμένει για 5 λεπτά (Strober ,2001). Στη συνέχεια, με τη χρήση μιας πιπέτας γίνεται η μεταφορά μικρής ποσότητας του μείγματος αιωρήματος κυττάρων-Trypan blue. Το μίγμα τοποθετείται σε αμφοτέρους τους θαλάμους του αιμοκυτταρομετρητή. Αγγίζοντας προσεκτικά την άκρη του καλύμματος με το άκρο της πιπέτας, κάθε θάλαμος γεμίζει περίπου με 5-10 μl και τελικά γίνεται η παρατήρησή του από το μικροσκόπιο. Τέλος, μετράται ο αριθμός των βιώσιμων και των μη βιώσιμων κυττάρων. Τα τελευταία θα έχουν χρωματιστεί μπλε. Κατόπιν υπολογίζεται η σχετική συγκέντρωση βιώσιμων και μη βιώσιμων κυττάρων και το ποσοστό μη βιώσιμων κυττάρων χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση :

$$\text{Non-viable Cell Count (\%)} = [(\text{Number Dead Cells Counted}) / (\text{Total number of cells})] \times 100$$

Στο πείραμα που πραγματοποιήσαμε στο Αττικό Νοσοκομείο στη διάταξη της οπτικής παγίδας χρησιμοποιήσαμε αναλογία 1:1 δηλαδή 10μL (μικρόλιτρα) καρκινικά κύτταρα με 10 μL trypan blue. Σκοπός ήταν να διερευνηθεί ποιοτικά η επίδραση της δέσμης της παγίδας στη ζωτικότητα των καρκινικών κυττάρων ώστε να μελετηθεί μελλοντικά η διπλή χρήση της ως εργαλείο μικροχειρισμού των καρκινικών κυττάρων, αλλά και ταυτόχρονα και ως ένα μέσο πρόκλησης επιλεκτικής φωτοθερμίας στα καρκινικά κύτταρα που οδηγεί στο θάνατό τους (σχήμα 2.9).



Σχήμα 2.8: Εισαγωγή μείγματος κυττάρων- trypan blue με πιπέτα.



Σχήμα 2.9: a) ένα ζωντανό καρκινικό κύτταρο που παγιδεύεται και b) κάτω από την φωτοθερμική επίδραση της παγίδας για ισχύ 100 mW, χρωματίζεται με το trypan blue c) πλέον έχει επέλθει ο κυτταρικός του θάνατος.

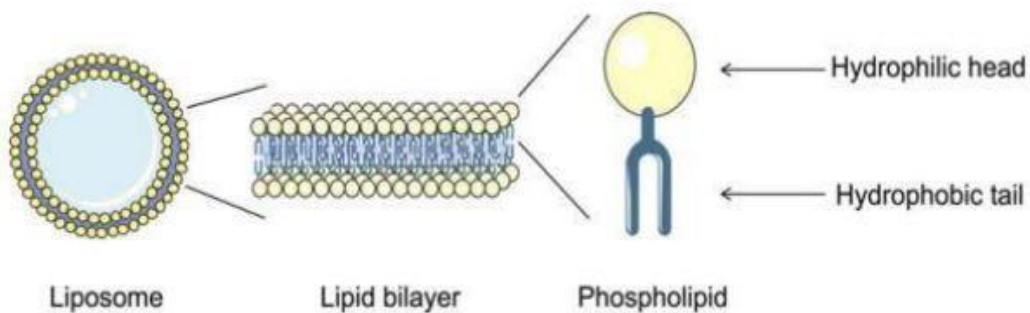
3. Λιποσώματα και οι εφαρμογές τους

3.1 Εισαγωγή στα λιποσώματα

Τα λιποσώματα είναι κολλοειδή σωματίδια αποτελούμενα από μια ή περισσότερες διπλοστοιβαδικές μεμβράνες φωσφολιπιδίων που περικλείουν στο εσωτερικό τους κάποιο υδατοειδές διάλυμα. Τα λιποσώματα συνήθως αποτελούνται από φωσφολιπίδια, ειδικά φωσφατιδοχολίνη, αλλά μπορεί επίσης να περιλαμβάνουν και άλλα λιπίδια, όπως φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, εφ' όσον αυτά είναι συμβατά με τη δομή διπλοστοιβάδας λιπιδίων. (Torchilin,2005)

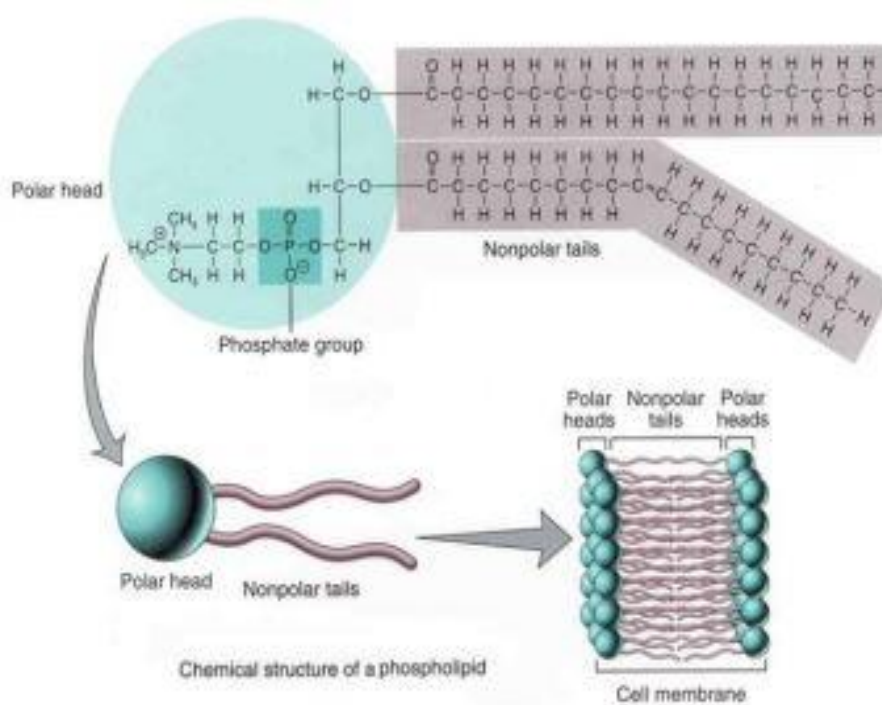
Γενικά, τα λιποσώματα είναι διακριτά ως σφαιρικά κυστίδια με μεγέθη που κυμαίνονται από 30 nm έως μερικά μικρόμετρα. Στο σχήμα 3.1 βλέπουμε τα δομικά στοιχεία ενός λιποσώματος. Επιπλέον στο σχήμα 3.2 φαίνεται ότι το φωσφολιπίδιο αποτελείται από υδρόφιλες κεφαλές και υδρόφοβες ουρές. Οι κεφαλές αποτελούν το πολικό τμήμα ενώ οι ουρές το μη πολικό τμήμα του φωσφολιπιδίου. Υπάρχουν τρεις κατηγορίες κεφαλών: κατιονικές, ανιονικές και ουδέτερες. Η κατιονική κεφαλή βοηθάει στην προσέλκυση του λιποσώματος από τις αρνητικά φορτισμένες κυτταρικές μεμβράνες. Η ανιονική κεφαλή περιέχει φωσφατιδυλοσερίνη, ενώ η ουδέτερη χοληστερόλη, η οποία βελτιώνει τη φυσική σταθερότητα των λιποσωμάτων.

Οι ομάδες των πολικών κεφαλών των φωσφολιπιδίων προσανατολίζονται στο εσωτερικό και εξωτερικό όπου υπάρχει υδάτινο μέσο. Από την άλλη μεριά, η συσσωμάτωση των πολικών λιπιδίων δεν περιορίζεται σε δομές διπλής στιβάδας που βασίζονται σε παράγοντες σύνθεσης στο εργαστήριο. Αντιθέτως μπορούν να αυτό-οργανώνονται σε δομές τέτοιες ώστε τα υδρόφοβα μέρη να μην έρχονται σε επαφή με το υδάτινο μέσο. (Μενεσιδης Ιωάννης, Φαρμακοποιός, Διπλωματική Εργασία).



Σχήμα 3.1: Δομικά στοιχεία λιποσώματος (εικόνα από Σπηλιώτη Μαρίνα, Διπλωματική Εργασία)

Phospholipids Analysis Service

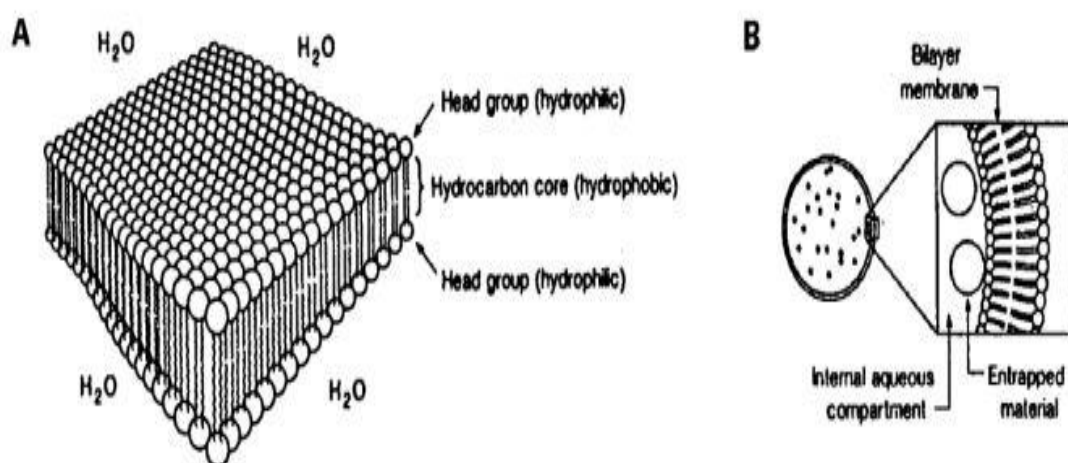


Σχήμα 3.2: Δομή φωσφολιπιδίου (εικόνα από Σπηλιώτη Μαρίνα, Διπλωματική Εργασία)

Ταυτόχρονα οι διεργασίες στις οποίες υπόκεινται τα λιποσώματα και οι φυσικές τους ιδιότητες θυμίζουν κατά πολύ αυτές των κυττάρων. Επομένως ο συνδυασμός των παραπάνω χαρακτηριστικών καθιστούν τα λιποσώματα ως άριστα μοντέλα των κυτταρικών μεμβρανών και για την μελέτη των σχέσεων μεταξύ της δομής τους και των λειτουργιών τους (Huang 1969). Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται συνήθως για την παρασκευή των λιποσωμάτων είναι οι λεκιθίνες αυγού (Egg phosphatidylcholines, EPC) διότι το κόστος τους είναι χαμηλό, αλλά και γιατί είναι χημικά αδρανείς.

Οι δυνάμεις που δρουν σε ένα λιπόσωμα είναι οι υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις πολικές κεφαλές, οι δυνάμεις Van der Waals ανάμεσα στις υδρογονανθρακικές αλυσίδες και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κεφαλών των λιπιδίων με τα μόρια του υδάτινου μέσου στο οποίο βρίσκονται.

Ακόμη, τα λιποσώματα λόγω του μεγέθους τους και του υδρόφοβου αλλά και υδρόφιλου χαρακτήρα τους αποτελούν ελπιδοφόρα συστήματα για την μεταφορά φαρμάκων. Οι ιδιότητες των λιποσωμάτων διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά την σύνθεση τους από τα λιπίδια, το φορτίο επιφάνειας, το μέγεθος και τη μέθοδο της παρασκευής τους. Η επιλογή της διπλοστοιβάδας καθορίζει το βαθμό της ακαμψίας ή της ρευστότητας καθώς και το φορτίο της. Για παράδειγμα, τα ακόρεστα είδη φωσφατιδυλοχολίνης από φυσικές πηγές (αυγά ή φωσφατιδυλοχολίνη σόγιας) δίδουν πολύ περισσότερο διαπερατές και λιγότερο σταθερές διπλοστοιβάδες, ενώ τα κορεσμένα φωσφολιπίδια με μακρές ακυλο-αλυσίδες (για παράδειγμα, διπαλμιτοϋλοφωσφατιδυλοχολίνη) σχηματίζουν μια άκαμπτη δομή διπλής στιβάδας. (Sahoo et al., 2003-Gabizon et al.,1998-Allen,1997)



Σχήμα 3.3: Σχηματικό διάγραμμα λιπιδικής διπλοστοιβάδας (A), και πως διαμορφώνεται το λιπόσωμα από τα φωσφολιπίδια (B) (εικόνα από Gibbs et al.,1999)

3.1.1 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα Λιποσωμάτων

Τα λιποσώματα εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα αλλά και μερικά μειονεκτήματα.

Πλεονεκτήματα λιποσωμάτων:

- Αυξημένη σταθερότητα του φαρμακολογικού παράγοντα εξαιτίας του εγκλεισμού του.
- Μειωμένη τοξικότητα του εγκλεισμένου φαρμακολογικού παράγοντα.
- Μειωμένη έκθεση των ευαίσθητων ιστών στους τοξικούς φαρμακολογικούς παράγοντες.
- Φορέας μη τοξικός, εύκαμπτος και βιοσυμβατός.
- Αύξηση αποτελεσματικότητας και θεραπευτικού δείκτη του φαρμάκου.
- Ελαστικότητα και ευκολία σύνδεσης με ενεργά κέντρα προσδετών για την επίτευξη της ενεργής στόχευσης.

Μειονεκτήματα λιποσωμάτων:

- Μικρός χρόνος ζωής.
- Πιθανή φωσφολιπιδική οξειδωση και αντιδράσεις υδρόλυσης.
- Αυξημένο κόστος παραγωγής.

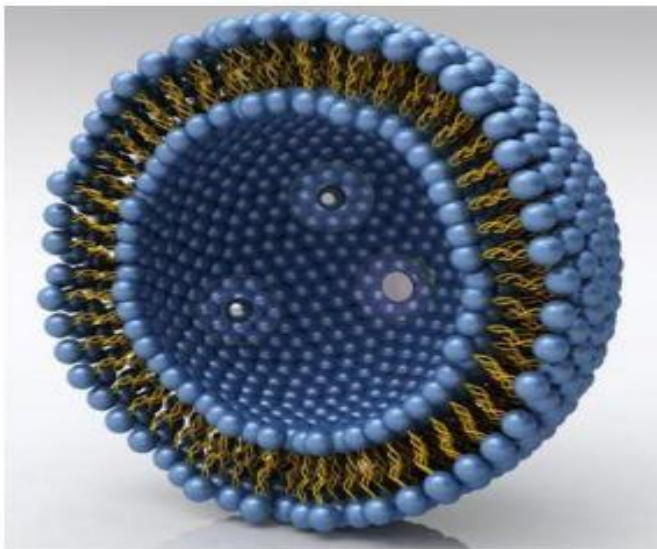
3.1.2 Είδη λιποσωμάτων

Ανάλογα με τον τρόπο παρασκευής τους δημιουργούνται και διαφορετικά είδη λιποσωμάτων ως προς το μέγεθος και τον αριθμό των στοιβάδων τους και κατηγοριοποιούνται ως εξής:

- Μεγάλα Πολυστοιβαδικά Λιποσώματα (MLV multi-lamellarvesicles)
Αποτελούνται από πολλές ομόκεντρες διπλοστοιβάδες, πέντε ή και δεκάδες, με μέγεθος από 500nm-5000nm. Χαρακτηριστικό των λιποσωμάτων αυτών είναι ότι περιέχουν περισσότερες από μία διπλοστοιβάδες. Γι' αυτό εγκλωβίζουν

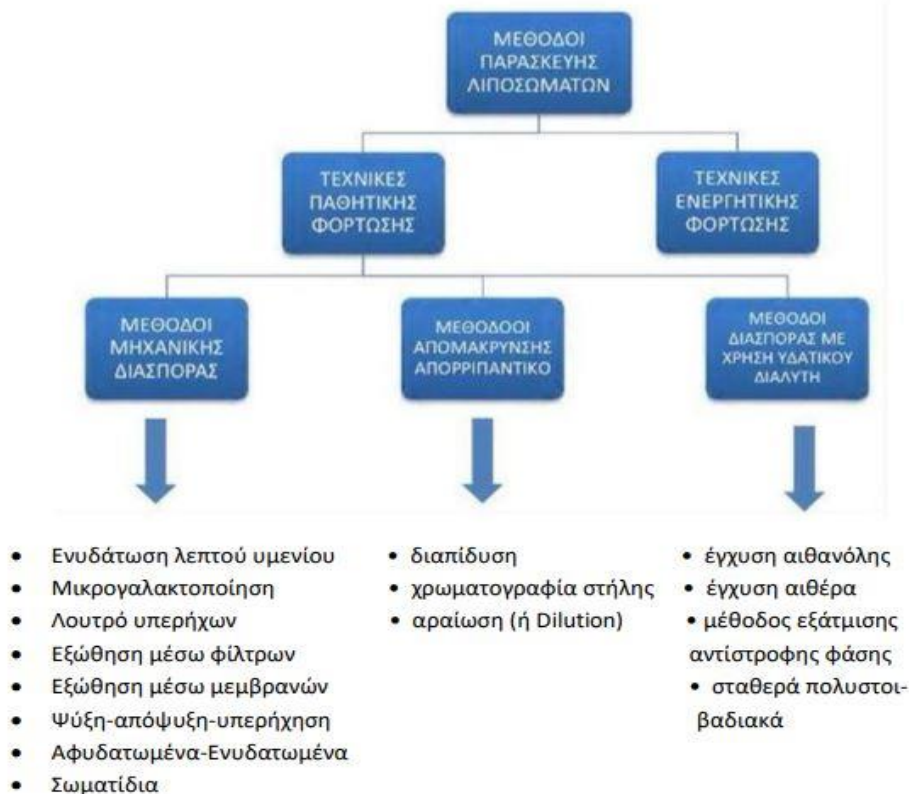
αποτελεσματικότερα υδρόφοβα μόρια, είναι σχετικά σταθερά, ωστόσο απομακρύνονται από την κυκλοφορία του αίματος σχετικά γρήγορα.

- Μεγάλα Μονοστοιβαδικά Λιποσώματα (LUV large unilamellar vesicles) με μέγεθος 100-1000nm. Περιέχουν στη δομή τους μία και μοναδική διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων και αυτό τα καθιστά αποτελεσματικότερα στον εγκλωβισμό υδρόφιλων μορίων καθώς περιέχουν μεγαλύτερο εσωτερικό υδρόφιλο τμήμα σε σχέση με τη υδρόφοβη επιφάνεια της διπλοστοιβάδας τους.
- Μικρά Μονοστοιβαδικά Λιποσώματα (SUV small unilamellar vesicles) με μέγεθος περίπου 100nm. Αποτελούνται από μία διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων. Τα μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα εμφανίζουν μεγάλη ομοιογένεια στο μέγεθος και είναι το μικρότερο δυνατό μέγεθος στο οποίο μπορεί να σχηματιστεί λιπόσωμα.



Σχήμα 3.4: Σφαιρική δομή λιποσώματος (Deamer,1980)

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι παρασκευής λιποσωμάτων που φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 3.5: Μέθοδοι παρασκευής λιποσωμάτων (Σιολετις Ροζλιν ,Πτυχιακή Εργασία)

3.2 Εφαρμογές των λιποσωμάτων

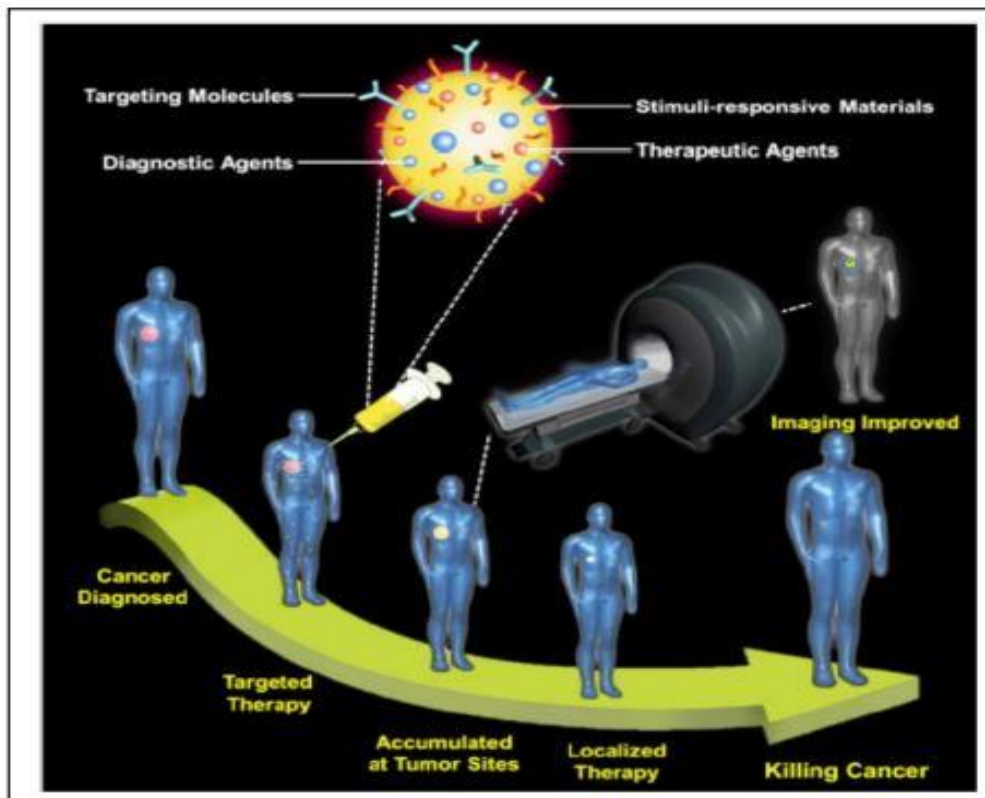
Το λιπόσωμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως όχημα για τη χορήγηση θρεπτικών καθώς και φαρμακευτικών ουσιών. Ακόμη, τα λιποσώματα μπορούν να παρασκευαστούν με διάσπαση βιολογικών μεμβρανών όπως σε επεξεργασία με υπερήχους. (Torchilin,2005)

Επιπλέον, οι βιομηχανίες τροφίμων και γεωργίας έχουν μελετήσει εκτενώς εγκλεισμό λιποσωμάτων για την ανάπτυξη συστημάτων μεταφοράς που μπορούν να παγιδεύουν ασταθείς ενώσεις (όπως είναι τα αντιμικροβιακά, τα αντιοξειδωτικά, οι γεύσεις και τα βιοδραστικά στοιχεία) και να προστατεύουν την δραστηριότητά τους. Τα λιποσώματα μπορούν να παγιδεύουν τόσο υδρόφοβες όσο και υδρόφιλες ενώσεις, αποφεύγοντας τον μεταβολισμό των ενώσεων στο εσωτερικό τους και απελευθερώνοντας το περιεχόμενο τους σε καθορισμένους στόχους. Στην λιπόφιλη περιοχή ανάμεσα στις στοιβάδες της μεμβράνης, αποθηκεύονται υδρόφοβες ουσίες

ενώ αντίστοιχα στην υδρόφιλη, στον πυρήνα του λιποσώματος ουσίες διαλυτές σε υδάτινα μέσα.(Μενεσίδης Ιωάννης, Φαρμακοποιός, Διπλωματική Εργασία).

Ακόμη βρίσκουν εφαρμογή και στον κλάδο των καλλυντικών, καθώς διεισδύουν στα βαθύτερα στρώματα του δέρματος, παρατείνοντας έτσι το χρόνο δράσης, καθώς και βελτιώνοντας την υγρασία του. Αρχικά λόγω της ομοιότητας τους με τις κυτταρικές μεμβράνες είναι βιοσυμβατά, βιοδιασπώμενα, μη τοξικά και μη ανοσογόνα και επομένως δεν οδηγούν σε ανοσοβιολογική απόκριση.

Πολλά από τα σύγχρονα πειράματα σε λιποσώματα στοχεύουν στην μελέτη και βέλτιστη κατασκευή τους ως φορείς φωτοευαίσθητων ουσιών που χρησιμοποιούνται στην φωτοδυναμική θεραπεία (ΦΔΘ) (Zeballos et al., 2012- Kuntsche et al.,2010). Η φωτοδυναμική θεραπεία περιλαμβάνει την ακτινοβόληση παθολογικών ιστών με μη θερμικό φως ενώ σε αυτά υπάρχει ήδη συγκέντρωση φωτοευαίσθητων ουσιών με χορήγησή τους στον οργανισμό. Οι ουσίες αυτές διεγείρονται με την ακτινοβολία και μέσα από φυσικοχημικές διεργασίες καταστρέφουν τα κύτταρα στα οποία βρίσκονται. Όμως με τους συμβατικούς τρόπους χορήγησης οι φωτοευαίσθητες ουσίες κατανέμονται σε όλο τον οργανισμό. Παρ' όλο που η ακτινοβόληση γίνεται μόνο στους ιστούς που επιθυμείται η δράση της δεν μπορεί να περιοριστεί μόνο στα παθολογικά κύτταρα και έτσι δέχονται ακτινοβόληση και τα υγιή. Με την ενθυλάκωση τέτοιων τοξικών ουσιών σε λιποσώματα έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνεται η αποδοτικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας και αυξάνεται η ασφαλής χορήγηση των φωτοευαίσθητων φαρμακευτικών ουσιών (από Τσουνάϊ Ε., Διπλωματική εργασία, ΕΜΠ).



Σχήμα 3.6: Χρήση των νανοσυστημάτων στη θεραπεία του καρκίνου (Liu et al., 2014).

Τέλος, μπορούν να οδηγήσουν στην απλούστευση της διαδικασίας μεταφοράς φαρμάκων σε καρκινικούς ιστούς. Η τεχνολογία εγκλεισμού λιποσωμάτων (Liposomal encapsulation technology, LET) είναι η πιο πρόσφατη τεχνική μεταφοράς που χρησιμοποιείται από ιατρικούς ερευνητές με στόχο την μεταφορά φαρμάκων που δρουν ως θεραπευτικοί παράγοντες στα όργανα-στόχους του σώματος. Το LET είναι μια μέθοδος δημιουργίας μικροσκοπικών λιποσωμάτων, τα οποία μπορούν να εγκλείσουν πολλά υλικά. Αυτά τα λιποσώματα δημιουργούν ένα φράγμα γύρω από το περιεχόμενό τους το οποίο είναι ανθεκτικό στα ένζυμα του στόματος και του στομάχου, αλκαλικών διαλυμάτων, χωνευτικών χυμών, αλάτων παραγόμενων από την χοληδόχο κύστη και την εντερική χλωρίδα που παράγονται στο ανθρώπινο σώμα, καθώς και ελεύθερες ρίζες. Αυτή η προστατευτική ασπίδα φωσφολιπιδίων δημιουργεί έναν ανθεκτικό φραγμό μέχρις ότου τα περιεχόμενα του λιποσώματος παραδοθούν στον ακριβή στόχο ή όπου θα χρησιμοποιηθεί το περιεχόμενο (Akbarzadeh et al., 2013). Ο εγκλωβισμός αντικαρκινικών φαρμάκων σε λιποσώματα, μειώνει δραστικά την τοξική τους δράση, ενώ παράλληλα αυξάνει την αποτελεσματικότητά τους. Χρησιμοποιώντας τον λιποσωμικό φορέα, αλλάζει η

φαρμακοκινητική του θεραπευτικού παράγοντα, βελτιώνοντας έτσι την βιοδιαθεσιμότητα του εγκλεισμένου φαρμάκου σε συγκεκριμένους ιστούς στόχους.

3.3 Φάσεις μετάβασης των λιποσωμάτων

Ανάλογα με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται, τα λιπίδια των διπλοστοιβάδων παρουσιάζουν μεγάλη ή και σχεδόν καθόλου ρευστότητα. Η εξάρτηση αυτή από τη θερμοκρασία είναι η λεγόμενη συμπεριφορά φάσης των λιποσωμάτων. Υπάρχει μια κρίσιμη τιμή της θερμοκρασίας, η θερμοκρασία μετάπτωσης, T_c , η οποία είναι χαρακτηριστική για κάθε είδος λιπιδίου και ορίζει τη μετάβασή τους από την λεγόμενη φάση πηκτής (gel phase) στη ρευστή φάση.

Η αύξηση της θερμοκρασίας ευνοεί την κίνηση Brown των σωματιδίων με αποτέλεσμα την αύξηση των μεταξύ τους συγκρούσεων και των συσσωματώσεων τους, γεγονός που έπεται τη μείωση της συνολικής επιφάνειας και αφετέρου της ελεύθερης ενέργειας, καθιστώντας το σύστημα θερμοδυναμικά πιο ασταθές. Τα λιπίδια όμως τα οποία επιλέγονται ως βάση δεν θα πρέπει να είναι πολύ μικρά, καθώς έρευνες έχουν δείξει πως η αύξηση του μήκους της αλυσίδας συνεπάγεται υψηλότερες θερμοκρασίες μετάπτωσης T_c και επομένως καλύτερη σταθερότητα στις θερμοκρασίες όπου λαμβάνουν χώρα οι διεργασίες (4 – 40°C). Όσο προσεγγίζεται η θερμοκρασία μετάβασης των λιπιδίων, τα λιποσώματα τείνουν να αποκτούν πιο ρευστή μεμβράνη και όχι τόσο ζελατινώδη, με αποτέλεσμα τη διαρροή δραστικών ουσιών (Li et al, 2019-Freitas et al., 1994- Joshi & Müller, 2009- Anderson & Omri, 2004).

Από την όψη της μοριακής δομής θα μπορούσε να ειπωθεί πως στην ρευστή φάση ($T > T_c$) οι υδρογονανθρακικές αλυσίδες είναι «λειωμένες» και κυριαρχεί χωρική αταξία των λιπιδικών μορίων στο επίπεδο της διπλοστοιβάδας. Αντίθετα στη φάση της γέλης (gel φάση, $T < T_c$) η διπλοστοιβάδα γίνεται σχετικά πιο άκαμπτη και τα λιπιδικά μόρια «παγώνουν» με τις κεφαλές τους να διατάσσονται σε μια σχετικά περιοδική δομή. Επομένως η θερμοκρασία στην οποία βρίσκονται τα λιποσώματα επηρεάζει και τις μηχανικές τους ιδιότητες (Dimova et al., 2000 - Lee et al., 2001). Όταν αυτά βρίσκονται στην ρευστή τους φάση δεν παρουσιάζουν αντίσταση στις διατμητικές τάσεις και είναι πιο εύκολο να λυγιστούν ενώ στην gel φάση συμβαίνει το αντίθετο.

4. Μελέτη της οπτικής παγίδας λιποσωμάτων με χρήση του Comsol Multiphysics και σύγκριση αποτελεσμάτων με τα αντίστοιχα πειραματικά

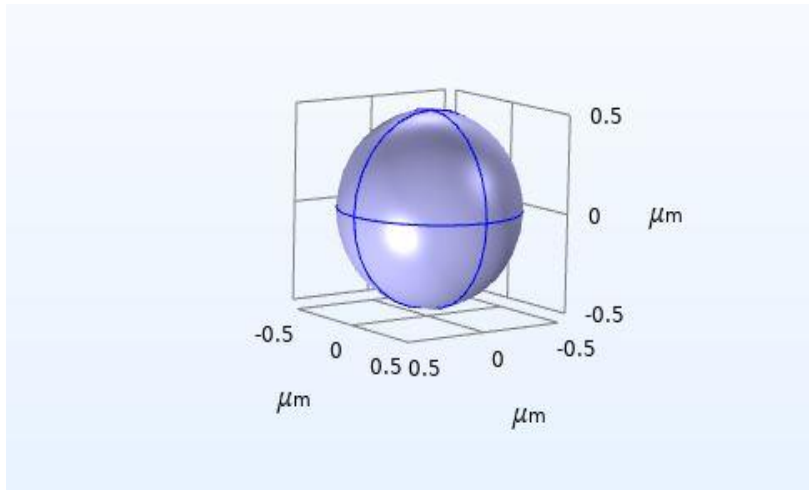
Η οπτική παγίδευση δεν είναι τόσο εύκολη τεχνική όσο φαίνεται, καθώς είναι πολλοί οι παράγοντες που πρέπει να εξεταστούν για να δημιουργηθεί μια ισχυρή και σταθερή παγίδα. Γι' αυτόν το λόγο σε αυτό το σημείο, με τη χρήση ενός προγράμματος προσομοίωσης, θα προσομοιώσουμε την οπτική παγίδα, και θα συγκρίνουμε τα αποτελέσματα μας για διάφορες τιμές των παραμέτρων της παγίδας με αντίστοιχα πειραματικά αποτελέσματα για τον υπολογισμό της αποδοτικότητας της. Όσο πιο μεγάλη είναι η αποδοτικότητα τόσο πιο ισχυρή είναι η παγίδευση που επιτυγχάνεται. Το πρόγραμμα που θα χρησιμοποιηθεί είναι το Comsol Multiphysics.

Το Comsol είναι ένα ισχυρό πρόγραμμα προσομοίωσης, με αρκετές υπολογιστικές δυνατότητες και μπορεί να προσομοιώσει πολλά φυσικά προβλήματα και να δώσει τις κατάλληλες λύσεις, ανάλογα με τα δεδομένα που έχουν καταχωρηθεί. Έτσι στο σημείο αυτό θα περιγράψουμε την διαδικασία που ακολουθήθηκε έτσι ώστε να προσομοιωθεί η πειραματική διάταξη της οπτικής παγίδας.

4.1 Περιγραφή COMSOL

Αρχικά, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η σωστή επιλογή του θεωρητικού μοντέλου που επιθυμούμε να προσομοιώσουμε. Στην περίπτωση μας επειδή πρόκειται για προσομοίωση μιας δέσμης laser, η δέσμη laser ισοδυναμεί με ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα. Αυτό είναι και το φυσικό μοντέλο που θα εισάγουμε στο COMSOL δηλαδή electromagnetic waves-ewfd.

Έπειτα, πολύ σημαντικό ρόλο έχει η δημιουργία της γεωμετρίας που θέλουμε να μελετήσουμε, δηλαδή το σχήμα της, οι διαστάσεις της, το υλικό από το οποίο είναι φτιαγμένη κοκ. Το σχήμα του σωματιδίου που επιθυμώ να παγιδευτεί είναι μία σφαίρα με διαστάσεις $R_x = 0.5\mu\text{m}$, $R_y = 0.5\mu\text{m}$, $R_z = 0.5\mu\text{m}$.



Σχήμα 4.1:Γεωμετρία παγιδευμένου σωματιδίου

Αρχικός σκοπός μας ήταν ο υπολογισμός των οπτικών δυνάμεων που ασκούνται σε μία παγιδευμένη σφαίρα. Το Comsol παρόλο που παρέχει μια αρκετά μεγάλη λίστα από υλικά δεν περιελάβανε το υλικό το οποίο επιθυμούσαμε και έτσι ορίσαμε εμείς τα χαρακτηριστικά του υλικού, όπως έχουν οριστεί και στην διεθνή βιβλιογραφία (Yu et al., 2013).

Οι πιο κάτω παράμετροι έχουν οριστεί με τέτοιο τρόπο για να χαρακτηρίζουν υλικά που είναι κοντά στα βιολογικά δείγματα.

Δείκτης διάθλασης: $n_1 = 1,378$

relative permittivity: $\epsilon_p = 1,378^2$

Electric conductivity: $\sigma = 0$ (S/m)

Relative permeability: $\mu_r = 1$

Αντίστοιχα ορίστηκε και το υλικό του buffer, που μέσα σε αυτό βρίσκεται το σωματίδιο. Το buffer που έχουμε ορίσει είναι νερό στην δική μας περίπτωση.

Δείκτης διάθλασης: $n_2 = 1,335$

Relative permittivity: $\epsilon_r = 1,335^2$

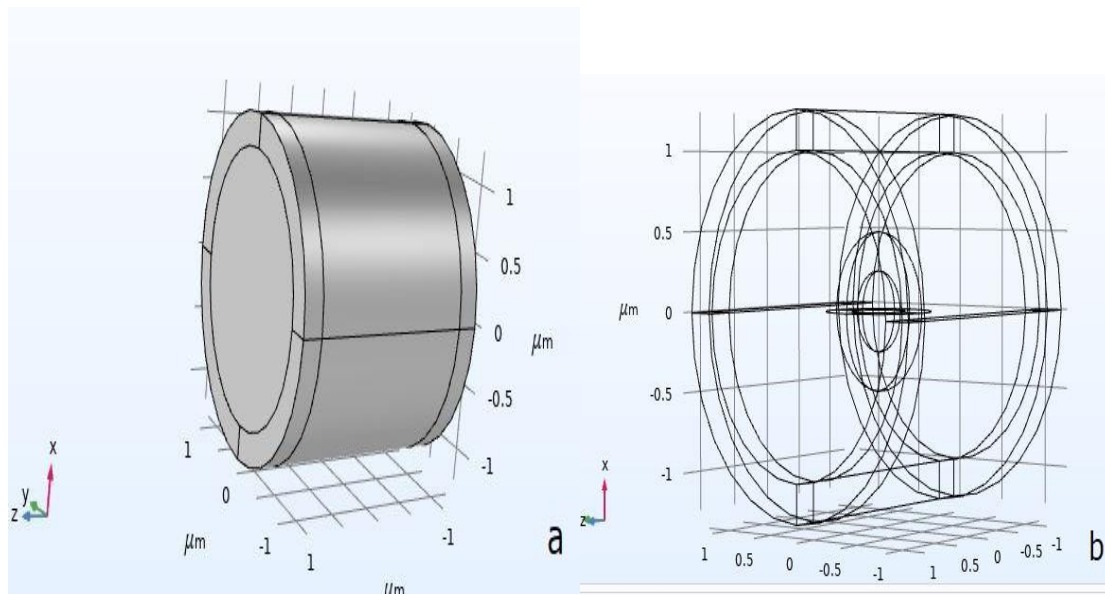
Electric conductivity: $\sigma = 0$ (S/m)

Relative permeability: $\mu_r = 1$

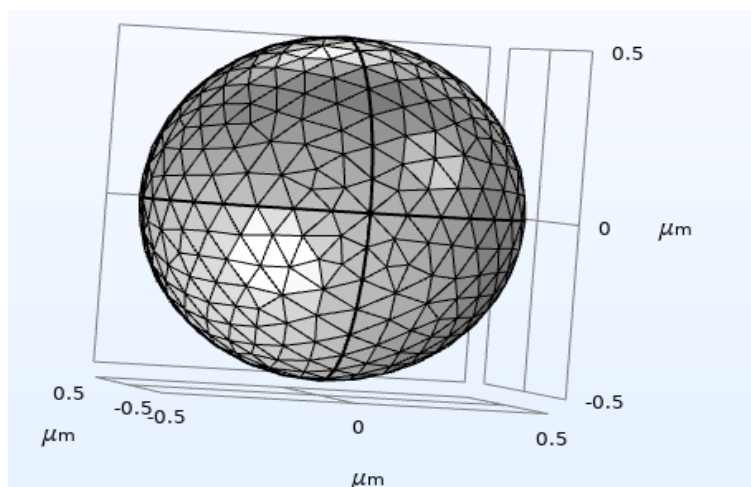
Αφού λοιπόν ορίσαμε την γεωμετρία και τα απαραίτητα υλικά, προχωρήσαμε στην δημιουργία του Perfectly Matched layer (PML). Το PML είναι μια επιφάνεια που τοποθετείται εξωτερικά της σφαίρας. Σκοπός της είναι να απορροφά τα εξερχόμενα κύματα. Το PML το έχουμε ορίσει με κυλινδρική συμμετρία και περικλείει τη σφαίρα και το έχουμε ορίσει το ίδιο υλικό με το περιβάλλον του σωματιδίου. Ο λόγος που το έχουμε ορίσει σαν κύλινδρο είναι διότι προσομοιάζει καλύτερη τη γεωμετρία του σωματιδίου και της δέσμης.

Το PML είναι μια σημαντική προσθήκη στην γεωμετρία. Αποτελεί μια τεχνητή στρώση απορρόφησης που χρησιμεύει στο να απορροφά το σκεδαζόμενο φως, έτσι ώστε αυτό να μην επανεισέρχεται στην περιοχή προσομοίωσης και να δημιουργεί αλλοιώσεις. Στην περίπτωση που είχαμε μεγάλη περιοχή προσομοίωσης δεν θα χρειαζόνταν. Εδώ όμως είναι περιορισμένη οπότε και είναι απαραίτητο.

Πριν προχωρήσουμε στον ορισμό των κατάλληλων εξισώσεων, έχουμε διακριτοποιήσει (mesh) την γεωμετρία μας. Η διακριτοποίηση χωρίζει την γεωμετρία σε πολλά μικρά κομμάτια και αυτό καθορίζει την ακρίβεια με την οποία θα υπολογιστεί η λύση. Αυτό βέβαια έχει και κάποιο κατώφλι, που καθορίζεται από την υπολογιστική δύναμη του υπολογιστή που χρησιμοποιούμε. Όσο πιο πυκνό είναι το mesh, δηλαδή όσο μικρότερα είναι τα στοιχειώδεις κομμάτια στα οποία έχει χωριστεί η γεωμετρία μας, τόσο μεγαλύτερη υπολογιστική δύναμη είναι απαραίτητη αφού το αποτέλεσμα θα είναι υπολογισμένο με μεγαλύτερη ακρίβεια. Με βάση τις ικανότητες του δικού μας υπολογιστή το μέγιστο μέγεθος στοιχείου έχει οριστεί $\frac{\lambda}{n_{RBC}/5}$ ενώ το μικρότερο $\frac{\lambda}{n_{RBC}/11}$.



Σχήμα 4.2: Στην εικόνα a) βλέπουμε την κυλινδρική γεωμετρία που έχει το PML ενώ στην b) φαίνεται πως περιβάλλει τη σφαίρα



Σχήμα 4. 3: Το meshing της γεωμετρίας

Για την εξαγωγή σωστών αποτελεσμάτων σημαντικό ρόλο έχει η δήλωση των εξισώσεων που περιγράφουν το ηλεκτρομαγνητικό κύμα της δέσμης laser.

Το ηλεκτρομαγνητικό κύμα έχει οριστεί ως μια γκαουσιανή δέσμη δηλαδή

$$E_b = E_{b0} \cdot \frac{w_0}{w(z)} \cdot e^{-\frac{((x-x_0)^2+(y-y_0)^2)}{w(z)^2}} \cdot e^{-j*k*(z-z_0) - j*k*\frac{((x-x_0)^2+(y-y_0)^2)}{2*R(z)^2} + j*ph(z)} \quad [V/m]$$

Όπου:

- $E_{b0} = \sqrt{\frac{2*P_0}{c*e_0*n_2}}$ με $l_0 = \frac{2*P_0}{\pi*w_0^2}$ η μέγιστη ένταση της δέσμης στην εστία & $w_0 = a*R$ η ακτίνα της δέσμης στην εστία
- $w(z) = w_0 * \sqrt{1 + \left(\frac{z-z_0}{zR}\right)^2}$, η ακτίνα της δέσμης σε κάθε θέση, όπου $zR = \frac{\pi*w_0^2}{wl}$ & $wl = \lambda/n_2$ & $k = (2*\pi) / wl$
- $ph(z) = \arctan(z-z_0 / zR)$ η συνιστώσα της φάσης που εξαρτάται μόνο από την απόσταση διάδοσης.

Ακόμη ,

$e_0 = 8.85*10^{-12} [F/m]$ (διηλεκτρική σταθερά του κενού)

$m_0 = \pi * 4 * 10^{-7} [H/m]$ (μαγνητική διαπερατότητα)

$c = 3*10^8 [m/s]$ (ταχύτητα του φωτός)

$\lambda = 656 \text{ nm}$ (μήκος κύματος)

$P = 71 \text{ mW}$ (ισχύς της δέσμης)

$R = 0.5 \mu\text{m}$ (ακτίνα σωματιδίου)

$x_0 = y_0 = 0$ (μετατόπιση της δέσμης κατά τον x & y άξονα αντίστοιχα)

$w_0 = a*R$ (διάμετρος της δέσμης στο σημείο εστίασης)

$a = 2$ (διάμετρος της δέσμης σε σχέση με την ακτίνα του σωματιδίου)

$z_0 = 1*10^{-6} \mu\text{m}$ (σημείο εστίασης της δέσμης)

Τέλος, πρέπει να προσδιοριστούν και οι εξισώσεις υπολογισμού των δυνάμεων. Οι δυνάμεις που ασκούνται στο λιπόσωμα έχουν προκύψει από την ολοκλήρωση του τανυστή τάσης Maxwell πάνω στην επιφάνεια του λιποσώματος. Η συνολική δύναμη που ασκείται πάνω στο λιπόσωμα έχει προκύψει από την ανάλυση με ολοκλήρωση σε ολόκληρη την επιφάνεια του παγιδευμένου σωματιδίου (Rockstuhl & Herzig, 2004) είναι:

$$\langle F \rangle = \iint \left\{ \frac{\epsilon}{2} \text{Re}[(\vec{E} \cdot \vec{n})\vec{E}^* - \frac{\epsilon}{4}(\vec{E} \cdot \vec{E}^*) \cdot \vec{n}] + \frac{\mu}{2} \text{Re}[(\vec{H} \cdot \vec{n})\vec{H}^*] - \frac{\mu}{4}(\vec{H} \cdot \vec{H}^*)\vec{n} \right\} dl'$$

Όπου n το κάθετο διάνυσμα σε κάθε θέση στην επιφάνεια του σωματιδίου. Η τελική μορφή των εξισώσεων της δύναμης που χρησιμοποιήθηκε στο Comsol είναι η :

$$F_x = \frac{1}{2} \cdot \epsilon_0 \cdot n_2^2 \cdot \text{Re} \left((E_x \cdot n_x + E_y \cdot n_y + E_z \cdot n_z) \cdot \overline{E_x} \right) - \frac{1}{4} \cdot \epsilon_0 \cdot n_2^2 \cdot \|E\|^2 \cdot n_x \\ + \frac{1}{2} \cdot m_0 \cdot \text{Re} \left((H_x \cdot n_x + H_y \cdot n_y + H_z \cdot n_z) \cdot \overline{H_x} \right) - \frac{1}{4} \cdot m_0 \cdot \|H\|^2 \cdot n_x$$

$$F_y = \frac{1}{2} \cdot \epsilon_0 \cdot n_2^2 \cdot \text{Re} \left((E_x \cdot n_x + E_y \cdot n_y + E_z \cdot n_z) \cdot \overline{E_y} \right) - \frac{1}{4} \cdot \epsilon_0 \cdot n_2^2 \cdot \|E\|^2 \cdot n_y \\ + \frac{1}{2} \cdot m_0 \cdot \text{Re} \left((H_x \cdot n_x + H_y \cdot n_y + H_z \cdot n_z) \cdot \overline{H_y} \right) - \frac{1}{4} \cdot m_0 \cdot \|H\|^2 \cdot n_y$$

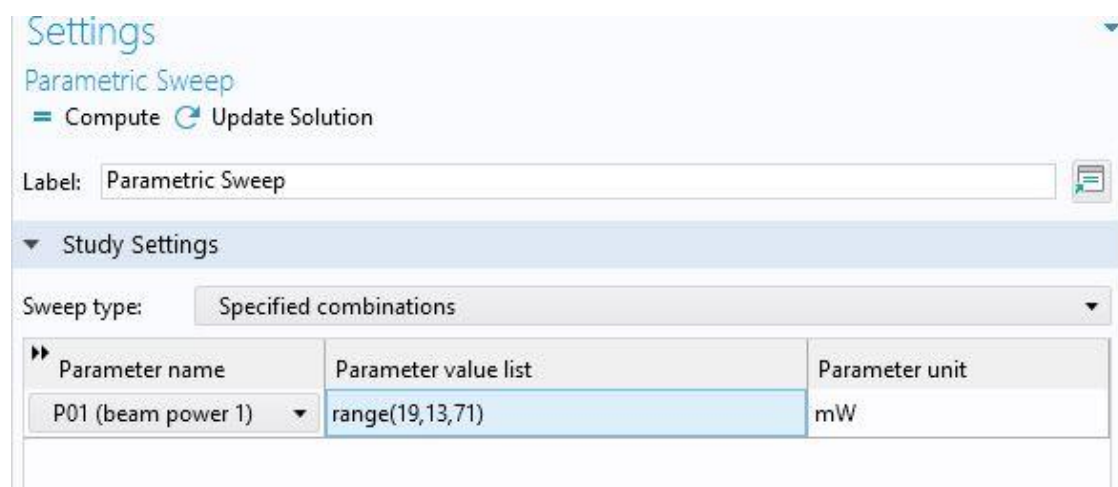
$$F_z = \frac{1}{2} \cdot \epsilon_0 \cdot n_2^2 \cdot \text{Re} \left((E_x \cdot n_x + E_y \cdot n_y + E_z \cdot n_z) \cdot \overline{E_z} \right) - \frac{1}{4} \cdot \epsilon_0 \cdot n_2^2 \cdot \|E\|^2 \cdot n_z \\ + \frac{1}{2} \cdot m_0 \cdot \text{Re} \left((H_x \cdot n_x + H_y \cdot n_y + H_z \cdot n_z) \cdot \overline{H_z} \right) - \frac{1}{4} \cdot m_0 \cdot \|H\|^2 \cdot n_z$$

Από αυτές τις εξισώσεις έγινε χρήση της 1ης εξίσωσης, καθώς αυτή είναι κάθετη στην διεύθυνση διάδοσης της δέσμης και μας ενδιαφέρει η εγκάρσια συνιστώσα της δύναμης για σύγκριση με τα πειραματικά δεδομένα.

4.2 Περιγραφή διαδικασίας

Σκοπός μας είναι η μελέτη της αποδοτικότητας της παγίδας και η σύγκριση των τιμών που θα προκύψουν από το comsol για τιμές ακτίνας λιποσώματος $R=0.425\mu\text{m}$ και $R=0.5\mu\text{m}$ με αντίστοιχες πειραματικές αποδοτικότητες. Το μήκος κύματος που μελετήθηκε ήταν $\lambda=656\text{nm}$. Έγινε επιλογή αυτού του μήκους κύματος επειδή βρίσκεται κοντά στα 660nm του διοδικού laser με σκοπό τα συμπεράσματα που θα προκύψουν από την θεωρητική μελέτη να είναι σχετικά με το πείραμα.

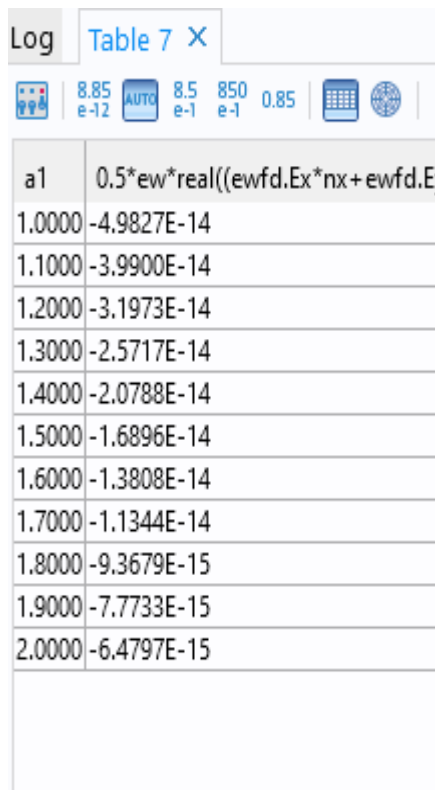
Αρχικά έχουν οριστεί οι κατάλληλες σταθερές/μεταβλητές όπως έχουν περιγραφεί και πιο πάνω. Μέσω της επιλογής Parametric Sweep που υπάρχει στις ρυθμίσεις του COMSOL, επιλέγουμε η παράμετρος η οποία συναρτήσει της θα υπολογίζεται η δύναμη F_x να είναι η P , έτσι ώστε να προσδιορίσουμε από τη κλίση της γραφικής παράστασης την αποδοτικότητα Q .



Σχήμα 4.4: Στιγμιότυπο από τη ρύθμιση της παραμέτρου της οποίας συναρτήσει αυτής θα υπολογιστεί η δύναμη F_x .

Αφού λοιπόν έχουμε ορίσει τις απαραίτητες παραμέτρους και το πρόγραμμα έχει κάνει τους απαραίτητους υπολογισμούς, προχωράμε στον υπολογισμό της F_x δύναμης, η οποία δίνεται από το Comsol στην πιο κάτω μορφή. Στη συνέχεια

καταχωρούμε τα αποτελέσματα μας σε ένα αρχείο Excel για τις τιμές των Fx συναρτήσεων των παραμέτρων P,a,R όπως έχουν προκύψει. Έπειτα γίνεται η επεξεργασία των πιο πάνω τιμών , δηλαδή ο υπολογισμός της κλίσης που σχηματίζουν τα σημεία στη περίπτωση που υπολογίζουμε το Q από τη γραφική Fx-P , καθώς και η δημιουργία των γραφικών παραστάσεων για Fx-a,Fx-R για να παρατηρήσουμε αν τα αποτελέσματα μας συνάδουν με αντίστοιχα πειραματικών από βιβλιογραφικές πηγές.



The screenshot shows a table window titled 'Table 7 X' with a toolbar containing icons for zooming, auto-scaling, and other table functions. The table contains two columns: 'a1' and numerical values in scientific notation. The values decrease in magnitude as 'a1' increases from 1.0000 to 2.0000.

a1	0.5*ew*real((ewfd.Ex*nx+ewfd.E
1.0000	-4.9827E-14
1.1000	-3.9900E-14
1.2000	-3.1973E-14
1.3000	-2.5717E-14
1.4000	-2.0788E-14
1.5000	-1.6896E-14
1.6000	-1.3808E-14
1.7000	-1.1344E-14
1.8000	-9.3679E-15
1.9000	-7.7733E-15
2.0000	-6.4797E-15

Σχήμα 4.5: Πίνακας αποτελεσμάτων όπως εμφανίζεται στο πρόγραμμα COMSOL MULTIPHYSICS

4.3 Βαθμονόμηση οπτικής παγίδας διοδικού laser με τη μέθοδο της διηλεκτροφόρησης για λιποσώματα

4.3.1 Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε και στο πρώτο κεφάλαιο, έχουν αναπτυχθεί διάφορα θεωρητικά και υπολογιστικά μοντέλα για να υπολογιστούν οι οπτικές δυνάμεις. Παρ' όλα αυτά κανένα μοντέλο δεν μπορεί να τις προβλέψει με ακρίβεια και πόσο μάλλον όταν οι συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος είναι διαφορετικές κάθε φορά, για παράδειγμα διάφορα δείγματα ή διάφοροι ρυθμοί εκπομπής laser. Έτσι, ο καλύτερος τρόπος για την μέτρηση τους είναι ο πειραματικός μέσω διαφόρων μεθόδων που έχουν αναπτυχθεί. Με τις μεθόδους αυτές μπορούν να μετρηθούν έμμεσα οι οπτικές δυνάμεις και να γίνει βαθμονόμηση της παγίδας, δηλαδή να δοθεί η σχέση των δυνάμεων με την εφαρμοζόμενη ισχύ του laser. Διάφοροι ερευνητές έχουν επιβεβαιώσει την αυστηρή αναλογία μεταξύ εγκάρσιας δύναμης και ισχύος της δέσμης laser (Παπαγιάκουμου,2005).

Οι μέθοδοι βαθμονόμησης που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι δυο, αυτή με βάση τη τυχαία κίνηση Brown των σωματιδίων και η βαθμονόμηση βάση δυνάμεων ιξώδους λόγω της ροής του υγρού του περιβάλλοντος μέσου. Στην πρώτη μέθοδο μελετάται το φάσμα ισχύος ενός σωματιδίου με βάση τη μετακίνηση του λόγω των θερμικών διακυμάνσεων, ενώ στην δεύτερη μέθοδο μελετώνται οι δυνάμεις που υφίσταται το παγιδευμένο σωματίδιο με βάση τη κίνησή του σε σχέση με το περιβάλλοντα υγρό (Svoboda & Block, 1994)

Στην παρούσα εργασία για την βαθμονόμηση οπτικών δυνάμεων σε λιποσώματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διηλεκτροφόρησης, η οποία αναπτύχθηκε στο εργαστήριο «Ανάπτυξη Laser και Εφαρμογές τους» του ΕΜΠ, στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της Ε. Χ. Παπαγιάκουμου (2005). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην μέτρηση δυνάμεων που προκύπτουν σε ένα διηλεκτρικό σωματίδιο όταν αυτό πολώνεται από ένα μη ομογενές ηλεκτρικό πεδίο.

4.3.2 Το φαινόμενο της διηλεκτροφόρησης

Ο όρος διηλεκτροφόρηση (dielectrophoresis, DEP) αρχικά χρησιμοποιήθηκε από τον Herbert Ackland Pohl, για να περιγράψει την κίνηση ενός σωματιδίου εξαιτίας της πόλωσης που επάγεται σε αυτό από ανομοιογενές ηλεκτρικό πεδίο. Ενώ στην ηλεκτροφόρηση η κίνηση καθορίζεται από το συνολικό εσωτερικό φορτίο ενός

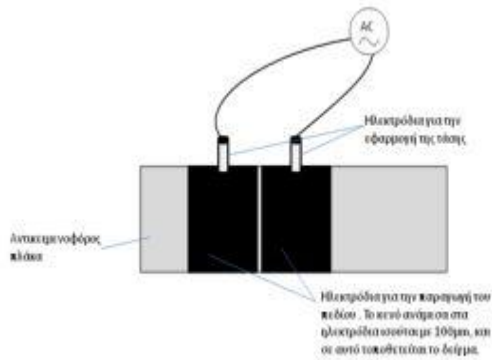
σωματιδίου, στην διηλεκτροφόρηση καθορίζεται από το μέγεθος και την πόλωση των φορτίων που επάγονται στο σωματίδιο από το ηλεκτρικό πεδίο, και προσδίδουν σε αυτό τις ιδιότητες ενός ηλεκτρικού δίπολου. Επιπλέον, υπάρχει μια σημαντική πειραματική διαφορά στα δυο φαινόμενα στο ότι η ηλεκτροφόρηση περιλαμβάνει την εφαρμογή συνεχούς ρεύματος ή χαμηλής συχνότητας ηλεκτρικού πεδίου που είναι συνήθως ομογενές, ενώ για την διηλεκτροφόρηση εφαρμόζονται πεδία εναλλασσόμενου ρεύματος σε ευρύ φάσμα συχνοτήτων τα οποία πρέπει να είναι ανομοιογενή (Pethig & Markx, 1997).

4.3.3 Βαθμονόμηση οπτικής παγίδας διοδικού laser με τη μέθοδο της διηλεκτροφόρησης

Συνήθως, χρησιμοποιούνται μέθοδοι βαθμονόμησης που απαιτούν ειδικό και περίπλοκο εξοπλισμό. Για τον λόγο αυτό πολλά ερευνητικά εργαστήρια ψάχνουν νέες μεθόδους που θα είναι πιο απλές στην κατασκευή αλλά και στην χρήση τους. Στην Ελλάδα μια τέτοια προσπάθεια έγινε στο εργαστήριο «Ανάπτυξη Lasers και εφαρμογών τους» στο ΕΜΠ, στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της Παπαγιάκουμου (2005), βασισμένη στο φαινόμενο της διηλεκτροφόρησης. Σε μια τέτοια μέθοδο πρώτα παγιδεύεται ένα σωματίδιο με την οπτική λαβίδα και ύστερα εφαρμόζεται τάση, έως ότου αυτό διαφύγει της παγίδας. Με την εφαρμοζόμενη τάση στο σωματίδιο δρα και η διηλεκτροφορητική δύναμη ταυτόχρονα με τις οπτικές δυνάμεις. Όταν το σωματίδιο διαφεύγει της οπτικής παγίδας θεωρείται ότι η διηλεκτροφορητική δύναμη εξισορροπεί την οπτική και άρα, μετρώντας την δύναμη DEP την στιγμή της διαφυγής, προκύπτει και η δύναμη της οπτικής παγίδας.

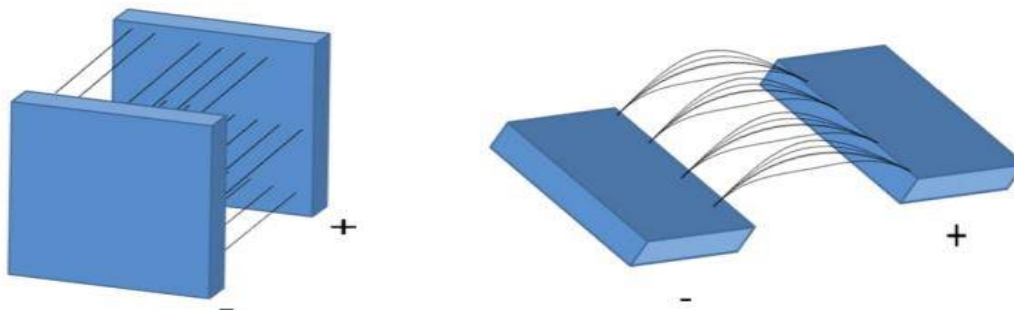
4.3.3.1 Πειραματική διάταξη

Για την εφαρμογή εναλλασσόμενου πεδίου στο παγιδευμένο σωματίδιο χρειάζεται μια διάταξη ηλεκτροδίων, όπου μπορεί να τοποθετηθεί εύκολα το δείγμα προς μελέτη. Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από δυο παράλληλα ηλεκτρόδια σε μορφή λεπτού φιλμ, πάχους 600nm, σε απόσταση μεταξύ τους 100μm (σχήμα 4.6). Η ανάπτυξη των ηλεκτροδίων έγινε με τη μέθοδο της φωτολιθογραφίας στην επιφάνεια ενός αντικειμενοφόρου πλακιδίου μικροσκοπίου. Η κατασκευή τους πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Μικροηλεκτρονικής του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» (σχήμα 4.7)



Σχήμα 4.6: Σχηματική αναπαράσταση της Σχήμα 4.7: Φωτογραφία της διάταξης διάταξης των ηλεκτροδίων(εικόνα από Τσουνάϊ Ε., Διπλωματική εργασία, ΕΜΠ)

Τα ηλεκτρόδια είναι παράλληλα μεταξύ τους ως προς την μικρότερη πλευρά όπως φαίνεται και στο σχήμα 4.8, και αυτό εξασφαλίζει την ανομοιογένεια του πεδίου που χρειάζεται για να δημιουργηθούν φαινόμενα διηλεκτροφόρησης. Στο ίδιο σχήμα φαίνεται η διαφορά στο πεδίο ανάμεσα σε δυο επίπεδες πλάκες ανάλογα με το πώς διατάσσονται μεταξύ τους.

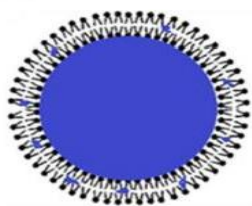


Σχήμα 4.8: Αριστερά, δυο πλάκες είναι τοποθετημένες παράλληλα με την μεγαλύτερη διάσταση της κάθε μιας να είναι απέναντι στην άλλη. Έτσι, θεωρώντας την διάσταση αυτή πολύ μεγαλύτερη από τις άλλες δυο και αγνοώντας τις περιοχές κοντά στα άκρα, το πεδίο που δημιουργείται είναι ομοιογενές. Ενώ στα δεξιά οι δυο πλάκες είναι τοποθετημένες έτσι ώστε οι πλευρές που «αντικρίζονται» είναι στενές, ώστε δεν μπορούμε να αγνοήσουμε τις ανομοιογένειες που προκαλούνται. Έτσι το πεδίο ανάμεσά τους είναι ανομοιογενές.(εικόνα από Τσουνάϊ Ε., Διπλωματική εργασία, ΕΜΠ)

4.3.3.2 Παρασκευή λιποσωμάτων

Στην εργασία αυτή η αποδοτικότητα της παγίδας μετρήθηκε για χρωσμένα λιποσώματα με μπλε του μεθυλενίου. Η παρασκευή τους έγινε με τη μέθοδο υδάτωσης λεπτού υμενίου (Thin Film Hydration Method, TFHM), η οποία οδηγεί σε σχηματισμό ετερογενών διασπορών κυρίως μεγάλων πολυστοιβαδικών κυστιδίων (Multilamellar Vesicles, MLVs). Ως λιπίδιο χρησιμοποιήθηκε λεκιθίνη ή αλλιώς φωσφατιδυλοχολίνη αυγού (egg Yolk phosphatidylcholine, EPC, Lipoid GmbH) και η παρασκευή των λιποσωμάτων έγινε στον τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών (με επικεφαλής τον Αναπλ. Καθ. Κ. Δεμέτζο).

Αρχικά διαλύθηκαν 92 mg λιπιδίου EPC σε χλωροφόρμιο, το οποίο ύστερα απομακρύνθηκε με την εφαρμογή κενού σε ένα περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator). Για να δημιουργηθεί ένα λείο και ομοιογενές υμένιο είναι επιθυμητή η αργή εξάτμιση του διαλύτη. Ακόμη, η μορφή του λιπιδικού φιλμ επηρεάζεται από την συγκέντρωση των λιπιδίων. Στη συνέχεια το υμένιο τοποθετήθηκε σε θάλαμο κενού όλο το βράδυ για την απομάκρυνση ιχνών οργανικού διαλύτη. Η ενυδάτωση του πραγματοποιήθηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα με τη προσθήκη 3ml διαλύματος μπλε του μεθυλενίου (methylene blue, MB) σε νερό υψηλής καθαριότητας (HPLC grade water, Sigma Aldrich) για 1 ώρα. Η θερμοκρασία ενυδάτωσης πρέπει να είναι μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία μετάβασης φάσης των λιπιδίων. Αυτό που προκύπτει μετά την ενυδάτωση είναι ένα διάλυμα πολυστοιβαδικών και πολυκυστιδικών (MultiVesicular vesicles, MVVs) λιποσωμάτων χρωσμένων με τη φωτοευαισθητοποιό ουσία. Τέλος το διάλυμα αυτό τοποθετήθηκε σε συσκευή υπερήχων για ένα λεπτό, και τα λιποσώματα διασπάστηκαν σε πολυκυδιστικά και ολιγοστοιβαδικά μικρότερων διαστάσεων, στην περίπτωση μας περίπου 1-3μm. Το μπλε του μεθυλενίου (MB) είναι μια υδρόφιλη ουσία θετικά φορτισμένη, οπότε έχει την τάση να εγκλωβίζεται στο εσωτερικό των λιποσωμάτων, στην υδρόφιλη δηλαδή περιοχή τους (Σπυράτου, 2010). Επειδή όμως το λιπίδιο που χρησιμοποιήθηκε είναι ελαφρώς αρνητικά φορτισμένο, μέρος του μπλε του μεθυλενίου μπορεί να βρεθεί και στην υδρόφοβη περιοχή ανάμεσα στις διπλοστοιβάδες του λιποσώματος.



Σχήμα 4.9: φαίνεται το πως η φωτοευαισθητοποιός ουσία, του μπλε του μεθυλενίου κατανέμεται στο λιπόσωμα.

4.4 Παρουσίαση Αποτελεσμάτων / Συμπερασμάτων

Οι οπτικές δυνάμεις που δρουν σε ένα διηλεκτρικό σωματίδιο στην εστία της δέσμης καθορίζονται από την προσπίπτουσα ισχύ, P , την ταχύτητα του φωτός, c , τον δείκτη διάθλασης του περιβάλλοντος μέσου, n_m , και ενός αδιάστατου παράγοντα, Q (Mazolli et al., 2003). Έτσι προκύπτει η σχέση:

$$F = Q \frac{n_m P}{c}$$

Η αποδοτικότητα της παγίδας μετριέται μέσω του αδιάστατου παράγοντα Q .

Μετρώντας τη δύναμη που ασκείται σε σωματίδια, ανάλογα με την ισχύ που εφαρμόζεται κάθε φορά, προκύπτει το διάγραμμα δύναμης - ισχύος. Από την κλίση της καμπύλης μπορεί να εξαχθεί και η τιμή για το παράγοντα Q .

Μια άλλη παράμετρος που επηρεάζει την αποδοτικότητα της παγίδας είναι το μέγεθος της δέσμης στο σημείο εστίασης και κυρίως η σχέση του με την ακτίνα του σωματιδίου. Οι Nahmias και Odde (2002) υπολογίζουν τις οπτικές δυνάμεις ως συνάρτηση της αδιάστατης παραμέτρου $a = a/w_{\text{παγ}}$, όπου a η ακτίνα του σωματιδίου (R στο comsol) και $w_{\text{παγ}}$ η ακτίνα της γκαουσιανής δέσμης (w_0 στο comsol). Εδώ εμείς χρησιμοποιούμε τον αντίστροφο λόγο στο comsol γιατί μας βοηθάει περισσότερο στις εξισώσεις. Έτσι έχουμε διάγραμμα ως συνάρτηση του $1/a$ δηλ. του a από τα δεδομένα στο πρόγραμμα όπως αναφέραμε και στην υποενότητα 4.1. Η εξάρτηση της εγκάρσιας δύναμης από αυτή τη παράμετρο φαίνεται στην υποενότητα 4.4.2.

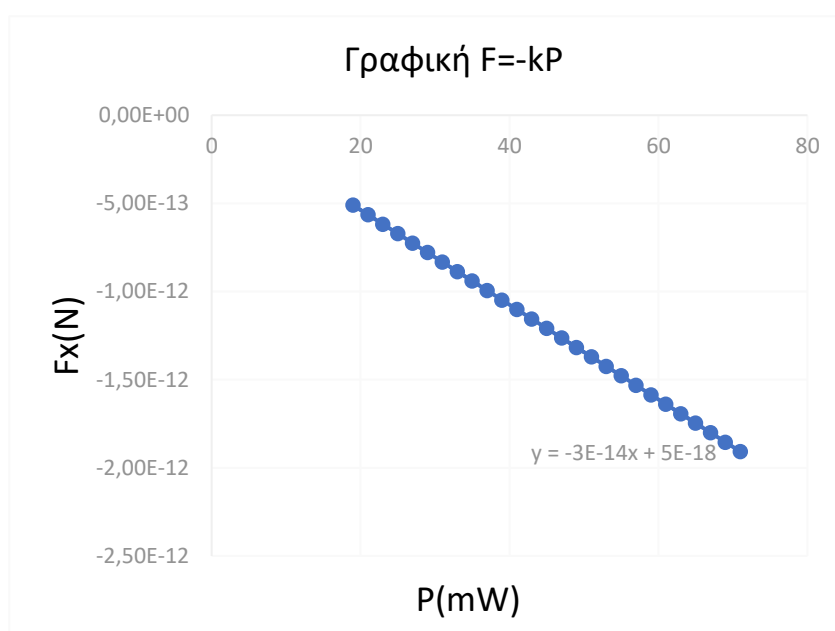
Τέλος στην υποενότητα 4.4.3 μελετάται η εξάρτηση της εγκάρσιας δύναμης από την ακτίνα του λιποσώματος. Δηλαδή η συμπεριφορά της δύναμης με αύξηση της ακτίνας και η σύγκριση του διαγράμματος με αντίστοιχο πειραματικό.

4.4.1 Εξάρτηση από την ισχύ P και υπολογισμός αποδοτικότητας

Στο comsol αρχικά εξετάστηκε η περίπτωση που έχουμε λιπόσωμα με $R=0,425\mu\text{m}$ και έπειτα για $R=0,5\mu\text{m}$. Τα αποτελέσματα και οι γραφικές παραστάσεις όπως προέκυψαν από το excel φαίνονται παρακάτω. Παρατηρούμε ότι προκύπτουν ευθείες με αρνητική κλίση. Εμείς κρατάμε την απόλυτη τιμή των κλίσεων για τον υπολογισμό του Q. Οι αρνητικές τιμές των δυνάμεων στα γραφήματα σχετίζονται με την φορά των αξόνων x,y,z που έχει οριστεί ως θετική στο πρόγραμμα.

4.4.1.1 Για $R=0,425\mu\text{m}$

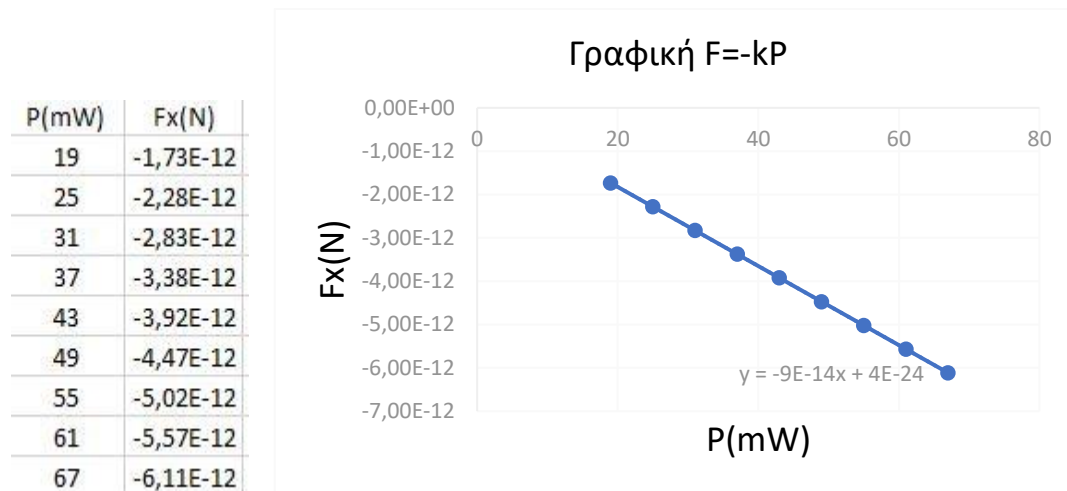
P(mW)	Fx(N)
19	-5,11E-13
21	-5,64E-13
23	-6,18E-13
25	-6,72E-13
27	-7,26E-13
29	-7,79E-13
31	-8,33E-13
33	-8,87E-13
35	-9,41E-13
37	-9,94E-13
39	-1,05E-12
41	-1,10E-12
43	-1,16E-12
45	-1,21E-12
47	-1,26E-12
49	-1,32E-12
51	-1,37E-12
53	-1,42E-12
55	-1,48E-12
57	-1,53E-12
59	-1,59E-12
61	-1,64E-12
63	-1,69E-12
65	-1,75E-12
67	-1,80E-12
69	-1,85E-12
71	-1,91E-12



Σχήμα 4.10: Αποτελέσματα και γραφική παράσταση F-P για $R=0.425\mu\text{m}$ όπως προκύπτουν στο excel για τις τιμές του comsol.

Από τον υπολογισμό της κλίσης προκύπτει αποδοτικότητα $Q=6,77*10^{-3}$.

4.4.1.2 Για $R=0,5\mu\text{m}$



Σχήμα 4.11: Αποτελέσματα και γραφική παράσταση F-P για $R=0.5\mu\text{m}$ όπως προκύπτουν στο excel για τις τιμές του comsol.

Από τον υπολογισμό της κλίσης προκύπτει αποδοτικότητα $Q=20,30 \cdot 10^{-3}$.

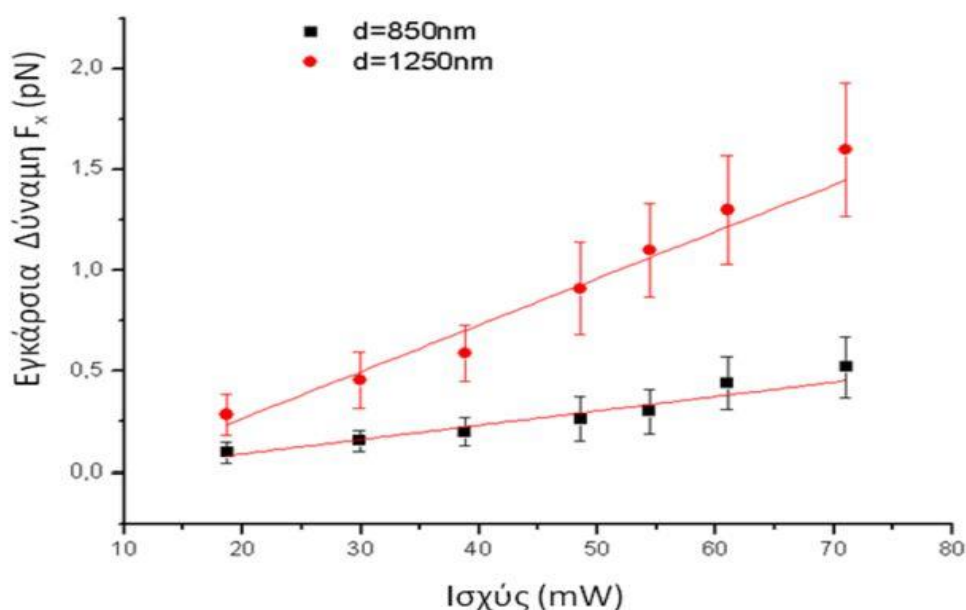
4.4.1.3 Σύγκριση με τις πειραματικές αποδοτικότητες

Στο σχήμα 4.12 φαίνονται οι καμπύλες δύναμης - ισχύος για λιποσώματα μικρότερα του $1\mu\text{m}$ και για λιποσώματα λίγο μεγαλύτερα του $1\mu\text{m}$. Σε αυτήν την κλίμακα οι δυνάμεις είναι σχετικά μικρές, της τάξεως των 0,1 έως 1,5 pN περίπου, με εφαρμοζόμενη ισχύ από 19 mW έως 71 mW, χρησιμοποιώντας κατάλληλα φίλτρα αποκοπής, όπως έγινε στο πειραματικό μέρος.

Από το πείραμα οπτικής παγίδευσης σε λιποσώματα, για λιποσώματα λίγο μικρότερα από ένα μικρόμετρο, η αποδοτικότητα υπολογίστηκε ίση με $Q=1,8 \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$, ενώ για τα λίγο μεγαλύτερα από 1 μικρόμετρο $Q=5,7 \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$. Οι τιμές αυτές είναι αρκετά χαμηλές και τα αποτελέσματα σημαίνουν ότι ένα ποσοστό τοις χιλίοις της ισχύος αποδίδει σε δύναμη οπτικής παγίδευσης. Είναι σημαντικό όμως να σημειωθεί πως για το μήκος κύματος των 660nm που χρησιμοποιήθηκε, οι απώλειες της ισχύος στον αντικειμενικό φακό ήταν μεγαλύτερες από 70%. Οπότε ένας κύριος

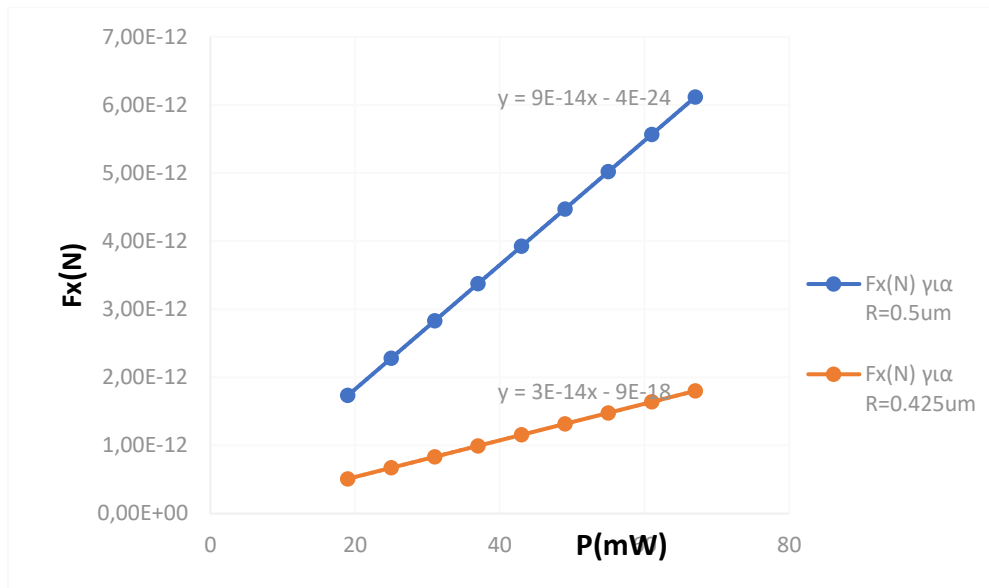
λόγος για τη μικρής τάξεως αποδοτικότητα, 10^{-3} , είναι οι σημαντικές απώλειες στην ισχύ. Επιπλέον εδώ τα λιποσώματα περικλείουν μπλε του μεθυλενίου, το οποίο απορροφά το κόκκινο φως του laser αλλά οι οπτικές δυνάμεις που παγιδεύουν ένα σωματίδιο οφείλονται στη διάθλαση της δέσμης από αυτό και ίσως η απορρόφηση μέρους της ισχύος να συντελεί στην μείωση της αποδοτικότητας.

Από τη θεωρητική προσομοίωση στο comsol προέκυψαν αποδοτικότητες $Q=6,77 \cdot 10^{-3}$ και $Q=20,30 \cdot 10^{-3}$ για ακτίνα λιποσώματος $R=0.425 \mu\text{m}$ και $R=0.5 \mu\text{m}$ αντίστοιχα. Συνεπώς βλέπουμε ότι όντως προκύπτουν μεγαλύτερες αποδοτικότητες σε σχέση με το πείραμα κάτι το οποίο το περιμέναμε. Στη θεωρητική προσομοίωση χρησιμοποιήθηκε η ακτίνα του λιποσώματος $R=0.5 \mu\text{m}$ αντί για $R=0.625 \mu\text{m}$ γιατί ο υπολογιστής δεν είχε μεγάλη υπολογιστική δύναμη για το comsol. Έτσι, ουσιαστικά αυτό που εξετάζουμε είναι τι συμβαίνει με τις αποδοτικότητες για την αύξηση του R και γίνεται μία σύγκριση μεταξύ των 2 τιμών (πειραματική-θεωρητική) για τις 2 περιπτώσεις του R .



Σχήμα 4.12: Εγκάρσια συνιστώσα δύναμης σε σχέση με την ισχύ για λιποσώματα διαμέτρου 850nm (τετράγωνα) και για διάμετρο $d=1,25 \mu\text{m}$ (κύκλοι) από το πείραμα.

Παίρνουμε τις απόλυτες τιμές των δυνάμεων από τα σχήματα 4.10 και 4.11 για να συγκρίνουμε τις γραφικές με το σχήμα 4.12. Έτσι προκύπτει το σχήμα 4.13.



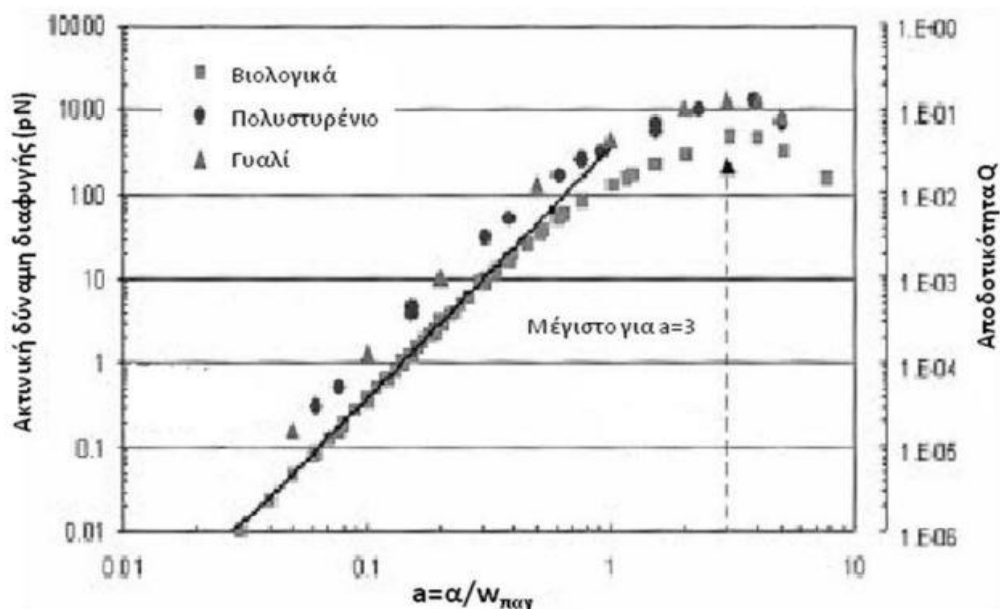
Σχήμα 4.13: Γραφική παράσταση που εμφανίζει τις 2 ευθείες όπως προέκυψαν από τις τιμές των F_x από το comsol συναρτήσει του P για τις 2 τιμές του R .

Παρατηρούμε ότι για πιο μεγάλο R δηλαδή ακτίνα λιποσώματος η αποδοτικότητα είναι μεγαλύτερη.

Επίσης, είναι σημαντικό να αναφέρουμε την επίδραση των σφαιρικών εκτροπών στην οπτική παγίδευση. Η κύρια αιτία των σφαιρικών εκτροπών σε μια διάταξη είναι η διαφορά των δεικτών διάθλασης του λαδιού που καταδύεται ο αντικειμενικός και του υδάτινου μέσου που περιβάλλει το δείγμα προς παγίδευση. Για παράδειγμα εδώ το λάδι του αντικειμενικού έχει δείκτη διάθλασης $n=1,57$ ενώ το δείγμα βρίσκεται σε υδάτινο περιβάλλον με δείκτη διάθλασης περίπου $1,33$. Οι σφαιρικές εκτροπές μειώνουν την αποδοτικότητα και όσο η απόσταση της εστίας της δέσμης από την καλυπτρίδα μεγαλώνει, τόσο αυξάνονται οι σφαιρικές εκτροπές και συνεπώς οι οπτικές δυνάμεις, μειώνονται (Ganic et al., 2004 - Rohrbach & Stelzer 2002-Vermeulen et al., 2006).

4.4.2 Μελέτη της F_x για μεταβολή της αδιάστατης παραμέτρου a

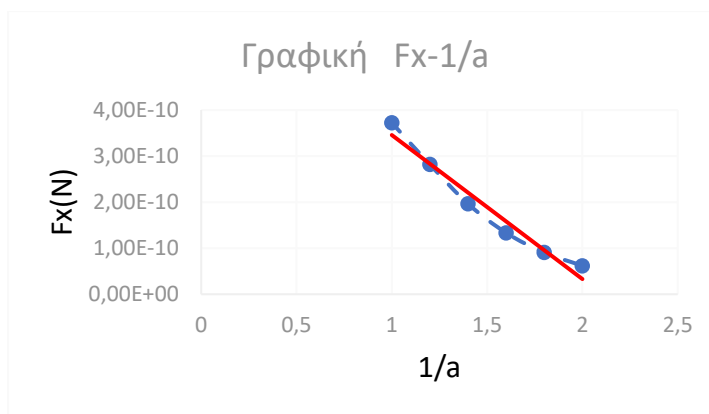
Στο πείραμα οπτικής παγίδευσης σε λιποσώματα θεωρούμε ότι $w_{\text{παγ}} \approx 1 \mu\text{m}$, $a=0,45 \mu\text{m}$ έως $a=0,63 \mu\text{m}$, οπότε η παράμετρος a θα κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0,45 και 0,63. Με αυτές τις τιμές για βιολογικά δείγματα οι Nahmias και Odde υπολογίζουν εγκάρσιες αποδοτικότητες περίπου $5-8 \cdot 10^{-3}$, που είναι κοντά στις τιμές που μετρήθηκαν. Στο σχήμα 4.14 φαίνεται η διαφορά στις τιμές της αποδοτικότητας για ίδια παράμετρο a , αλλά για διαφορετικά υλικά και άρα και δείκτη διάθλασης.



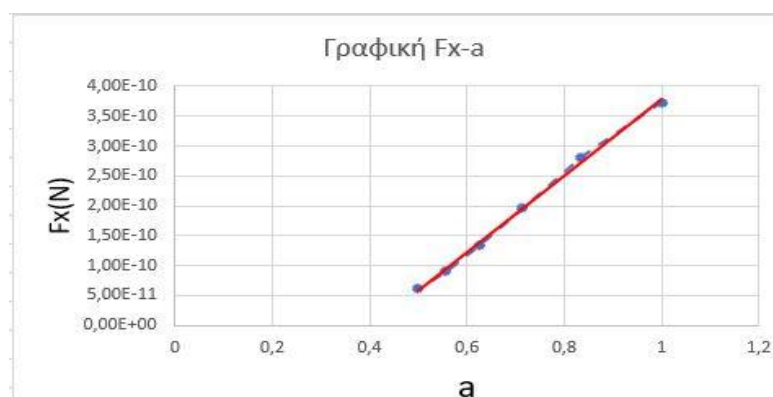
Σχήμα 4.14: Ακτινική δύναμη διαφυγής για ισχύ 1W, $n_m=1,33$, ως συνάρτηση της αδιάστατης παραμέτρου a , για σχετικό δείκτη διάθλασης $m=1,05$ για βιολογικά δείγματα, $m=1,16$ για πολυμερικά σφαιρίδια και $m=1,20$ για σφαίρες πολυστυρενίου. Η ευθεία γραμμή αντιστοιχεί στην προσέγγιση Rayleigh (τροποποιημένο από Nahmias & Odde, 2002).

Στο σχήμα 4.15 βλέπουμε από τη θεωρητική προσομοίωση τα αποτελέσματα της εγκάρσιας δύναμης συναρτήσει του $1/a$ για λιπόσωμα και παρατηρούμε ότι είναι αναμενόμενη σε σχέση με την προηγούμενη που είναι συναρτήσει του a από τη βιβλιογραφία. Για τα δεδομένα στο comsol θεωρήσαμε ότι το R κυμαίνεται από 0,5 έως $1 \mu\text{m}$ και ακολούθως ο λόγος $1/a$ από 1 έως 2.

1/a	Fx(N)
1	3,72E-10
1,2	2,82E-10
1,4	1,96E-10
1,6	1,33E-10
1,8	9,04E-11
2	6,19E-11



a	Fx(N)
1	3,72E-10
0,834	2,82E-10
0,714	1,96E-10
0,625	1,33E-10
0,556	9,04E-11
0,5	6,19E-11



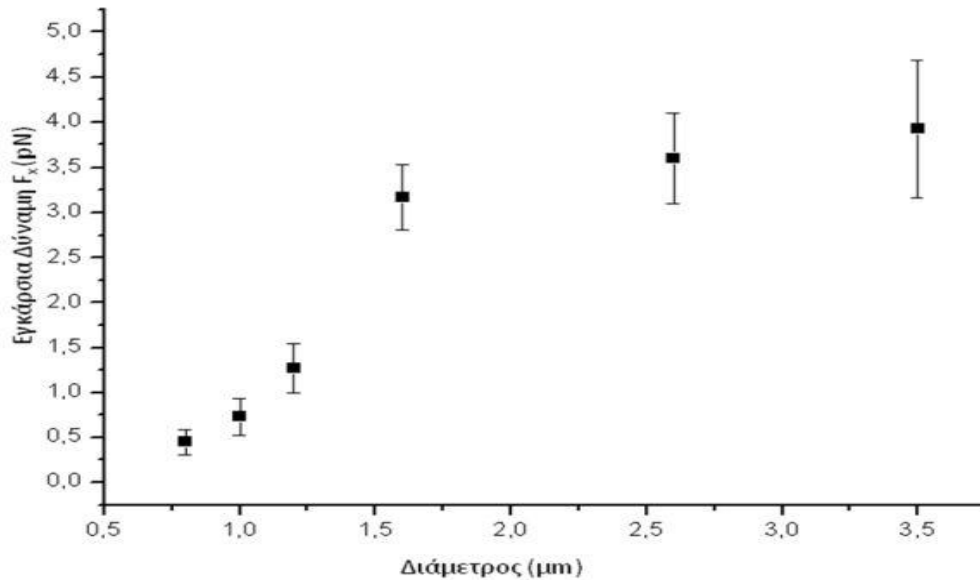
Σχήμα 4.15: Δεδομένα από το comsol και γραφική παράσταση της Fx συναρτήσει του 1/a για P=1W.

Φαίνεται ότι η εξάρτηση δεν είναι γραμμική αλλά έχουμε φαινόμενα κορεσμού (σταθεροποίησης της δύναμης) για μεγάλες τιμές του 1/a. Στην πράξη δηλαδή αυτό σημαίνει ότι καθώς αυξάνει η ακτίνα της δέσμης σε σχέση με την ακτίνα του σωματιδίου οι δυνάμεις μειώνονται πιο έντονα στην αρχή και πιο ομαλά στη συνέχεια

4.4.3 Μελέτη της Fx για μεταβολή του R

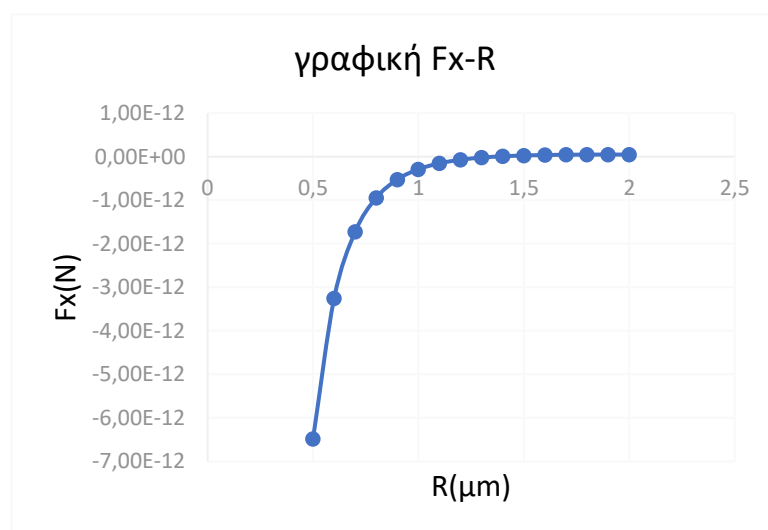
Επιπλέον, από το πείραμα οπτικής παγίδευσης σε λιποσώματα μετρήθηκαν εγκάρσιες δυνάμεις από 0,45 pN έως 3,92 pN για λιποσώματα με διαμέτρους από 0,8μm έως 3,5μm και σταθερή ισχύ P=71mW. Παρατηρούμε στο γράφημα 4.16 ότι στις μικρές τιμές των διαμέτρων, η δύναμη μεταβάλλεται πιο απότομα ενώ όσο αυτές αυξάνουν φαίνεται η εξάρτηση από την διάμετρο να είναι μικρότερη και να τείνει σε πλατό. Αυτή η συμπεριφορά είναι η αναμενόμενη καθώς για τα πολύ μεγάλα σωματίδια εφαρμόζεται το γεωμετρικό μοντέλο όπου οι οπτικές δυνάμεις δεν εξαρτώνται από την διάμετρο, ενώ για τα πολύ μικρά, στην περιοχή Rayleigh η εξάρτηση είναι r^3 , και στην ενδιάμεση περιοχή αναμένεται να είναι από r^0 έως r^3 (Ashkin, 1992 - Ganic et al., 2004 -Simmons et al., 1994).

Από τη θεωρητική προσομοίωση του comsol για μεταβολή του R από 0,5 έως 2μm προέκυψε η γραφική παράσταση του σχήματος 4.17 .Από το γράφημα παρατηρούμε ότι εξαγάμε τα ίδια συμπεράσματα που προέκυψαν και από τη πειραματική μελέτη. Απλώς αλλάζαμε την ακτίνα του λιποσώματος στα δεδομένα του comsol αντί για τη διάμετρο του.



Σχήμα 4.16: Διάγραμμα της εγκάρσιας συνιστώσας της οπτικής δύναμης ως συνάρτηση της διαμέτρου των λιποσωμάτων από το πείραμα.

R(um)	Fx(N)
0,5	-6,48E-12
0,6	-3,26E-12
0,7	-1,72E-12
0,8	-9,43E-13
0,9	-5,24E-13
1	-2,88E-13
1,1	-1,52E-13
1,2	-7,01E-14
1,3	-2,09E-14
1,4	9,07E-15
1,5	2,72E-14
1,6	3,80E-14
1,7	4,41E-14
1,8	4,72E-14
1,9	4,84E-14
2	4,83E-14



Σχήμα 4.17: Δεδομένα από το comsol και γραφική παράσταση της F_x συναρτήσεϊ του R.

Συμπεράσματα και προοπτικές

Γνωρίζουμε ότι η ισχυρή παγίδευση είναι ένας σημαντικός παράγοντας σε βιοϊατρικές εφαρμογές, πόσο μάλλον για τα λιποσώματα που χρησιμοποιούνται ως φορείς φαρμακευτικών ουσιών. Μέσω της δέσμης laser μπορεί να γίνει στοχευμένη μετακίνηση του λιποσώματος σε κύτταρα-στόχους μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Στη δική μας μελέτη έγινε και σύγκριση μεταξύ της πειραματικής αποδοτικότητας για λιποσώματα με την αποδοτικότητα από τη θεωρητική προσομοίωση μέσω του COMSOL. Το αποτέλεσμα που προέκυψε είναι ότι παρόλο που οι 2 αποδοτικότητες είχαν ίδια τάξη μεγέθους, στο πείραμα υπολογίστηκε μικρότερη αποδοτικότητα λόγω διαφόρων σφαλμάτων που ήταν και το αναμενόμενο.

Κλείνοντας αυτή την διπλωματική εργασία θα ήθελα να αναφέρω τις προοπτικές καθώς και τις μελλοντικές προεκτάσεις που θα μπορούσε να λάβει το συγκεκριμένο θέμα. Όσο αφορά την προσομοίωση, υπάρχουν πολλές παράμετροι που μπορούν να μελετηθούν και να συγκριθούν μεταξύ τους έτσι ώστε κάθε φορά να βρίσκεται ο βέλτιστος συνδυασμός παραμέτρων ώστε να δημιουργείται η πιο αποδοτική παγίδα. Οι παράμετροι που θα μπορούσαν να μελετηθούν είναι περισσότερα μήκη κύματος και διαφορετικές γεωμετρίες. Άλλη εφαρμογή που μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω του COMSOL είναι αυτή του διαχωρισμού κυττάρων. Κάνοντας εκ των προτέρων την προσομοίωση μέσω COMSOL γνωρίζεις για ποια γεωμετρία είναι πιο ισχυρή η παγίδα με αποτέλεσμα σε περίπτωση που πρέπει να διαχωριστούν κύτταρα για παράδειγμα να υπάρχει ήδη γνώση ποια είναι αυτά που θα παγιδευτούν και ποια δεν θα τα καταφέρουν.

Βιβλιογραφία

- Agnieszka Z. Wilczewska Katarzyna, Niemirowicz Karolina H. Markiewicz, Halina Car., Nanoparticles as drug delivery systems, Pharmacological Reports. Elsevier., Sep- Oct 2012
- Akbarzadeh Abolfazl, Rogaie Rezaei-Sadabady, Soodabeh Davaran, Sang Woo Joo⁵, Nosratollah Zarghami, Younes Hanifehpour, Mohammad Samiei, Mohammad Kouhi and Kazem Nejati-Koshki, Liposome: classification, preparation, and Applications. Nano review., 2013.
- Allen TM., Liposomes, Opportunities in drug delivery Drugs, 1997
- Anderson, M., & Omri, A. (2004). The effect of different lipid components on the in vitro stability and release kinetics of liposome formulations. Drug delivery, 11(1), 33-39. doi.org/10.1080/10717540490265243
- Ang Li , Ammar H. Mansoor, Kevin S.W. Tan C.T. Lim, "Observations on the internal and surface morphology of malaria infected blood cells using optical and atomic force micro- sscopy", Journal of Microbiological Methods vol. 66, 2006
- Ashkin A. "Acceleration and trapping of particles by radiation pressure", Physical Review Letters, Vol.24, No 4, (1970)
- Ashkin A. and J. M. Dziedzic, "Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria", Science, vol. 235, no. 4795, pp. 1517-1520, 1987
- Ashkin A. and J. M. Dziedzic, "Radiation pressure on a free liquid surface", Phys. Rev. Lett., vol. 30, pp. 139-142, 1973
- Ashkin A., "Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers", Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 94, pp. 4853-4860, 1997
- Ashkin A., "History of optical trapping and manipulation of small-neutral particle, atoms and molecules", Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE Journal of, vol. 6, no. 6, pp. 841-856, 2000
- Ashkin A., J. M. Dziedzic and T. Yamane, "Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams", Nature, vol. 330, pp. 769-771, 1987
- Ashkin A., J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm and S. Chu, "Observation of a single beam gradient force optical trap for dielectric particles", Opt. Lett., vol. 11, no. 5, pp. 288-290, 1986
- Ashkin, A., "Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime", Biophys.J. 61, 569-582, (1992).
- Cell biotechnology. (x.x). Λιποσώματα. Ανακτήθηκε από <https://liposoma.gr>

- Chu S. L. Hollberg, J. E. Bjorkholm, A. Cable and A. Ashkin, "Three-dimensional viscous confinement and cooling of atoms by resonance radiation pressure", *Phys. Rev. Lett.*, vol. 55, no. 1, pp. 48-51, 1985
- Clement-Sengewald, A., Schütze, K., Ashkin, A., Palma, G. A., Kerlen, G., & Brem, G. *Fertilization of bovine oocytes induced solely with combined laser microbeam and optical tweezers. Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 13(3), 259–265(1996). doi:10.1007/bf02065947
- Constable A., Kim J., J. Mervis, F. Zarinetchi and M. Prentiss, "Demonstration of a fiber-optical light-force trap", *Opt. Lett.*, vol. 18, no. 21, pp. 1867-1869, 1993
- Deamer D. and Uster P., 'Liposome preparation methods and monitoring liposome fusion. In: Baserga R., Crose,C and Royeza G. Introduction of Macromolecules into viable Mammalian cells', Alan R. Liss, New York , p.p 205-220,1980
- Derrycke, A. S. L. and Witte, P. A. M, "Liposomes for photodynamic therapy", *Adv. Drug Deliver. Rev.* 56, 17-30, (2004)
- Dholakia, K., Reece, P. and Gu, M., "Optical micromanipulation", *Chem. Soc. Rev.* 37, 42-55, (2007).
- Dholakia Kishan, Woei Ming Lee, Lynn Paterson, MacDonald Michael P., Richard McDonald, Igor Andreev, Patience Mthunzi, C. Tom A. Brown, Robert F. Marchington, Andrew C. Riches, "Optical Separation of Cells on Potential Energy Landscapes: Enhancement with Dielectric Tagging", *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 13, No. 6, November/December 2007
- Dimova, R., Pouligny, B. and Dietrich, C., "Pretransitional Effects in Dimyristoylphosphatidylcholine vesicle membranes: optical dynamometry study", *Biophysic. J.* 79, 340-356, (2000).
- Dwivedi, Sahu , Prasad,' Role of liposome in nove Idrug delivery. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics'*, 4(2), pp 116-119, 2014
- Freitas, C., Lucks, J. S., & Müller, R. H. (1994). P238 effect of storage conditions on long-term stability of "solid lipid nanoparticles"(SLN) in aqueous dispersion. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(1-2), 178. doi.org/10.1016/0928-0987(94)90411-1
- Gabizon A, Goren D, Cohen R, Barenholz Y,Development of liposomal anthracyclines: from basics to clinical applicationsJ *Control Release* ,1998
- Ganic, D., Gan, X., Gu, M., "Exact radiation trapping force calculation based on vectorial diffraction theory", *J. Opt. Soc. Am.* 12, (2004)

- Garcés-Chávez V., K. Dholakia and G. C. Spalding, "Extended-area optically induced organization of microparticles on a surface", *Applied Physics Letters*, vol. 86, no. 3, pp. 031106–031106–3, 2005
- Gauthier Robert C., "Computation of the optical trapping force using an FDTD based technique", *Optics Express*, vol. 13, no. 10, May 2005
- Ghosh A., Supurna Sinha, J. A. Dharmadhikari, S. Roy, A. K. Dharmadhikari, J. Samuel, S. Sharma and D. Mathur, "Euler buckling-induced folding and rotation of red blood cells in an optical trap", *Physical Biology*, vol. 3, No. 1, March 2006
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., & Mulligan, C. N. Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3), 213–224, (1999)
- Glass D. G., N. McAlinden, O. R. Millington, and A. J. Wright, "A minimally invasive optical trapping system to understand cellular interactions at onset of an immune response," *PLoS One*, vol. 12, no. 12, pp. 1–13, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0188581.
- Gordon J. P., "Radiation forces and momenta in dielectric media", *Phys. Rev.*, vol. A8, pp. 14-21, 1973
- Gouesbet, G., Maheu, B., Grehan, G., "Scattering of a Gaussian Beam by a Sphere Using a Bromwich Formulation: Case of an Arbitrary Location", *Part. Part. Syst. Charact.* 5, 1-8, (1988)
- Greulich K. O., "Selected applications of laser scissors and tweezers and new applications in heart research.," *Methods Cell Biol.*, vol. 82, pp. 59–80, 2007, doi: 10.1016/S0091-679X(06)82002-9.
- Griffith David J. s, "Εισαγωγή στην ηλεκτροδυναμική", Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2012
- Griffiths, D. J., "Εισαγωγή στην Ηλεκτροδυναμική, τόμος II", μτφ. Αρβανιτήδης Σ. και Λαυρέντζος Α., Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Κρήτη, (2004)
- https://en.wikipedia.org/wiki/Optical_sorting
- Huang, C.-H., "Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics", *Biochemistry* 8, 344-352, (1969).
- Jones P. H., Maragó O., and Volpe G., 2016. *Optical Tweezers: Principles and Applications*. Cambridge, USA: Cambridge University Press. <https://www.cambridge.org/core/books/optical-tweezers/D2D5FD82066E9FF88284C89095A2CB60>

- Joost van Mameren, Gijs J.L. Wuite, and Iddo Heller, "Introduction to Optical Tweezers: Background, System Designs, and Commercial Solutions", Chapter 1
- Joshi, M. D., & Müller, R. H. (2009). Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 71(2), 161-172. doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.003
- Kerker M., "The scattering of light and other electromagnetic radiation", NY: Academic, New York, pp. 32-37, 1969
- Kreysing M. K, T. Kiessling, A. Fritsch, C. Dietrich, J. R. Guck and J. A. Käs, "The optical cell rotator", *Opt Express*, vol. 16, no. 21, pp. 16984–16992, 2008
- Lee, C.-H., Lin, W.-C. and Wang, J., "All-optical measurements of the bending rigidity of lipid-vesicle membranes across structural phase transitions", *Phys. Rev. E* 64, 020901 ,(1-4), (2001).
- Lenton Isaac C.D. , Scott Ethan K., Halina Rubinsztein-Dunlop, Itia A. Favre-Bulle," *Optical Tweezers Exploring Neuroscience*", *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 27 Sec. Nanobiotechnology, Volume 8 (2020)
- Li Yan, Zhongyi Guo, Shiliang Qu, "Living cell manipulation in a microfluidic device by femto-second optical tweezers", *Optics and Lasers in Engineering*, vol. 55, Page: 150-154, November 2013
- Li, M., Du, C., Guo, N., Teng, Y., Meng, X., Sun, H., & Galons, H. (2019). Composition design and medical application of liposomes. *European journal of medicinal chemistry*, 164, 640-653. doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.007
- Liu J., Huang Y., Kumar A., Tan A., Jin S., Mozhi A., Liang X-J. pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. *Biotechnology Advances*, 32: 693–710,2014.
- Marchington R. F., M. Mazilu, S. Kuriakose, V. Garcés-Chávez, P. J. Reece, T. F. Krauss, M. Gu, and K. Dholakia, "Optical detection and sorting of microparticles in a near-field optical geometry", *Optics Express*, vol. 16, no. 6, March 2008
- Mazolli, A., Maia Neto, P. A and Nussenzveig, H. M., "Theory of trapping forces in optical tweezers", *Proc. R. Soc. Lond.* 459, 3021-3041, (2003).
- McGloin David and Reid Jonathan P., "40 years of Optical Manipulation", *OPN Optics & Photonics News*, March 2010

- Moffitt J. R., Y. R. Chemla, S. B. Smith, and C. Bustamante, "Recent advances in optical tweezers," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 77, no. August, pp. 205–228, 2008, doi: 10.1146/annurev.biochem.77.043007.090225.
- Molloy Justin E., Miles J. Padgett, "Lights, action: optical tweezers", *Contemporary Physics*, vol. 43, no.4, pp. 241-258, 2002
- Nahmias, Y. K., Odde, D. J., "Analysis of radiation forces in laser trapping and laserguided-direct writing applications", *IEEE J. Quantum Electron.* 38, 131-141, (2002).
- Nieminen Timo A., Gregor Knoner, Norman R. Heckenberg, Halina RubindzteinDunlop, "Physics of Optical Tweezers", *Methods in Cell Biology*, vol. 82, 2007 118
- Nieminen Timo A., Knoner Gregor, Heckenberg Norman R., Halina Rubindztein-Dunlop, 'Physics of Optical Tweezers', *Methods in Cell Biology*, Vol. 82, (2007)
- Novotny, L., Bian, R. X. and Xie, X. S., "Theory of nanometric optical tweezers", *Phys. Rev. Lett.*, vol. 79, no. 4, pp. 645-648, 1997
- Pethig, R. and Markx, G. H., "Applications of dielectrophoresis in biotechnology", *Trends Biotechnol.* 15, 426-432, (1997)
- Philips W. D. and Metcalf H. J., "Cooling and trapping atoms", *Scientific American*, vol. 256, pp. 50-56, 1987
- Press Release: The 1997 Nobel Prize in Physics, Available: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1997/press.html
- Radenovic Aleksandra, "OPTICAL TRAPPING – Handout", *ADVANCED BIOENGINEERING METHODS LABORATORY OPTICAL TRAPPING*, Ecole Polytechnique Federale de Louasanne
- Raghunathan K. et al., "Mechanics of DNA: Sequence Dependent Elasticity", *Proc. 119 SPIE*, 8097, 2011
- Rancourt-Grenier Sebastien, Ming-Tzo Wei, Jar-Jin Bai, Arthur Chiou, Paul P. Bareil, Pierre-Luc Duval, and Yunlong Sheng, "Dynamic deformation of red blood cell in Dual-trap Optical Tweezers", *Optics Express*, vol. 18, No. 10, May 2010
- Rockstuhl C. and Herzig H. P., "Rigorous diffraction theory applied to the analysis of the optical force on elliptical nano- and micro-cylinders," *J. Opt. A Pure Appl. Opt.*, vol. 6, no. 10, p. 921–931, 2004, doi: 10.1088/1464-4258/6/10/001.

- Rohrbach, A. and Stelzer, E. H., "Trapping forces, force constants, and potential depths for dielectric spheres in the presence of spherical aberrations" *Appl. Opt.* 41, 2494-2507, (2002).
- Romberg B, Hennink WE, Storm G Sheddable coatings for long-circulating, nanoparticles, *Pharm Res*, 2008
- Sahoo SK, Labhasetwar V DDT, *Nanotech approaches to drug delivery and imaging.*, 2003
- Seeger S., S. Monajembashi, K. -J Hutter, G. Futterman, J. Wolfrum, and K. O. Greulich, "Application of laser optical tweezers in immunology and molecular genetics," *Cytometry*, vol. 12, no. 6, pp. 497–504, 79 1991, doi: 10.1002/cyto.990120606.
- Seminar talk "Recent progress in Nano- optics and Photonics", "Optical tweezers (and a few selected applications)", University of Wien
- Simmons, R. M., Finer, J. T., Chu, S. and Spudich, J. A., "Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap", *Biophys. J.* 70, 1813-1822, (1994).
- Smith S., Cui Y., Bustamante C., "Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules", *Science*, February 1996
- Stevenson D.J., F. Gunn-Moore, and K. Dholakia, "Light forces the pace: Optical manipulation for biophotonics", *J. Biomed. Opt.*, 15, 2010
- Strober, W., "Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability", *Current Protocols in Immunology*, (2001)
- Svoboda, K. and Block, S. M., "Biological applications of optical forces", *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23, 247-285, (1994)
- Torchilin VP. , "Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers", *Nat. Rev. Drug Discov.*, 4: 145 -59. 4, 2005
- Vermeulen, K. C., Wuite, G. J. L., Stienen, G. J. M. and Schmidt, C. F., "Optical trap stiffness in the presence and absence of spherical aberrations", *Appl. Opt.* 45, 1812-1819, (2006).
- Xin Hongbao, Yuchao Li, Yong-Chun Liu, Yao Zhang, Yun-Feng Xiao and Baojun Li, "Optical Forces: From Fundamental to Biological Applications", *Adv. Mater.* 2001994, (2020)
- Yu L., Sheng Y., and Chiou A., "Three-dimensional light-scattering and deformation of individual biconcave human blood cells in optical tweezers," *Opt. Express*, vol. 21, no. 10, p. 12174, 2013, doi: 10.1364/oe.21.012174

- Zhang Dianwen, X.-C. Yuan, S. C. Tjin and S. Krishnan, "Rigorous time-domain simulation of momentum transfer between light and microscopic particles in optical trapping", *Optics Express*, vol. 12, no. 10, May 2004
- Κοτσιφάκη Δόμνα, "Οπτική Παγίδα και Μικροχειρισμός Διηλεκτρικών Σωματιδίων και Βιολογικών Δειγμάτων Χρησιμοποιώντας Δέσμες Laser", Διδακτορική διατριβή, ΕΜΠ, 2012
- Κρομμύδας Ν., "Βελτιστοποίηση των Δυνάμεων Οπτικής Παγίδευσης με χρήση μικρο-δομημένων υποστρωμάτων", Διπλωματική Εργασία, Τομέας Φυσικής της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών του Ε.Μ.Π., Αθήνα (2018)
- Μενεσιδης Ιωάννης, Φαρμακοποιός, Διπλωματική Εργασία με τίτλο: "Μαγνητικοί λιποσωμικοί φορείς με εγκλεισμό φλαβονοειδούς για στοχευμένη χορήγηση".
- Παπαγιιάκουμου, Ε., "Διερεύνηση των φυσικών χαρακτηριστικών και του τρόπου διάδοσης σύμφωνης ακτινοβολίας για την κατανόηση των βασικών μηχανισμών οπτικής παγίδευσης", Διδακτορική Διατριβή, Τομέας Φυσικής της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών του Ε.Μ.Π., Αθήνα (2005).
- Σιολετις Ροζλιν , «Αναστολή Οξειδωσης Λιποσώματος Από Τα Αντιοξειδωτικά Ντομάτας», Πτυχιακή Εργασία, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 2016
- Σπηλιώτη Μαρίνα, "Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση πράσινων διεργασιών εγκλεισμού του φυσικού αλκαλοειδούς καφεΐνη σε βιοσυμβατά λιποσωμικά συστήματα με χρήση φυσικών βαθέων ευτηκτικών διαλυτών", Διπλωματική Εργασία, Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π., Αθήνα (2021)
- Σπυράτου, Ε., "Φωτο-βιοφυσικές εφαρμογές των laser και ανάπτυξη μεθοδολογίας μικροχειρισμού νανοσωματιδίων με χρήση οπτικής παγίδας laser", Διδακτορική Διατριβή, Τομέας Φυσικής της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών του Ε.Μ.Π., Αθήνα (2010).
- Τσουνάϊ Ε., "Βαθμονόμηση οπτικής παγίδας μέσω διηλεκτροφόρησης και μέτρηση ελαστικών ιδιοτήτων σε λιποσώματα", Διπλωματική Εργασία, Τομέας Φυσικής της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών του Ε.Μ.Π., Αθήνα (2012)