



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

**ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗ ΟΠΤΙΚΗΣ ΠΑΓΙΔΑΣ ΜΕΣΩ
ΔΙΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΛΑΣΤΙΚΩΝ
ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΣΕ ΔΙΠΟΣΩΜΑΤΑ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΤΣΟΥΝΑΪ ΕΥΦΡΟΣΥΝΗ

Επιβλέπουσα: Μυρσίνη Μακροπούλου
Αν. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Οκτώβριος 2012

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα λευκή.



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗ ΟΠΤΙΚΗΣ ΠΑΓΙΔΑΣ ΜΕΣΩ ΔΙΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΛΑΣΤΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΣΕ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΤΣΟΥΝΑΪ ΕΥΦΡΟΣΥΝΗ

Επιβλέπουσα: Μυρσίνη Μακροπούλου
Αν. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή

(Υπογραφή)

.....
Μ. Μακροπούλου
Αν. Καθηγήτρια

(Υπογραφή)

.....
Κ. Ράπτης
Καθηγητής

(Υπογραφή)

.....
Α. Σεραφετινίδης
Καθηγητής

Αθήνα, Οκτώβριος 2012

(Υπογραφή)

.....

ΤΣΟΥΝΑΪ ΕΥΦΡΟΣΥΝΗ

Διπλωματούχος Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών Ε.Μ.Π.

© 2012– All rights reserved

Περίληψη

Τα λιποσώματα είναι κολλοειδή σωματίδια αποτελούμενα από μια ή περισσότερες φωσφολιπιδικές διπλοστοιβάδες, οι οποίες περικλείουν στο εσωτερικό τους ένα υδατικό διάλυμα. Λόγω των ιδιοτήτων της μεμβράνης τους, αποτελούν ένα ιδανικό κυτταρικό μοντέλο, αλλά επίσης και το κύριο συστατικό προηγμένων συστημάτων μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών. Σημαντικό ρόλο στη συμπεριφορά τους, όσον αφορά τις παραπάνω λειτουργίες, έχουν οι μηχανικές ιδιότητες των λιπιδικών μεμβρανών. Σε αυτήν την εργασία μελετήθηκαν λιποσώματα από λεκιθίνη αυγού χρωσμένα με μπλε του μεθυλενίου, και μετρήθηκε το μέτρο διάτμησης και το μέτρο κάμψης τους με την τεχνική της οπτικής παγίδας γραμμής.

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 διάταξη της συμβατικής οπτικής παγίδας τοποθετήθηκαν δυο κυλινδρικοί φακοί, πριν την είσοδο της δέσμης στον αντικειμενικό φακό, μετατρέποντας έτσι τη συμβατική οπτική παγίδα σε οπτική παγίδα γραμμής (Line Optical Tweezers). Με την τεχνική αυτή, η δέσμη εστιάζεται σε μια μόνο διάσταση και, λόγω αυτού του προφίλ, τα λιποσώματα υπόκεινται σε μετασχηματισμούς της μεμβράνης τους και σε αντιστρεπτές παραμορφώσεις.

Για τη μέτρηση των οπτικών δυνάμεων που ασκούνται στα λιποσώματα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διηλεκτροφόρησης. Με δυο επίπεδα μικρο-ηλεκτρόδια, τοποθετημένα στο πλακίδιο όπου μελετάται το δείγμα, εφαρμόζεται εναλλασσόμενη τάση στα ήδη παγιδευμένα λιποσώματα έως ότου αυτά διαφύγουν της παγίδας. 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. Επίσης μετρήθηκε η αποδοτικότητα της οπτικής παγίδας γραμμής για λιποσώματα με διάμετρο 3 μm . Παρόλο που η αποδοτικότητα και στις δυο περιπτώσεις ήταν σχετικά χαμηλή σε σχέση με άλλες αναφορές, οι οπτικές δυνάμεις που προέκυψαν ήταν αρκετά ισχυρές για την σταθερή παγίδευση λιποσωμάτων μικρότερων του ενός μικρομέτρου ή για την παραμόρφωση λιποσωμάτων διαμέτρων 4 και 5 μm .

Γνωρίζοντας, με τον παραπάνω τρόπο, τις δυνάμεις που προκαλούν τις ελαστικές παραμορφώσεις στα λιποσώματα, και προσδιορίζοντας τη μεταβολή των διαστάσεών τους με το λογισμικό του μικροσκοπίου, χρησιμοποιήθηκαν κάποια μηχανικά μοντέλα για τον υπολογισμό του μέτρου διάτμησης και του μέτρου ακαμψίας τους. Οι τιμές που προέκυψαν για το μέτρο κάμψης κυμαίνονται στην ίδια τάξη μεγέθους με αυτές που αναφέρονται στην βιβλιογραφία για λιποσώματα σε gel φάση, ενώ αυτές για το μέτρο διάτμησης είναι σχετικά χαμηλές, αλλά οι αναφορές σε σχετικές μετρήσεις είναι περιορισμένες.

Επιπλέον μετρήθηκε η ελαστικότητα των λιποσωμάτων με μπλε του μεθυλενίου διαμέτρου 1-2 μm , μέσω της τεχνικής της μικροσκοπίας ατομικών δυνάμεων, ως μια προσπάθεια για το συνδυασμό των αποτελεσμάτων με αυτά της οπτικής παγίδας γραμμής. Παρατηρήθηκε πως οι τιμές του μέτρου κάμψης που προέκυψαν από τις μετρήσεις μέσω της μικροσκοπίας ατομικών δυνάμεων ήταν χαμηλότερες από τις τιμές που υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της οπτικής παγίδας γραμμής. Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και αλλού στη σχετική βιβλιογραφία. Τέλος, μελετήθηκε η ελαστικότητα λιποσωμάτων διαφόρων συνθέσεων, όπως και άλλα με την ενσωμάτωση σε αυτά υπερδιακλαδικών πολυμερών δεύτερης γενιάς. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η προσθήκη τέτοιων πολυμερών συντελεί στην αύξηση του μέτρου ελαστικότητας των λιποσωμάτων.

Abstract

Liposomes are colloidal particles consisting of one or more phospholipid bilayers which enclose an aqueous solution. Due to the properties of their membranes, they consist an ideal cell model, and as well the main component of advanced drug delivery systems. The mechanical properties of their membranes play an important role in their behavior as such systems. In this dissertation we studied liposomes from egg lecithine stained with methylene blue and we measured their shear and bending modulus, using Line Optical Tweezers.

A diode laser emitting at a wavelength of 660 nm and an inverted microscope with objective lens of numerical aperture $NA = 1.25$ and magnification 100X, were used in order to achieve the optical trap system. By adding two cylindrical lenses before the laser entrance to the objective lens, the conventional optical trap was converted to a line optical trap system. This way the laser output is focused in a single dimension, thus the liposomes are subject to transformations of their membranes and to reversible deformations.

In order to calculate the optical forces acting on liposomes, the method of dielectrophoresis was used. By means of two planar microelectrodes, placed on the sample plate, alternating voltage was applied in the trapped liposomes, until they escape the optical trap. Optical forces on liposomes of 850 and 1250 nm diameters were measured for different laser power values, and the conventional optical trap efficiency was calculated. Moreover, the efficiency of the line optical trap was measured for liposomes with diameter of 3 μm . Despite the fact that both values of the trapping efficiencies were low in regard to other references, the optical forces obtained were strong enough to achieve stable trapping of liposomes smaller than one micrometer, or to induce deformation of liposomes with diameters of 4 and 5 μm .

With the optical forces specified as above, and determining the change in the dimensions of the liposomes by the optical microscope's software, some mechanical models were used in order to calculate the shear and bending modulus. The values obtained for the bending modulus are in the range of the values reported elsewhere for liposomes in gel phase, while the shear modulus values measured are relatively low, while references to relevant measurements are limited.

Moreover, the Young modulus of liposomes stained with methylene blue, with diameters of 1-2 μm , was measured by the method of atomic force microscopy (AFM), as an attempt for the combination of both results from AFM and Line Optical Tweezers. It was observed that the values of bending modulus obtained by the AFM measurements were lower than those obtained with the Line Optical Tweezers. Similar results have also been reported elsewhere in the literature. Finally, it was also measured the elasticity of liposomes of different kind of compartments, as well as others incorporating hyperbranched polymers of second generation. According to the results, it seems that the addition of such polymers tend to increase the Young modulus of the liposomes.

Keywords: optical tweezers, dielectrophoresis, liposomes membrane mechanical properties,

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία έγινε στο εργαστήριο «Ανάπτυξη Lasers και Εφαρμογών τους», στον τομέα Φυσικής της σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών του Ε.Μ.Π.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς την επιβλέπουσα της εργασίας, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Μ. Μακροπούλου, για τη συνεχή βοήθεια και τη συμπαράσταση της. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διδάκτορα κ. Ε. Σπυράτου για την πολύτιμη αρωγή της, αλλά και την στήριξη της καθόλα την διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτορα κ. Έ. Μουρελάτου για την παρασκευή των λιποσωμάτων, και τον επίκουρο Καθηγητή κ. Γ. Τσιγαρίδα για τις συμβουλές του σε θέματα μαθηματικών.

Η σελίδα αυτή είναι σκόπιμα λευκή

Περιεχόμενα

1.	Φυσικές αρχές της οπτικής παγίδευσης.....	11
1.1	Λίγα λόγια για την ιστορία της οπτικής παγίδευσης.....	11
1.2	Οπτικές Δυνάμεις	13
1.2.1	Γεωμετρικό μοντέλο	16
1.2.2	Προσέγγιση δίπολου	17
1.2.3	Ηλεκτρομαγνητική θεωρία , ενδιάμεση περιοχή ($r \approx \lambda$)	18
1.3	Εφαρμογές της οπτικής παγίδας στην βιολογία	20
2	Διάταξη οπτικής παγίδας και παγίδας γραμμής.....	23
2.1	Βασικές αρχές για τον σχεδιασμό μιας διάταξης οπτικής παγίδας	23
2.2	Διάταξη της συμβατικής οπτικής παγίδας.....	26
2.2.1	Οπτικός σχεδιασμός	26
2.2.2	Πειραματική Διάταξη	29
2.2.3	Παρατήρηση της παγίδας σε κύτταρα μαγιάς, σφαίρες πολυστερενίου και λιποσώματα.....	31
2.3	Πειραματική διάταξη για την επίτευξη οπτικής παγίδας γραμμής (Line Optical Tweezers).....	32
2.3.1	Σύγχρονες τεχνικές οπτικής παγίδευσης πέραν της συμβατικής	32
2.3.2	Εισαγωγή στην οπτική παγίδα γραμμής	34
2.3.3	Πειραματική διάταξη της οπτικής παγίδας γραμμής και οπτικός σχεδιασμός	37
3	Βαθμονόμηση οπτικής παγίδας διοδικού laser με τη μέθοδο της διηλεκτροφόρησης για λιποσώματα.....	41
3.1	Εισαγωγή	41
3.1.1	Μέθοδος διαφυγής.....	42
3.1.2	Μέθοδος της ακαμψίας της παγίδας (<i>trap stiffness</i>).....	43
3.2	Το φαινόμενο της διηλεκτροφόρησης	44
3.2.1	Διηλεκτροφόρηση σε βιολογικά σωματίδια.....	47

3.3	Βαθμονόμηση οπτικής παγίδας διοδικού laser με τη μέθοδο της διηλεκτροφόρησης.....	48
3.3.1	Πειραματική διάταξη.....	49
3.3.2	Αναλυτική έκφραση πεδίου.....	51
3.3.3	Πειραματική διαδικασία.....	55
3.3.3.1	Παρασκευή λιποσωμάτων.....	55
3.3.3.2	Παράγοντας Clausius- Mossotti.....	56
3.3.3.3	Βέλτιστη θέση παγίδας για την βαθμονόμηση.....	57
3.3.4	Αποδοτικότητα της οπτικής παγίδας.....	61
3.3.5	Αποδοτικότητα της οπτικής παγίδας γραμμής.....	66
4	Λιποσώματα και οι εφαρμογές τους στη βιοφυσική	69
4.1	Εισαγωγή στα λιποσώματα.....	69
4.2	Εφαρμογές των λιποσωμάτων	71
4.3	Φυσιολογία και χαρακτηριστικά λιποσωμάτων	72
4.3.1	Φάσεις μετάβασης των λιποσωμάτων	75
4.4	Μελέτη λιποσωμάτων χρωσμένων με μπλε του μεθυλενίου και των ελαστικών τους ιδιοτήτων με οπτική παγίδα γραμμής	76
4.4.1	Λιποσώματα χρωσμένα με μπλε του μεθυλενίου.....	76
4.4.2	Παρατήρηση μετασχηματισμών των λιποσωμάτων με MB λόγω της οπτικής παγίδας γραμμής.....	77
4.4.3	Μέτρηση του μέτρου διάτμησης, μ	80
4.4.4	Μέτρηση του μέτρου κάμψης, κ	84
5	Μέτρηση ελαστικότητας λιποσωμάτων με την χρήση Μικροσκοπίας Ατομικών Δυνάμεων	89
5.1	Εισαγωγή.....	89
5.2	Αρχές λειτουργίας της Μικροσκοπίας Ατομικών Δυνάμεων (AFM)	90
5.3	Μέτρηση του μέτρου ελαστικότητας MB λιποσωμάτων με την τεχνική του AFM	94
5.4	Μέτρηση ελαστικότητας σε λιποσώματα συνδεδεμένα με υπερδιακλαδικά πολυμερή.....	99
	Βιβλιογραφία	105

1. Φυσικές αρχές της οπτικής παγίδευσης

1.1 Λίγα λόγια για την ιστορία της οπτικής παγίδευσης

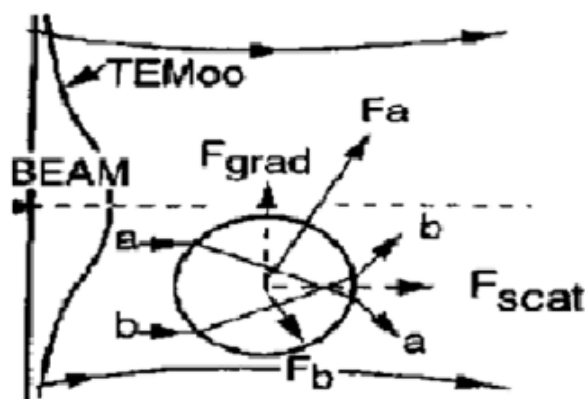
Ο όρος οπτική παγίδα ή αλλιώς οπτική τσιμπίδα ή λαβίδα, αναφέρεται στο χειρισμό μικροσκοπικών σωματιδίων μέσω οπτικών δυνάμεων με μη επεμβατικό τρόπο. Οι δυνάμεις αυτές προκύπτουν από την πίεση ακτινοβολίας μιας ισχυρά εστιασμένης δέσμης laser. Ως γνωστόν, τα φωτόνια οποιασδήποτε ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας μεταφέρουν ορμή, την οποία και μεταβάλλουν όταν προσπίπτουν στην ύλη. Η μεταβολή στην ορμή των φωτονίων συνεπάγεται, λόγω της αρχής διατήρησης της ορμής, μεταβολή στην ορμή της ύλης, και, σύμφωνα με το δεύτερο νόμο του Νεύτωνα, προκύπτει δύναμη ασκούμενη στην ύλη.

Αναφορά για μηχανική δύναμη πάνω σε σώματα λόγω του φωτός γίνεται ήδη στις αρχές του 17^{ου} αιώνα από τον Kepler. Ο Maxwell με την ηλεκτρομαγνητική του θεωρία το 1896 προβλέπει την πίεση ακτινοβολίας του φωτός και την ορμή του. Σύντομα η θεωρία αυτή επιβεβαιώνεται με πειράματα του Lebediew το 1902 και των Nicols και Hull την ίδια περίπου περίοδο. Διαπιστώθηκε ότι οι δυνάμεις αυτές είναι πολύ μικρές για να έχουν κάποια τεχνολογική εφαρμογή και επισκιάζονται από επιδράσεις άλλες πέραν της πίεσης ακτινοβολίας, παραδείγματος χάρη από θερμικές αλληλεπιδράσεις.

Με την εφεύρεση των laser τα πράγματα άλλαξαν δραματικά. Πλέον ήταν στη διάθεση των επιστημόνων μια ακτινοβολία σύμφωνη και μεγάλης έντασης. Ο πρώτος που εφάρμοσε δέσμη laser για να μελετήσει την επίδραση της πίεσης ακτινοβολίας σε μικροσκοπικά σωματίδια ήταν ο Ashkin το 1969. Αυτό που τον παρακίνησε ήταν η διαπίστωση πως, αν ένα ισχυρό laser προσπίπτει σε ένα σωματίδιο περίπου ενός μικρομέτρου, η δύναμη που προκύπτει είναι αρκετές τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη από τη δύναμη λόγω βαρύτητας. Επίσης συνειδητοποίησε ότι μπορούσε στο πείραμα αυτό να αποφύγει τις επιδράσεις λόγω ραδιομετρικών δυνάμεων χρησιμοποιώντας διαφανή σωματίδια μέσα σε επίσης διαφανές μέσο (Ashkin 1970). Έτσι λοιπόν για πρώτη φορά έγινε δυνατή η ανύψωση διηλεκτρικών σωματιδίων αιωρούμενων σε νερό λόγω της δύναμης σκέδασης της ακτινοβολίας του laser. Τοποθετώντας δυο

δέσμες, τη μια απέναντι στην άλλη, το σωματίδιο ισορροπεί και στις τρεις διαστάσεις (Ashkin 1970).

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. Αυτό συμβαίνει όταν ο δείκτης διάθλασης του σωματιδίου είναι μεγαλύτερος του μέσου ενώ αν ισχύει το αντίστροφο, τα σωματίδια απομακρύνονται από το κέντρο της δέσμης. 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. Στο σχήμα 1.1 φαίνεται το σχεδιάγραμμα που έκανε ο Ashkin για να εξηγήσει τις δυνάμεις αυτές. Συνεχίζοντας τις έρευνες ο ίδιος και οι συνεργάτες του οδηγήθηκαν το 1986 στη δημιουργία μιας οπτικής παγίδας δύναμης βαθμίδας μονής δέσμης, όπως είναι και ο επίσημος όρος για αυτήν την τεχνική (Ashkin et al., 1986). Με μια ισχυρά εστιασμένη δέσμη laser, διηλεκτρικά σφαιρίδια διαμέτρων 25 nm έως 10 μm αιωρούμενα σε νερό παγιδευτήκαν σταθερά στις τρεις διαστάσεις με μια μόνο δέσμη laser. Αυτό το φαινόμενο οφείλεται σε αξονική συνιστώσα της δύναμης βαθμίδας που εξισορροπεί τη δύναμη σκέδασης (Ashkin et al., 1986).



Σχήμα 1.1: Το σχεδιάγραμμα του Ashkin για την ερμηνεία των δυνάμεων που προκύπτουν όταν μια δέσμη ρυθμού TEM_{00} προσπίπτει σε ένα σφαιρικό διηλεκτρικό σωματίδιο. Οι ακτίνες a και b διαθλώνονται 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. (Ashkin 1986)

Ο Ashkin αρχικά ήθελε να εφαρμόσει την οπτική παγίδα στο πάγωμα και στην ακινητοποίηση ουδέτερων ατόμων (atom trapping and cooling) μελετώντας το φαινόμενο ήδη από τις πρώτες του έρευνες. Οι έρευνες αυτές και η εξέλιξη τους οδήγησαν στην δημιουργία του laser cooling και της μαγνητο-οπτικής παγίδας από

τον Chu, ο οποίος για την εργασία αυτή βραβεύτηκε με το νόμπελ Φυσικής (1997) μαζί με τους Claude Cohen-Tannoudji και William Daniel Phillips. Ήδη όμως από την αρχή της εξέλιξης της παρατηρήθηκε ότι το σύστημα της οπτικής παγίδευσης προσφέρεται για εφαρμογές στην βιολογία και μάλιστα έδωσε την δυνατότητα να μελετηθούν κάποιες διεργασίες με τρόπο που μέχρι πρότινος δεν ήταν εφικτός.

1.2 Οπτικές Δυνάμεις

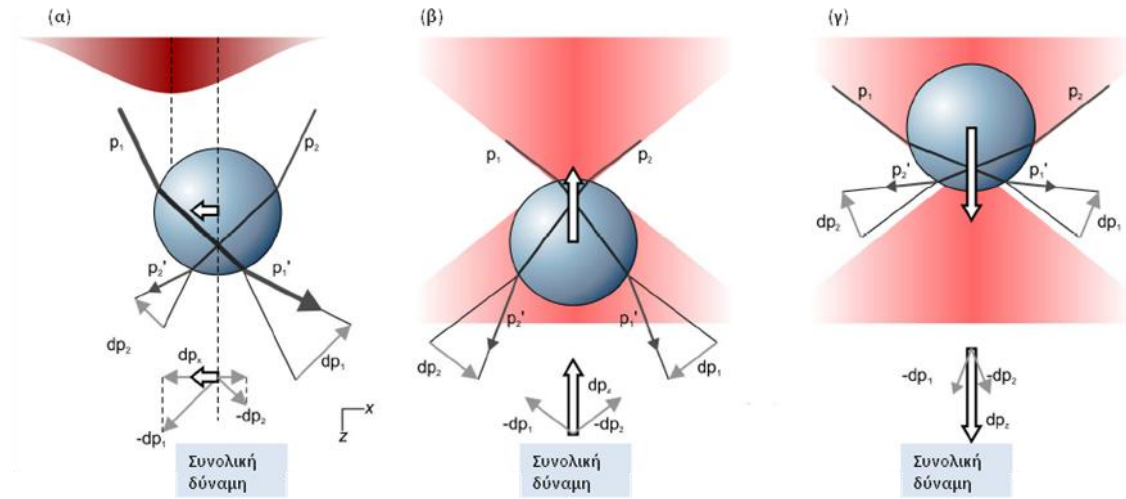
Η οπτική παγίδα, στην απλή της μορφή, αποτελείται από μια δέσμη laser που εστιάζεται ισχυρά με έναν αντικειμενικό φακό μεγάλου αριθμητικού ανοίγματος. Οι οπτικές δυνάμεις που δρουν σε ένα διηλεκτρικό σωματίδιο στην εστία της δέσμης καθορίζονται από την προσπίπτουσα ισχύ, P , την ταχύτητα του φωτός, c , τον δείκτη διάθλασης του περιβάλλοντος μέσου, n_m , και ενός αδιάστατου παράγοντα, Q , ως εξής:

$$F = Q \frac{n_m P}{c} \quad 1.1.$$

Ο παράγοντας Q εκφράζει την αποδοτικότητα της παγίδας, δηλαδή το ποσοστό της ισχύος της δέσμης laser που συντελεί στην οπτική δύναμη (Mazolli et al., 2003) και εξαρτάται από το αριθμητικό άνοιγμα του αντικειμενικού φακού (NA), το μήκος κύματος (λ), την πόλωση, τον ρυθμό του laser, το σχετικό δείκτη διάθλασης (δείκτης διάθλασης διηλεκτρικού n_p , προς αυτό του μέσου n_m) και την γεωμετρία του διηλεκτρικού σωματιδίου (Svoboda & Block, 1994). Για να επιτευχθεί σταθερή παγίδα καθοριστικό ρόλο παίζει ο παράγοντας Q , γιατί ο δείκτης διάθλασης n_m είναι δεδομένος, αφού τα δείγματα βρίσκονται συνήθως σε υδατοειδή μέσα και η ισχύς δεν μπορεί να αυξηθεί απεριόριστα γιατί θα προκαλέσει βλάβη στο δείγμα.

Οι δυνάμεις που συμβάλλουν στην παγίδευση ενός σωματιδίου οφείλονται στην αλληλεπίδραση του σωματιδίου και του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου της δέσμης που προσπίπτει σε αυτό, δηλαδή στην ηλεκτρομαγνητική σκέδαση και στις μεταβολές της ορμής λόγω αυτής. Γενικά η λύση του προβλήματος της ηλεκτρομαγνητικής σκέδασης απαιτεί την λύση των εξισώσεων του Maxwell και των ανάλογων οριακών συνθηκών. Όμως με κάποιες προσεγγίσεις μπορεί κανείς να έχει μια εικόνα για το πώς λειτουργεί η οπτική παγίδα. Τα πλέον γνωστά θεωρητικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για να δώσουν μια ποιοτική εξήγηση είναι η

προσέγγιση δίπολου βασισμένη στην θεωρία σκέδασης Rayleigh και το γεωμετρικό μοντέλο βασισμένο στη γεωμετρική οπτική.



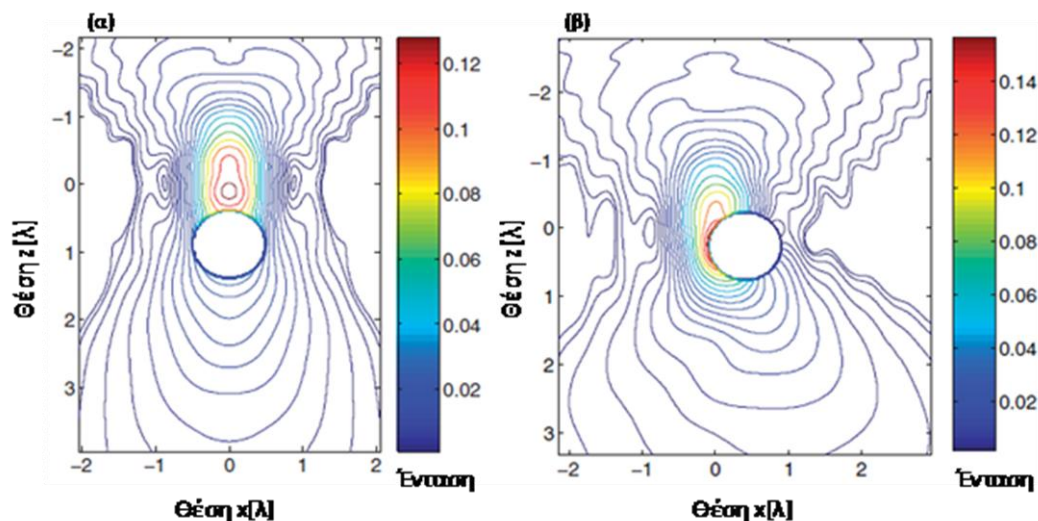
Σχήμα 1.2: Όταν μια δέσμη προσπίπτει με ορμή p_p σε ένα σφαιρικό σωματίδιο, η μεταβολή της ορμής Δp λόγω της ανάκλασης, (α), αντιστοιχεί σε μια ίση και αντίθετη ορμή στο σωματίδιο $-\Delta p$ και από δεύτερο νόμο του Νεύτωνα αυτό σημαίνει εφαρμογή δύναμης, F , σε αυτό. Παρομοίως με τη διάθλαση της δέσμης, περίπτωση (β), η μεταβολή της ορμής της παράγει την δύναμη F στην διεύθυνση της ορμής, p_p , που αποκτάει το σωματίδιο. (εικόνα από JPK Instruments Technical report)

Με βάση αυτά τα μοντέλα, για να ερμηνευθεί ο μηχανισμός της οπτικής παγίδευσης, οι δυνάμεις αναλύονται σε δυο συνιστώσες, στην δύναμη σκέδασης που ωθεί το υπό παγίδευση σωματίδιο στην κατεύθυνση διάδοσης του φωτός και στην δύναμη βαθμίδας που το ωθεί προς την περιοχή μεγαλύτερης έντασης, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή. Σε μια σταθερή παγίδα στις τρεις διαστάσεις η αξονική συνιστώσα βαθμίδας, η οποία τραβάει το σωματίδιο στην περιοχή της εστίασης της δέσμης, υπερισχύει της συνιστώσας σκέδασης που σπρώχνει το σωματίδιο στην κατεύθυνση της διάδοσης της δέσμης. Αποτέλεσμα της ισορροπίας αυτών των δυνάμεων είναι η μετατόπιση της θέσης ισορροπίας του παγιδευμένου σωματιδίου λίγο πιο κάτω από την εστία του αντικειμενικού φακού.

Με τις παραδοχές της γεωμετρικής οπτικής μπορεί να εξηγηθούν οι δυνάμεις που δρουν στο παγιδευμένο σωματίδιο με ένα απλό τρόπο. Έστω ότι δυο ακτίνες με ορμή p_1 και p_2 προσπίπτουν πάνω σε ένα σφαιρικό σωματίδιο, όπως φαίνεται στην εικόνα του σχήματος 1.2. Στην εικόνα αυτή φαίνεται η μεταβολή στις ορμές των ακτίνων λόγω της διάθλασής τους από το σωματίδιο, p_1' και p_2' και η συνισταμένη

της ορμής, dp , του τελευταίου που προκύπτει από αυτή την μεταβολή. Όταν το σφαιρίδιο είναι εγκάρσια μετατοπισμένο από την εστία, η συνισταμένη δύναμη βαθμίδας είναι στην διεύθυνση κάθετη στην διάδοση της δέσμης με κατεύθυνση προς την εστία (σχήμα 1.2(α)). Ενώ όταν το σωματίδιο βρίσκεται στον άξονα διάδοσης της δέσμης, αλλά μετατοπισμένο από την εστία, προκύπτει η συνισταμένη αξονική δύναμη βαθμίδας με κατεύθυνση πάλι την εστία (σχήμα 1.2(β) και (γ)).

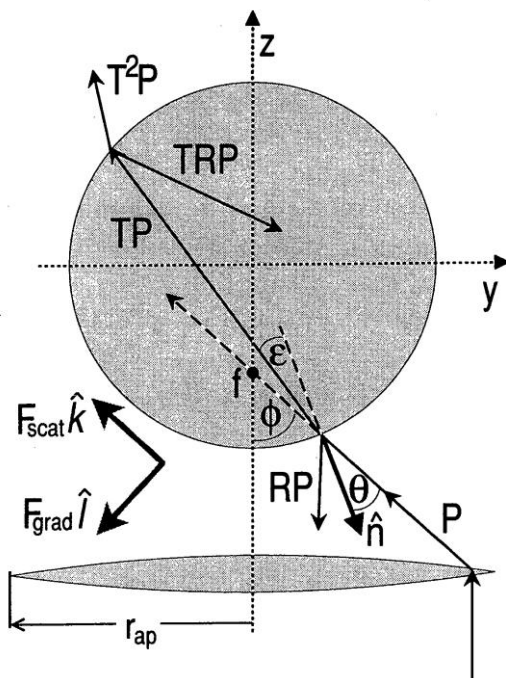
Τα ίδια συμπεράσματα προκύπτουν και από ηλεκτρομαγνητικούς υπολογισμούς για την επίδραση ενός σωματιδίου όταν βρίσκεται στο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο μιας δέσμης laser. Στο διάγραμμα του σχήματος 1.3, το οποίο είναι βασισμένο σε ακριβείς ηλεκτρομαγνητικούς υπολογισμούς, φαίνεται ο τρόπος που επιδρά το παγιδευμένο σωματίδιο στην ένταση του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου στο οποίο βρίσκεται (Nieminen et al., 2007). Στην πρώτη περίπτωση (σχήμα 1.3 (α)) το σωματίδιο είναι μετατοπισμένο αξονικά από το σημείο ισορροπίας και φαίνεται η αλλαγή στην σύγκλιση της δέσμης, η οποία προσπίπτει προς τα κάτω, ενώ στην δεύτερη περίπτωση (σχήμα 1.3 (β)) είναι μετατοπισμένο ακτινικά και φαίνεται ότι η δέσμη εκτρέπεται στα δεξιά συντελώντας σε μια δύναμη αντίδρασης στο σωματίδιο προς τα αριστερά. Στη συνέχεια, ακολουθεί μια περιγραφή των διάφορων μοντέλων για την περιγραφή των οπτικών δυνάμεων στην οπτική παγίδα.



Σχήμα 1.3: Διάγραμμα έντασης ως συνάρτηση της αξονικής, z , και της ακτινικής, x , θέσης του σωματιδίου (Nieminen et al., 2007) όταν αυτό είναι μετατοπισμένο αξονικά από την εστία της δέσμης (α) και όταν είναι μετατοπισμένο εγκάρσια της διάδοσης από την εστία (β).

1.2.1 Γεωμετρικό μοντέλο

Στο μοντέλο αυτό η δέσμη laser αναλύεται σε παράλληλες ακτίνες που εστιάζονται από τον αντικειμενικό φακό σε ένα σημείο. Με την παραδοχή ότι η διάμετρος του σωματιδίου, $2r$, είναι πολύ μεγαλύτερη του μήκους κύματος της δέσμης, οι ακτίνες ανακλώνται και διαθλώνται στην επιφάνεια του σωματιδίου σύμφωνα με το νόμο του Snell (Nahmias & Odde, 2002). Η κυματική φύση του φωτός δεν λαμβάνεται υπόψη σε αυτή την περίπτωση και άρα σχετικά φαινόμενα όπως η περίθλαση θεωρούνται αμελητέα. Μια ακτίνα προσπίπτει στην επιφάνεια σφαίρας υπό γωνία θ (σχήμα 1.4) 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 (σχήμα 1.4). Η συνολική δύναμη από αυτήν την ακτίνα είναι το άθροισμα της συνεισφοράς των εξερχόμενων ακτίνων, PR , PT^2 , PT^2R , PT^2R^2 , ..., PT^2R^n (Ashkin 1992).



Σχήμα 1.4: 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)

Βασισμένος στους τύπους του Roosen και των συνεργατών του (Roosen et al., 1979) ο Ashkin, περιέγραψε την συνολική δύναμη από μια ακτίνα φωτός με έναν απλό τύπο, αναλύοντάς τη σε δυο συνιστώσες. Την συνιστώσα την κάθετη στην διάδοση της δέσμης F_y , την όρισε ως την δύναμη βαθμίδας F_g , ενώ την παράλληλη στην δέσμη F_z την όρισε ως τη δύναμη σκέδασης F_s (Ashkin, 1992):

$$F_z = F_s = \frac{n_m P}{c} \left\{ 1 + R \cos 2\theta - \frac{T^2 [\cos(2\theta - 2r) + R \cos 2\theta]}{1 + R^2 + 2R \cos 2r} \right\}$$

1.2

$$F_y = F_g = \frac{n_m P}{c} \left\{ R \sin 2\theta - \frac{T^2 [\sin(2\theta - 2r) - R \sin 2\theta]}{1 + R^2 + 2R \cos 2r} \right\} \quad 1.3$$

όπου θ, r είναι οι γωνίες πρόσπτωσης και διάθλασης αντίστοιχα (Ashkin, 1992). Για να προκύψει η συνολική δύναμη που δρα στο σωματίδιο αθροίζονται οι παραπάνω δυνάμεις για όλες τις ακτίνες, έτσι στα πλαίσια του γεωμετρικού μοντέλου η μέθοδος αυτή είναι ακριβής. Επίσης, αφού οι συντελεστές Fresnel R και T εξαρτώνται από την πόλωση των ακτίνων, στον υπολογισμό των δυνάμεων υπεσέρχεται και η εξάρτηση από αυτήν.

1.2.2 Προσέγγιση δίπολου

Στην περίπτωση που η ακτίνα του σωματιδίου είναι πολύ μικρότερη από το μήκος κύματος ($r \ll \lambda$) κυριαρχεί η σκέδαση Rayleigh και το σωματίδιο θεωρείται ως σημειακό δίπολο που επάγεται από το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο της δέσμης του laser. Για ένα σφαιρικό σωματίδιο με σχετικό δείκτη διάθλασης m , η διπολική ροπή λόγω του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου του φωτός, \mathbf{E} , είναι παράλληλη στην διεύθυνσή του και γραμμικά εξαρτώμενη από αυτό, $\mathbf{p}(\mathbf{r}, t) = \alpha \mathbf{E}(\mathbf{r}, t)$. Το μέγεθος α είναι η πολωσιμότητα του σωματιδίου και ισούται με:

$$\alpha = 4\pi r^3 \varepsilon \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \quad 1.4$$

Η σκεδαζόμενη ισχύς του φωτός, όταν αυτό προσπίπτει στο εν λόγω σωματίδιο, δίνεται από τον τύπο (Miles et al., 2001):

$$P_{scat} = \frac{8\pi^3 \alpha^2}{3\varepsilon^2 \lambda^4} I_0 \quad 1.5$$

όπου ϵ είναι η διηλεκτρική σταθερά του μέσου στο οποίο βρίσκεται το σωματίδιο και η ένταση που ισούται με τη μέση τιμή του διανύσματος Poynting:

$$I_0 = \langle \mathbf{S}(\mathbf{r}, t) \rangle = (\epsilon c / 2) |\mathbf{E}(\mathbf{r}, t)|^2 \quad 1.6.$$

Συνεπώς η δύναμη που θα ασκηθεί στο σωματίδιο λόγω σκέδασης θα είναι ίση με:

$$F_{scat} = n_m P_{scat} / c = \frac{128\pi^5 n_m r^6}{3\lambda^4 c} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 I_0 \quad 1.7.$$

Επειδή το σωματίδιο-δίπολο στην εστία της δέσμης βρίσκεται σε μια βαθμίδα ηλεκτρομαγνητικού πεδίου υπόκειται και σε μια δύναμη βαθμίδας (Ashkin et al., 1986):

$$F_{grad} = \frac{1}{2} n_m \alpha \nabla E^2 \quad 1.8$$

Από τον τύπο (1.4) και (1.6) προκύπτει ότι η δύναμη βαθμίδας ισούται με

$$F_{grad} = \frac{2\pi r^3 n_m}{c} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \nabla I_0 \quad 1.9$$

1.2.3 Ηλεκτρομαγνητική θεωρία , ενδιάμεση περιοχή ($r \approx \lambda$)

Οι οπτικές δυνάμεις προκύπτουν όπως προαναφέρθηκε 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, \vec{T} , ως εξής (Griffiths 2004, κεφ7, ελληνική μετάφραση):

$$\mathbf{F} = \oint_S \vec{T} d\mathbf{a} - \epsilon_0 \mu_0 \frac{d}{dt} \int_V \mathbf{S} d\tau \quad 1.10$$

όπου \mathbf{S} το διάνυσμα Poynting, $d\mathbf{a} = \mathbf{n} da$ το στοιχειώδες εμβαδό και \mathbf{n} το κάθετο διάνυσμα σε αυτό και dt ο στοιχειώδης όγκος. Στην στατική περίπτωση και παίρνοντας τη μέση χρονική τιμή της δύναμης, ο δεύτερος όρος της (1.10) μηδενίζεται και η δύναμη υπολογίζεται με τον τύπο:

$$\langle \mathbf{F} \rangle = \left\langle \int_S \vec{T} d\mathbf{a} \right\rangle \quad 1.11$$

με τον τανυστή τάσης του Maxwell να ισούται με (Griffiths 2004, κεφ7, ελληνική μετάφραση):

$$T_{ij} = \varepsilon_0 (E_i E_j - \frac{1}{2} \delta_{ij} E^2) + \frac{1}{\mu_0} (B_i B_j - \frac{1}{2} \delta_{ij} B^2) \quad 1.12$$

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

Όπως φαίνεται από τις εξισώσεις (1.11) και (1.12) για να υπολογίσει κανείς τις οπτικές δυνάμεις πρέπει πρώτα να εξάγει τους τύπους για το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο που προκύπτει από την σκέδαση της δέσμης από ένα σωματίδιο. 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 προσπιπτόμενο, σκεδαζόμενο και το 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.

Γενικά το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο που προκύπτει από την πρόσπτωση μιας εστιασμένης δέσμης laser σε ένα σωματίδιο εξαρτάται είναι συνάρτηση των ιδιοτήτων της δέσμης, μήκος κύματος, ρυθμός, ισχύς και διάμετρος της δέσμης, αλλά και των ιδιοτήτων του σωματιδίου, διάμετρος, σχήμα και δείκτης διάθλασης. Για να μελετηθούν οι διαφορετικές περιπτώσεις των παραπάνω μεγεθών έχουν αναπτυχθεί γενικευμένες θεωρίες Lorentz-Mie (Generalized Lorentz Mie Theory, GLMT). Η ονομασία αυτή ορίστηκε από τον Gouesbet και τους συναδέλφους του (Gouesbet et al., 1988), οι οποίοι 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):

$$\mathbf{F}(\mathbf{r}) = \frac{n_m}{c} \frac{2P}{\pi w_0^2} [\hat{x} C_{pr,x}(\mathbf{r}) + \hat{y} C_{pr,y}(\mathbf{r}) + \hat{z} C_{pr,z}(\mathbf{r})] \quad 1.13$$

όπου οι συντελεστές, $C_{pr,x}$, $C_{pr,y}$, και $C_{pr,z}$, είναι οι διατομές για την πίεση ακτινοβολίας (Gouesbet et al., 1988 - Ren&Gouesbet, 1994).

Ο Barton και οι συνεργάτες του (1988) επέκτειναν την θεωρία σκέδασης Lorentz-Mie λαμβάνοντας υπόψη τους το πεδίο που δημιουργείται μέσα στο σωματίδιο και κοντά στην επιφάνειά του. Γενικά έχουν γίνει διάφορες προσπάθειες ώστε να λαμβάνονται υπόψη διάφοροι παράμετροι όπως η περίθλαση στον αντικειμενικό φακό από τον Mazolli και τους συνεργάτες του (Mazolli et al., 2003), οι οποίοι χρησιμοποιούν για την έκφραση του πεδίου την ολοκληρωτική αναπαράσταση του τύπου Debye. Άλλο παράδειγμα είναι η περιγραφή του πεδίου βασισμένη στην διανυσματική θεωρία περίθλασης, όπου λαμβάνεται υπόψη ο διανυσματικός χαρακτήρας των πεδίων μιας ισχυρά εστιασμένης δέσμης (Ganic et al., 2004).

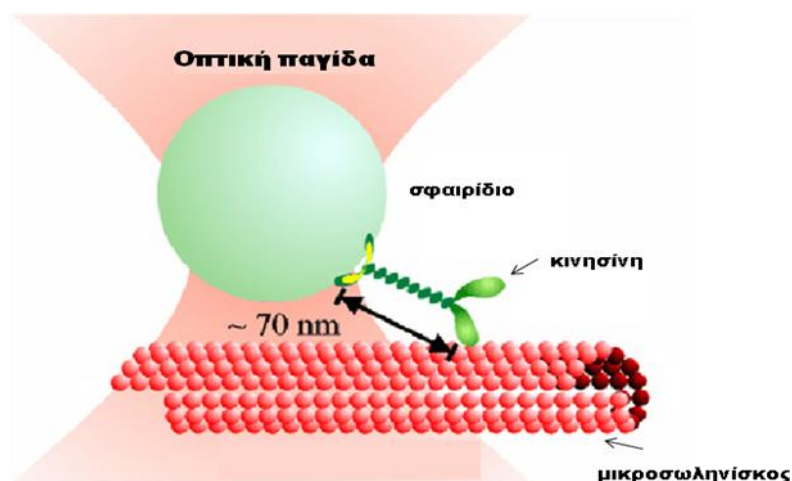
1.3 Εφαρμογές της οπτικής παγίδας στην βιολογία

Με την εξέλιξη της τεχνικής της οπτική λαβίδας επήλθε η δυνατότητα για επαγωγή ελεγχόμενων δυνάμεων καθώς και η ακριβής βαθμονόμησή τους. Αυτά σε συνδυασμό με το σχετικά εύκολο και μη επεμβατικό χειρισμό που προσφέρει το φως καθιστούν την οπτική παγίδα κατάλληλη για τη μελέτη βιολογικών συστημάτων.

Ιδιαίτερα σπουδαία είναι η συνεισφορά της 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. Έτσι 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. 1993). 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 1.5). 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.



Σχήμα 1.5: 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.

(σχήμα από <http://www.stanford.edu/group/blocklab/kinesin/kinesin.html>)

Μια άλλη ενδιαφέρουσα εφαρμογή της οπτικής παγίδας ως αισθητήρα δυνάμεων είναι η μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων του DNA και άλλων πρωτεϊνών. Για παράδειγμα ο Wang και οι συνεργάτες του στην ομάδα του Block (Wang et al., 1998) βρήκαν ότι η δύναμη που ασκεί η RNA πολυμεράση κατά την μεταγραφή ενός γονιδίου DNA είναι 25pN. Επίσης έχει μελετηθεί ο μηχανισμός της μυϊκής συστολής εξετάζοντας την λειτουργία της μυοσίνης και της ακτίνης και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης (Dholakia et al., 2007)

Με απευθείας παγίδευση βιολογικών μακρομορίων ή κυτταρικών μεμβρανών, ή με τη βοήθεια των latex σφαιριδίων, μπορεί κανείς να προκαλέσει ελαστικές παραμορφώσεις στα υπό μελέτη βιολογικά υλικά και να μετρήσει με αυτό τον τρόπο τις διάφορες ελαστικές τους ιδιότητες, όπως το μέτρο στρέψης, την ακαμψία λυγισμού και το μέτρο ελαστικότητας. Για παράδειγμα ο Chu (1991) προσδένοντας δυο σφαίρες πολυστυρενίου στα άκρα ενός μορίου DNA μελέτησε τις ελαστικές του ιδιότητες και ο Henon με τους συνεργάτες του (1999) με παρόμοιο τρόπο μετρήσε το

μέτρο στρέψης ενός ερυθροκυττάρου και η Dimova και άλλοι (Dimova et al., 2000) τις ελαστικές ιδιότητες λιπιδικών κυστιδίων.

Το σύστημα της οπτικής παγίδας μπορεί να συνδυαστεί με άλλες τεχνικές laser όπως το «νυστέρι laser» για παγίδευση και ταυτόχρονα μικροχειρουργική αλλά και με άλλες τεχνικές όπως η μικροπιπέτα και η μικροσκοπία φθορισμού παρέχοντας ισχυρά συστήματα για τη μελέτη βιολογικών μηχανισμών. Αξίζει για παράδειγμα να αναφερθούν οι έρευνες που έχουν γίνει για *in vitro* γονιμοποίηση, στις οποίες συνδιάζεται 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)

Σε αυτή την εργασία ο στόχος είναι η εφαρμογή της οπτικής παγίδας στην μελέτη και στις μετρήσεις των ελαστικών ιδιοτήτων των λιποσωμάτων χρωσμένων με μπλε του μεθυλενίου. Σε αυτή τη περίπτωση τα λιποσώματα επιμηκύνονται λόγω του προφίλ της δέσμης που είναι μια ευθεία γραμμή, σε αντίθεση με τα παραδείγματα που αναφέρθηκαν παραπάνω, όπου η επιμήκυνση προκαλείται με την μετακίνηση σφαιριδίων προσκολλημένων στο σωματίδιο προς μελέτη.

2 Διάταξη οπτικής παγίδας και παγίδας γραμμής

2.1 Βασικές αρχές για τον σχεδιασμό μιας διάταξης οπτικής παγίδας

Μια βασική διάταξη οπτικής παγίδευσης αποτελείται από μια πηγή laser, ένα μικροσκόπιο που θα εστιάσει ισχυρά τη δέσμη πάνω στο δείγμα, τα κατάλληλα οπτικά εξαρτήματα για την οδήγηση της δέσμης στον αντικειμενικό φακό του μικροσκοπίου, και τέλος ένα σύστημα καταγραφής εικόνας, το οποίο συχνά αποτελείται από μια CCD κάμερα. Το laser επιλέγεται ώστε το μήκος κύματός του να είναι κατάλληλο για το δείγμα, δηλαδή να υπάρχει ελάχιστη απορρόφηση και άρα βλάβη στο δείγμα. Για παράδειγμα σε μη ζωντανά δείγματα, όπως σφαίρες πολυστυρενίου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ορατό φως, ενώ για βιολογικά υλικά προτιμότερα είναι laser κοντινού υπερύθρου γιατί σε αυτά οι συντελεστές απορροφικότητας είναι μικροί. Άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό του laser είναι η ισχύς, που πρέπει να είναι αρκετή, συνήθως για βασικά πειράματα μια ισχύς από 2 έως 100 mW είναι αρκετή. Επιπλέον ο ρυθμός εξόδου είναι προτιμότερο να είναι μονός εγκάρσιος ρυθμός, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση μιας γκαουσιανής δέσμης, TEM₀₀, για να υπάρξει η επιθυμητή εστίαση και ο βαθμός αστιγματισμού να είναι ο ελάχιστος.

Η κατανόηση των μηχανισμών που μπορούν να επιφέρουν αλλοιώσεις ή βλάβες στις βιοδομές δεν είναι απλή και ακόμη δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Υπάρχει κάποιο κατώφλι για την οπτική βλάβη (opticution, όρος που έχει αποδοθεί από τον Ashkin) που καθορίζει πρακτικά το όριο της φωτεινής ισχύος ακτινοβολήσης του δείγματος και συνεπώς της δύναμης που μπορεί να ασκηθεί. Συνεπώς, κριτήριο για την επιλογή της κατάλληλης πηγής laser για οπτική παγίδευση είναι το μήκος κύματος σε συνδυασμό με την ισχύ της ακτινοβολίας.

Για να είναι σταθερή η παγίδα πρέπει η δύναμη βαθμίδας που ωθεί το σωματίδιο προς την εστία να είναι μεγαλύτερη από την δύναμη σκέδασης που το ωθεί στην διεύθυνση διάδοσης της δέσμης. Αυτό μπορεί να κατανοηθεί αν θεωρηθεί ένα μοντέλο βασισμένο στην δύναμη Lorentz, που εξάγεται από το φως στα άτομα του

παγιδευμένου αντικειμένου. Συντόμως αυτό λέει πως το φως επάγει στην ύλη μια διπολική ροπή P , η οποία είναι ανάλογη του ηλεκτρικού πεδίου E . Η συνολική ενέργεια του επαγόμενου δίπολου στο πεδίο είναι $U = -\mathbf{P}\mathbf{E} \propto -\mathbf{E}\mathbf{E} \propto -I$, καθώς η ένταση I , είναι ανάλογη του τετραγώνου του ηλεκτρικού πεδίου σε ένα ισοτροπικό μέσο με γραμμική πόλωση ως προς το πεδίο. Άρα η ενέργεια ελαχιστοποιείται όταν το σωματίδιο βρεθεί στη θέση μέγιστης έντασης. Για μια εστιασμένη δέσμη αυτή η θέση είναι το σημείο εστίας της, επομένως τα σωματίδια θα έλκονται από την εστία. Αφού το δυναμικό είναι ανάλογο της έντασης, τότε η δύναμη είναι ανάλογη της βαθμίδας του I , και είναι η δύναμη που ευθύνεται για την οπτική παγίδευση (Smith, 1999). Αυτό θα μπορούσε αντίστοιχα να εξηγηθεί και με άλλες προσεγγίσεις όπως το γεωμετρικό μοντέλο.

Από τα παραπάνω συνεπάγεται ότι αύξηση στην ισχύς της δέσμης επιφέρει αύξηση στην ικανότητα παγίδευσης και για δεδομένη ισχύς η αποδοτικότητα της παγίδας αυξάνεται όσο μειώνεται το μέγεθος του σημείου εστίασης του laser, $w_{\text{παγ}}$, παρέχοντας έτσι μέγιστη ένταση στο σημείο εστίασης. Βέβαια η εστίαση της δέσμης σε ένα πολύ μικρό σημείο περιορίζεται από το όριο της περίθλασης. Για έναν ιδανικό φακό εστιακής απόστασης, f , που εστιάζει μια συγκλίνουσα δέσμη διαμέτρου D και μήκους κύματος λ_0 , το $w_{\text{παγ}}$, θα είναι (Smith 1999):

$$w_{\text{παγ}} \geq \frac{1.22 f \lambda}{2D} = \frac{1.2 \lambda_0 \tan[\sin^{-1}(NA/n)]}{n} = \frac{1.22 \lambda_0}{n} \sqrt{\left(\frac{n}{NA}\right)^2 - 1} \quad 2.1,$$

όπου NA είναι το αριθμητικό άνοιγμα του φακού και n , ο δείκτης διάθλασης του μέσου. Επομένως καθοριστικό ρόλο για την ισχυρή εστίαση παίζει ο αντικειμενικός φακός που πρέπει να είναι μεγάλου αριθμητικού ανοίγματος και μεγάλης μεγέθυνσης. Η συνήθης επιλογή είναι ελαιοκαταδυτικοί φακοί με $NA > 1$ και μεγάλη μεγέθυνση, 60X ή 100X.

Τα παραπάνω ισχύουν κυρίως για την αξονική απόδοση της παγίδας και όχι για την εγκάρσια για την οποία ισχύει το αντίστροφο. Έχει αποδειχτεί ότι με αύξηση του NA αυξάνεται η αξονική συνιστώσα βαθμίδας αλλά μειώνεται η εγκάρσια (Ashkin 1992- Bing-Huan et al., 2008). Επιπλέον πειραματικά αποτελέσματα από τον Malagnino και τους συνεργάτες του δείχνουν ότι για πολύ μικρά σωματίδια φακός 100x είναι πιο αποδοτικός από ότι ο 40x, ενώ για μεγαλύτερα, π.χ 4μm πιο αποδοτικός είναι ο 40x (Malagnino et al., 2002). Σε παρόμοια συμπεράσματα

κατέληξε και η Παπαγιάκουμου στην διδακτορική διατριβή της, μελετώντας σφαίρες πολυστυρενίου και κύτταρα μαγιάς (Παπαγιάκουμου, Διδακτορική διατριβή ΕΜΠ, 2005). Παρόλ'αυτά, επειδή η παγίδευση είναι πιο δύσκολη στον άξονα διάδοσης δέσμης, για να υπάρξει μια σταθερή τρισδιάστατη παγίδα, πρωτίστως ενδιαφέρει η αξονική συνιστώσα βαθμίδας να είναι μεγαλύτερη από αξονική συνιστώσα σκέδασης.

Όταν η διάμετρος της δέσμης D , στο άνοιγμα του αντικειμενικού είναι μικρότερη από τη διάμετρο του φακού, $D_{\text{αντ.}}$, τότε το $w_{\text{παγ.}}$ δεν θα είναι το ελάχιστο, ενώ αν η διάμετρος της δέσμης είναι μεγαλύτερη από αυτή του φακού δεν θα εισέρχεται όλη η δέσμη στο φακό και άρα η βαθμίδα της έντασης θα είναι μειωμένη. Ένα κριτήριο για την επιλογή της διαμέτρου της δέσμης είναι η μεγιστοποίηση της έντασης στο κέντρο της δέσμης. Το ιδανικό είναι η δέσμη να καλύπτει ακριβώς το φακό δηλ. $D_{\text{παγ.}} = d$, ή να υπερκαλύπτει ελαφρώς το άνοιγμα του φακού. Συνήθως η δέσμη υπερκαλύπτει το φακό και λαμβάνεται υπόψη η ενεργός της διάμετρος, η περιοχή δηλαδή που περιλαμβάνει το $1/e^2$ της έντασης μιας γκαουσιανής δέσμης. Γενικά η διάμετρος της δέσμης είναι μικρότερη από αυτή του φακού και για να διευρυνθεί η δέσμη χρησιμοποιείται ένα τηλεσκοπικό σύστημα αποτελούμενο από δυο επιπεδόκυρτους φακούς. Αν οι φακοί με εστιακές αποστάσεις f_1 και f_2 αντίστοιχα είναι τοποθετημένοι σε απόσταση $d=f_1+f_2$ η μεγένθυση στην διάμετρο της δέσμης θα είναι $M=f_2/f_1$.

Τέλος η δέσμη πρέπει να ευθυγραμμιστεί και να οδηγηθεί κατάλληλα ώστε η εστίαση της να συμπίπτει με το επίπεδο εστίασης του δείγματος και να παραμένει κεντραρισμένη στο πίσω άνοιγμα του αντικειμενικού φακού. Η παγίδα, επιπλέον, πρέπει να κινείται σε σχέση με το δείγμα, πράγμα το οποίο μπορεί να γίνει είτε κινώντας το δείγμα, είτε τη δέσμη. Το δείγμα μπορεί να μετακινείται στο x - y επίπεδο μετακινώντας την αντικειμενοφόρο τράπεζα του μικροσκοπίου και αφήνοντας την παγίδα σταθερή στον οπτικό άξονα. Για μικρές αλλά ακριβείς μετατοπίσεις το δείγμα μπορεί να τοποθετηθεί πάνω σε πιεζοηλεκτρική τράπεζα με κίνηση στο x - y επίπεδο. Κίνηση της παγίδας κατά τον οπτικό άξονα (z -κατεύθυνση) επιτυγχάνεται εστιάζοντας το μικροσκόπιο πάνω ή κάτω (μια διαδικασία που επίσης μπορεί να γίνει μηχανοκίνητα) εκμεταλλευόμενοι το γεγονός ότι η δέσμη του laser εστιάζεται στο ίδιο επίπεδο με αυτό του δείγματος (Svoboda & Block, 1994).

Η εισαγωγή της δέσμης στο μικροσκόπιο, χωρίς να παρεμποδίζεται η λειτουργία του μικροσκοπίου σαν όργανο παρατήρησης, επιτυγχάνεται με την

εισαγωγή διχρωϊκού κατόπτρου για το κατάλληλο μήκος κύματος. Ο διχρωϊκός καθρέφτης ανακλά σχεδόν απόλυτα σε γωνία 45° το μήκος κύματος για το οποίο έχει κατασκευαστεί και αφήνει να περάσουν όλα τα υπόλοιπα μήκη κύματος. Συνεπώς, η δέσμη laser ανακλάται στις 45° και εισέρχεται στον αντικειμενικό φακό, ενώ το φως από το δείγμα διέρχεται από το διχρωϊκό στον προσοφθάλμιο φακό του μικροσκοπίου για παρατήρηση.

2.2 Διάταξη της συμβατικής οπτικής παγίδας

2.2.1 Οπτικός σχεδιασμός

Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε η διάταξη που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο «Ανάπτυξη Laser και Εφαρμογές τους» στο ΕΜΠ, κατά την διδακτορική διατριβή της Σπυράτου Ε. (2010). Σε αυτήν την διάταξη χρησιμοποιήθηκε ένα διοδικό laser που εκπέμπει στα 660nm και ένα ανάστροφο μικροσκόπιο. Συνήθως χρησιμοποιούνται ανάστροφα μικροσκόπια, ώστε η δέσμη να εισαχθεί στην οπτική διαδρομή πριν τον φακό, συνεπώς το μικροσκόπιο παρέχει ταυτόχρονα την απεικόνιση, τον χειρισμό του θαλάμου παγίδευσης και την εστίαση και επίσης προτιμάται από τους βιολόγους γιατί προσφέρει πιο εύκολη πρόσβαση στο δείγμα (Neuman&Block, 2004).

Η δέσμη του διοδικού laser έχει σχεδόν ορθογώνιο προφίλ με διάσταση 3X5 mm στην έξοδο της, ενώ το άνοιγμα του αντικειμενικού με μεγέθυνση 100x έχει διάμετρο 6 mm. Οπότε χρειάζεται μια διεύρυνση της δέσμης, όπως εξηγήθηκε στην προηγούμενη ενότητα, κατά έναν παράγοντα περίπου 1,5. Για αυτόν το σκοπό χρησιμοποιήθηκε ένα τηλεσκοπικό σύστημα αποτελούμενο από ένα ζεύγος επιπεδόκυρτων φακών L_1 και L_2 , όπως φαίνεται στο σχήμα 2.1. Επίσης η εστία της δέσμης πρέπει να σχηματιστεί στο εστιακό επίπεδο του αντικειμενικού φακού, που είναι και το επίπεδο του δείγματος, ώστε να είναι δυνατή η ταυτόχρονη παρατήρηση της δέσμης και του παγιδευμένου σωματιδίου. Επομένως η επιλογή της εστιακής απόστασης των δυο φακών, f_1 και f_2 αντίστοιχα, είναι κρίσιμη για τη σωστή διεύρυνση και εστίαση της δέσμης. 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:

$$D_2 = D_1 \frac{d - f_1}{|f_1|} \quad 2.2$$

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:

$$\frac{1}{f_2} = \frac{1}{d - f_1} - \frac{1}{l - f_2} \quad 2.3$$

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

$$D = \frac{D_2}{1 - \frac{f_2}{l}} \quad 2.4.$$

Συνδυάζοντας τις εξισώσεις (2.2), (2.3) και (2.4) προκύπτει η εξίσωση του λόγου των διαμέτρων D και D_1 :

$$\frac{f_2}{|f_1|} = \frac{D}{D_1} \quad 2.5.$$

Με τη διάμετρο D δεδομένη επιλέγεται η απόσταση των φακών από την σχέση (2.4), ενώ η διάμετρος D καθορίζεται από το άνοιγμα του φακού σύμφωνα με τη σχέση :

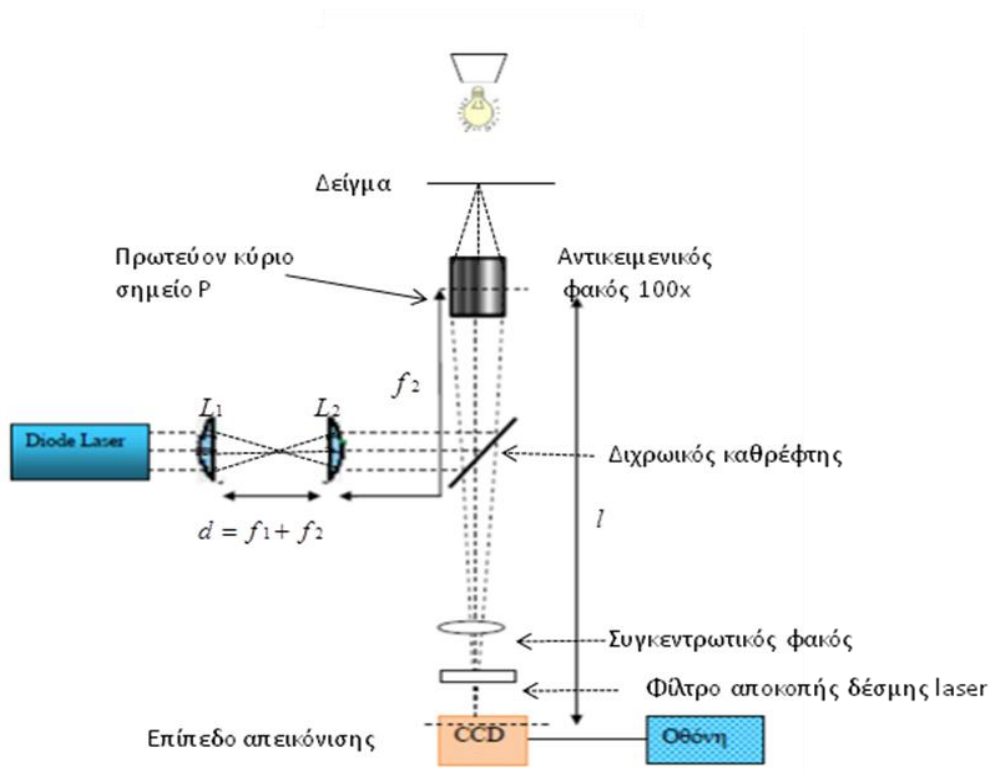
$$D = \frac{2NAf_3}{n} \quad 2.6$$

όπου f_3 η εστιακή απόσταση του αντικειμενικού φακού.

Από την εξίσωση (2.5) φαίνεται 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

γερμίζει 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 (2.5) μπορεί κανείς να υπολογίσει την απόσταση d των φακών L_1 και L_2 από την εξίσωση (2.2). 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.



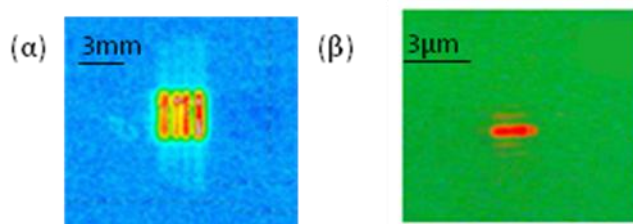
Σχήμα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Φαίνονται τα μεγέθη και οι αποστάσεις που περιγράφηκαν στο κείμενο (εικόνα από Ελίνα Σπυράτου, Διδακτορική διατριβή ΕΜΠ, 2010).

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.

Η δέσμη αφού διευρύνεται από το σύστημα των τηλεσκοπικών φακών ανακλάται από τον διχρωϊκό καθρέφτη και εισέρχεται στο στον αντικειμενικό του μικροσκοπίου. Παράλληλα 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.

2.2.2 Πειραματική Διάταξη

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω το laser που χρησιμοποιήθηκε είναι διοδικό 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 (multi-cavity laser) και μέγιστη τιμή ισχύος 85 mW. Σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά του κατασκευαστή η δέσμη έχει σχεδόν ορθογώνιο προφίλ, γραμμική πόλωση, σχεδόν μηδενικό εγκάρσιο ρυθμό TEM_{00} και παράγοντα ποιότητας δέσμης $M^2 \approx 15$. Στο σχήμα 2.2 φαίνεται το προφίλ της δέσμης όπως καταγράφηκε από μια πυροηλεκτρική κάμερα (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 κοιλοτήτων, στο σύνολό τους σχηματίζουν ένα περίπου ορθογώνιο προφίλ.



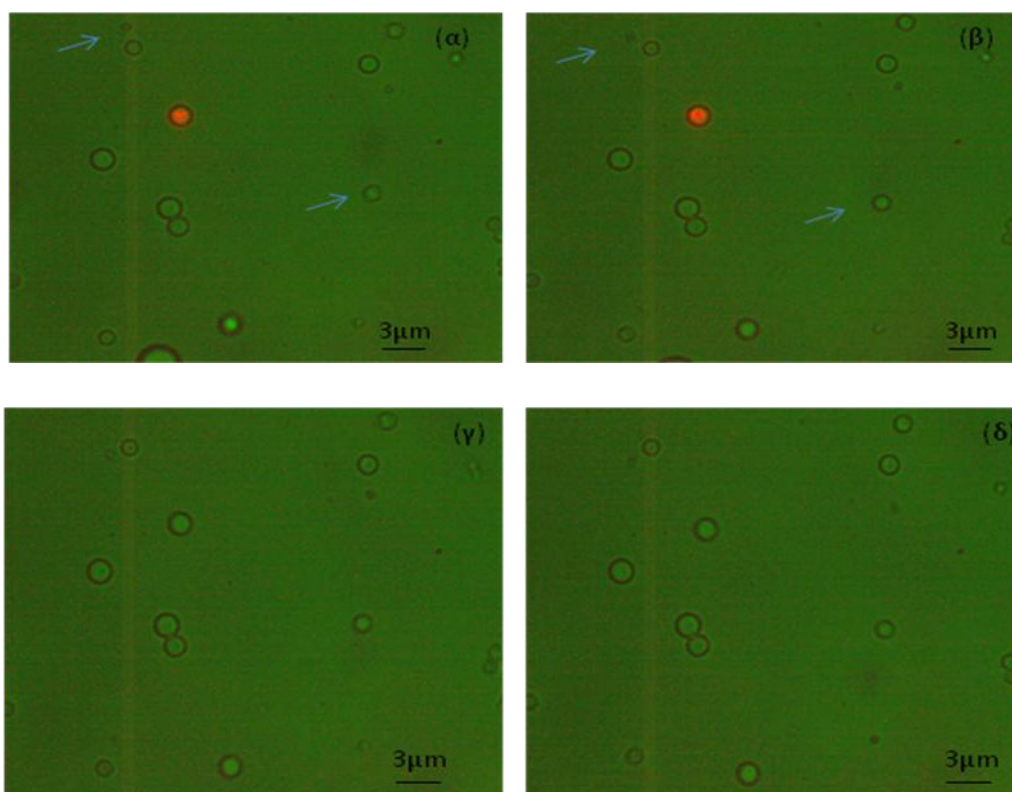
Σχήμα 2.2: Το προφίλ της δέσμης στην έξοδο του laser ανιχνευμένο με μια πυροηλεκτρική κάμερα (α), και πως καταγράφεται από την CCD κάμερα περνώντας από πράσινο φίλτρο που είναι ελάχιστο διαπερατό στο κόκκινο φως.

Χρησιμοποιήθηκε ένα ανάστροφο μικροσκόπιο (Leica DMIL), το εσωτερικό του οποίου τροποποιήθηκε ώστε να εισαχθεί σε αυτόν ένας διχρωικός καθρέφτης (Ekspla). Ο διχρωικός καθρέφτης είναι ειδικά κατασκευασμένος για να ανακλά σε ποσοστό 99,5% τα μήκη 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 ελαιοκαταδυτικός μεγέθυνσης 100x και αριθμητικού ανοίγματος $NA=1,25$. 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.

Η παρατήρηση του πειράματος γίνεται μέσω μιας CCD κάμερας και η επεξεργασία της εικόνας γίνεται μέσω κατάλληλου λογισμικού προγράμματος της Leica. 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 τοποθετείται σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα και καλύπτεται από μια πολύ λεπτή καλυπτρίδα και ύστερα τοποθετείται στην αντικειμενοφόρο τράπεζα του μικροσκοπίου.

2.2.3 Παρατήρηση της παγίδας σε κύτταρα μαγιάς, σφαίρες πολυστυρενίου και λιποσώματα

Ύστερα από την ευθυγράμμιση της διάταξης δοκιμάστηκε παγίδευση σε σφαίρες πολυστυρενίου και σε κύτταρα μαγιάς. Ενδεικτικά στο σχήμα 2.3 φαίνεται μια τέτοια παγίδευση σε πολυστυρένιο. Το πράσινο χρώμα οφείλεται στα φίλτρα που έχουν τοποθετηθεί για την αποκοπή της δέσμης από την CCD κάμερα. Παρ'όλα αυτά ένα μέρος της δέσμης περνάει στην κάμερα και αυτό διευκολύνει την ευθυγράμμιση της διάταξης. 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. Με δοκιμή παγίδευσης στα λιποσώματα παρατηρήθηκε σταθερή παγίδευση μέχρι και σε λιποσώματα μικρότερα του ενός μικρόμετρου, περίπου 600-700nm.



Σχήμα 2.3: Στιγμιότυπα από βίντεο καταγραφής παγίδευσης σφαιρών πολυστυρενίου. Τα μπλε βελάκια δείχνουν σφαίρες που μετακινούνται (α) και (β), ενώ φαίνεται το παγιδευμένο σωματίδιο. Όταν το laser σβήνει, το παγιδευμένο σφαιρίδιο αρχίζει και πάλι να μετακινείται.

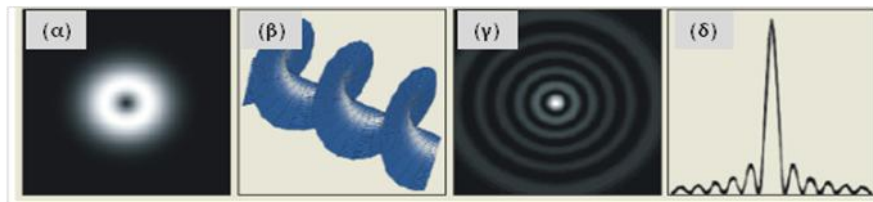
2.3 Πειραματική διάταξη για την επίτευξη οπτικής παγίδας γραμμής (*Line Optical Tweezers*)

2.3.1 Σύγχρονες τεχνικές οπτικής παγίδευσης πέραν της συμβατικής

Μέχρι τώρα η συζήτηση έχει περιοριστεί στις οπτικές παγίδες με γκαουσιανό προφίλ δέσμης, ή στις συμβατικές όπως αλλιώς θα μπορούσαν να αποκαλεστούν. Ο λόγος είναι ότι αποτελούν την βασική διάταξη για την επίτευξη μιας τρισδιάστατης παγίδευσης, πιο απλή στην περιγραφή και ανάλυση και αρκετά αποδοτική. Πλέον όμως υπάρχουν διατάξεις οπτικής παγίδευσης πιο σύνθετες από αυτήν της συμβατικής οπτικής παγίδας που προσφέρουν την δυνατότητα για διαφορετικούς τρόπους χειρισμού και επιπλέον καινοτόμες εφαρμογές.

Παράδειγμα τέτοιων τεχνικών είναι η χρήση δεσμών υψηλού ρυθμού όπως είναι οι δέσμες Laguerre-Gaussian ρυθμού και οι δέσμες Bessel (σχήμα 2.4), με διαφορετικές εφαρμογές η καθεμία. Η δέσμη ρυθμού Laguerre-Gaussian (L-G) χαρακτηρίζεται από δυο ακέραιους αριθμούς, p και l , που καθορίζουν τον αριθμό των δακτυλίων και τα χαρακτηριστικά της αζιμουθιακής φάσης αντίστοιχα. Μια εφαρμογή μιας τέτοιας δέσμης είναι η αύξηση της αξονικής αποδοτικότητας μιας παγίδας καθώς είναι γνωστό ότι αυτή βελτιώνεται όταν η ένταση των παραξονικών ακτίνων είναι μεγάλη ενώ στο κέντρο μηδενική (Simpson et al., 1998). Επίσης αξιοποιώντας το γεγονός ότι τα μέτωπα κύματος αυτής της δέσμης παρουσιάζουν ελικοειδή φάση, έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές για την περιστροφή διαφόρων σωματιδίων (Paterson et al., 1992-Dasgupta et al., 2011). Εκτός από αυτές τις πρακτικές εφαρμογές η δέσμη L-G χρησιμοποιείται για την μελέτη της φύσης του φωτός και της ιδιότητας του να μεταφέρει τροχιακή στροφορμή.

Μια σχετικά νέα εξέλιξη της οπτικής παγίδας είναι η χρήση δεσμών Bessel, που συχνά αναφέρονται και ως δέσμες μηδενικών διαθλάσεων (Molloy 2002). Το προφίλ μια τέτοιας δέσμης αποτελείται από έναν φωτεινό κεντρικό κροσσό που περικλείεται από ομόκεντρους δακτυλίους με φθίνουσα ένταση (σχήμα 2.4 (γ)). Η ένταση της δέσμης στο κέντρο της δεν παρουσιάζει δυνάμεις βαθμίδας και έτσι αυτή χρησιμοποιείται για δισδιάστατη παγίδευση ή για οδήγηση σωματιδίων (Arlt et al., 2001).



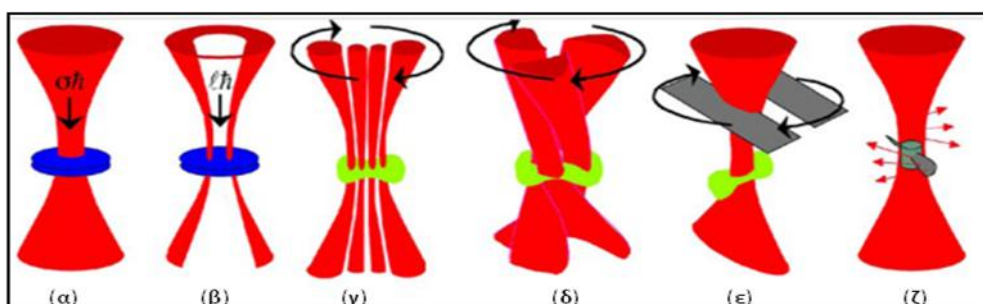
Σχήμα 2.4: Απεικόνιση της διατομής της έντασης μιας Laguerre-Gaussian δέσμης με $l=1$ (α) και της ελικοειδούς της φάσης (β) καθώς και της διατομής της έντασης μιας δέσμης Bessel μηδενικής τάξης (γ) και του προφίλ της κατανομής της έντασης (δ). (εικόνα από Dholakia et al., 2002)

Όπως ήδη αναφέρθηκε οι δέσμες L-G ρυθμού εφαρμόζονται για την περιστροφή σωματιδίων. Ένας τρόπος για να γίνει αυτό είναι ο συνδυασμός μιας τέτοιας δέσμης με μια απλή γκαουσιανή δέσμη επίπεδου μετώπου κύματος (σχήμα 2.5 (δ)) (Paterson et al., 1992). Μια άλλη τεχνική είναι αυτή που χρησιμοποιήθηκε από τον Sato και τους συνεργάτες του (1991), όπου με περιστροφή μιας δέσμης L-G (σχήμα 2.5 (γ)) πραγματοποίησαν περιστροφή ερυθροκυττάρων.

Πέρα όμως από τη χρήση δέσμης υψηλού ρυθμού υπάρχουν και άλλες τεχνικές που εκμεταλλεύονται την μεταφορά τροχιακής στροφορμής μιας δέσμης και την μεταφορά της σε ένα σωματίδιο. Στο σχήμα 2.5(α) και 2.5(β) φαίνονται δυο από αυτές, όπου τα παγιδευμένα σε επίπεδης πόλωσης δέσμη σωματίδια, είναι διπλοθλαστικά ή απορροφητικά και έτσι το σπιν αλλά και η τροχιακή στροφορμή της δέσμης τα εξαναγκάζει σε συγκεκριμένο προσανατολισμό. Περιστρέφοντας το επίπεδο πόλωσης της δέσμης περιστρέφονται και τα σωματίδια (Neumann & Block, 2004). Άλλος ένας τρόπος που βασίζεται στα χαρακτηριστικά του σωματιδίου είναι αυτός που φαίνεται στο σχήμα 2.5(ζ) όπου οι δυνάμεις βαθμίδας που προκύπτουν κατά την παγίδευση με επίπεδα πολωμένη δέσμη, δημιουργούν συνισταμένη ροπή λόγω της ασυμμετρίας του σωματιδίου. Τέλος μια σχετική απλή μέθοδος είναι η συναρμολόγηση ενός διαφράγματος σε μια κινητή τράπεζα από όπου θα περνάει η δέσμη (σχήμα 2.5(ε)) και έτσι περιστρέφοντας το διάφραγμα περιστρέφεται και ο άξονας της δέσμης (Molloy et al., 2002).

Μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα καινοτομία στον τομέα της οπτικής παγίδευσης είναι η εφαρμογή περιθλαστικών οπτικών συστημάτων για την δημιουργία οπτικής παγίδας ολογραμμάτων. Χρησιμοποιώντας έναν περιθλαστικό διαχωριστή δέσμης, μια απλή μονή δέσμη μετατρέπεται σε πολλές ξεχωριστές δέσμες δημιουργώντας

πολλαπλές αυτόνομες παγίδες ή δημιουργείται με κατάλληλους επαναληπτικούς αλγορίθμους από έναν υπολογιστή (Grier, 2003). Πρωτοπόρα είναι επίσης η δημιουργία πολλαπλών παγίδων με διαμερισμό χρόνου. Σε αυτή τη μέθοδο μια δέσμη σαρώνει αστραπιαία κάποια σημεία ώστε ο χρόνος που θα βρίσκεται η δέσμη σε κάθε σημείο-παγίδα να είναι μικρότερος από τον χρόνο διάχυσης του παγιδευμένου σωματιδίου. Με την χρήση γρήγορου ακουστο-οπτικού εκτροπέα έχει επιτευχθεί ταυτόχρονη παγίδευση 8 σωματιδίων (Molloy, 2002).



Σχήμα 2.5: Απεικόνιση των διαφόρων μεθόδων που χρησιμοποιούνται συνήθως για την περιστροφή σωματιδίων μέσω του οπτικού χειρισμού. (εικόνα από Molloy, 2002)

Ένας άλλος τρόπος για την πολλαπλή παγίδευση είναι η χρήση οπτικής παγίδας γραμμής, δηλαδή μιας δέσμης όπου η μια διάσταση του προφίλ της είναι πολύ μεγαλύτερη της άλλης. Μια τέτοια παγίδα αναπτύσσεται μέσω σάρωσης της δέσμης χρησιμοποιώντας περιστρεφόμενους ή γαλβανικούς καθρέπτες (Crocker et al. 1999) ή ακουστο-οπτικούς εκτροπέες (Nambiar & Meiners, 2002) όπως ειπώθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο. Ένα όμως πιο απλοποιημένο σύστημα είναι αυτό με τη χρήση δυο κυλινδρικών φακών πριν την είσοδο της δέσμης laser στο μικροσκόπιο (Mohanty & Gupta, 2005-Biancaniello & Crocker 2006-Khan et al. 2006-Spyratou et al. 2009). Σε αυτή την περίπτωση η δέσμη του laser εστιάζεται σε μια διάσταση δημιουργώντας μια συμμετρική κατανομή της έντασης της δέσμης γύρω από το κέντρο του άξονα γραμμής.

2.3.2 Εισαγωγή στην οπτική παγίδα γραμμής

Η παγίδα γραμμής αναπτύχθηκε και παρουσιάστηκε πρώτη φορά από τον Sasaki και την ομάδα του το 1991, με τη σάρωση μιας γκαουσιανής δέσμης σε μια ευθεία γραμμή (Biancaniello & Crocker, 2006). Με αυτή τη μέθοδο η παγίδα

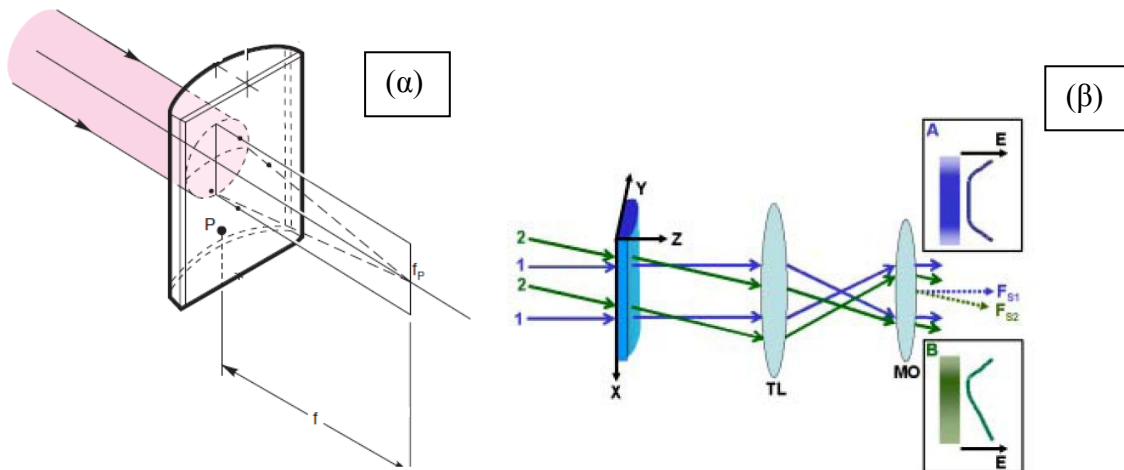
γραμμής έχει χρησιμοποιηθεί για την παγίδευση και τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ κολλοειδών σφαιριδίων μέσα σε ένα σύνθετο υγρό (Crocker et al., 1999).

Η ισχύς της παγίδας που προκύπτει με σάρωση εξαρτάται από τη μέση χρονική τιμή της έντασης σε κάθε σημείο. Συγκεκριμένα όταν η συχνότητα σάρωσης είναι μεγαλύτερη από αυτή της χαλάρωσης ενός σωματιδίου, αυτό ουσιαστικά «βλέπει» ως δυναμικό της χρονική αυτή μέση τιμή της έντασης (Nambier et al., 2004). Αν η ένταση της σαρωμένης δέσμης είναι σταθερή τότε ένα παγιδευμένο σωματίδιο είναι ελεύθερο να μετακινηθεί κατά μήκος της γραμμής αλλά είναι παγιδευμένο στις άλλες δυο διαστάσεις. Επιπλέον αν ο ρυθμός της σάρωσης είναι ανομοιόμορφος δηλαδή δεν είναι ίδιος για όλα τα σημεία της γραμμής τα σωματίδια μετακινούνται προς τα σημεία όπου αυτός είναι μικρότερος και άρα η μέση τιμή της έντασης μεγαλύτερη.

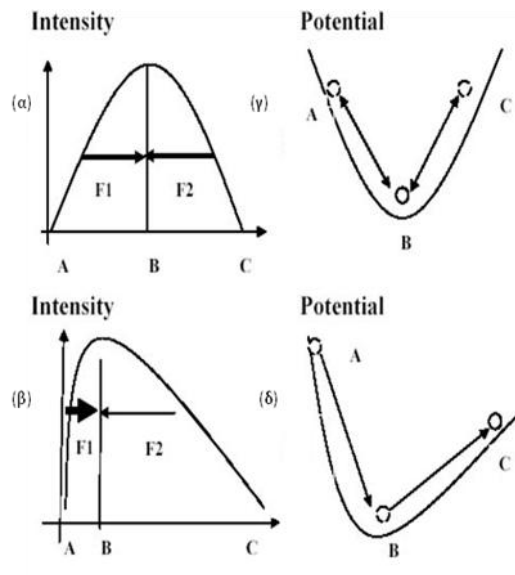
Μια απλή τεχνική για την δημιουργία παγίδα γραμμής είναι η τοποθέτηση δυο κυλινδρικών φακών στον οπτικό δρόμο της δέσμης πριν αυτή εισέλθει στον αντικειμενικό φακό. Οι κυλινδρικοί φακοί έχουν την ιδιότητα να μην διαθλούν τις ακτίνες στην διεύθυνση του οπτικού τους άξονα αλλά μόνο στην κάθετη σε αυτόν (σχήμα 2.6 (α)) με αποτέλεσμα στο επίπεδο εστίασης του αντικειμενικού φακού το προφίλ της δέσμης να έχει σχήμα γραμμής. Με αυτό τον τρόπο η κατανομή της έντασης είναι συμμετρική κατά μήκος της γραμμής γύρω από τον κεντρικό άξονα της και άρα είναι συμμετρικό και το δυναμικό της παγίδας.

Όμως μπορεί κανείς να δημιουργήσει μια παγίδα γραμμής με ασύμμετρη κατανομή της έντασης όπως παρουσιάζεται στο σχήμα (2.6 (β)). Στρέφοντας τον έναν κυλινδρικό φακό έτσι ώστε η δέσμη να εισέρχεται σε αυτόν υπό γωνία και όχι κάθετα, δημιουργείται μια τέτοια ασύμμετρη κατανομή. Όταν η ένταση γύρω από το κέντρο της δέσμης είναι συμμετρική, θα είναι συμμετρικές και οι δυνάμεις βαθμίδας που συμβάλλουν στην παγίδα, το σωματίδιο παγιδεύεται στο κέντρο και βρίσκεται σε ένα συμμετρικό δυναμικό (σχήμα 2.7(α,γ)). Αντίθετα σε μια ασύμμετρη παγίδα η βαθμίδα έντασης είναι περισσότερο απότομη και οι δυνάμεις που προκύπτουν είναι και αυτές ασύμμετρικές (σχήμα 2.7(β,δ)). Σε αυτή την περίπτωση το σωματίδιο παγιδεύεται στα σημεία μεγαλύτερης έντασης και ύστερα λόγω του ότι το δυναμικό δεν είναι συμμετρικό οδηγούνται στην περιοχή που αυτό είναι μικρότερο και τέλος διαφεύγουν της παγίδας. Η ταχύτητα διαφυγής εξαρτάται από το βάθος του δυναμικού και από τον βαθμό ασυμμετρίας του πηγαδιού του δυναμικού και μπορεί

να ρυθμιστεί μέσω της ισχύς της δέσμης και ασυμμετρίας στην έντασης. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την παγίδευση και ελεγχόμενη μεταφορά μικροσωματιδίων (Mohanty & Gupta, 2005) ή και νανοσωλήνων άνθρακα (Kahn et al., 2006).



Σχήμα 2.6: Όταν μια γκαουσιανή δέσμη περνάει από έναν κυλινδρικό φακό εστιάζεται σε μια μόνο διεύθυνση. P είναι το πρωτεύον σημείο του κυλινδρικού, f η εστιακή του απόσταση και f_p το εστιακό επίπεδο (α). Η κατανομή της έντασης στην γραμμή εξαρτάται από την κλίση της δέσμης ως προς τον άξονα Y. Όταν η δέσμη είναι κάθετη σε αυτόν (1) η ένταση είναι συμμετρική ενώ όταν αποκλίνει (2) είναι ασύμμετρη.



Σχήμα 2.7: Διάγραμμα της έντασης ως προς την απόσταση από το κέντρο της δέσμης B και το αντίστοιχο δυναμικό για μια συμμετρική παγίδα (α) και (γ), το ίδιο για μια ασύμμετρη (β) και (δ) αντίστοιχα. (Mohanty & Gupta, 2005)

Η Spyratou μαζί με τους συνεργάτες της (2009) χρησιμοποίησαν την παγίδα γραμμής για την παρατήρηση της επίδρασης της σε ερυθροκύτταρα και MB λιποσώματα αλλά και την επιμήκυνση τους. Παρατηρήθηκε ότι όταν αυτά παγιδεύονται η τάση που εφαρμόζεται τα επιμηκώνει και έτσι χρησιμοποιώντας κάποια μαθηματικά μοντέλα υπολογίστηκαν οι ελαστικές τους ιδιότητες. Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιείται η παγίδα γραμμής επίσης για την μελέτη της συμπεριφοράς των λιποσωμάτων σε αυτή και για την εκτίμηση των ελαστικών τους ιδιοτήτων όπως το μέτρο κάμψης και το μέτρο διάτμησης.

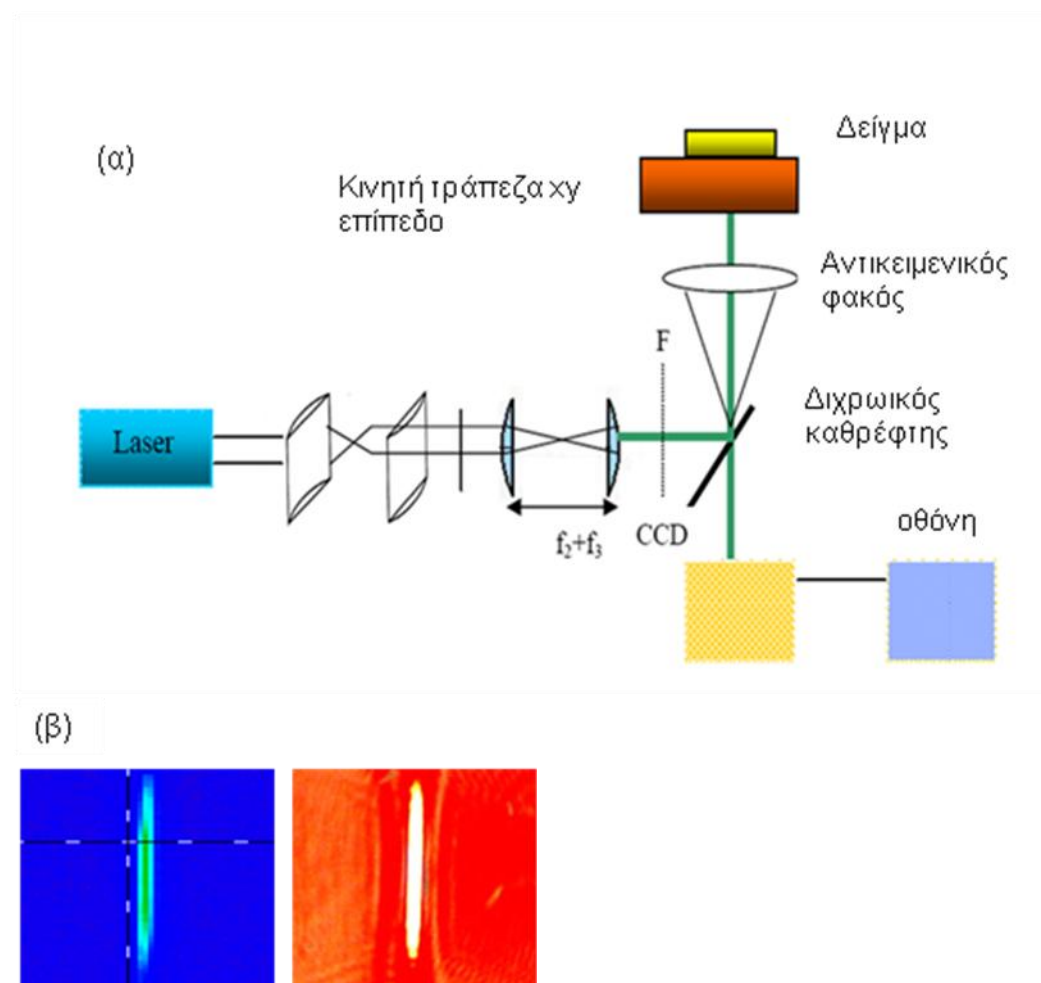
2.3.3 Πειραματική διάταξη της οπτικής παγίδας γραμμής και οπτικός σχεδιασμός

Γενικά για την ανάπτυξη μιας παγίδας γραμμής οι απαιτήσεις είναι ίδιες με αυτές της συμβατικής παγίδας με μόνη ίσως διαφορά ότι η πρώτη είναι πολύ πιο ευαίσθητη στις διαμήκεις σφαιρικές εκτροπές που αντιστοιχούν στις ακριανές ακτίνες οι οποίες συναντούν τον οπτικό άξονα πίσω από τις αξονικές. Με προσεχτική ευθυγράμμιση των οπτικών στοιχείων ώστε η διέλευση της δέσμης να είναι όσο το δυνατόν κοντά στο κέντρο των φακών ελαχιστοποιεί κάπως αυτές τις εκτροπές. Ένας άλλος τρόπος ελαχιστοποίησης είναι η αύξηση των εστιακών αποστάσεων των φακών από τους οποίους περνάει η δέσμη ή η χρήση καταδυτικού ελαίου με δείκτη διάθλασης κοντά σε αυτό του δείγματος (Biancaniello & Crocker, 2006).

Επίσης όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα έχει μεγάλη σημασία οι κυλινδρικοί φακοί να είναι τοποθετημένοι με τον οπτικό τους άξονα κάθετα στον άξονα διάδοσης της δέσμης (σχήμα 2.6(β)) ώστε το δυναμικό της παγίδας που θα προκύψει να είναι συμμετρικό και η παγίδευση σταθερή. Εφόσον η δύναμη σε ένα παγιδευμένο σωματίδιο είναι ανάλογη της έντασης τα παγιδευμένα σωματίδια «νιώθουν» μια αρμονική δύναμη επαναφοράς με σταθερά ακαμψίας αντιστρόφως ανάλογης του μήκους της εστίας-γραμμής.

Το σύστημα της οπτικής παγίδας γραμμής αναπτύχθηκε πάνω στο υπάρχον σύστημα της συμβατικής οπτικής παγίδας που περιγράφηκε προηγουμένως. Για να είναι το προφίλ της δέσμης μια ευθεία γραμμή, τοποθετήθηκαν μπροστά από τους επιεδόκυρτους τηλεσκοπικούς φακούς L_1 και L_2 , δυο θετικοί κυλινδρικοί φακοί (σχήμα 2.8(α)). Με την προσθήκη αυτών των φακών το προφίλ της δέσμης είναι μια σχεδόν μονοδιάστατη γραμμή (σχήμα 2.8 (β)). Το μήκος της κηλίδας που θα σχηματιστεί στο επίπεδο του δείγματος είναι αντιστρόφως ανάλογο με τη διάμετρο

της δέσμης στο πίσω άνοιγμα του φακού και μπορεί να ρυθμιστεί με μικρές μετακινήσεις του πρώτου κυλινδρικού φακού κάθετα πάντα στην διάδοση της δέσμης.



Σχήμα 2.8: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης όταν σε αυτή προστίθενται οι κυλινδρικοί φακοί (α). Το επίπεδο F είναι το επίπεδο εστίασης των τηλεσκοπικών φακών. Στο (β) φαίνεται το προφίλ της δέσμης που προκύπτει με την εστίασή της σε μια διάσταση λόγω των κυλινδρικών φακών. Αριστερά η εικόνα είναι από πυροηλεκτρική κάμερα και δεξιά από την CCD κάμερα.

Οι κυλινδρικοί φακοί που χρησιμοποιήθηκαν είναι της ίδιας εστιακής απόστασης, $f = 10 \text{ cm}$ και τοποθετήθηκαν σε απόσταση ίση με $d = 12,4 \text{ cm}$ μεταξύ τους έτσι ώστε σε συνδυασμό με τις διαστάσεις της ήδη υπάρχουσας διάταξης το προφίλ της δέσμης που δημιουργείται στο επίπεδο εστίασης είναι $1 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$.

Γενικά παρατηρήθηκε πως τα λιποσώματα με διάμετρο κοντά στο $1 \mu\text{m}$ δεν παγιδεύονται σταθερά στην παγίδα γραμμής αλλά παρουσιάζουν μια ταλάντευση χωρίς όμως να διαφεύγουν της παγίδας. Ο Dasgupta και οι συνεργάτες του (2003)

αναφέρουν πως οι διαστάσεις του προφίλ της δέσμης που θα προκύψει χρησιμοποιώντας δυο κυλινδρικούς φακούς καθορίζουν το μέγεθος των αντικειμένων που μπορούν να παγιδευτούν. Αν μια μεγάλη δέσμη χρησιμοποιηθεί για μικρά σωματίδια η ισχύς δεν θα αξιοποιηθεί. Οπότε αυτό ίσως εξηγεί και τη μη σταθερή παγίδευση για τα μικρά λιποσώματα. Λόγω του προφίλ της δέσμης που χρησιμοποιήθηκε μπορεί να παρουσιάζονται ασυμμετρίες στο δυναμικό που δεν γίνονται αισθητές στα μεγαλύτερα λιποσώματα. Τα πολύ μικρά λιποσώματα όμως τις «νιώθουν» αυτές τις ασυμμετρίες στο δυναμικό και ίσως για αυτό ταλαντεύονται.

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

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. Συνεπώς ο καλύτερος τρόπος για την μέτρηση τους είναι ο πειραματικός μέσω διαφόρων μεθόδων που έχουν αναπτυχθεί.

Με αυτές τις μεθόδους 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). Για μικρές, όμως, δυνάμεις και μεγάλα σωματίδια η βαρυτική δύναμη θα έπρεπε να αλλάζει την αξονική θέση παγίδευσης των σωματιδίων με έναν τρόπο εξαρτώμενο από την ισχύ της δέσμης. Έτσι, στις μικρές τιμές ισχύος η εγκάρσια συνιστώσα της δύναμης παγίδευσης θα πρέπει να εξαρτάται με εκθετικό τρόπο από την ισχύ, με εκθέτη λίγο μεγαλύτερο από τη μονάδα (Svoboda και Block, 1994).

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 περίπτωση μελετάται το φάσμα ισχύος ενός σωματιδίου με βάση τη μετακίνηση του λόγω των θερμικών διακυμάνσεων, ενώ στην δεύτερη περίπτωση 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 και θα συζητηθεί αναλυτικότερα στις επόμενες ενότητες αυτού του κεφαλαίου.

3.1.1 Μέθοδος διαφυγής

Με τη μέθοδο διαφυγής βαθμονομούνται οι οπτικές δυνάμεις σε σχέση με μια δύναμη ιξώδους που ασκείται σε ένα σωματίδιο λόγω της ροής που προκαλείται στο περιβάλλον του. Γενικά η δύναμη ιξώδους για ένα σφαιρικό σωματίδιο είναι $\vec{F} = \beta \cdot \vec{u}$, όπου β είναι ο συντελεστής τριβής και u η ταχύτητα του σωματιδίου. Όταν δεν παρουσιάζεται τυρβώδης ροής το β μπορεί να υπολογιστεί από τον νόμο του Stokes με την σχέση: $\beta = 6\pi\eta r$, όπου r η ακτίνα του σωματιδίου και η ο συντελεστής ιξώδους του υγρού. Στις τυπικές διατάξεις της οπτικής παγίδας ο αριθμός Reynolds είναι πολύ μικρός, της τάξεως του 10^{-5} , οπότε μπορεί κανείς να χρησιμοποιήσει του παραπάνω τύπους και να βαθμονομήσει την παγίδα με αυτή τη μέθοδο.

Πρώτα το σωματίδιο παγιδεύεται και ύστερα υπόκειται σε μια γνωστή δύναμη ιξώδους ολόένα αυξανόμενη, εωσότου διαφύγει της παγίδας. Μια τέτοια δύναμη μπορεί να προκύψει χρησιμοποιώντας έναν θάλαμο ροής στο οποίο αυξάνεται συνεχώς η ταχύτητα του υγρού που ρέει προς το σωματίδιο μέχρι αυτό να διαφύγει της παγίδας (Svoboda & Block, 1994). Την στιγμή της διαφυγής η ταχύτητα του σωματιδίου ισούται με την ταχύτητα της ροής του υγρού, η οποία είναι γνωστή επομένως μπορεί να υπολογίσει κανείς και την δύναμη.

Ένας εναλλακτικός τρόπος είναι να μετακινείται η αντικειμενοφόρος πλάκα όπου είναι τοποθετημένο το δείγμα με γνωστή ταχύτητα ή ακόμη να είναι το δείγμα σταθερό και να μετακινείται η οπτική παγίδα (Svoboda & Block, 1994). Ομοίως με προηγουμένως μετριέται η ταχύτητα του σωματιδίου την στιγμή που αυτό διαφεύγει της παγίδας, η οποία ισούται με την ταχύτητα της αντικειμενοφόρου πλάκας ή της παγίδας. Σε αυτές τις περιπτώσεις ο συντελεστής τριβής β εξαρτάται από την

απόσταση του σωματιδίου από την καλυπτρίδα και στην περίπτωση που αυτή είναι συγκρίσιμη με την ακτίνα του επηρεάζει σημαντικά τις μετρούμενες δυνάμεις.

Στην πρώτη περίπτωση, δηλαδή στον θάλαμο ροής η παγίδευση συνήθως γίνεται κοντά στα τοιχώματα του θαλάμου με αποτέλεσμα να δημιουργούνται δυνάμεις συνάφειας με το σωματίδιο, οι οποίες το μετατοπίζουν εκτός του εστιακού επιπέδου. Ενώ στην δεύτερη όπως προειπώθηκε η δύναμη εξαρτάται σημαντικά από την απόσταση στην οποία γίνεται η μέτρηση από την καλυπτρίδα. Τα παραπάνω αποτελούν τα κύρια μειονεκτήματα των μεθόδων που βασίζονται σε αυτές τις τεχνικές.

3.1.2 Μέθοδος της ακαμψίας της παγίδας (trap stiffness)

Σε αυτή την περίπτωση η παγίδα προσομοιάζεται με ένα ελατήριο στο οποίο είναι συνδεδεμένο ένα αντικείμενο (το προς παγίδευση σωματίδιο) με σημείο ισορροπίας το σημείο όπου η συνισταμένη των οπτικών δυνάμεων ισούται με μηδέν. Αν το σωματίδιο μετακινηθεί ελάχιστα από την θέση ισορροπίας ασκείται σε αυτό μια δύναμη επαναφοράς, η οποία για μικρές μετακινήσεις δίνεται από τον νόμο του Hook: $\vec{F} = -\kappa\vec{x}$, όπου το κ εδώ εκφράζεται ως η ακαμψία της παγίδας (σχήμα 3.1). Επειδή όμως το σωματίδιο βρίσκεται σε υγρό περιβάλλον πρέπει να προστεθεί στον τύπο αυτό και ο όρος που οφείλεται στην δύναμη τριβής που προκύπτει από την μετακίνηση μέσα σε υγρό ιξώδους η , και εντέλει η δύναμη δύνεται από τον τύπο: $\vec{F} = -\kappa\vec{x} + 6\pi\eta\vec{u}$.



Σχήμα 3.1: Το μηχανικό ανάλογο της οπτικής παγίδας. Αν το σωματίδιο αποκλίνει κατά Δx από το σημείο παγίδευσης δρα σε αυτό μια δύναμη επαναφοράς $F_{restore} = -\kappa\Delta x$. (εικόνα από Dholakia et al., 2007)

Μετακινώντας λοιπόν το σωματίδιο ελάχιστα από την θέση ισορροπίας του και υπολογίζοντας την δύναμη που χρειάστηκε για να μετακινηθεί, υπολογίζει κανείς το κ. Μια τέτοια διαδικασία όμως δεν είναι πολύ πρακτική και έτσι συνήθως το σωματίδιο διεγείρεται από μια εξωτερική πηγή ταλάντωσης και φέρεται ως αρμονικός ταλαντωτής. Η συχνότητα της εξωτερικής πηγής διέγερσης είναι γνωστή και μπορεί κανείς να μετρήσει τη διαφορά φάσης αυτής και της ταλάντωσης του σωματιδίου, η οποία δίνει ένα μέτρο για την ακαμψία της παγίδας.

Επίσης αντί να χρησιμοποιηθεί κάποια εξωτερική δύναμη, δύναται να αξιοποιηθεί η ίδια η θερμική κίνηση Brown των σωματιδίων, η οποία προκαλεί σε ένα παγιδευμένο σωματίδιο τυχαίες διακυμάνσεις. Υπολογίζοντας το φάσμα ισχύος του σωματιδίου με βάση τη συχνότητα ταλάντωσής του από το σχετικό διάγραμμα μπορεί να υπολογίσει κανείς την ακαμψία της παγίδας.

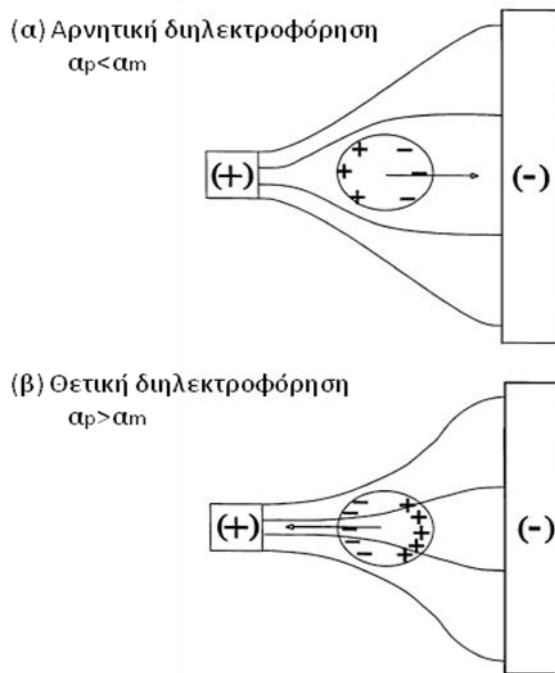
Είναι φανερό ότι σε αυτή τη μέθοδο απαιτείται ακριβής υπολογισμός της θέσης του σωματιδίου, κάτι που μπορεί να επιτευχθεί με ειδικούς φωτο-ανιχνευτές ή με τη χρήση κατάλληλων συμβολόμετρων, χρειάζεται δηλαδή εξεζητημένο εξοπλισμό.

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. Υπάρχει επίσης 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).

Η διπολική ροπή, \mathbf{p} , που επάγεται από ένα πεδίο, αντιστοιχεί στην δημιουργία ίσων και αντίθετων φορτίων, $+q$ και $-q$, στην διεπιφάνεια του σωματιδίου και του

μέσου που το περιβάλλει. Αν το πεδίο είναι ανομοιογενές το τοπικό ηλεκτρικό πεδίο \mathbf{E} και η αντίστοιχη δύναμη $\mathbf{E} \cdot d\mathbf{q}$, σε κάθε πλευρά του σωματιδίου είναι διαφορετικά. Έτσι το σωματίδιο θα κινηθεί προς την περιοχή μεγαλύτερης έντασης (θετική DEP) ή προς την περιοχή χαμηλότερης έντασης (αρνητική DEP) ανάλογα με το αν η πολωσιμότητα του σωματιδίου, α_p , είναι μεγαλύτερη από αυτή του μέσου περιβάλλοντος, α_m , ή μικρότερη αντίστοιχα (σχήμα 3.2).



Σχήμα 3.2: Στην περίπτωση που το σωματίδιο βρίσκεται σε ανομοιογενές πεδίο με πολωσιμότητα μεγαλύτερη από το ίδιο, κινείται προς την κατεύθυνση μικρότερης έντασης (α), ενώ το αντίθετο συμβαίνει αν η πολωσιμότητα του σωματιδίου είναι μεγαλύτερη από αυτή του πεδίου (β). Επίσης η διπολική ροπή του σωματιδίου ευθυγραμμίζεται με το πεδίο ανάλογα πάλι με τη σχέση των δυο πολωσιμοτήτων.

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

$$\mathbf{p}(\mathbf{r}, \omega) = 4\pi\epsilon_m r^3 \left(\frac{\sigma_p^* - \sigma_m^*}{\sigma_p^* + 2\sigma_m^*} \right) \mathbf{E}(\mathbf{r}) = 4\pi\epsilon_m r^3 \left(\frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \right) \mathbf{E}(\mathbf{r}) \quad 3.1$$

σ_p^* και σ_m^* είναι οι μιγαδικές αγωγιμότητες του σωματιδίου και του μέσου αντίστοιχα, και ε_p^* και ε_m^* οι μιγαδικές διηλεκτρικές διαπερατότητες, που ορίζονται με τους τύπους: $\sigma^* = \sigma + i\varepsilon\omega$, και $\varepsilon^* = \varepsilon - i(\sigma/\omega)$, όπου ε η διηλεκτρική διαπερατότητα, σ η αγωγιμότητα, και ω η γωνιακή συχνότητα του εφαρμοζόμενου πεδίου. Η ποσότητα που είναι στην παρένθεση είναι γνωστή ως παράγοντας Clausius-Mossotti :

$$f_{C-M} = \left[\frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*} \right] = \left[\frac{\sigma_p^* - \sigma_m^*}{\sigma_p^* + 2\sigma_m^*} \right] \quad 3.2$$

Ο παράγοντας f_{C-M} μεταβάλλεται ως συνάρτηση της συχνότητας του εφαρμοζόμενου πεδίου, και εξαρτώμενο από τις διηλεκτρικές ιδιότητες του σωματιδίου και του περιβάλλοντος μέσου, μπορεί να πάρει τιμές από -0,5 έως +1,0. Για συχνότητες κάτω των 1kHz ο παράγοντας f_{C-M} καθορίζεται κυρίως από την πολωσιμότητα λόγω επιφανειακών φορτίων, ενώ όσο αυξάνεται η συχνότητα, πρώτα η ενεργός αγωγιμότητα και ύστερα η ενεργός διηλεκτρική διαπερατότητα, γίνονται οι κυρίαρχοι παράγοντες συνεισφοράς. Μια θετική τιμή στον f_{C-M} σημαίνει ευθυγράμμιση της επαγόμενης διπολικής ροπής με το πεδίο και θετική διηλεκτροφορητική δύναμη (σχήμα 3.2). Αντίθετα για αρνητική τιμή του f_{C-M} το επαγόμενο δίπολο και το εφαρμοζόμενο πεδίο είναι αντίρροπα, και προκύπτει αρνητική δύναμη DEP.

Σύμφωνα με την καθιερωμένη θεωρία η διηλεκτροφορητική δύναμη που δρα σε ένα διηλεκτρικό σφαιρικό σωματίδιο προκύπτει από την χρονοεξαρτώμενη εξίσωση:

$$\mathbf{F}(\omega) = 2\pi\varepsilon_m r^3 (f_{C-M}) \bar{\nabla} \mathbf{E}^2 \quad 3.3$$

η οποία γενικά χρησιμοποιείται προσεγγιστικά, όταν θεωρούμε ότι η ανομοιογένεια του ηλεκτρικού πεδίου είναι σε μικρό βαθμό (Wang et al, 1997) και η μέση τιμή της δίνεται από το πραγματικό μέρος της εξίσωσης (3.3) και ισούται με:

$$\mathbf{F}(\omega) = 2\pi\varepsilon_m r^3 \text{Re}(f_{C-M}) \bar{\nabla} |\mathbf{E}_{rms}|^2 \quad 3.4,$$

όπου \mathbf{E}_{rms} είναι η χρονική μέση τιμή του ηλεκτρικού πεδίου. Από την εξίσωση (3.3) φαίνεται ότι η δύναμη εξαρτάται από το ∇E^2 , επομένως με αντιστροφή της πόλωσης της εφαρμοζόμενης τάσης δεν αντιστρέφεται η δύναμη DEP.

3.2.1 Διηλεκτροφόρηση σε βιολογικά σωματίδια

Το μέγεθος των φορτίων που επάγονται σε ένα κύτταρο από ένα ηλεκτρικό πεδίο είναι μικρό και ισοδυναμεί στο 0,1% του συνολικού επιφανειακού φορτίου που φυσιολογικά έχουν τα κύτταρα και οι μικροοργανισμοί. Όμως τα φορτία αυτά δεν κατανέμονται ομοιόμορφα στην επιφάνεια αλλά δημιουργούν ένα μακροσκοπικό δίπολο (Pethig & Markx, 1997). Όταν ένα σωματίδιο είναι βυθισμένο σε νερό υφίσταται δυνάμεις άνωσης και βαρύτητας και αν είναι πολύ μικρό επιδρά σε αυτό και η δύναμη που οφείλεται λόγω της θερμικής κίνησης Brown. Για ένα σωματίδιο ακτίνας $r=1\mu\text{m}$ και πυκνότητας $1.05\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ (τυπικά για ένα κύτταρο ή για μια σφαίρα latex) μέσα σε ένα υδατοειδές μέσο σε θερμοκρασία δωματίου, οι βαρυτικές και Brown δυνάμεις έχουν η καθεμία τιμή περίπου $2\times 10^{-15}\text{N}$. Για να έχει μια σημαντική επίδραση η δύναμη DEP πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερη, που από την εξίσωση (3.4) για $\text{Re}(f_{c-M}) = 0,5$ προκύπτει ότι ο παράγοντας ∇E^2 πρέπει να είναι κοντά στα $9\times 10^{12}\text{V}^2\text{m}^{-3}$. Τέτοιες τιμές είναι εφικτές με πεδία μικρότερα από 10^4V m^{-1} (Pethig & Markx, 1998). Για μεγαλύτερα σωματίδια όμως, καθώς και η δύναμη DEP και η βαρυτική είναι ανάλογες του όγκου του σωματιδίου, η απαιτούμενη τιμή για το ∇E^2 είναι ανεξάρτητη της ακτίνας. Ωστόσο για σωματίδια μικρότερα του $1\mu\text{m}$, η επίδραση της τυχαίας κίνησης Brown, όντας ανάλογη του $1/r$, αυξάνεται ραγδαία και υπερέρχει της βαρυτικής επίδρασης και είναι η κυρίαρχη ανταγωνίστρια της δύναμης DEP.

Τα βιολογικά κύτταρα παρουσιάζουν μεγάλες επαγόμενες διπολικές ροπές που εξαρτώνται κατά πολύ από την συχνότητα του εφαρμοζόμενου πεδίου. Αυτό συμβαίνει διότι τα κύτταρα αποτελούνται από δομές σε επαφή μεταξύ τους, αποτελούμενες από υλικά με πολύ διαφορετικές ηλεκτρικές ιδιότητες, οδηγώντας σε μεγάλες διεπιφανειακές πολώσεις στα όρια μεταξύ των στρωμάτων. Για παράδειγμα η αγωγιμότητα της μεμβράνης είναι της τάξης $10^{-7}\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$, ενώ στο εσωτερικό του κυττάρου μπορεί να είναι και μέχρι $1\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$. Όταν πεθαίνει ένα κύτταρο η μεμβράνη γίνεται διαπερατή και η αγωγιμότητα της αυξάνεται κατά ένα παράγοντα 10^4 , και το κύτταρο ανταλλάσσει ελεύθερα ουσίες με το εξωτερικό περιβάλλον (Goater & Pethig, 1998). Αυτές οι αλλαγές, όπως και μορφολογικές ή φυσιολογικές διαφορές, παρουσιάζονται ως μεγάλες αλλαγές στην πόλωση και άρα στην δύναμη DEP.

Σε χαμηλές συχνότητες, το εσωτερικό του κυττάρου, προστατεύεται από το πεδίο από την ενεργή χωρητικότητα της μεμβράνης και έτσι αυτή δέχεται όλο το ηλεκτρικό δυναμικό που εφαρμόζεται στο κύτταρο. Αν το δυναμικό στην μεμβράνη είναι μεγαλύτερου του 1 Volt, η ηλεκτρική τάση στην μεμβράνη είναι αρκετή για να διευκολύνει φαινόμενα όπως ηλεκτροπόρωση και ηλεκτροσύμφυση των κυττάρων (Pethig & Markx, 1998). Για κύτταρα ακτίνας περίπου 2.5-5 μ m, το εφαρμοζόμενο πεδίο που απαιτείται για να παραχθούν τέτοια φαινόμενα είναι 1-3 x 10⁵ V m⁻¹. Αν για παράδειγμα το ηλεκτρικό πεδίο δημιουργείται από ηλεκτρόδια σε απόσταση 100 μ m μεταξύ τους, τότε για να παρατηρηθούν τέτοια φαινόμενα πρέπει να εφαρμοστεί τάση 10 με 30 Volt. Όμως για την άσκηση δυνάμεων διηλεκτροφόρησης σε κύτταρα τέτοιου μεγέθους αρκεί δυναμικό μικρότερο του 10⁴ V m⁻¹. Συνεπώς ο διηλεκτροφορικός χειρισμός κυττάρων δεν οδηγεί σε μη αντιστρέψιμες βλάβες, κάτι το οποίο έχει επιβεβαιωθεί και πειραματικά (Goater & Pethig, 1998).

3.3 Βαθμονόμηση οπτικής παγίδας διοδικού laser με τη μέθοδο της διηλεκτροφόρησης

Οι μέθοδοι βαθμονόμησης που χρησιμοποιούνται συνήθως, 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.

Ο συνδυασμός οπτικών και διηλεκτρικών δυνάμεων, έγινε για πρώτη φορά από μια ομάδα του Ινστιτούτου Βιολογίας του Βερολίνου σε συνεργασία με την ομάδα του Karl-Otto Greulich στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας της Jena. Εκεί η ηλεκτρική παγίδευση επιτυγχάνεται με ένα «κλωβό ηλεκτρικού πεδίου» (*field cage*), που αποτελείται από μια τρισδιάστατη διάταξη μικροηλεκτροδίων (Fuhr et al., 1998). Ο Fuhr και οι συνεργάτες (1998) του κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι δυνάμεις παγίδευσης λόγω της οπτικής λαβίδας και αυτές λόγω του ηλεκτρικού κλωβού είναι της ίδιας τάξης μεγέθους. Επιπλέον, με την ταυτόχρονη εφαρμογή οπτικών και

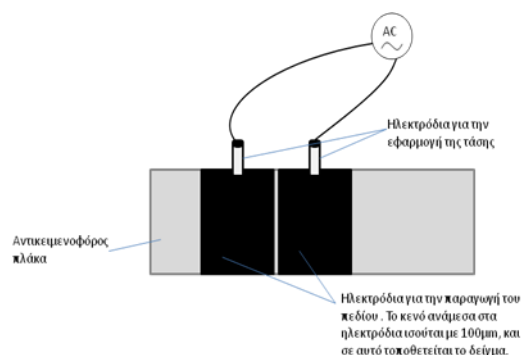
διηλεκτροφορητικών δυνάμεων η παρεμβολή μεταξύ του ηλεκτρικού πεδίου και του οπτικού είναι σχετικά μικρή (Fuhr et al., 1998).

Η ομάδα του ΕΜΠ σε συνεργασία με την Ιατρική Σχολή, Carol Davilla, του Βουκουρεστίου υιοθέτησαν αυτήν τη μέθοδο αλλά με μια απλούστερη διάταξη (Παπαγιακούμου, 2005). Στα πλαίσια αυτής της έρευνας έγινε βαθμονόμηση παγίδας για κύτταρα μαγιάς διαστάσεων 3,0 έως 7,5 μm και σφαίρες πολυστυρένιου 8 μm (Paragiakoumou et al., 2006).

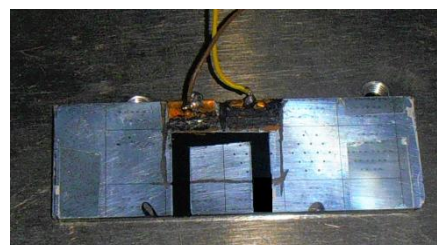
Η διαδικασία που ακολουθείται σε μια τέτοια μέθοδο είναι ότι πρώτα παγιδεύεται ένα σωματίδιο με την οπτική λαβίδα και ύστερα εφαρμόζεται τάση, έως ότου αυτό διαφύγει της παγίδας. Με την εφαρμοζόμενη τάση στο σωματίδιο δρα και η διηλεκτροφορητική δύναμη ταυτόχρονα με τις οπτικές δυνάμεις. Όταν το σωματίδιο 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.

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 100 μm (σχήμα 3.3). 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 3.4).

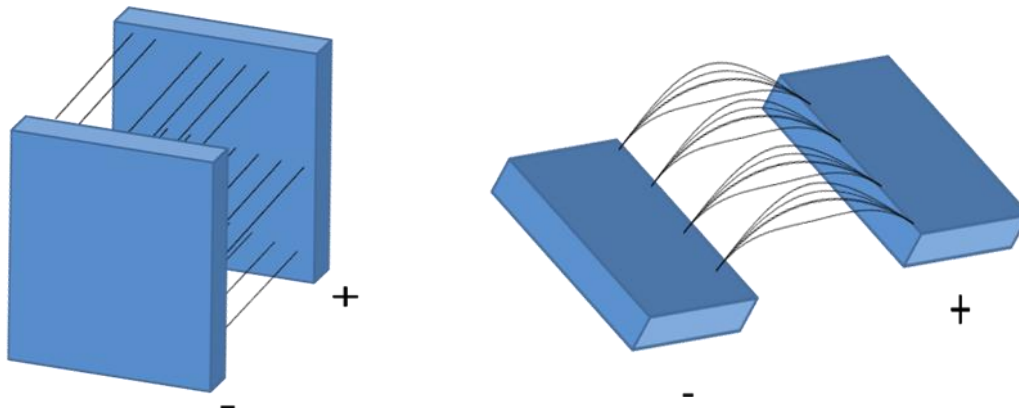


Σχήμα 3.3: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης των ηλεκτροδίων

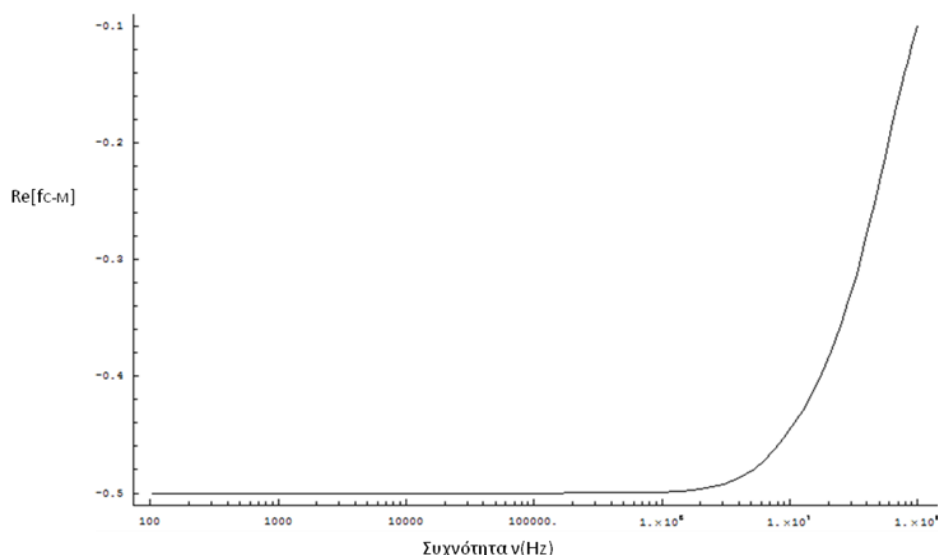


Σχήμα 3.4: Φωτογραφία της διάταξης

Τα ηλεκτρόδια είναι παράλληλα μεταξύ τους ως προς την μικρότερη πλευρά όπως φαίνεται και στο σχήμα 3.5, 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 3.5: 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.



Σχήμα 3.6: Διάγραμμα του πραγματικού μέρους του παράγοντα Clausius-Mossotti, $\text{Re}[f_{C-M}]$, ως συνάρτηση της συχνότητας, για ένα λιπόσωμα ακτίνας $r=0,5\mu\text{m}$. Στην περιοχή της συχνότητας $\nu=1\text{MHz}$, που επιλέχθηκε εδώ, τυχόν μεταβολές της συχνότητας δεν επιφέρουν σημαντικές μεταβολές του $\text{Re}[f_{C-M}]$. (τα διαγράμματα πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα Mathematica).

Η συγκεκριμένη διάταξη είναι σχετικά απλή στην κατασκευή της και το πεδίο που δημιουργείται ανάμεσα στα ηλεκτρόδια μπορεί να βρεθεί θεωρητικά με αναλυτική μέθοδο. Επιπλέον η απόσταση των ηλεκτροδίων είναι αρκετά μικρή ώστε με εφαρμογή σχετικά χαμηλών τάσεων να προκύπτουν δυνάμεις που θα μετακινήσουν τα σωματίδια με τις επιθυμητές διαστάσεις.

Η εφαρμογή της τάσης στα ηλεκτρόδια έγινε με γεννήτρια εναλλασσόμενου ρεύματος και η συχνότητα του ημιτονοειδούς σήματος επιλέχθηκε να είναι ίση με 1 MHz. Σε αυτή την περιοχή της συχνότητας το πραγματικό μέρος του παράγοντα Clausius-Mossotti είναι σχετικά σταθερός, χωρίς απότομες μεταβολές, άρα το ίδιο συμβαίνει και με την δύναμη διηλεκτροφόρησης (σχήμα 3.6). Ο υπολογισμός του παράγοντα Clausius-Mossotti εξηγείται αναλυτικά σε επόμενη ενότητα.

Παρόλο που η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε είναι σχετικά απλή, ωστόσο πρέπει να σημειωθεί πως υπήρχαν και δυσκολίες κατά την διεξαγωγή του πειράματος. Συγκεκριμένα, επειδή το μικροσκόπιο της διάταξης είναι ανάστροφο, τα ηλεκτρόδια που συνδέουν το πλακίδιο με την γεννήτρια (σχήμα 1.3) δυσκολεύουν τη σταθερότητα του πλακιδίου, αφού αυτό τοποθετείται ανάποδα στην τράπεζα, και άρα και την εστίαση. Η εστίαση γίνεται κοντά στο επίπεδο των ηλεκτροδίων κάτι που μειώνει πολύ την απόσταση εργασίας του αντικειμενικού. Με προσεχτικούς όμως χειρισμούς κατά την διαδικασία της εστίασης κάτι τέτοιο μπορεί να αντιμετωπιστεί πλήρως.

3.3.2 Αναλυτική έκφραση πεδίου

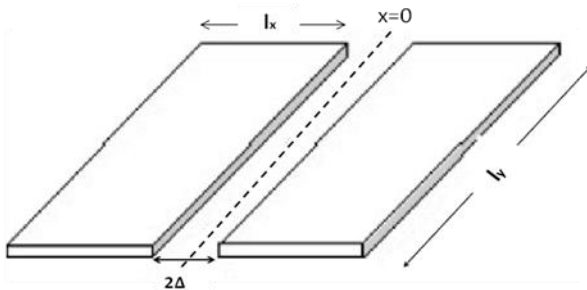
Από την εξίσωση (3.4) φαίνεται ότι για να καθοριστεί η διηλεκτροφορητική δύναμη πρέπει να είναι γνωστός πέρα των άλλων, ο παράγοντας $\nabla|E_{rms}|^2$, δηλαδή πρέπει να υπολογιστεί το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται με την εφαρμογή τάσης στα ηλεκτρόδια. Στο σχήμα 3.7 φαίνονται οι συμβολισμοί που θα χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό του πεδίου. Το επίπεδο των ηλεκτροδίων είναι το επίπεδο $z=0$, l_x είναι το μήκος κατά τον άξονα x και ισούται με μερικά εκατοστά, ενώ το l_y είναι το μήκος στον άξονα y . Επίσης 2Δ ορίζεται το μήκος του κενού χώρου μεταξύ των ηλεκτροδίων και ισούται με 100μm. Η απόσταση x μετριέται από τη μέση του ενδιάμεσου χώρου των πλακιδίων (σχήμα 3.6) και εφόσον οι μετρήσεις γίνονται για x και z της τάξεως του Δ και κοντά στο κέντρο του ενδιάμεσου χώρου, το l_y μπορεί να θεωρηθεί άπειρο.

Αν $\Phi(x,y,z)$ είναι το δυναμικό του ηλεκτρικού πεδίου τότε είναι γνωστό πως απουσία ηλεκτρικών φορτίων αυτό ικανοποιεί την εξίσωση Laplace:

$$\nabla^2 \Phi = 0$$

3.5. Επιπλέον μπορεί εύκολα να εξαχθεί και η εξίσωση που περιγράφει το δυναμικό στο επίπεδο των ηλεκτροδίων σε προσέγγιση πρώτης τάξης. Συγκεκριμένα πάνω στα ηλεκτρόδια το δυναμικό θεωρείται ότι είναι σταθερό και ότι ανάμεσα τους μεταβάλλεται γραμμικά ως προς την απόσταση x , άρα για $z=0$ το δυναμικό δίνεται από τον τύπο:

$$\Phi(x, y, 0) = \begin{cases} \frac{V}{2} \cos(\omega t), & -l_x - \Delta < x < -\Delta \\ -\frac{V}{2} \cos(\omega t) \frac{x}{\Delta}, & -\Delta \leq x \leq \Delta \\ -\frac{V}{2} \cos(\omega t), & l_x < x < l_x + \Delta \end{cases} \quad 3.6$$



Σχήμα 3.7. Απεικόνιση του συμβολισμού των διαστάσεων των ηλεκτροδίων.

Η εξίσωση (3.6) περιγράφει επομένως τις συνοριακές συνθήκες που πρέπει να ικανοποιεί το δυναμικό $\Phi(x,y,z)$ και μαζί με την εξίσωση (3.5) αποτελούν το πρόβλημα που πρέπει να λυθεί για να βρεθεί η μορφή του. Από την μορφή των συνοριακών συνθηκών φαίνεται ότι το πρόβλημα προς επίλυση είναι πρόβλημα Dirichlet.

Γενικά ισχύει ότι για ένα πρόβλημα Dirichlet ορίζεται μια συνάρτηση Green του τελεστή Laplace στην περιοχή που ισχύει η εξίσωση (3.5) (εδώ η περιοχή που μας ενδιαφέρει είναι $\Omega = \{ \mathcal{R}^3, z \geq 0 \}$) (Δάσιος & Κυριάκη, 1994) :

$$G(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = E(\mathbf{r}, \mathbf{r}') + H(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \quad 3.7$$

η οποία ικανοποιεί τις συνθήκες:

$$\begin{aligned} \nabla_{\mathbf{r}}^2 G(\mathbf{r}, \mathbf{r}') &= \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \\ G(\mathbf{r}, \mathbf{r}') &= 0 \quad \text{για τα } \mathbf{r}=(x,y,0) \end{aligned} \quad 3.8.$$

$E(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$ είναι η θεμελιώδης λύση του τελεστή Laplace και $H(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$ μια αρμονική συνάρτηση στο Ω (δηλαδή $\nabla^2 H = 0$) για την οποία ισχύει $H(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = -E(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$ για $z=0$ και $\mathbf{r}=(x,y,z)$. Δεδομένου ότι μπορεί να βρεθεί μια συνάρτηση Green με τις παραπάνω ιδιότητες, η λύση του προβλήματος Dirichlet, δηλαδή εδώ η λύση για το δυναμικό, δίνεται από το ολοκλήρωμα (Δάσιος & Κυριάκη, 1994):

$$\Phi(\mathbf{r}) = \oint_A \Phi(x, y, z=0) \frac{\partial G(\mathbf{r}, \mathbf{r}')}{\partial n} dA \quad 3.9,$$

όπου n το διάνυσμα το κάθετο στην επιφάνεια A , που είναι η επιφάνεια των ηλεκτροδίων και του μεταξύ τους χώρου, και $dA=dx dy$.

Η θεμελιώδης λύση του τελεστή Laplace είναι γνωστή και ισούται με:

$$E(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \frac{-1}{4\pi|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} \quad 3.10.$$

Για να βρεθεί η συνάρτηση Green χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των ειδώλων (Παπαγιακούμου, 2005) σύμφωνα με την οποία πρέπει να βρεθεί ένα φανταστικό φορτίο ώστε αυτή να είναι μηδέν στο σύνορο. Προκύπτει ότι η συνάρτηση Green δίνεται από την εξίσωση :

$$\begin{aligned} G(\mathbf{r}, \mathbf{r}') &= \frac{-1}{4\pi|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} + \frac{1}{4\pi|\mathbf{r} - \mathbf{r}''|} \\ &= \frac{-1}{4\pi\sqrt{(x-x')^2 + (y-y')^2 + (z-z')^2}} + \frac{1}{4\pi\sqrt{(x-x')^2 + (y-y')^2 + (z+z')^2}} \end{aligned} \quad 3.11$$

και

$$\frac{\partial G}{\partial n} = -\frac{\partial G}{\partial z} \Big|_{z=0} = \frac{-z'}{2\pi[(x-x')^2 + (y-y')^2 + z'^2]^{3/2}} \quad 3.12.$$

Αντικαθιστώντας την εξίσωση (1.12) στη σχέση (1.9) το δυναμικό προκύπτει λύνοντας το διπλό ολοκλήρωμα:

$$\Phi(x, y, z) = \int_{-l_x-\Delta}^{l_x+\Delta} \int_{-\infty}^{+\infty} \Phi(x, y, 0) \frac{-z'}{2\pi[(x-x')^2 + (y-y')^2 + z'^2]^{3/2}} dx dy \quad 3.13.$$

Αρχικά μπορεί να λυθεί το ολοκλήρωμα ως προς y :

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{[(x-x')^2 + (y-y')^2 + z'^2]^{3/2}} dy = \frac{2}{(x-x')^2 + z'^2} \quad 3.14$$

καθώς το $\frac{-z'\Phi(x, y_0)}{2\pi}$ βγαίνει έξω από το ολοκλήρωμα γιατί δεν εξαρτάται από το

y. Η ολοκλήρωση ως προς x γίνεται σε τρία διαστήματα ξεχωριστά:

$$\int_{-l_x - \Delta}^{-\Delta} \frac{2}{(x-x')^2 + z'^2} dx = \frac{2}{z'} [\arctan(\frac{l_x + \Delta + x'}{z'}) - \arctan(\frac{\Delta + x'}{z'})] \quad 3.15,$$

$$\int_{-\Delta}^{\Delta} \frac{-2x/\Delta}{(x-x')^2 + z'^2} dx = -\frac{1}{\Delta} \ln \frac{(x'-\Delta)^2 + z'^2}{(x'+\Delta)^2 + z'^2} - \frac{2x'}{z'\Delta} [\arctan(\frac{\Delta - x'}{z'}) + \arctan(\frac{\Delta + x'}{z'})] \quad 3.16$$

και

$$\int_{\Delta}^{\Delta + l_x} \frac{-2}{(x-x')^2 + z'^2} dx = \frac{-2}{z'} [\arctan(\frac{l_x + \Delta - x'}{z'}) - \arctan(\frac{\Delta - x'}{z'})] \quad 3.17.$$

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, η λύση για το ηλεκτρικό δυναμικό είναι:

$$\Phi(x, y, z) = \frac{-V}{2\pi} \cos(\omega t) \left[\frac{z}{\Delta} \ln \sqrt{\frac{(x+\Delta)^2 + z^2}{(x-\Delta)^2 + z^2}} + \arctan \frac{2xz}{z^2 - x^2 + (l_x + \Delta)^2} \right. \\ \left. - \arctan\left(\frac{2xz}{z^2 + \Delta^2 - x^2}\right) + \frac{x}{\Delta} \arctan\left(\frac{2\Delta z}{z^2 - \Delta^2 + x^2}\right) \right] \quad 3.18.$$

Επειδή όπως ειπώθηκε νωρίτερα, το l_x είναι πολύ μεγαλύτερο από ότι τα x, z, και Δ , ο δεύτερος όρος της εξίσωσης (1.18) μπορεί να αγνοηθεί και εν τέλει το δυναμικό είναι:

$$\Phi(x, y, z) = \frac{-V}{2\pi} \cos(\omega t) \left[\frac{z}{\Delta} \ln \sqrt{\frac{(x+\Delta)^2 + z^2}{(x-\Delta)^2 + z^2}} \right. \\ \left. - \arctan\left(\frac{2xz}{z^2 + \Delta^2 - x^2}\right) + \frac{x}{\Delta} \arctan\left(\frac{2\Delta z}{z^2 - \Delta^2 + x^2}\right) \right] \quad 3.19.$$

Στη συνέχεια οι υπολογισμοί γίνονται μέσω του λογισμικού προγράμματος Mathematica του Wolfram, και το ίδιο ισχύει και για τα διαγράμματα 3.6, 3.10, 3.11 και 3.12. Παίρνοντας την ενεργό μέση τιμή του δυναμικού, αυτό πολλαπλασιάζεται με τον παράγοντα $1/\sqrt{2}$ και υπολογίζοντας την βαθμίδα του προκύπτει η εξίσωση του ηλεκτρικού πεδίου $\mathbf{E}_{\text{rms}}(x, y, z)$. Για τον υπολογισμό της δύναμης διηλεκτροφόρησης υπολογίζεται το τετράγωνο του $\mathbf{E}_{\text{rms}}(x, y, z)$ που κάνοντας τα προαναφερθέντα βήματα προκύπτει:

$$E_{rms}^2 = \frac{V^2}{8\pi^2\Delta^2} \left[\frac{-8x^2z\Delta + [x^4 + 2x^2(z^2 - \Delta^2) + (z^2 + \Delta^2)^2] \arctan\left(\frac{2z\Delta}{x^2 + z^2 - \Delta^2}\right)}{[(x - \Delta)^2 + z^2][(x + \Delta)^2 + z^2]} \right]^2 + \frac{V^2}{8\pi^2\Delta^2} \left[\frac{4x\Delta(x^2 - z^2 - \Delta^2) + [x^4 + 2x^2(z^2 - \Delta^2) + (z^2 + \Delta^2)^2] \ln \sqrt{\frac{(x + \Delta)^2 + z^2}{(x - \Delta)^2 + z^2}}}{[(x - \Delta)^2 + z^2][(x + \Delta)^2 + z^2]} \right]^2 \quad 3.20.$$

Εφόσον υπολογίστηκε το E_{rms}^2 μπορεί κανείς να υπολογίσει και τη βαθμίδα του και αν είναι γνωστά τα χαρακτηριστικά του σωματιδίου προς παγίδευση, όπως η ακτίνα του και τα διηλεκτρικά του χαρακτηριστικά αλλά και αυτά του μέσου περιβάλλοντος, από τον τύπο (3.4) υπολογίζεται η δύναμη διηλεκτροφόρησης.

3.3.3 Πειραματική διαδικασία

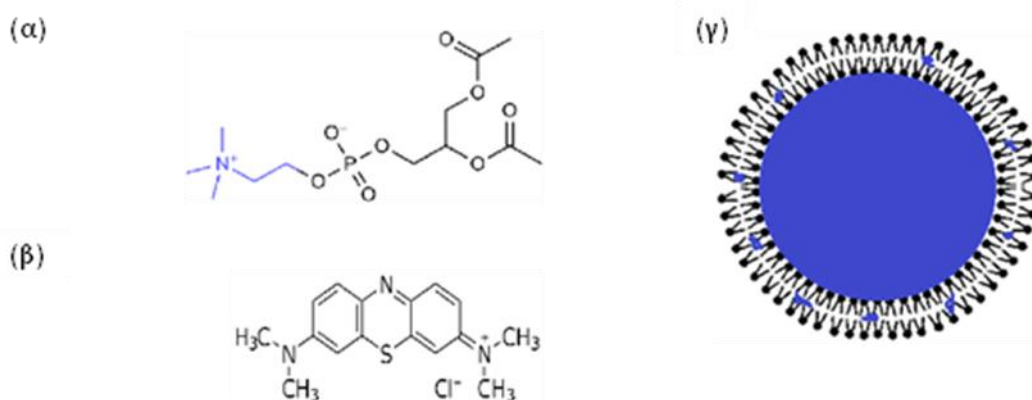
3.3.3.1 Παρασκευή λιποσωμάτων

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. Επίσης 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 ενυδάτωσή 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 φωτοευαίσθητοιου ουσία (σχήμα 3.8). 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 1-3 μ m.

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 3.8: Το λιπίδιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν φωσφατιδυλοχολίνη. Στο σχήμα 3.8(α) φαίνεται η χημική του ένωση. Στο 3.8(β) απεικονίζεται η χημική ένωση της φωτοευαίσθητοιου ουσίας, του μπλε του μεθυλενίου και στο 3.8(γ) φαίνεται το πως αυτή κατανέμεται στο λιπόσωμα.

3.3.3.2 Παράγοντας Clausius- Mossotti

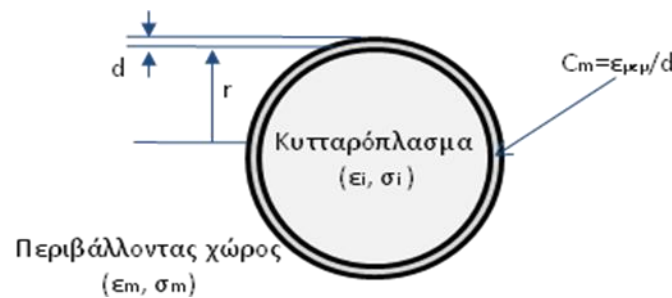
Ο παράγοντας Clausius-Mossotti, f_{C-M} , προσδίδει στην δύναμη την εξάρτηση από την συχνότητα του εφαρμοζόμενου ρεύματος στα ηλεκτρόδια, καθώς και από τις διηλεκτρικές ιδιότητες των σωματιδίων προς μελέτη και του μέσου που τα περιβάλλει. Επειδή το δείγμα εδώ είναι χρωσμένα λιποσώματα, η εξίσωση (3.2), που ορίζει τον f_{C-M} για ένα σφαιρικό σωματίδιο, πρέπει να τροποποιηθεί κατάλληλα για μια δομή που αποτελείται από μεμβράνη και το εσωτερικό που αυτή περικλείει. Γενικά για κύτταρα ή λιποσώματα η αγωγιμότητα της μεμβράνης έχει σχετικά

χαμηλή τιμή οπότε για τον υπολογισμό του f_{C-M} χρησιμοποιείται ένα μοντέλο (σχήμα 3.9), όπου η μιγαδική επιδεκτικότητα του εσωτερικού του κυττάρου, αντικαθίσταται από την ενεργή μιγαδική επιδεκτικότητα και ο τύπος που προκύπτει είναι (Kaler & Jones, 1990):

$$f_{C-M}(\omega) = \frac{\omega^2(\tau_e\tau_{mi} - \tau_i\tau_{me}) - 1 + j\omega(\tau_{me} - \tau_e - \tau_{mi})}{2 - \omega^2(\tau_i\tau_{me} + \tau_e\tau_{mi}) + j\omega(\tau_{me} + 2\tau_e + 2\tau_{mi})} \quad 3.21,$$

όπου οι χρόνοι χαλάρωσης ορίζονται ως $\tau_i = \varepsilon_i / \sigma_i$, $\tau_{mi} = C_m r / \sigma_i$, $\tau_e = \varepsilon_e / \sigma_e$ και $\tau_{me} = C_m r / \sigma_e$ (Stoicheva&Hui, 1994) και οι δείκτες e και i αντιστοιχούν στο εξωτερικό και στο εσωτερικό του λιποσώματος. Για το δείγμα στην παρούσα εργασία οι τιμές που λήφθηκαν είναι $\varepsilon_i = \varepsilon_e = 80\varepsilon_0$ και $\sigma_i = \sigma_e = 9.17\text{mS/m}$ και η τιμή της χωρητικότητας της μεμβράνης είναι $C_m = 0.38\text{mF/m}^2$ (Σπυράτου, 2010).

Τα λιποσώματα, για τα οποία έγινε η βαθμονόμηση της οπτικής παγίδας είχαν διαστάσεις κοντά στο $1\mu\text{m}$, άλλα λίγο μικρότερα και άλλα λίγο μεγαλύτερα, και το πραγματικό μέρος του παράγοντα C-M υπολογίστηκε κατά μέσο όρο ίσος με $\text{Re}[f_{C-M}(\omega)] = -0.5$ για $\omega = 2\pi\nu = 2\pi \cdot 1\text{MHz}$. Επομένως όπως φαίνεται από την τιμή $\text{Re}[f_{C-M}]$, για τα λιποσώματα προκύπτει αρνητική διηλεκτροφόρηση. Αυτό σημαίνει πως με την εφαρμογή τάσης στα ηλεκτρόδια αναμένεται τα λιποσώματα να απομακρύνονται από τα ηλεκτρόδια.



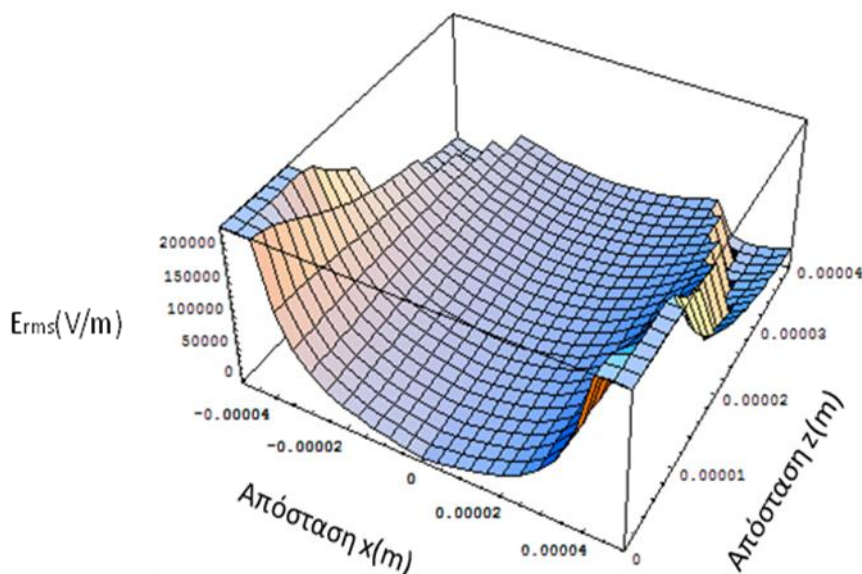
Σχήμα 3.9 Το μοντέλο που χρησιμοποίησαν οι Kaler και Jones (1990) για τον υπολογισμό του f_{C-M} για κύτταρα και που χρησιμοποιείται και εδώ για τα λιποσώματα. Το εσωτερικό θεωρείται ομογενές και περιβάλλεται από μεμβράνη χωρητικότητας $C_m = \varepsilon_{me} / d$, όπου ε_{me} η διηλεκτρική διαπερατότητα της μεμβράνης και d το πάχος της.

3.3.3.3 Βέλτιστη θέση παγίδας για την βαθμονόμηση

Την πρώτη φορά που χρησιμοποιήθηκε η παραπάνω διάταξη παρατηρήθηκε πως η δύναμη διηλεκτροφόρησης είναι ευαίσθητη σε μεταβολές του z και επίσης ότι

αυτή η ευαισθησία μεταβάλλεται με το x (Παπαγιάκουμου, 2010). Πρέπει λοιπόν να οριστεί η περιοχή της διάταξης στην οποία οι μεταβολές στην δύναμη διηλεκτροφόρησης, λόγω μεταβολών στο x και στο z , δεν είναι απότομες. Στο σχήμα 3.10 απεικονίζεται το διάγραμμα του ηλεκτρικού πεδίου, E_{rms} , και η ασυνέχειά που αυτό παρουσιάζει. Συγκεκριμένα κοντά στο επίπεδο των ηλεκτροδίων, δηλαδή για μικρές τιμές του z , η ασυνέχεια του πεδίου είναι στα όρια των ηλεκτροδίων, ενώ όσο αυξάνεται το z η ασυνέχεια πλησιάζει το μέσο χώρο ανάμεσα στα ηλεκτρόδια.

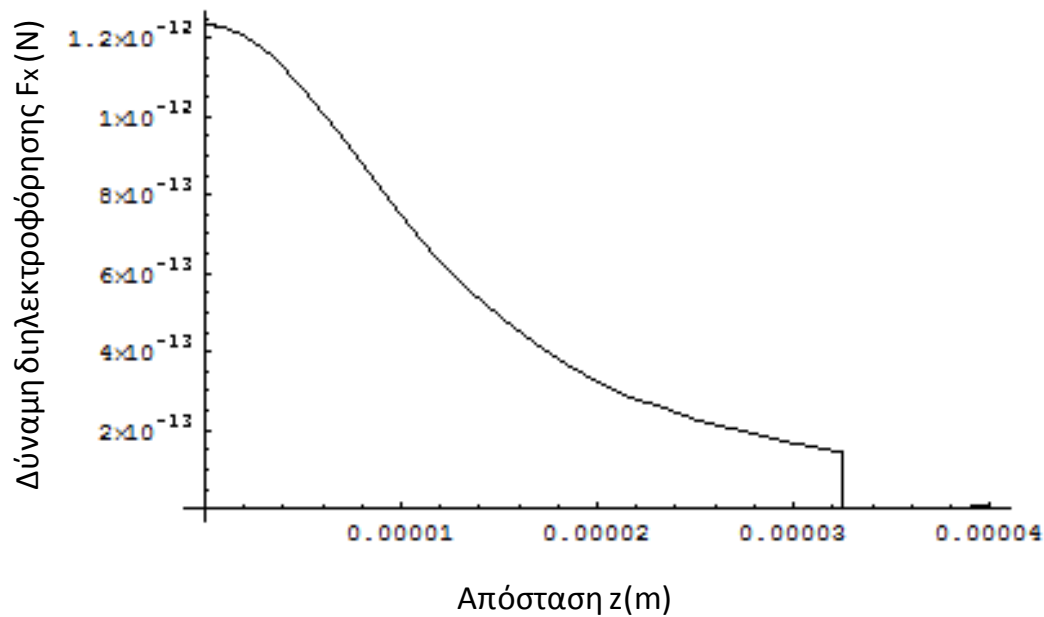
Το προηγούμενο συμπέρασμα φαίνεται πιο καθαρά στο σχήμα 3.11 όπου παρατηρώντας κανείς πως αλλάζει η εγκάρσια συνιστώσα της δύναμης διηλεκτροφόρησης, F_x , συναρτήσει της απόστασης z , φαίνεται η ασυνέχεια της δύναμης για z κοντά στα $32\mu\text{m}$, η οποία προκύπτει από την ασυνέχεια του πεδίου. Συμπερασματικά για μικρές τιμές του z είναι πιο εύκολο να καθοριστεί κάποια περιοχή ανάμεσα στα ηλεκτρόδια, στην οποία δεν θα έχουμε απότομες μεταβολές του πεδίου και συνεπώς της δύναμης. Επιπλέον, για τιμές του z γύρω στα $8\text{-}10\mu\text{m}$, δεν διευκολύνονται οι μετρήσεις κοντά στα ηλεκτρόδια, δηλαδή για x κοντά στα $50\mu\text{m}$.



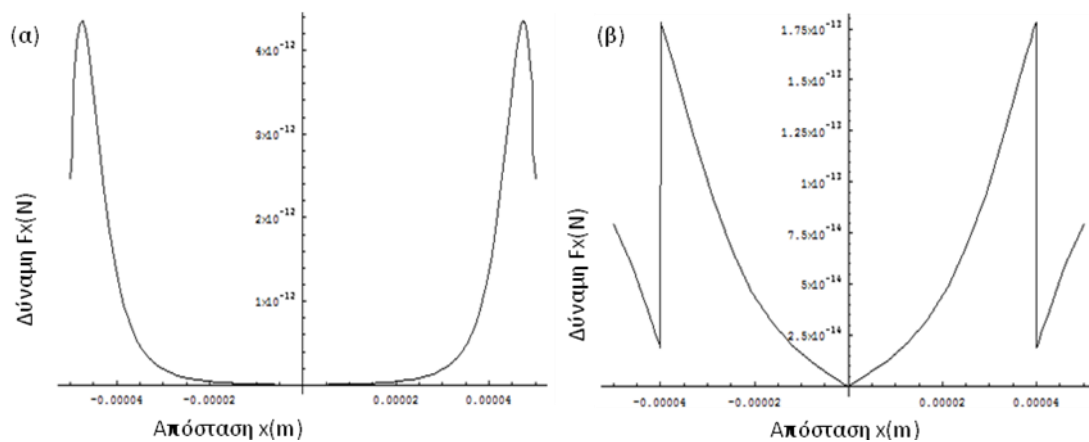
Σχήμα 3.10.: Τρισδιάστατη απεικόνιση του ηλεκτρικού πεδίου, E_{rms} , για τάση 12V. Φαίνεται η ασυνέχεια του πεδίου, η οποία για z κοντά στο 0 είναι κοντά στα ηλεκτρόδια και όσο αυξάνεται το z πλησιάζει στο μέσο χώρο ανάμεσα στα ηλεκτρόδια. (διάγραμμα από Mathematica.)

Στο σχήμα 3.12 απεικονίζεται η εγκάρσια δύναμη, F_x , για ένα λιπόσωμα με ακτίνα $r=0,5\mu\text{m}$, $\text{Re}[f_{C-M}]=-0.5$ και τάση $V=12\text{V}$, σε δυο περιπτώσεις, μια για $z=8\mu\text{m}$

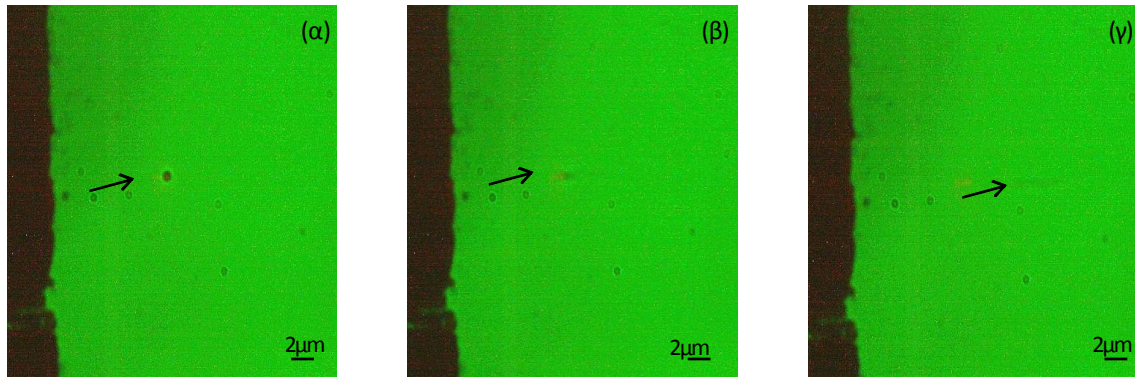
και μια για $z=32\mu\text{m}$. Βλέπει κανείς ότι επιβεβαιώνονται τα προηγούμενα συμπεράσματα, για $z=32\mu\text{m}$ οι μεταβολές της δύναμης είναι πολύ απότομες και, σε αντίθεση με την περίπτωση που $z=8\mu\text{m}$, οι κατάλληλες περιοχές του x είναι πολύ περιορισμένες. Επίσης στην περίπτωση που $z=8\mu\text{m}$ προκύπτει ότι στην περιοχή κοντά στη μέση της απόστασης των ηλεκτροδίων δεν θα είχε νόημα κάποια μέτρηση δυνάμεων, καθώς αυτές τείνουν στο μηδέν.



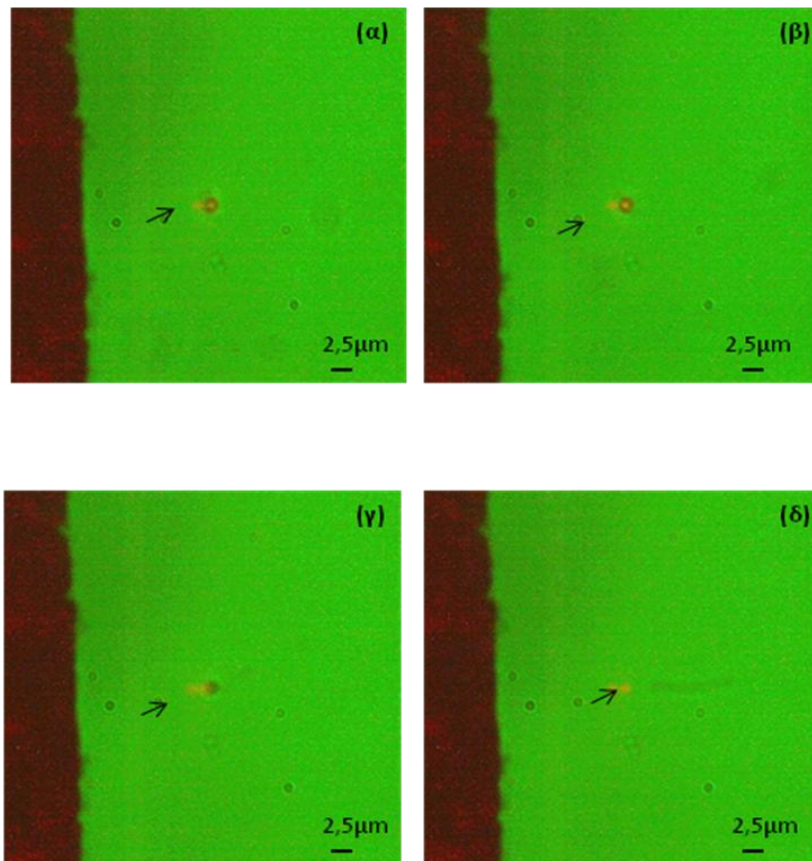
Σχήμα 3.11: Διάγραμμα της εγκάρσιας συνιστώσας της διηλεκτροφορητικής δύναμης F_x , ως προς την απόσταση $z(m)$, για ένα λιπόσωμα με $r=0,5\mu\text{m}$ και $\text{Re}[f_{C-M}]=-0.5$ και τάση $V=12V$. Φαίνεται η ασυνέχεια για z κοντά στα $32\mu\text{m}$.



Σχήμα 3.12: Διάγραμμα της εγκάρσιας διηλεκτροφορητικής δύναμης ως προς την απόσταση $x(m)$, για $z = 8\mu\text{m}$ (α), και για $z = 32\mu\text{m}$ (β), ακτίνα $r = 0,5\mu\text{m}$, $\text{Re}[f_{C-M}] = -0.5$ και τάση $V = 12V$.



Σχήμα 3.13 Φαίνεται το λιπόσωμα που είναι παγιδευμένο σε απόσταση 13 μm περίπου από το ηλεκτρόδιο (α). Στη φωτογραφία 1.12(β) μόλις αρχίζει να διαφεύγει από την παγίδα και στην 1.12(γ) έχει ήδη διαφύγει και υπόκειται πλέον μόνο στη δύναμη διηλεκτροφόρησης. Το λιπόσωμα απομακρύνεται από το ηλεκτρόδιο αφού, όπως προαναφέρθηκε, ο παράγοντας Clausius-Mossotti είναι αρνητικός.



Σχήμα 3.14: Στιγμιότυπα από βίντεο που καταγράφει την παγίδευση ενός λιποσώματος (αυτό που δείχνει το μαύρο βελάκι) διαμέτρου 1,25 μm (α) και (β), και τη διαφυγή του όταν εφαρμόζεται τάση (γ) και (δ). Στο 1.13(δ) το σχήμα του λιποσώματος δεν είναι όντως αυτό που φαίνεται, αλλά απεικονίζεται έτσι γιατί απομακρύνεται πολύ γρήγορα σε σχέση με τη δυνατότητα λήψης της κάμερας CCD.

Συνοψίζοντας, η μέτρηση των δυνάμεων διηλεκτροφόρησης στην συγκεκριμένη διάταξη ευνοείται για z γύρω στα 8 μm και για x μεγαλύτερα από 25 μm

αλλά μικρότερα από 40μm. Στην περιοχή αυτή η βαθμίδα του πεδίου παρουσιάζει συνιστώσα μόνο στον άξονα x, ενώ συνιστώσα z παρουσιάζεται για μικρές τιμές του x, που όμως δεν ενδείκνυνται για μετρήσεις. Αυτό σημαίνει ότι στην διάταξη που έχει επιλεχθεί για αυτή την εργασία μετρώνται μόνο οι εγκάρσιες οπτικές δυνάμεις και όχι οι αξονικές, όπως και η εγκάρσια αποδοτικότητα της παγίδας.

Όπως προαναφέρθηκε, για την μέτρηση της οπτικής δύναμης πρώτα παγιδεύεται το λιπόσωμα και ύστερα εφαρμόζεται τάση από την γεννήτρια εως ότου αυτό διαφύγει της παγίδας. Τη στιγμή που το λιπόσωμα διαφεύγει, η τάση που δείχνει ο παλμογράφος είναι αυτή που θα εισέρθει στον τύπο για τον υπολογισμό του E_{rms}^2 , και άρα της δύναμης διηλεκτροφόρησης, που θεωρείται ότι ισούται με την εγκάρσια συνιστώσα της οπτικής δύναμης. Στο σχήμα 3.13 φαίνεται η διαδικασία αυτή για ένα λιπόσωμα με διάμετρο 0,85μm και στο σχήμα 3.14 για διάμετρο 1,25μm.

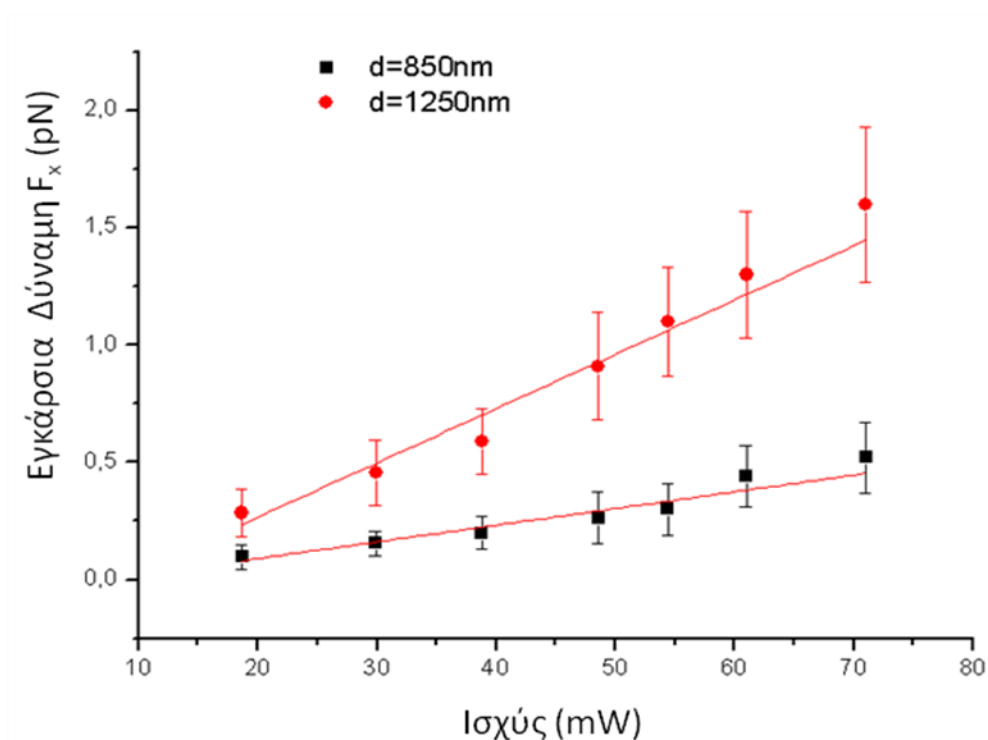
3.3.4 Αποδοτικότητα της οπτικής παγίδας

Η αποδοτικότητα της παγίδας μετριέται μέσω του αδιάστατου παράγοντα Q, ο οποίος εμπεριέχει πολλές παραμέτρους, όπως εξηγείται και στο κεφάλαιο 1.2, και προκύπτει από την σχέση 1.1: $F = Q \frac{n_m P}{c}$

Μετρώντας τη δύναμη που ασκείται σε κάποια 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.

Στο σχήμα 3.15 φαίνονται οι καμπύλες δύναμης - ισχύος για λιποσώματα μικρότερα του 1μm και για λιποσώματα λίγο μεγαλύτερα του 1μm. 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. Κυρίαρχη επίδραση στο σφάλμα υπολογισμού της δύναμης έχει το σφάλμα στις τάσεις που μετρήθηκαν και στη μέτρηση των ακτίνων των λιποσωμάτων. Συγκεκριμένα, η δύναμη που υπολογίζεται (τύπος 3.4) εξαρτάται από το τετράγωνο της τάσης και τον κύβο της ακτίνας και επομένως είναι ευαίσθητη σε μικρές μεταβολές ενός εκ των δύο. Αυτό σημαίνει ότι ένα μικρό σχετικό σφάλμα στην τάση ή στην ακτίνα αντιστοιχεί σε αρκετά μεγάλο σχετικό σφάλμα στην δύναμη, και κυρίως στην περίπτωση που οι δυνάμεις είναι μικρές. Για τις διαμέτρους

το σφάλμα υπολογίστηκε περίπου 10% μιας και οι διαστάσεις των λιποσωμάτων ήταν σχετικά μικρές.



Σχήμα 3.15: Εγκάρσια συνιστώσα δύναμης σε σχέση με την ισχύ για λιποσώματα διαμέτρου 850nm (τετράγωνα) και για διάμετρο $d=1,25\mu\text{m}$ (κύκλοι).

Για λιποσώματα λίγο μικρότερα από ένα μικρόμετρο, η αποδοτικότητα υπολογίστηκε ίση με $Q=1,8\pm 0,2 \times 10^{-3}$, ενώ για αυτά τα λίγο μεγαλύτερα από 1 μικρόμετρο $Q=5,7 \pm 0,5 \times 10^{-3}$. Οι τιμές αυτές είναι αρκετά χαμηλές και τα αποτελέσματα σημαίνουν ότι ένα ποσοστό τοις χιλίοις της ισχύος αποδίδει σε δύναμη οπτικής παγίδευσης. Βέβαια ακόμη και έτσι οι δυνάμεις που προκύπτουν είναι αρκετές για να παγιδευτούν σταθερά λιποσώματα αυτής της τάξης μεγέθους. 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%. Συνεπώς 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. Όμως 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.

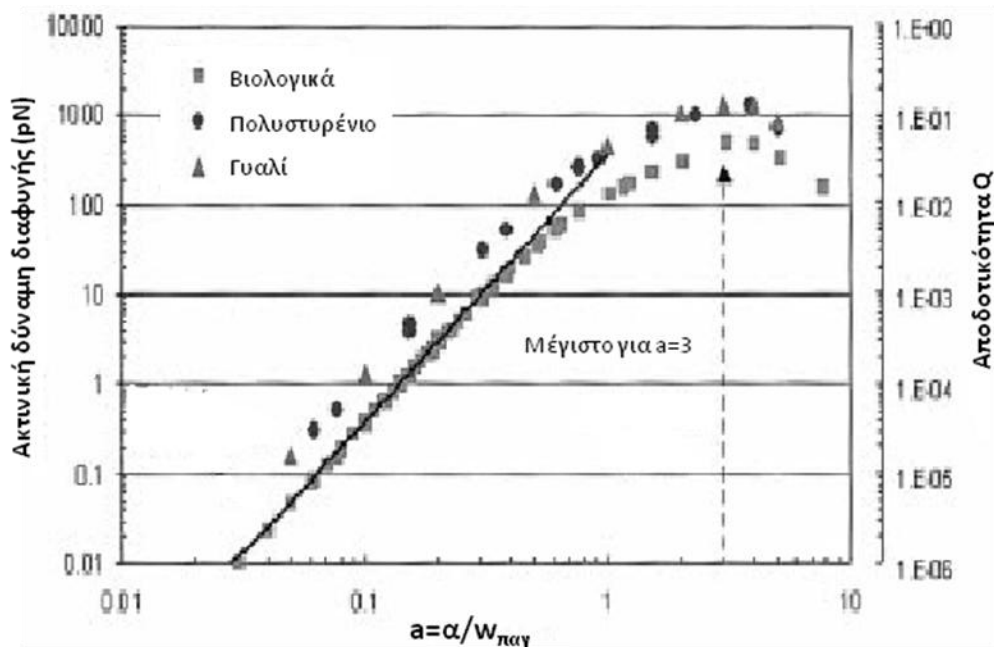
Γενικά, στη σχετική βιβλιογραφία για σωματίδια κοντά στο 1μm, οι τιμές που δίνονται συνήθως για την εγκάρσια αποδοτικότητα είτε από θεωρητικούς υπολογισμούς είτε από πειραματικές μετρήσεις είναι της τάξεως του 10^{-2} (Block 1990-Rohrbach & Stelzer 2002-Ghislain et al., 1994). Ενώ αποδοτικότητες με τιμές παρόμοιες με αυτές που υπολογίστηκαν εδώ, αποδίδονται συνήθως για σωματίδια διαμέτρου 200nm ή μικρότερα (Ganic et al., 2004- Rohrbach & Stelzer 2002-Kachynski et al., 2003). Τα παραπάνω είναι ενδεικτικά και δεν μπορεί να γίνει άμεση ποσοτική σύγκριση καθώς σε κάθε περίπτωση, παράμετροι όπως ο σχετικός δείκτης διάθλασης, μέγεθος δέσμης στην εστία, σφαιρικές εκτροπές και περίθλαση είναι διαφορετικές, όπως διαφορετική είναι και η μέθοδος για τον υπολογισμό των οπτικών δυνάμεων.

Συνήθως βαθμονόμηση γίνεται σε μη βιολογικά υλικά, ενώ από όσο είναι γνωστό δεν βρέθηκε κάποια αναφορά για βαθμονόμηση σε λιποσώματα, τα οποία έχουν μικρό σχετικό δείκτη διάθλασης όπως και τα κύτταρα ή τα βιολογικά δείγματα γενικότερα. Έχει αποδειχθεί ότι όσο αυξάνει ο σχετικός δείκτης διάθλασης (δ.δ) τόσο αυξάνεται και η ισχύς της παγίδας (Ghislain et al., 1994 - Vermeulen et al., 2006 - Snoboda & Block, 1994), εκτός από την περίπτωση που γίνεται πολύ μεγάλος και τα σωματίδια αντανακλούν τη δέσμη με αποτέλεσμα να υπερισχύει η δύναμη σκέδασης. Για παράδειγμα ο Ghislain και οι συνεργάτες του (1994) για σφαίρα πολυστυρενίου με διάμετρο 1μm και δείκτη διάθλασης (δ.δ) 1,57 μέτρησαν εγκάρσια αποδοτικότητα ίση με 0,08, ενώ για αντίστοιχη σφαίρα πυριτίας με δ.δ 1,47 η αποδοτικότητα ήταν μικρότερη, ίση με 0,05.

Η Παπαγιάκουμου και οι συνεργάτες της (Paragiakoumou et al., 2006) χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο βαθμονόμησης με αυτήν της παρούσας εργασίας, μέτρησαν αποδοτικότητα 0,06 για κύτταρα μαγιάς διαμέτρου 3,4μm. Επίσης ο Fuhr και οι συνεργάτες του (Fuhr et al., 1998) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο της διηλεκτροφόρησης για τη βαθμονόμηση της παγίδας τους με διαφορετική όμως διάταξη. Μετρήθηκε αποδοτικότητα 0,07 για σφαιρίδια διαμέτρου 4,9μm.

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

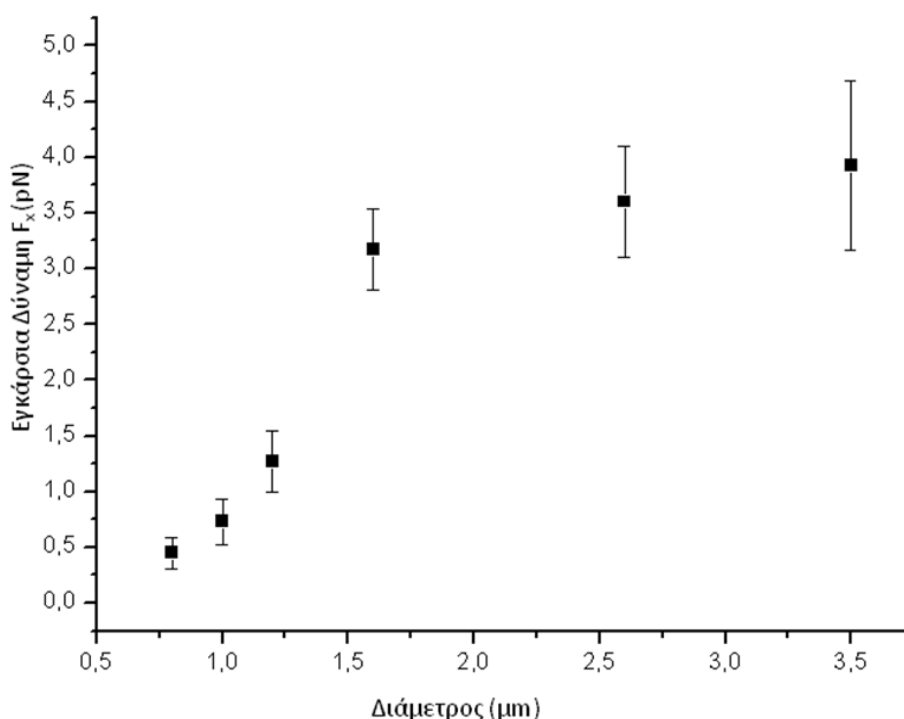
σωματιδίου. Οι Nahmias και Odde (2002) υπολογίζουν τις οπτικές δυνάμεις βασισμένοι στην GLMT ως συνάρτηση της αδιάστατης παραμέτρου $a = \alpha/w_{\text{παγ}}$, όπου α η ακτίνα του σωματιδίου και $w_{\text{παγ}}$ η ακτίνα της γκαουσιανής δέσμης. Εδώ η δέσμη δεν είναι γκαουσιανή και με πρόχειρους υπολογισμούς θα μπορούσαμε να πούμε ότι $w_{\text{παγ}} \approx 1 \mu\text{m}$, $\alpha = 0,45 \mu\text{m}$ έως $\alpha = 0,63 \mu\text{m}$, 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 εδώ (σχήμα 3.16). Επιπλέον στο σχήμα 3.16 φαίνεται η διαφορά στις τιμές της αποδοτικότητας για ίδια παράμετρο a , αλλά για διαφορετικά υλικά και άρα και δείκτη διάθλασης.



Σχήμα 3.16: 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).

Επίσης αξίζει να αναφερθεί η 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 $\delta.\delta$ 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., 1994 - Rohrbach & Stelzer 2002 - Vermeulen et al., 2006). Για παράδειγμα ο Ganic και οι συνεργάτες του (1994) με θεωρητικούς υπολογισμούς για ένα σφαιρίδιο πολυστυρένιου με ακτίνα $r=0,5\mu\text{m}$, βρήκαν αποδοτικότητα περίπου 0,1 για απόσταση $d=9\mu\text{m}$ από την καλυπτρίδα και περίπου 0,07 για $d=20\mu\text{m}$. Στη διάταξη που χρησιμοποιήθηκε εδώ η παγίδευση έπρεπε να γίνει κοντά στο επίπεδο των ηλεκτροδίων (για τους λόγους που αναφέρθηκαν στην ενότητα 1.3.3.3), επομένως η παγίδα δεν ήταν κοντά στην καλυπτρίδα.



Σχήμα 3.17: Διάγραμμα της εγκάρσιας συνιστώσας της οπτικής δύναμης ως συνάρτηση της διαμέτρου των λιποσωμάτων.

Ακόμη μετρήθηκαν εγκάρσιες δυνάμεις από 0,45 pN έως 3,92 pN για λιποσώματα με διαμέτρους από 0,8 μm έως 3,5 μm και σταθερή ισχύ $P=71\text{mW}$. Στις μικρές τις 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 (σχήμα 3.17). 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).

3.3.5 Αποδοτικότητα της οπτικής παγίδας γραμμής

Με τον τρόπο που περιγράφηκε στις προηγούμενες ενότητες, μετρήθηκαν και οι δυνάμεις που ασκούνται σε λιποσώματα, χρωσμένα με MB, από την οπτική παγίδα γραμμής. Όπως ήταν αναμενόμενο οι δυνάμεις λόγω της παγίδας γραμμής είναι μικρότερες από ότι αυτές της συμβατικής παγίδας. Αυτό είναι λογικό αφού, για κάποια τιμή της ισχύος P, η ένταση της δέσμης I ισούται με P/A , όπου A η επιφάνεια της δέσμης στο εστιακό επίπεδο. Επομένως η ισχύς ανά μονάδα επιφανείας στην παγίδα γραμμής είναι μικρότερη και άρα μικρότερες θα είναι και οι δυνάμεις που δρουν στα παγιδευμένα σωματίδια.

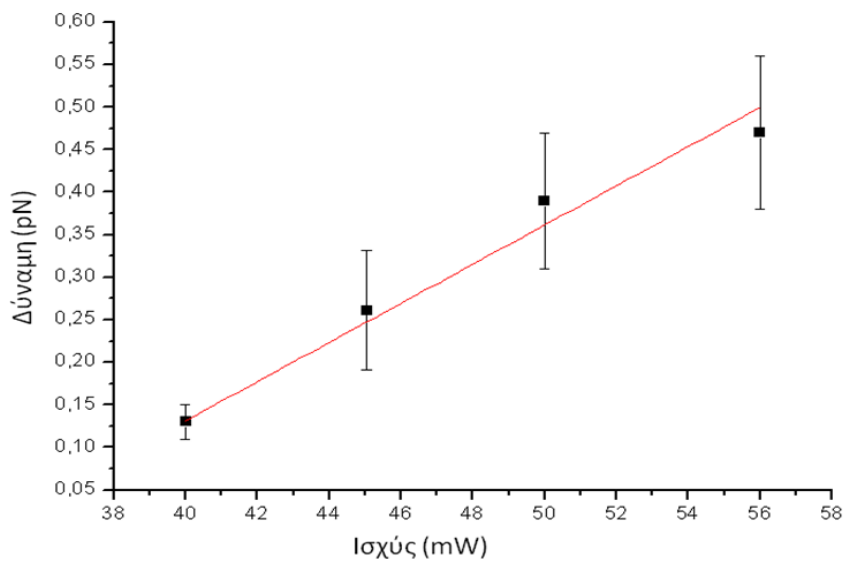
Μετρήθηκαν οι δυνάμεις για ένα λιπόσωμα με διάμετρο $d=3\mu\text{m}$ εφαρμόζοντας ισχύ από 40mW έως 56 mW (για τέσσερις διαφορετικές τιμές της ισχύος) και υπολογίστηκε η αποδοτικότητα από την κλίση του σχετικού διαγράμματος δύναμης-ισχύος (σχήμα 3.18). Η τιμή της αποδοτικότητας βρέθηκε ίση με $Q_{\text{line}}= 5,2\pm 0,4 \times 10^{-3}$. Παρατηρείται πως η τιμή της αποδοτικότητας είναι αρκετά μικρή και παρόλο που σε αυτήν την περίπτωση το λιπόσωμα είναι μεγαλύτερο από αυτά που μελετήθηκαν στην προηγούμενη ενότητα η τιμή της αποδοτικότητας είναι περίπου ίδια (πίνακας 1). Αυτό βέβαια, όπως ειπώθηκε και πριν, είναι λογικό αφού αναμένεται η αποδοτικότητα της παγίδας γραμμής να είναι μικρότερη αυτής της συμβατικής.

Πίνακας 1

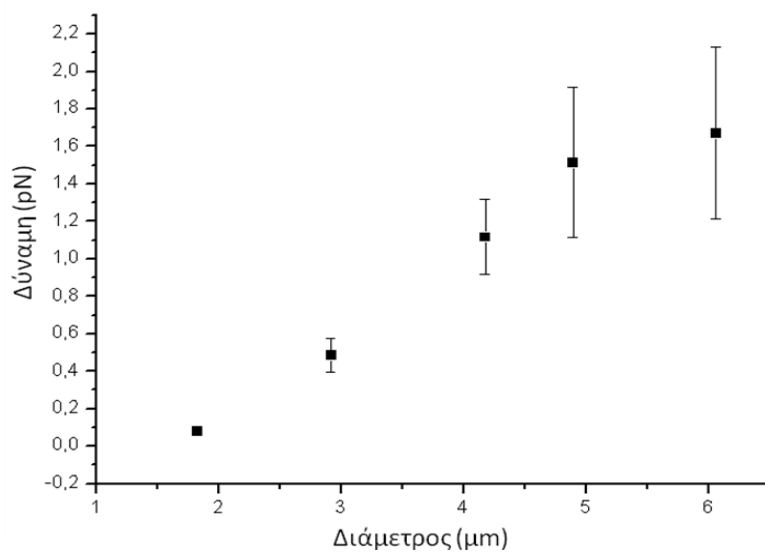
Q για $d=0,85 \mu\text{m}$ (συμβατική παγίδα)	Q για $d=1,25 \mu\text{m}$ (συμβατική παγίδα)	Q_{line} για $d=3\mu\text{m}$ (παγίδα γραμμής)
$1,8\pm 0,2 \times 10^{-3}$	$Q=5,7 \pm 0,5 \times 10^{-3}$	$5,2 \pm 0,4 \times 10^{-3}$

Επίσης μετρήθηκαν οι δυνάμεις για διάφορα μεγέθη λιποσωμάτων εφαρμόζοντας τιμή ισχύος ίση με 56mW. Στο σχήμα 3.19 φαίνεται το διάγραμμα

δύναμης-διαμέτρου που προκύπτει από μετρήσεις σε λιποσώματα με διάμετρο από 1,8 μm έως 6 μm . Όπως και για την συμβατική παγίδα γραμμής, η δύναμη παρουσιάζει μια σχεδόν γραμμική αύξηση ως προς την διάμετρο με φθίνοντα όμως ρυθμό, τουλάχιστον στο εύρος τιμών των διαμέτρων των λιποσωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, για το οποίο δεν μπορούμε να ξέρουμε αν τελικά φθάνει σε πλατό.



Σχήμα 3.18: Διάγραμμα δύναμης - ισχύος για ένα λιπόσωμα διαμέτρου $d=3\mu\text{m}$.



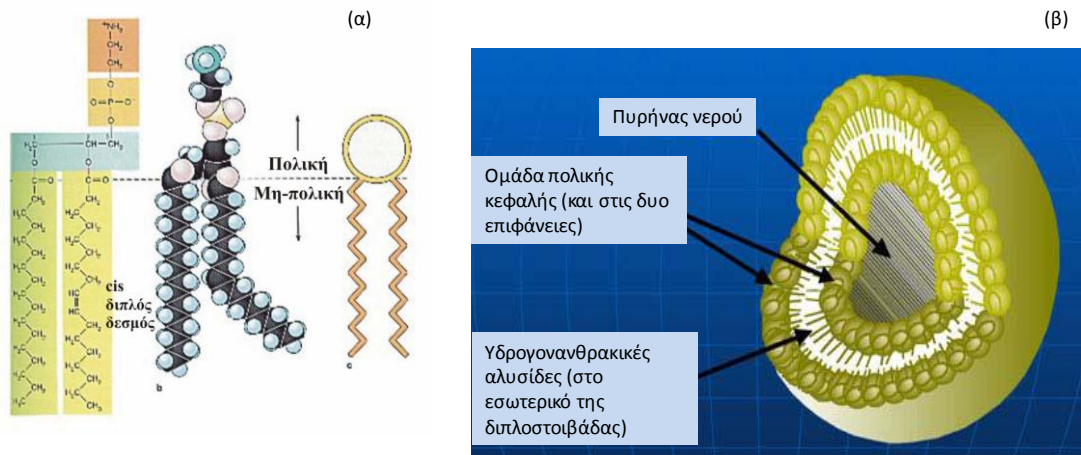
Σχήμα 3.19: Διάγραμμα δύναμης - διαμέτρου για λιποσώματα με MB με διαμέτρους από 1,8 μm έως 6 μm .

4 Λιποσώματα και οι εφαρμογές τους στη βιοφυσική

4.1 Εισαγωγή στα λιποσώματα

Οι βιολογικές μεμβράνες των κυττάρων και των υποκυτταρικών οργανιδίων αποτελούνται από πολλά είδη διαφορετικών μορίων που συμβάλλουν στις λειτουργίες που αυτές πρέπει να φέρουν εις πέρας. Παρά όλα αυτά όμως, το βασικό δομικό στοιχείο όλων των βιομεμβρανών είναι τα φωσφολιπιδικά μόρια. Τα μόρια αυτά είναι αμφίφιλα που σημαίνει ότι αποτελούνται από ένα υδρόφοβο μέρος και ένα υδρόφιλο. Το υδρόφοβο μέρος ή ουρά όπως αλλιώς λέγεται, αποτελείται από μια ή περισσότερες μη πολικές υδρογοναθρακικές αλυσίδες, ενώ το υδρόφιλο κεφάλι αποτελείται από μια πολική ομάδα. Στους ζωντανούς οργανισμούς αυτή αποτελείται από ένα μόριο φωσφατιδυλοχολίνης (σχήμα 4.1(α)) ή σφιγγυομελίνης. Χάρη στην υδροφοβική επίδραση και στην τάση των συστημάτων να μειώνουν όσο το δυνατόν την ελεύθερη ενέργεια τους, όταν τα λιπίδια βρεθούν σε υδατικό μέσο αυτό-οργανώνονται σε δομές τέτοιες ώστε τα υδρόφοβα μέρη να μην έρχονται σε επαφή με αυτό. Για τα φωσφολιπίδια συγκεκριμένα, η δομή που ευνοείται ενεργειακά είναι αυτής της διπλοστοιβάδας.

Τα λιποσώματα είναι κolloειδή σωματίδια αποτελούμενα από μια ή περισσότερες διπλοστοιβαδικές μεμβράνες φωσφολιπιδίων που περικλείουν στο εσωτερικό τους κάποιο υδατοειδές διάλυμα. (σχήμα 4.1(β)) Δηλαδή τα συστατικά της μεμβράνης είναι όμοια με αυτά των βασικών δομικών στοιχείων των φυσικών μεμβρανών των κυττάρων. 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.



Σχήμα 4.1: Σχηματική αναπαράσταση ενός μορίου φωσφατιδυλοχολίνης (α) και ενός λιποσώματος (εικόνα από Göran Karlsson) (β).

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.

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:

- Πολυστοιβαδικά λιποσώματα (Multilamellar Vesicles, MV). Αποτελούνται από πολλές ομόκεντρες διπλοστοιβάδες, πέντε ή και δεκάδες, με μέγεθος από 500nm-5000nm. Η απόσταση μεταξύ των στοιβάδων καθορίζεται από την ισορροπία των ελκτικών δυνάμεων Van der Waals και των ηλεκτροστατικών δυνάμεων.
- Μεγάλα μονοστοιβαδικά λιποσώματα (Large Unilamellar Vesicles, LUV). Αυτά διαθέτουν μια μόνο διπλοστοιβάδα και το μέγεθος τους είναι περίπου 1000nm.
- Μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα (Small Unilamellar Vesicles, SUV). Το μέγεθος τους είναι περίπου 100nm και είναι το μικρότερο δυνατό στο οποίο μπορεί να σχηματιστούν λιποσώματα.
- Πολυκυστιδικά λιποσώματα (Multivesicular Vesicles, MVV). Αποτελούνται από ένα μεγάλο λιπόσωμα με άλλα μικρότερα στο εσωτερικό του, που σε αντίθεση με τα MLVs δεν είναι ομόκεντρα.

4.2 Εφαρμογές των λιποσωμάτων

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, τα λιποσώματα, χάρη στις φυσικές τους ιδιότητες που είναι παρόμοιες με αυτές των βιολογικών μεμβρανών, παρέχουν μοντέλα βιομεμβρανών για συστηματική μελέτη των μηχανικών και ρεολογικών ιδιοτήτων των διπλοστοιβάδων συναρτήσει της μεμβρανικής τους σύστασης και της θερμοκρασίας (Dimova et al., 2006). Ήδη όμως από τη δεκαετία του '70 πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει την συμπεριφορά των λιποσωμάτων ως φορείς δραστικών και φωτοευαίσθητων ουσιών.

Μετά τη χορήγησή του, ένα φάρμακο έχει ελεύθερη πρόσβαση σε διάφορα σημεία του οργανισμού. Αυτή η ευρεία κατανομή του φαρμάκου μπορεί να προκαλέσει τοξικές επιδράσεις και στα υγιή κύτταρα αλλά επίσης έχει μειωμένη συγκέντρωση στις περιοχές που επιθυμείται και άρα μειωμένη αποτελεσματικότητα. Επομένως στόχος στην φαρμακευτική επιστήμη είναι η δημιουργία ενός βέλτιστου μηχανισμού που συγκεντρώνει το φάρμακο σε εκείνο το σημείο του οργανισμού που αποτελεί το στόχο δράσης της δραστικής ουσίας. Για αυτό το σκοπό έχουν μελετηθεί διάφορα κολλοειδή νανοσωματίδια με πιο σημαντικά τα λιποσώματα. Οι λόγοι είναι η δυνατότητα πρόσδεσης των πολικών τους κεφαλών με άλλα μόρια, οι μηχανικές και ρεολογικές τους ιδιότητες (Ligand Targeted Liposomes, LTLs) και η ύπαρξη δυο διαφορετικών διαμερισμάτων, ένα λιπόφιλο και ένα υδρόφιλο, στο ίδιο σωματίδιο. Στην λιπόφιλη περιοχή ανάμεσα στις στοιβάδες της μεμβράνης, αποθηκεύονται υδρόφοβες ουσίες ενώ αντίστοιχα στην υδρόφιλη, στον πυρήνα του λιποσώματος ουσίες διαλυτές σε υδάτινα μέσα.

Τα συμβατικά λιποσώματα, όπως αποκαλούνται στην απλή τους μορφή, έχουν μικρό χρόνο ζωής όσον αφορά την παραμονή τους στο αίμα γιατί εντοπίζονται εύκολα από τα μακροφάγα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Μια λύση σε αυτό το πρόβλημα είναι η τροποποίηση των λιποσωμάτων με πολυμερή για την δημιουργία στερεοχημικών σταθεροποιημένων λιποσωμάτων (Stealth liposomes). Συνήθως τα πολυμερή που χρησιμοποιούνται για την σταθεροποίηση των λιποσωμάτων είναι οι πολυαιθυλενογλυκόλες (PEG).

Πολλά από τα σύγχρονα πειράματα σε λιποσώματα στοχεύουν στην μελέτη και βέλτιστη κατασκευή τους ως φορείς φωτοευαίσθητων ουσιών που

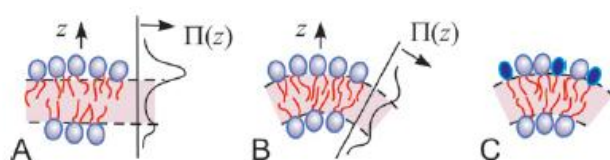
χρησιμοποιούνται στην φωτοδυναμική θεραπεία (ΦΔΘ) (Zeballos et al., 2012- Kuntsche et al., 2010). Η φωτοδυναμική θεραπεία περιλαμβάνει την ακτινοβόληση παθολογικών ιστών με μη θερμικό φως ενώ σε αυτά υπάρχει ήδη συγκέντρωση φωτοευαίσθητων ουσιών με χορήγησή τους στον οργανισμό. Οι ουσίες αυτές διεγείρονται 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. Επίσης μια άλλη δυσκολία που προκύπτει είναι ότι πολλές από αυτές τις ουσίες είναι υδρόφοβες και όταν βρίσκονται στο αίμα δημιουργούν συσσωματώματα με αποτέλεσμα την μειωμένη αποδοτικότητα τους ως προς την διέγερση από το φως. 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 (Derrycke & Witte, 2004).

4.3 Φυσιολογία και χαρακτηριστικά λιποσωμάτων

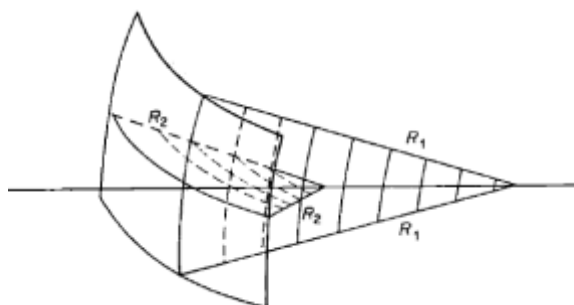
Τα λιποσώματα ή τα κυστίδια αναφέρονται γενικότερα ως αυτό-οργανωμένα υλικά, υπό την έννοια ότι λόγω της υδροφοβικής αλληλεπίδρασης και των υδροφιλικών αλληλεπιδράσεων τα λιπίδια πραγματοποιούν συγκεκριμένους σχηματισμούς. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, για τα φωσφολιπίδια η πιο «βολική» δομή είναι η λιπιδική διπλοστοιβάδα η οποία λόγω των ίδιων επιδράσεων με προηγουμένως σχηματίζει κλειστές δομές, τα κυστίδια, ώστε να μην υπάρχουν ελεύθερες άκρες. Στην πραγματικότητα για να δημιουργηθούν κλειστές δομές πρέπει να δοθεί ενέργεια στο σύστημα των λιπιδικών διπλοστοιβάδων και δεν αρκεί απλή ανάδευση λιπιδίων σε υδατικό διάλυμα (Lasic 1998).

Όταν μια διπλοστοιβάδα αποτελείται από δυο συμμετρικές στρώσεις λιπιδικών μορίων, ενεργειακά ευνοείται να είναι επίπεδη και για να καμπυλωθεί πρέπει να της δοθεί κάποια ενέργεια. Όπως και για μια οποιαδήποτε επιφάνεια έτσι για την λιπιδική μεμβράνη όταν υπόκειται σε παραμόρφωση και καμπυλώνεται, αποθηκεύεται σε αυτήν μια ενέργεια, η ενέργεια κάμψης (bending energy) η οποία εξαρτάται από τις πρωταρχικές καμπυλότητες, C_1 και C_2 (σχήμα 4.3) (Canham 1970).

Εναλλακτικά αν υπάρχουν ασυμμετρίες ανάμεσα στις δυο στοιβάδες στο μέγεθος ή στην σύσταση, η μεμβράνη παρουσιάζει μια αυθόρμητη καμπυλότητα (spontaneous curvature, C_0) (Berndl et al., 1990 - Dobereiner et al., 1993). Όπως φαίνεται και στο σχήμα 4.2 όταν στη μια στοιβάδα η σύσταση είναι πυκνότερη ή έχουν προστεθεί άλλου είδους μόρια με μη ομοιόμορφο τρόπο, η πίεση $\Pi(z)$ με κατεύθυνση παράλληλη με την μεμβράνη είναι μεγαλύτερη. Για να εκτονωθεί αυτή η επιπλέον πίεση στην περιοχή των «κεφαλών» των λιπιδίων, η μεμβράνη αποκτά μια εγγενή καμπυλική ροπή και έτσι παρουσιάζει μια προτιμώμενη καμπυλότητα, την λεγόμενη αυθόρμητη.



Σχήμα 4.2: Αν στην μια στοιβάδα υπάρχουν περισσότερα μόρια από ότι στην άλλη, τότε σε αυτήν παρουσιάζεται αυξημένη πίεση, $\Pi(z)$, ανάμεσά τους (A) και για να μειωθεί και να επέλθει ισορροπία, η μεμβράνη κάμπτεται και παρουσιάζει μια αυθόρμητη καμπυλότητα (B). Το ίδιο συμβαίνει αν στην μια στοιβάδα προστεθούν άλλου είδους μόρια (C). (εικόνα από Dimova et al., 2006)

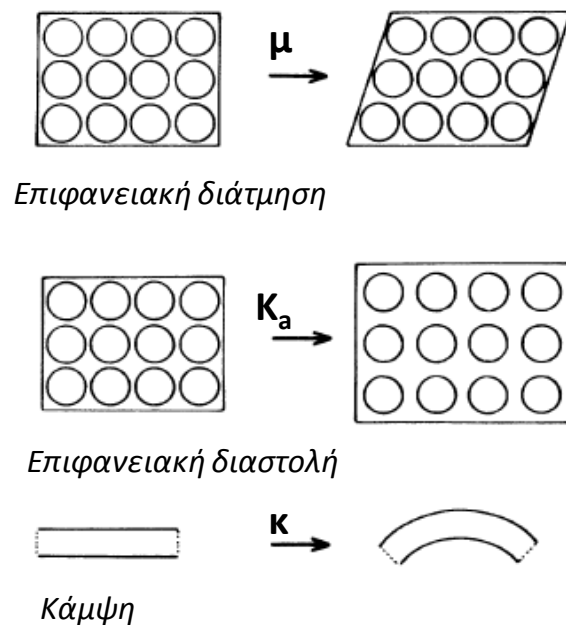


Σχήμα 4.3: Απεικόνιση μιας επιφανειακής μεμβράνης σε δισδιάστατη κάμψη. $R_1=1/C_1$ και $R_2=1/C_2$ είναι η ακτίνες καμπυλότητας. (εικόνα από Rand's Ph.D. Thesis, 1964, University of Western Ontario)

Γενικά, για λόγους απλούστευσης, τα λιποσώματα θεωρούνται ως σφαιρικά σωματίδια. Στην πραγματικότητα ανάλογα με διαφόρους παραμέτρους όπως η θερμοκρασία, η ωσμωτική πίεση ή σύσταση της λιπιδικής μεμβράνης, αυτά παρουσιάζουν διάφορα σχήματα και μετασχηματισμούς. Για την ερμηνεία αλλά και την παρουσίαση όλων των δυνατών μετασχηματισμών έχουν προταθεί διάφορα θεωρητικά μοντέλα, βασισμένα στην ελαχιστοποίηση της ενέργειας του

λιποσώματος και στα πλαίσια των περιορισμών της σταθερής επιφάνειας, A , και του όγκου, V και αγνοώντας επιδράσεις όπως υδροδυναμικές ροές ή ραδιομετρικές δυνάμεις (Helfrich, 1973 - Svetina & Zecks, 1989 - Seifert & Lipowsky, 1995). Επομένως το πρόβλημα του καθορισμού των πιθανών σχημάτων των λιπιδικών κυστιδίων ανάγεται στην εύρεση μιας έκφρασης για την ενέργεια που αυτά περικλείουν.

Θεωρώντας ότι η μεμβράνη ενός κλειστού κυστιδίου είναι μια δισδιάστατη επιφάνεια, σαν ένα λεπτό φιλμ, αυτή μπορεί να διασταλεί, να καμπυλωθεί ή να υποστεί διατμητικές τάσεις. Σε μια κατάσταση ισορροπίας και στο όριο της γραμμικής ελαστικότητας η μεμβράνη χαρακτηρίζεται από κάποιες μηχανικές ιδιότητες που εκφράζονται με κάποιες σταθερές: μέτρο ακαμψίας, κ , γκαουσιανό μέτρο καμπυλότητας, $\bar{\kappa}$, μέτρο επιφανειακής συμπίεστικότητας, K_a , και μέτρο διάτμησης, μ . Κάποιες χαρακτηριστικές παραμορφώσεις μιας μεμβράνης και οι σταθερές που τις χαρακτηρίζουν παρουσιάζονται στο σχήμα (4.4). Στην περίπτωση της κάμψης όμως πρέπει να ληφθεί υπόψη η διπλοστοιβαδική φύση της μεμβράνης, αφού κάμπτοντας την η πάνω στοιβάδα τεντώνεται ενώ η κάτω συμπιέζεται.



Σχήμα 4.4: Σχηματική απεικόνιση κάποιων χαρακτηριστικών παραμορφώσεων μιας λιπιδικής μεμβράνης.

4.3.1 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_m , η οποία είναι χαρακτηριστική για κάθε είδος λιπιδίου και ορίζει τη μετάβασή τους από την λεγόμενη φάση πηκτής (gel phase) στη ρευστή φάση. Η συμπεριφορά φάσης και άρα η θερμοκρασία μετάπτωσης, καθορίζονται από τις δυνάμεις Van der Waals ανάμεσα στα γειτονικά λιπιδικά μόρια. Συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος των υδρογονανθρακικών αλυσίδων, δηλαδή ο αριθμός των μορίων άνθρακα, τόσο αυξάνεται η θερμοκρασία T_m , γιατί οι υδροφοβικές ουρές έχουν μεγαλύτερη επιφάνεια αλληλεπίδρασης. Επιπλέον η θερμοκρασία μετάπτωσης μειώνεται όσο αυξάνει ο βαθμός ακορεστότητας των λιπιδίων, καθώς ένας διπλός μη κορεσμένος δεσμός άνθρακα-άνθρακα σπάει την περιοδική δομή. Τέλος η T_m εξαρτάται και από το φορτίο και το μέγεθος της πολικής κεφαλής. Γενικά σε θερμοκρασία δωματίου τα κορεσμένα λιπίδια με μήκος μεγαλύτερο από 14 άνθρακες βρίσκονται σε gel φάση ενώ αυτά με μικρότερο μήκος σε ρευστή.

Από την όψη της μοριακής δομής θα μπορούσε να ειπωθεί πως στην ρευστή φάση ($T > T_m$) οι υδρογονανθρακικές αλυσίδες είναι «λειωμένες» και κυριαρχεί χωρική αταξία των λιπιδικών μορίων στο επίπεδο της διπλοστοιβάδας. Θεωρητικά υπάρχει και η δυνατότητα μεταβίβασης μορίων από την μια στοιβάδα στην άλλη αλλά αυτό συμβαίνει πιο σπάνια και σε μεγάλη χρονική κλίμακα. Αντίθετα στη φάση της γέλης (gel φάση, $T < T_m$) 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.

4.4 Μελέτη λιποσωμάτων χρωσμένων με μπλε του μεθυλενίου και των ελαστικών τους ιδιοτήτων με οπτική παγίδα γραμμής.

Ένας από τους στόχους της εργασίας αυτής ήταν η παγίδευση λιποσωμάτων χρωσμένων με μπλε του μεθυλενίου (MB) με χρήση της παγίδας γραμμής, όπως αυτή περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2. Έχει παρατηρηθεί πως σε ένα τέτοιο προφίλ δέσμης τα παγιδευμένα σωματίδια υπόκεινται σε επιμήκυνση, θεωρώντας ότι ασκούνται σε αυτά δυο διαμετρικά αντίθετες δυνάμεις (σχήμα 4.8) (Spyratou et al., 2010). Όταν η διαδικασία αυτή γίνεται μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, δεν παρουσιάζονται φαινόμενα υστέρησης και επομένως οι παραμορφώσεις των λιποσωμάτων θεωρούνται ότι είναι ελαστικές. Υπό αυτές τις προϋποθέσεις και με βάση κάποια μηχανικά μοντέλα μετράται το μέτρο διάτμησης (shear modulus), μ , και το μέτρο κάμψης (bending rigidity), κ . Επίσης παρατηρήθηκαν γνωστά φαινόμενα όπως budding και pearling.

4.4.1 Λιποσώματα χρωσμένα με μπλε του μεθυλενίου

Η παρασκευή των λιποσωμάτων πραγματοποιήθηκε στον τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, και η διαδικασία περιγράφηκε στην ενότητα 3.3.3.

Όπως ειπώθηκε προηγουμένως, τα λιποσώματα μελετώνται ως φορείς φωτοευαίσθητων ουσιών για τη χρήση τους στη φωτοδυναμική θεραπεία (ΦΔΘ) του καρκίνου. Μια ουσία που παραδοσιακά μελετάται τα τελευταία χρόνια είναι το μπλε του μεθυλενίου (σχήμα 3.8 (β), κεφάλαιο 3). Χάρη στη χαμηλή τοξικότητα αλλά και στην υψηλή απόδοση σε παραγωγή μονήρους οξυγόνου, το μπλε του μεθυλενίου είναι μια πολλά υποσχόμενη φωτοευαίσθητοποιός ουσία για τη ΦΔΘ του καρκίνου (Tang et al., 2005). Διεγείρεται στα 660 nm και με την παραγωγή μονήρους οξυγόνου προκαλεί τη δημιουργία ελεύθερων ριζών με αποτέλεσμα την καταστροφή των παθολογικών κυττάρων.

Ο τρόπος που τα λιποσώματα-φορείς κυκλοφορούν στον οργανισμό αλλά και ο τρόπος και ο ρυθμός έκχυσης της ουσίας που περικλείουν εξαρτάται από τις ρεολογικές και μηχανικές τους ιδιότητες. Συνεπώς έχει ενδιαφέρον να μελετήσει

κανείς τις ιδιότητες αυτές των λιποσωμάτων χρωσμένων με μπλε του μεθυλενίου (Methylene Blue , MB). Η δέσμη laser που χρησιμοποιείται για τον σκοπό αυτής της εργασίας έχει μήκος κύματος που συμπίπτει με το μήκος κύματος διέγερσης του μπλε του μεθυλενίου. Με αυτόν τον τρόπο με το ίδιο laser διεγείρεται η φωτοευαισθητοποιός ουσία και ταυτόχρονα παγιδεύονται και μελετώνται τα χαρακτηριστικά τους υπό την διέγερση αυτή.

4.4.2 Παρατήρηση μετασχηματισμών των λιποσωμάτων με MB λόγω της οπτικής παγίδας γραμμής.

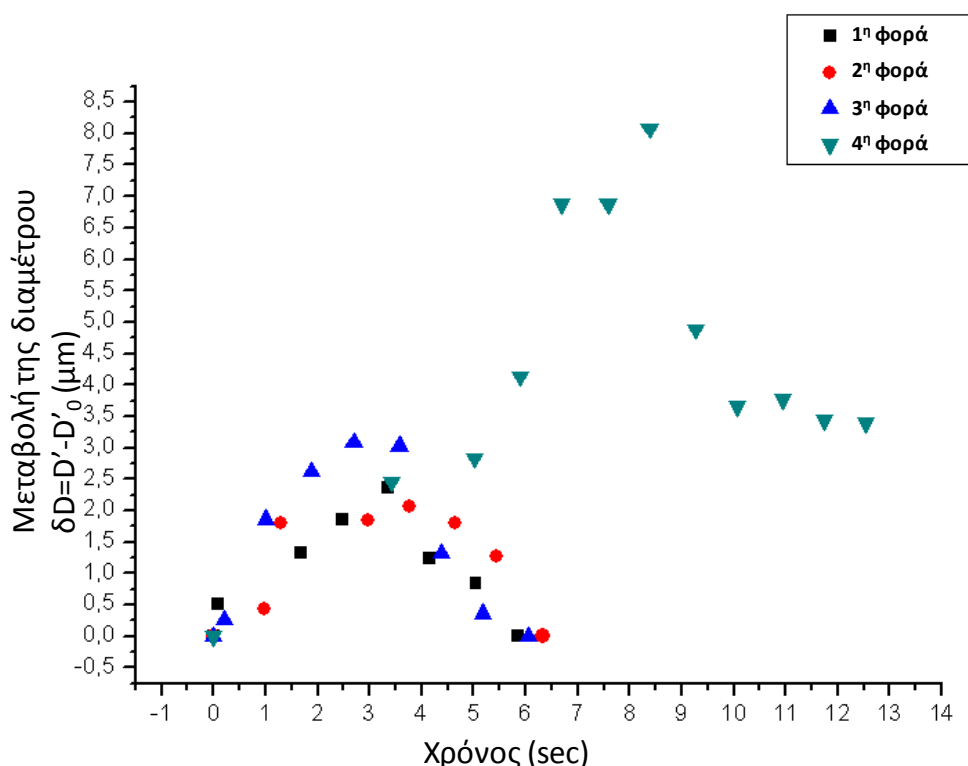
Για την μέτρηση του μέτρου διάτμησης και του μέτρου κάμψης, τα λιποσώματα παρέμειναν στην παγίδα γραμμής για μικρό χρονικό διάστημα, περίπου 3-4 δευτερόλεπτα, και με την αποκοπή της δέσμης του laser αυτά επανήλθαν στο αρχικό τους σχήμα (διάγραμμα σχήματος 4.5). Στην περίπτωση που η διάρκεια παραμονής στην παγίδα ήταν μεγαλύτερη, αυτά παρουσιάζανε φαινόμενα υστέρησης και δεν επανήλθαν στις αρχικές τους διαστάσεις. Στιγμιότυπα από μια τέτοια διαδικασία φαίνονται στο σχήμα 4.6 όπου το ελεύθερο λιπόσωμα σταδιακά ελκύεται και παγιδεύεται από την οπτική παγίδα γραμμής (σχήμα 4.6 (α, β, γ)). Παράλληλα επημηκύνεται λόγω των τάσεων που αυτή του ασκεί (γ, δ). Με την αποκοπή της δέσμης του laser (4.6 (ε, ζ)) το λιπόσωμα επανέρχεται στο αρχικό του σχήμα. Με περαιτέρω διάρκεια του λιποσώματος στην παγίδα αυτό υπόκειται σε μη ελαστικές παραμορφώσεις (4.6 (ι, κ)) με αποτέλεσμα να μην επανέρχεται στο αρχικό του σχήμα όταν η δέσμη αποκοπεί ξανά (4.6 (λ, μ))

Με κάποιους υπολογισμούς, θεωρώντας ότι το λιπόσωμα αρχικά είναι σφαιρικό και μετασχηματίζεται σε ελλειψοειδές εκ περιστροφής, φαίνεται ότι η επιφάνεια διατηρείται σταθερή κατά τις ελαστικές παραμορφώσεις, οπότε οι υπολογισμοί που θα γίνουν παρακάτω για τις ελαστικές ιδιότητες θα υπόκεινται στον περιορισμό της σταθερής επιφάνειας. Ο όγκος διαφοροποιείται ελάχιστα, πιθανόν λόγω εκροών του εσωτερικού διαλύματος που προκύπτουν από το μετασχηματισμό πόρων στην μεμβράνη (Lee et al., 2001).

Βέβαια, δεν παρατηρήθηκαν σε όλα τα λιποσώματα ελαστικές παραμορφώσεις. Υπήρχαν περιπτώσεις λιποσωμάτων, που παρά τη μεγάλη σε χρονική διάρκεια, $t > 1 \text{ min}$, παραμονής τους στην παγίδα γραμμής δεν φαίνεται να υπέστησαν οποιαδήποτε τροποποίηση. Τέτοια λιποσώματα ήταν μάλλον

πολυστοιβαδικά με πολύ περισσότερες στοιβάδες από αυτά στα οποία παρατηρήθηκαν μετασχηματισμοί.

Από την άλλη, σε λιποσώματα με MB, τα οποία επιμηκύνθηκαν με την παγίδα γραμμής αλλά παρέμειναν σε αυτήν για περισσότερο χρόνο από ότι αναφέρθηκε παραπάνω, παρατηρήθηκαν διάφοροι μη ελαστικοί μετασχηματισμοί όπως η διαδικασία του μπολιάσματος (budding) και περισταλτικές αστάθειες (pearling). Στιγμιότυπα τέτοιων μετασχηματισμών φαίνονται στο σχήμα 4.7. Το λιπόσωμα υπόκειται σε περισταλτικές μεταβάσεις ενώ ταυτόχρονα τεντώνεται υπό την επίδραση του laser.

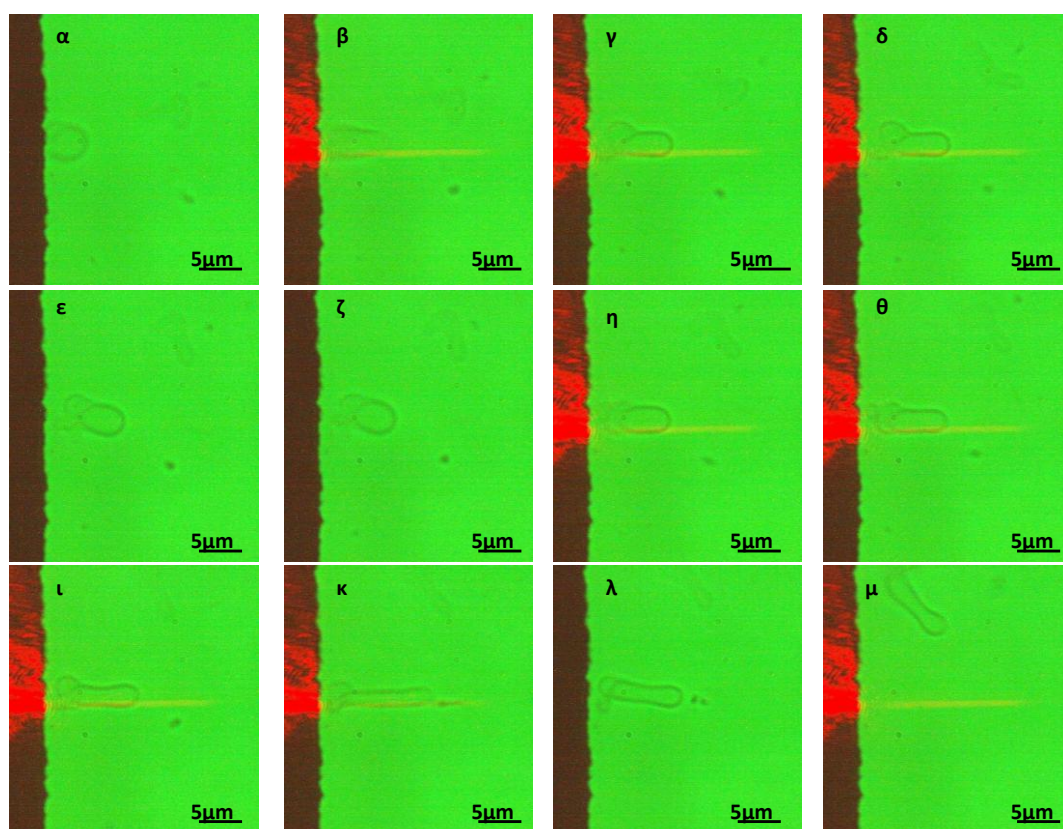


Σχήμα 4.5: Διάγραμμα που δείχνει την μεταβολή της οριζόντιας διαμέτρου, $D'=5\mu\text{m}$, ενός λιποσώματος συναρτήσει της διάρκειας κατά την οποία βρίσκεται στην παγίδα γραμμής. Θεωρείται $t=0$ η χρονική στιγμή που αυτό παγιδεύεται και για $t=3-4$ s αποκόπτεται η δέσμη laser και το λιπόσωμα επανέρχεται στην αρχική του μορφή, $\delta D=0$. Αυτό επαναλαμβάνεται 3 φορές (1^η φορά :τετράγωνο, 2^η φορά: κύκλος, 3^η φορά: όρθιο τρίγωνο). Την τέταρτη φορά το λιπόσωμα παραμένει για περισσότερο χρόνο στην παγίδα, $t=9$ sec, και παρουσιάζεται υστέρηση. Το λιπόσωμα δεν επανέρχεται στις αρχικές του διαστάσεις (4^η φορά: ανάστροφο τρίγωνο). Η δύναμη που εφαρμόζεται σε αυτό το λιπόσωμα είναι $F=1,52\pm 0,40$ pN.

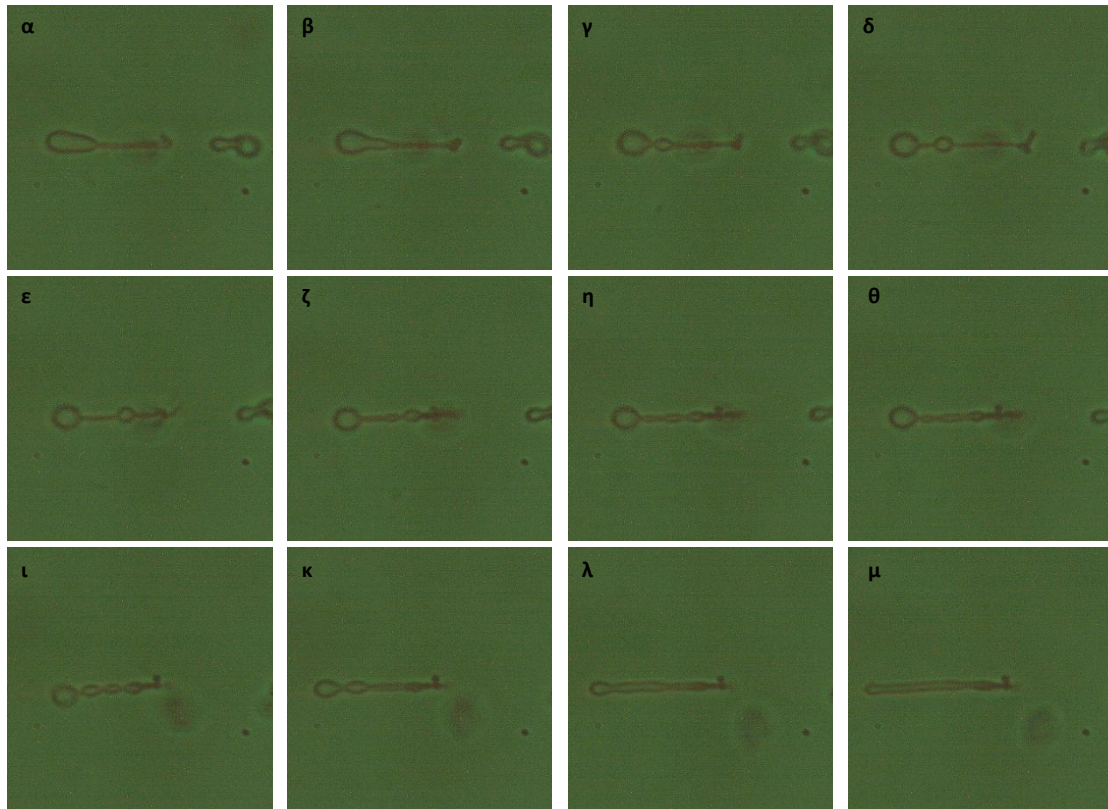
Επίσης, με την παραμονή του δείγματος κάτω από το φως του μικροσκοπίου, σταδιακά το υδατικό διάλυμα εξατμίζεται και έτσι η εσωτερική ωσμωτική πίεση των

λιποσωμάτων αυξάνεται και παρουσιάζεται εκροή του εσωτερικού διαλύματος στο περιβάλλον. Συνεπώς ο εσωτερικός όγκος σταδιακά μειώνεται και δημιουργείται περίσσεια επιφάνειας, που όπως ειπώθηκε οδηγεί σε μη ελαστικούς μετασχηματισμούς των λιποσωμάτων, όπως η διαδικασία μολιάσματος.

Όπως είναι γνωστό, τέτοιοι μετασχηματισμοί δημιουργούνται με αύξηση της θερμοκρασίας ή της ωσμωτικής πίεσης δημιουργώντας περίσσεια επιφάνειας λόγω μείωσης του περικλειόμενου όγκου (Dobereiner et al., 2003 - Miao et al., 1994). Στη συγκεκριμένη περίπτωση που μελετάται εδώ, η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλείται από την έντονη απορρόφηση της δέσμης laser μήκους κύματος 660nm από τα MB-λιποσώματα. Η κάθε μετάβαση και ο κάθε μετασχηματισμός διέπονται από την αρχή της ελάχιστης ελεύθερης ενέργειας του λιποσώματος.



Σχήμα 4.6: Στιγμιότυπα από ένα λιπόσωμα καθώς αυτό παγίδευται στην παγίδα γραμμής (α \rightarrow β \rightarrow γ), και ταυτόχρονα επιμηκώνεται. Με την αποκοπή της δέσμης του laser αυτό επανέρχεται στο αρχικό του σχήμα (ε, ζ), και με την επαναφορά της δέσμης αποκτά πάλι ελλειψοειδές σχήμα (η, θ). Με την περαιτέρω παραμονή του στην δέσμη το λιπόσωμα, υπόκειται σε μεγάλες μεταβολές (ι, κ) και αυτή την φορά με αποκοπή της δέσμης δεν επανέρχεται στο αρχικό του σχήμα (λ, μ).



Σχήμα 4.7: Στιγμιότυπα από μετασχηματισμούς ενός λιποσώματος, το οποίο έχει «τεντωθεί» και έχει σχηματίσει μια ουρά, ενώ βρίσκεται παγιδευμένο στην οπτική παγίδα γραμμής (α). Στο (β) φαίνεται η διαδικασία μπολιάσματος, και στη συνέχεια ο σχηματισμός μιας πέρλας (γ→δ), η οποία διαδίδεται στα δεξιά της δέσμης, (ε-ζ), και επιμηκύνεται ενώ ταυτόχρονα δημιουργούνται και άλλες πέρλες (η-κ) λόγω περισταλτικών ασταθειών. Το λιπόσωμα ολοένα επιμηκύνεται και στο τέλος, $t=59 \text{ sec}$, αποκτά σωληνοειδή μορφή (μ).

4.4.3 Μέτρηση του μέτρου διάτμησης, μ .

Τα λιποσώματα στην gel φάση παρουσιάζουν μη μηδενικό μέτρο στρέψης, $\mu \neq 0$, όμως, εξ όσων γνωρίζουμε, σχετικές μετρήσεις είναι περιορισμένες στην βιβλιογραφία. Πρώτη φορά μελετήθηκαν οι ελαστικές ιδιότητες των λιπιδικών κυστιδίων σε gel φάση από την Dimova και τους συνεργάτες της (2000) με τη μέθοδο της οπτικής δυναμομετρίας. Συγκεκριμένα, με τον μικροχειρισμό δυο μικροσφαιριδίων προσδεμένων στη μεμβράνη του λιποσώματος μετρήθηκε η ελαστική ακαμψία της, k_M , η οποία είναι ανάλογη του μέτρου διάτμησης (Dimova et al., 2000): $k_M \cong 8\pi\mu / \ln(l_o / \alpha)$, δεδομένου ότι $\mu \ll K_a$, με α τη διάμετρο και l_o την αρχική απόσταση ανάμεσα στα δυο σφαιρίδια. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα λοιπόν το μ αναμένεται να είναι περίπου 10^{-3} dyn/cm για θερμοκρασία $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Επίσης η Spyratou και οι συνεργάτες της (2009) μέτρησαν απευθείας το μέτρο διάτμησης λιποσωμάτων με τη μέθοδο της οπτικής παγίδας γραμμής, που είναι και η μέθοδος που χρησιμοποιείται και εδώ. Η τιμή που υπολογίστηκε είναι $\mu=1,0 \pm 0,2 \mu\text{N/m}$ και ταιριάζει με τα συμπεράσματα της Dimona και των συνεργατών της.

Για τον υπολογισμό του μέτρου διάτμησης χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο βασισμένο στην μηχανική των Landau και Lhifshitz (1959) για μικρές παραμορφώσεις (Henon et al., 1999 -Spyratou et al., 2009). Στην περιοχή αυτή οι απλοί νόμοι της ελαστικότητας είναι:

$$\begin{aligned}\sigma_{xx} &= K(e_{xx} + e_{yy}) + \mu(e_{xx} - e_{yy}) \\ \sigma_{yy} &= K(e_{xx} + e_{yy}) + \mu(e_{yy} - e_{xx}) \\ \sigma_{xy} &= 2\mu e_{xy}\end{aligned}\tag{4.1}$$

όπου $\sigma_{ij} = \delta F_i / \delta x_j$ και $e_{ij} = 1/2(\delta u_i / \delta x_j + \delta u_j / \delta x_i)$, είναι ο τανυστής τάσεων και παραμορφώσεων αντίστοιχα (σχήμα 4.8), K το μέτρο της επιφανειακής συμπίεστικότητας και μ το ελαστικό μέτρο διάτμησης της μεμβράνης. Επειδή το πάχος της μεμβράνης είναι σταθερό, το πρόβλημα της παραμόρφωσης της μπορεί να θεωρηθεί δισδιάστατο και να περιγραφεί όπως και αυτό του σχήματος 4.8. Αν στο λιπόσωμα ασκούνται δυο δυνάμεις σε δυο διαμετρικά αντίθετα σημεία στην επιφάνεια της μεμβράνης, τότε οι παραμορφώσεις μπορούν να υπολογιστούν σε οποιοδήποτε σημείο. Η μεταβολή της διαμέτρου κάθετα στη διεύθυνση των δυνάμεων είναι (Henon et al., 1999):

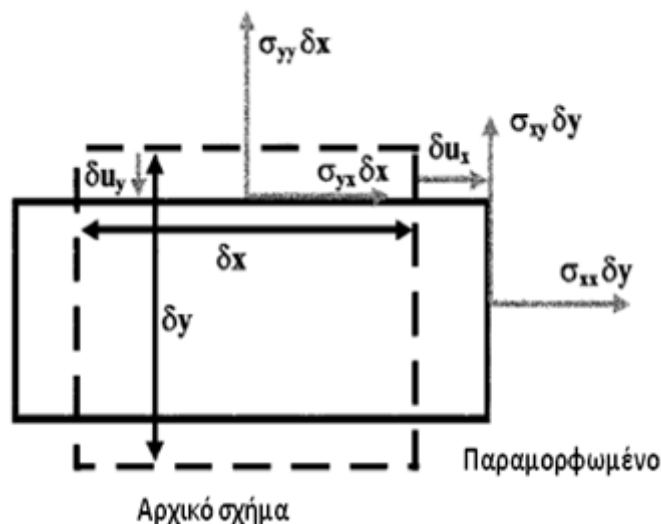
$$D = D_0 - \frac{F}{2\pi\mu} \left(1 + \left(1 - \frac{\pi}{2} \right) \frac{\mu}{K} \right)\tag{4.2}$$

Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η ελαστική επιφανειακή συμπίεστικότητα, K , ισούται με $K \approx 300 \text{ dyn/cm}$, για λιποσώματα σε gel φάση (Needham & Evans, 1988) και ισχύει ότι $\mu \ll K$. Επομένως η σχέση 1.2 απλοποιείται και η μεταβολή στη διάμετρο δίνεται από τον τύπο:

$$D = D_0 - \frac{F}{2\pi\mu}\tag{4.3}$$

Τα λιποσώματα στα οποία παρατηρήθηκε ελαστική επιμήκυνση ήταν αρχικά σχεδόν σφαιρικά ώστε να μπορούν να δεχτούν επιπλέον κάμψη της μεμβράνης τους και να μετασχηματιστούν σε ελλειψοειδή, έχοντας περίσσεια επιφάνειας. Αυτά που έχουν τέλειο σφαιρικό σχήμα θέλουν πολύ μεγαλύτερες ενέργειες για να

παραμορφωθούν, αφού ήδη για συγκεκριμένο όγκο καταλαμβάνουν την ελάχιστη επιφάνεια (Rochal et al., 2005 - Sleep et al., 1999). Ταυτόχρονα όμως η απόκλιση τους από σφαιρικό σχήμα δεν είναι μεγάλη οπότε θεωρούνται αρχικά σφαιρικά για λόγους απλούστευσης.



Σχήμα 4.8: Οι τάσεις και οι παραμορφώσεις σε μια επιφανειακή στοιχειώδη επιφάνεια.

Μόλις κάποιο λιπόσωμα παγιδεύεται στην παγίδα γραμμής και αποκτά ελλειψοειδές σχήμα (σχήμα 4.10 (α,γ)), η δέσμη laser εμποδίζεται και το λιπόσωμα επανέρχεται στην αρχική του μορφή (σχήμα 4.10 (β,δ)), χωρίς να παρουσιάζονται φαινόμενα υστέρησης. Αν παραμείνει όμως στην παγίδα για περισσότερο χρόνο, τότε η παραμόρφωση δεν είναι ελαστική και το λιπόσωμα δεν επανέρχεται πλήρως στο αρχικό του σχήμα (σχήμα 4.10 (ε-θ)).

Επειδή τα λιποσώματα με MB απορροφούν έντονα το μήκος κύματος της δέσμης που χρησιμοποιείται για παγίδευση, ένας παράγοντας που επηρεάζει το αποτέλεσμα θα μπορούσε να είναι η αύξηση της θερμοκρασίας ή οι φυσικοχημικές αλλαγές της μεμβράνης λόγω αυτής. Παρ' όλα αυτά, από μελέτες έχει προκύψει ότι το μέτρο διάτμησης μειώνεται κατά $6 \times 10^{-5} \text{ dyn/cm}^2\text{C}$, για παράδειγμα αύξηση της θερμοκρασίας από τους 25°C στους 45°C αντιστοιχεί σε μείωση της τιμής του μ κατά 20% (Waugh & Evans, 1979). Επίσης, επειδή όπως ειπώθηκε η παραμόρφωση που μετριέται είναι για τα πρώτα δευτερόλεπτα που το σωματίδιο είναι παγιδευμένο,

θεωρείται ότι δεν είναι σημαντική η επιρροή της αύξησης της θερμοκρασίας λόγω της απορρόφησης από το laser στον υπολογισμό του μ .

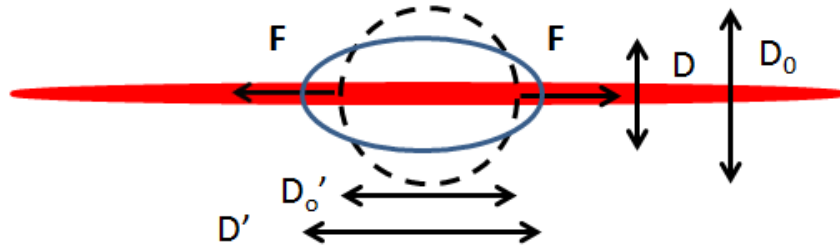
Οι δυνάμεις που ασκούνται από την παγίδα γραμμής μετρήθηκαν με τη μέθοδο της διηλεκτροφόρησης (κεφάλαιο 3) και η διάμετρος των λιποσωμάτων καθώς και οι μεταβολές της (σχήμα 4.9) μετρήθηκαν με το λογισμικό Leica DMIL του μικροσκοπίου. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται οι τιμές του μέτρου διάτμησης για λιποσώματα με διάμετρο 4 και 5 μm , όπως υπολογίστηκαν με την παραπάνω μέθοδο. Παρόλο που η μέθοδος είναι ίδια με αυτήν της Σπυράτου και των συνεργατών της (2009), η τιμή που προέκυψε εδώ για το μέτρο διάτμησης είναι αρκετά μικρότερη. Αυτό εν μέρει ίσως οφείλεται και στο διαφορετικό δείγμα καθώς και στο ότι στα λιποσώματα εδώ με μικρότερες δυνάμεις της τάξεως των 1,5 pN υπήρχαν αισθητές μεταβολές της διαμέτρου, ΔD .

Ο Helfer και η ομάδα του (2001) μελέτησαν τις ελαστικές ιδιότητες σε λιποσώματα επικαλυμμένα με ακτίνη, η οποία μετατρέπει τα κυστίδια σε ρευστή φάση σε πιο άκαμπτα. Με τους υπολογισμούς βρήκαν ότι το μέτρο διάτμησης κυμαίνεται στα 0,5-5 $\mu\text{N/m}$, που δεν απέχει πολύ από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

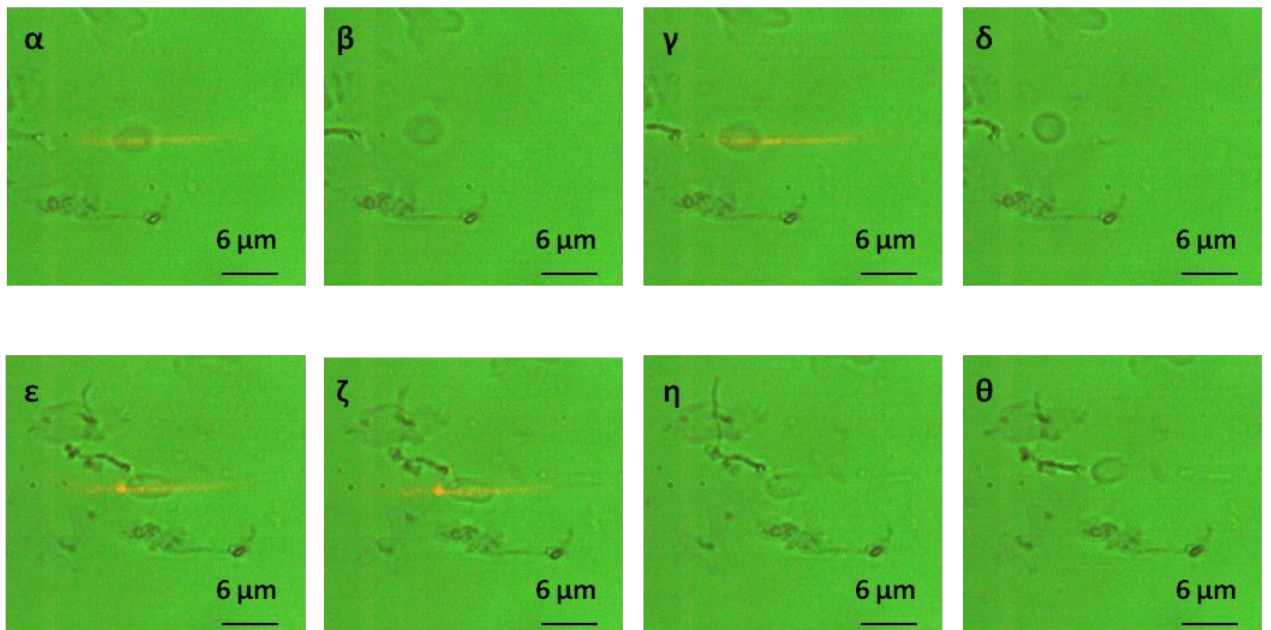
Πίνακας 2

Διάμετρος λιποσώματος	4 μm	5 μm
Μέτρο διάτμησης, μ	$0,28 \pm 0,06 \mu\text{N/m}$	$0,17 \pm 0,05 \mu\text{N/m}$
Μέτρο κάμψεως, κ	$4,45 \pm 0,82 \text{ piconerg}$	$2,56 \pm 0,68 \text{ piconerg}$

Τέλος, έχουν γίνει πολλές μετρήσεις του μέτρου διάτμησης σε ερυθροκύτταρα, είτε με τη μέθοδο της μικροπιπέτας (Evans, 1973 - Hochmuth & Waugh, 1987) με τιμές της τάξεως των 10^{-5} N/m, είτε με μικροχειρισμό μικροσφαιριδίων μέσω οπτικής παγίδας (Henon et al., 1999 - Dao et al., 2003) με τιμές από 1,7 $\mu\text{N/m}$ έως 13,3 $\mu\text{N/m}$. Φαίνεται όμως ότι, σε ένα ερυθροκύτταρο, στο μέτρο διάτμησης συμβάλει κυρίως η κυτταροσκελετική του δομή (Popescu et al., 2006 - Sleep et al., 1999), επομένως δεν μπορεί να γίνει άμεση σύγκριση των τιμών του μέτρου διάτμησης των λιποσωμάτων με αυτό των ερυθροκυττάρων.



Σχήμα 4.9: Σχηματική αναπαράσταση της μεταβολής που υφίσταται το λιπόσωμα, $\Delta D = D - D_0$, ενώ βρίσκεται παγιδευμένο, καθώς και των δυνάμεων, F , που ασκούνται σε αυτό λόγω της παγίδας γραμμής.



Σχήμα 4.10: Στιγμιότυπα από την παγίδευση ενός λιποσώματος. Αρχικά παγιδεύεται για λιγότερο από 3 s (α) και (γ) και φαίνεται ότι επανέρχεται στο αρχικό σφαιρικό σχήμα (β) και (δ). Αν αφηθεί περισσότερη ώρα στην παγίδα και επιμηκυνθεί περισσότερο (ε,ζ) δεν επανέρχεται πλήρως (θ).

4.4.4 Μέτρηση του μέτρου κάμψης, κ .

Ο υπολογισμός του μέτρου κάμψης έγινε με την κλασσική μέθοδο μέσω του υπολογισμού της μεταβολής της ενέργειας κάμψεως του λιποσώματος όταν σε αυτό ασκείται κάποια δύναμη. Όπως και προηγουμένως θεωρήθηκε ότι το λιπόσωμα υπόκειται σε δυο δυνάμεις διαμετρικά αντίθετες (σχήμα 4.9) με διεύθυνση παράλληλη στο προφίλ γραμμής της δέσμης και οι μετρήσεις γίνονται για ελαστικές παραμορφώσεις σε μικρό χρονικό διάστημα, ώστε να μην υπάρξουν φαινόμενα υστέρησης.

Θεωρώντας ένα λιπόσωμα επιφάνειας Ω ως μια δισδιάστατη κλειστή επιφάνεια στον τρισδιάστατο χώρο, η οποία χαρακτηρίζεται από τις κύριες καμπυλότητες, C_1 και C_2 , η ελεύθερη ενέργεια του E ισούται με (Helfrich, 1973 - Seifert & Lipowsky, 1995):

$$E = \frac{\kappa}{2} \int_{\Omega} (C_1 + C_2)^2 dA + \bar{\kappa} \int_{\Omega} C_1 C_2 dA \quad 4.4 .$$

Ο δεύτερος όρος της εξίσωσης 4.4 χαρακτηρίζεται από την γκαουσιανή ακαμψία, $\bar{\kappa}$ και για συνεχείς διαταραχές σε μια κλειστή επιφάνεια ισούται με $\bar{\kappa} 4\pi$ και είναι ανεξάρτητο των καμπυλοτήτων, C_1 και C_2 . Επομένως μια μεταβολή στην ενέργεια του λιποσώματος θα ισούται με την μεταβολή του πρώτου όρου της εξίσωσης 4.4 και, γνωρίζοντας τα παραπάνω, εύκολα μπορεί να υπολογιστεί το μέτρο ακαμψίας, κ . Από την αρχή διατήρησης της ενέργειας συμπεραίνει κανείς ότι η μεταβολή στην ενέργεια, E , ισούται με το έργο $W = F \cdot (D' - D_0)$ (σχήμα 4.9) που παράγει η παγίδα γραμμής στο λιπόσωμα, δεδομένου ότι η παραμόρφωσή του προκύπτει μόνο εξαιτίας αυτού του έργου.

Αρχικά θεωρείται ότι το λιπόσωμα είναι σφαιρικό και πως καμιά τάση ή δύναμη δεν δρα σε αυτό, άρα $C_1 = C_2 = 1/R_0$, όπου R_0 η ακτίνα του και $\int_{\Omega} (C_1 + C_2)^2 dA = 16\pi$. Όταν αυτό πλέον παγιδευτεί, μετασχηματίζεται σε ελλειψοειδές με μικρό ημι-άξονα a και μεγάλο ημι-άξονα b (σχήμα 4.11) και με κύριες καμπυλότητες που δίνονται από τους τύπους (Lee et al., 2001):

$$C_1 = -\frac{r^2 - r(d^2 r / d\theta^2) + 2(dr / d\theta)^2}{[r^2 + (dr / d\theta)^2]^{3/2}} \quad 4.5$$

και

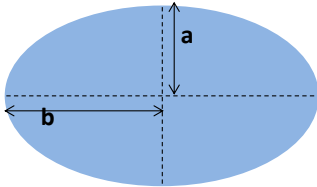
$$C_2 = -\frac{2r^2}{b^2 [4r^2 + r^{-2}(dr^2 / d\theta)^2]^{1/2}} \quad 4.6,$$

όπου r η ακτίνα καμπυλότητας στο σημείο της επιφάνειας με αζιμουθιακή γωνία θ και ισούται με $r(\theta) = a \cdot b / (a^2 \sin^2 \theta + b^2 \cos^2 \theta)^{1/2}$.

Επομένως, συνοψίζοντας τα προηγούμενα, το μέτρο ακαμψίας κ θα υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\kappa = \frac{2W}{\int_{\Omega} (C_1 + C_2)^2 dA - 16\pi} \quad 4.7,$$

όπου τα C_1 και C_2 δίνονται τελικά ως συναρτήσεις της γωνίας θ και το ολοκλήρωμα είναι στην επιφάνεια Ω , η οποία είναι επιφάνεια ενός ελλειψοειδούς εκ περιστροφής.



Σχήμα 4.11: Σχηματική απεικόνιση του πως φαίνεται στο μικροσκόπιο το λιπόσωμα όταν μετασχηματίζεται. Προσέγγιση ως ελλειψοειδές εκ περιστροφής με μικρό ημι-άξονα a και μεγάλο b .

Οι οπτικές δυνάμεις που δρουν στο λιπόσωμα είναι γνωστές (κεφάλαιο 3), η μεταβολή στη διάμετρο όπως και προηγουμένως μετριέται με το λογισμικό του μικροσκοπίου, το ίδιο και τα a και b . Επιπλέον το ολοκλήρωμα στην εξίσωση 4.7 υπολογίζεται με το πρόγραμμα Mathematica 5.2 του Wolfram, με αριθμητική προσέγγιση. Πραγματοποιώντας λοιπόν τα παραπάνω, οι τιμές που προέκυψαν για το μέτρο κάμψης των χρωσμένων με μπλε του μεθυλενίου λιποσωμάτων είναι $4,45 \pm 0,82$ και $2,56 \pm 0,8$ picroerg για διάμετρο 4 και 5 μm αντίστοιχα. Γενικά ισχύει πως για μικρότερα λιποσώματα το μέτρο κάμψης είναι μεγαλύτερο από ότι για αυτά με μεγαλύτερη διάμετρο (Lin et al., 2011), αλλά δεν μπορεί κανείς να ισχυριστεί ότι αυτό είναι υπεύθυνο για τη διαφορά στις δυο τιμές της εργασίας μας.

Για λιποσώματα που βρίσκονται σε ρευστή κατάσταση οι τιμές του μέτρου κάμψης που αναφέρονται στην βιβλιογραφία κυμαίνονται από περίπου 0,25 picroergs (Kummrow & Helfrich, 1991) έως 0,8 picroergs (Mutz & Helfrich, 1990) για egg yolk phosphatidylcholine λιποσώματα ή 1,2 picroergs (Duwe & Sackmann, 1990-Rawicz et al., 2000) έως 1,45 picroergs (Leet et al., 2001) για dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) λιποσώματα. Μελετώντας την εξάρτηση του μέτρου κάμψης κ από τη θερμοκρασία προκύπτει ότι αυτό αυξάνεται με την μείωση της θερμοκρασίας και με την μετάβασή τους στην gel φάση (Dimova et al., 2000 - Lee et al., 1999 - Lee et al., 2001). Στις τελευταίες αναφορές η τιμή που προέκυψε για λιποσώματα DMPC κάτω από τη θερμοκρασία μετάβασης ήταν περίπου 10 picroergs. Στην διάταξη που χρησιμοποιήθηκε εδώ δεν υπάρχει κάποιος μηχανισμός που να παρέχει με ακρίβεια

πληροφορία για τη θερμοκρασία. Όμως το πείραμα διεξάγεται σε θερμοκρασία δωματίου και τα EPC λιποσώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζουν μετάπτωση φάσης σε θερμοκρασία 50 °C. Επίσης για τη μέτρηση του μέτρου κάμψης αυτά παρέμειναν στην παγίδα για λιγότερο από 4 δευτερόλεπτα (διάγραμμα) οπότε να μην δεν ορίζεται η ακριβής θερμοκρασία αλλά διατηρούνται στην gel φάση. Οπότε οι τιμές που προέκυψαν εδώ φαίνεται να ταιριάζουν με τις προβλέψεις που θέλουν το μέτρο κάμψης να είναι μεγαλύτερο στην gel φάση και να μειώνεται έως την θερμοκρασία προμετάβασης T_m (Dimova et al., 2000).

Σε αντίθεση με το μέτρο διάτμησης, έχει αποδειχθεί ότι το μέτρο κάμψης των ερυθροκυττάρων, μιας και εξαρτάται από την λιπιδική διπλοστοιβάδα και δεν επηρεάζεται από τον κυτταροσκελετό, δεν διαφέρει πολύ από αυτό των λιποσωμάτων (Sleep et al., 1999). Χρησιμοποιώντας οπτική παγίδα γραμμής έχει υπολογιστεί το μέτρο κάμψης των ερυθροκυττάρων ίσο με 2,56 piconewtons (Σπυράτου, Διδ/κή διατριβή ΕΜΠ, 2010), μια τιμή που ταιριάζει πολύ καλά με τις τιμές που βρέθηκαν εδώ (πίνακας 2).

5 Μέτρηση ελαστικότητας λιποσωμάτων με την χρήση Μικροσκοπίας Ατομικών Δυνάμεων

5.1 Εισαγωγή

Οι μηχανικές ιδιότητες των φωσφολιπιδικών μεμβρανών σχετίζονται από πολλές απόψεις με την συμπεριφορά των λιποσωμάτων, όπως ο σχηματισμός τους, η σταθερότητα, το μέγεθος, το σχήμα, η σύμφυση ή μετασχηματισμοί κατά τη διαδικασία μολιάσματος. Το μέτρο ακαμψίας είναι μια χαρακτηριστική ιδιότητα των λιποσωμάτων που σχετίζεται άμεσα με την λειτουργία τους αλλά και με την συμπεριφορά τους κατά την μετάβαση από την gel στην ρευστή φάση. Τέτοιες μετρήσεις έχουν πραγματοποιηθεί κατά καιρούς με διάφορες τεχνικές, όπως η αναρρόφηση με μικροπιπέτα (Evans & Rawicz, 1990), ή η παραμόρφωση μέσω εναλλασσόμενων ηλεκτρικών πεδίων (Kummrow & Helfrich, 1991). Μια διαδεδομένη μέθοδος είναι η χρήση οπτικών δυνάμεων με διάφορες τεχνικές, όπως με τον μικροχειρισμό σφαιριδίων πολυστυρενίου (Henon et al., 1999 - Lee et al., 2001) ή με την οπτική παγίδα γραμμής (Spyratou et al., 2009) που εφαρμόστηκε σε αυτήν την εργασία και αναλύθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Οι οπτικές δυνάμεις προσφέρουν τη δυνατότητα να μελετηθούν οι μηχανικές ιδιότητες λιποσωμάτων ή κυττάρων με μη επεμβατικό τρόπο και ταυτόχρονα προσφέρουν μεγάλο οπτικό βάθος της ανάλυσής τους. Όμως η τεχνική αυτή περιορίζεται από την διακριτική ικανότητα της οπτικής μικροσκοπίας που καθορίζεται από το διακριτικό όριο περίθλασης του φωτός και συνήθως εφαρμόζεται σε γιγάντια λιποσώματα.

Μια επιπλέον τεχνική για τη μελέτη των παραπάνω φαινομένων είναι αυτή της μικροσκοπίας ατομικών δυνάμεων (Atomic Force Microscopy, AFM) (Delorme & Fery, 2006 - Liang et al., 2004a - Liang et al., 2004b), η οποία υπάγεται στην ευρύτερη κατηγορία της μικροσκοπίας σάρωσης με ακίδα (Scanning Probe Microscope, SPM). Τέτοιες μέθοδοι χρησιμοποιούν μια ακίδα διαστάσεων λίγων νανομέτρων για τη σάρωση μιας επιφάνειας συνήθως νάνο ή μικρο-σωματιδίων, προσφέροντας τρισδιάστατες εικόνες υψηλής ανάλυσης. Τα υλικά που δύναται να μελετηθούν με το AFM ποικίλουν από κεραμικά και μέταλλα έως βιολογικά μόρια και βιολογικές μικροδομές.

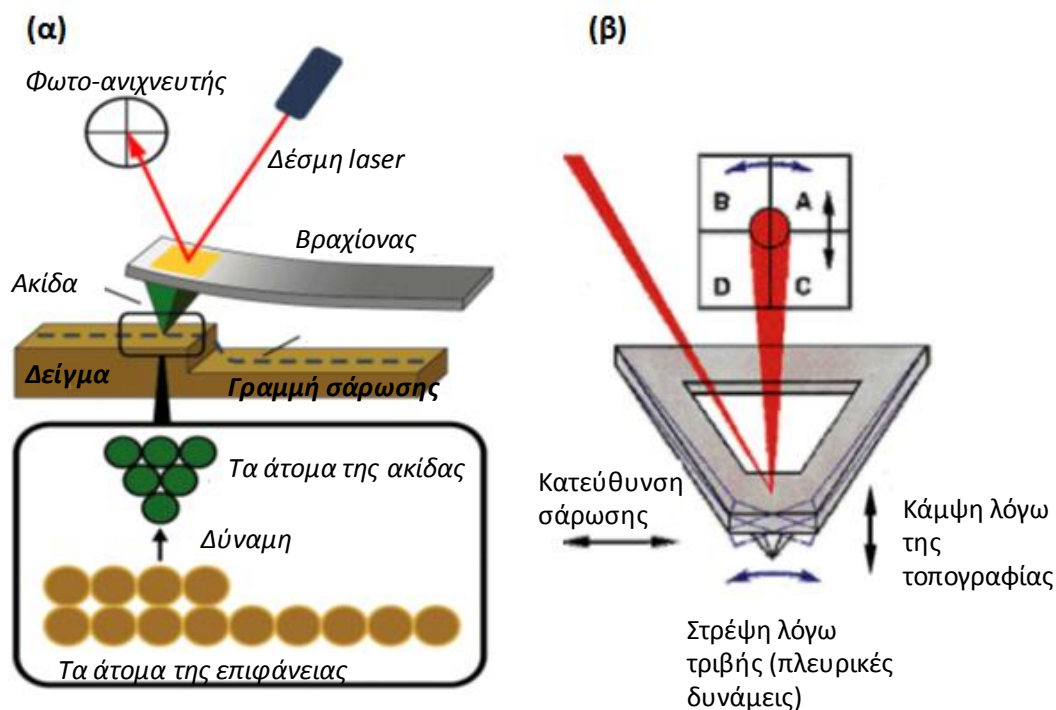
Συνεπώς το πεδίο εφαρμογών του AFM είναι πολύ ευρύ, από την επιστήμη των επιφανειών έως τις βιολογικές και ιατρικές έρευνες. Αυτό που ενδιαφέρει εδώ είναι κυρίως η μέτρηση των μηχανικών ιδιοτήτων των κυττάρων ή λιποσωμάτων που εξάγονται από τις καμπύλες δύναμης - παραμόρφωσης. Το AFM εφαρμόζεται αποτελεσματικά για την μελέτη της μορφολογίας ή των μικρομηχανικών ιδιοτήτων λιποσωμάτων της τάξης των νανομέτρων. Επιπλέον η χρήση του είναι ευρεία γιατί τα δείγματα μπορούν να βρίσκονται είτε σε υγρό είτε σε κενό ή ακόμη και σε υγρό περιβάλλον. Όμως παρόλο που είναι από τις λιγότερο επεμβατικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται, δεν παύει να προκαλεί παραμορφώσεις στα δείγματα λόγω της ακίδας σάρωσης. Επίσης για την μελέτη των δειγμάτων αυτά πρέπει να επιστρωθούν σε κάποια επίπεδη επιφάνεια, όπως η μίκα, με αποτέλεσμα την προσρόφησή τους από αυτήν και τυχόν παραμορφώσεις. Συνοψίζοντας τα μειονεκτήματα και τα πλεονεκτήματα και των δυο παραπάνω μεθόδων, φαίνεται ότι ο συνδυασμός των μετρήσεων μέσω AFM και αυτών μέσω οπτικών δυνάμεων και η σύγκριση των σχετικών αποτελεσμάτων μπορεί να δώσει μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για τις μηχανικές ιδιότητες των λιποσωμάτων και άρα της συμπεριφοράς τους.

5.2 Αρχές λειτουργίας της Μικροσκοπίας Ατομικών Δυνάμεων (AFM)

Η λειτουργία του AFM βασίζεται στην αλληλεπίδραση μιας πολύ λεπτής ακίδας (10-15nm) με το προς μελέτη δείγμα. Η ακίδα αυτή σαρώνει την επιφάνεια σε απόσταση λίγων νανομέτρων ή μέσω μηχανικής επαφής και εκτρέπεται λόγω των δυνάμεων αλληλεπίδρασης ακίδας-δείγματος (σχήμα 5.1(α)). Οι δυνάμεις αυτές είναι κυρίως δυνάμεις Van der Waals και σε κοντινές αποστάσεις είναι απωστικές ενώ σε μεγαλύτερες αποστάσεις είναι ελκτικές. Μετρώντας αυτές τις αλληλεπιδράσεις, μεταφέροντας τα σχετικά δεδομένα σε έναν υπολογιστή και χρησιμοποιώντας ένα κατάλληλο λογισμικό, δύναται να κατασκευαστεί μια εικόνα της υπό μελέτης επιφάνειας.

Μια διάταξη AFM αποτελείται από την κεφαλή του μικροσκοπίου, τη μονάδα ελέγχου και έναν υπολογιστή. Με την σειρά του το μικροσκόπιο αποτελείται από έναν βραχίονα, συνήθως σχήματος V, με διαστάσεις 100-200 μm σε μήκος, 10-40 μm σε πλάτος και 0.3-2 μm σε πάχος, μια ακίδα τοποθετημένη στην άκρη του βραχίονα

διαστάσεων 10-100 nm συνήθως, και την πιεζοηλεκτρική βάση πάνω στην οποία τοποθετείται το δείγμα.



Σχήμα 5.1: Αριστερά φαίνεται μια τυπική απεικόνιση μιας διάταξης AFM και δεξιά (β) φαίνονται οι κινήσεις που πραγματοποιεί ο βραχίονας λόγω της αλληλεπίδρασης της ακίδας με τα άτομα της επιφάνειας και τις αντίστοιχες ανακλάσεις της δέσμης.

Τα υλικά που συνήθως χρησιμοποιούνται για την κατασκευή του βραχίονα είναι νιτρίδια του πυριτίου Si_3N_4 ντοπαρισμένο με (n) προσμίξεις. Η πιεζοηλεκτρική βάση μετακινείται κατακόρυφα προσεγγίζοντας την ακίδα, και ανάλογα με τις δυνάμεις που προκύπτουν, ο βραχίονας κάμπτεται θετικά ή αρνητικά σε συνάρτηση με τη σταθερά ελατηρίου, k_c , που το χαρακτηρίζει. Τυπικά οι σταθερές ελατηρίου κυμαίνονται από 10^{-1} έως 10^{-2} N/m. Γενικά το σχήμα της ακίδας παίζει καθοριστικό ρόλο στις μετρήσεις και μαζί με την σταθερά του ελατηρίου αποτελούν τις παραμέτρους που πρέπει να επιλέξει κανείς ανάλογα με το δείγμα που θέλει να μελετήσει.

Αυτή η απόκλιση του βραχίονα ανιχνεύεται μέσω της ανάκλασης μιας δέσμης laser που προσπίπτει στη πίσω επιφάνεια του (σχήμα 5.1(β)). Πιο συγκεκριμένα, μια δέσμη laser προσπίπτει πάνω στον βραχίονα και ανάλογα με την απόκλισή του, αυτή ανακλάται και ανιχνεύεται μέσω ενός φωτο-ανιχνευτή τεσσάρων τεταρτημορίων.

Όταν η δέσμη μετακινείται κάθετα ανάμεσα στα πάνω (B,A) και στα κάτω τεταρτημόρια (C,D), σημαίνει ότι υπάρχει κάμψη λόγω της τοπογραφίας της επιφάνειας. Ενώ όταν η μετακίνηση είναι οριζόντια από τα (B, D) στα (A, C), σημαίνει ότι παράγεται μια στρέψη λόγω της τριβής και αντιστοιχεί στις πλευρικές δυνάμεις. Στη συνέχεια ο φωτοανιχνευτής μετατρέπει την ανακλώμενη δέσμη σε ηλεκτρικό σήμα και μέσω ενός οπτικού μοχλού το σήμα αυτό ενισχύεται έως 1000 φορές, καθιστώντας εφικτή την ανίχνευση αποκλίσεων μικρότερων του 1 nm.

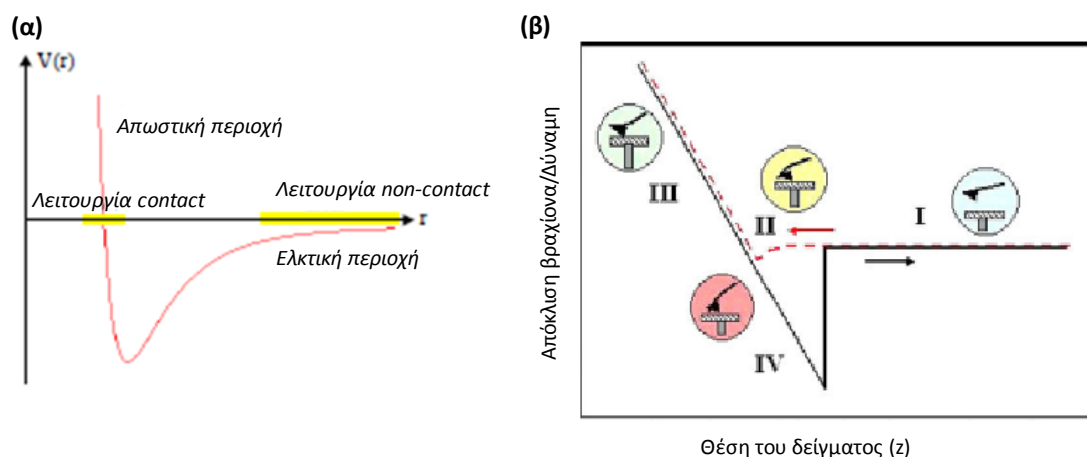
Για την μετακίνηση του δείγματος στο x-y επίπεδο αλλά και κατά τον άξονα z, είναι υπεύθυνη η πιεζοηλεκτρική βάση η οποία αποτελείται από πιεζοηλεκτρικούς κρυστάλλους. Τα υλικά αυτά έχουν την ιδιότητα να συστέλλονται ή να διαστέλλονται όταν βρίσκονται υπό την επίδραση μια ηλεκτρικής τάσης ή αντίστροφα να αποκτούν ένα ηλεκτρικό δυναμικό όταν τους ασκείται μηχανική τάση. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η ακριβής και ελεγχόμενη μετακίνηση του δείγματος ώστε να πραγματοποιηθεί η σάρωση. Εναλλακτικά υπάρχουν διατάξεις όπου ο βραχίονας είναι τοποθετημένος σε πιεζοηλεκτρική βάση και μπορεί να μετακινηθεί.

- Διάγραμμα δύναμης-απόστασης:

Όταν δυο μόρια ή δυο επιφάνειες πλησιάζουν μεταξύ τους η σχετική αλληλεπίδραση περιγράφεται από ένα δυναμικό τύπου Lennard-Jones (σχήμα 5.2(α)). Σε μικρές αποστάσεις επικρατεί το απωστικό δυναμικό ενώ σε μεγαλύτερες το ελκτικό. Στο διάγραμμα του σχήματος 5.2(β) απεικονίζεται μια τυπική πειραματική καμπύλη δύναμης-απόστασης. Στον οριζόντιο άξονα είναι οι τιμές της απόστασης που διαγράφει ο πιεζοηλεκτρικός αισθητήρας ενώ στον κάθετο δίνονται οι τιμές για την απόκλιση του βραχίονα, δ_c . Όμως η δύναμη που αντιστοιχεί σε αυτή την απόκλιση δίνεται από τον τύπο του Hooke και ισούται με : $F=k_c \cdot \delta_c$, άρα ο κάθετος άξονας μπορεί να είναι και ο άξονας της δύναμης. Η απόσταση μεταξύ ακίδας και δείγματος ισούται με: $D= Z- (\delta_c-\delta_s)$, όπου δ_s είναι το σφάλμα στην μέτρηση της απόκλισης που οφείλεται στην ύπαρξη ανωμαλιών στην επιφάνεια .

Στην περιοχή I ο βραχίονας βρίσκεται ελεύθερος χωρίς να αλληλεπιδρά με το δείγμα ενώ στη περιοχή II ο αισθητήρας εκτείνεται και πλησιάζει την ακίδα. Καθώς συμβαίνει αυτό, σε απόσταση μερικών nm μια ελκτική δύναμη εμφανίζεται μεταξύ των ατόμων της επιφάνειας του δείγματος και των ατόμων της επιφάνειας της ακίδας. Η ακίδα κάμπτεται γιατί ελκύεται προς το δείγμα και έρχεται σε επαφή με αυτό. Από το σημείο αυτό και μετά η ακίδα είναι σε επαφή με την επιφάνεια και καθώς ο

αισθητήρας εκτείνεται περαιτέρω, η ακίδα εκτρέπεται περισσότερο (περιοχή III, κόκκινη διακεκομμένη γραμμή). Ύστερα από την πλήρη έκταση ο βραχίονας αρχίζει να αποκλίνει (περιοχή III μαύρη γραμμή) και στο σημείο IV αποκλίνει τόσο ώστε είναι και πάλι ελεύθερο.



Σχήμα 5.2: Διάγραμμα δυναμικού ως προς την απόσταση της ακίδας από το δείγμα (α) και διάγραμμα δύναμη-απόστασης για ένα πλήρη κύκλο καθώς το δείγμα πλησιάζει την ακίδα και εωσότου ξανα-απομακρυνθεί (β).

Τρόποι λειτουργίας του AFM:

- Contact mode :

Σε αυτή τη λειτουργία η ακίδα έρχεται σε μηχανική επαφή με την επιφάνεια που σαρώνει. Η σάρωση γίνεται είτε με τη διατήρηση της σταθερής απόστασης της ακίδας ρυθμίζοντας την θέση της σε συγκεκριμένο ύψος από την επιφάνεια είτε διατηρείται σταθερή η δύναμη ρυθμίζοντας την απόκλιση του βραχίονα ώστε να διατηρείται σταθερή και καταγράφεται η κίνηση στον z άξονα. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται συνήθως για την ανάλυση εικόνων με διακριτικότητα σε ατομικές διαστάσεις. Ο βραχίονας που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι εύκαμπτος ώστε να μπορεί να αποκλίνει από πολύ μικρές δυνάμεις και να έχει μεγάλη συχνότητα συντονισμού ώστε να μην επηρεάζεται από δονητικές αστάθειες.

- Non-contact mode :

Σε αυτή την περίπτωση ο βραχίονας λειτουργεί στην περιοχή των ελκτικών δυνάμεων (σχήμα 5.2(α)) και η αλληλεπίδραση ακίδας-δείγματος είναι η ελάχιστη. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει την μελέτη του

δείγματος χωρίς να επηρεάζει το σχήμα του και να το παραμορφώνει. Συνήθως οι βραχίονες που χρησιμοποιούνται για non-contact mode είναι από πυρίτιο και έχουν σταθερά ελαστικότητας 20-100 N/m.

- Tapping mode :

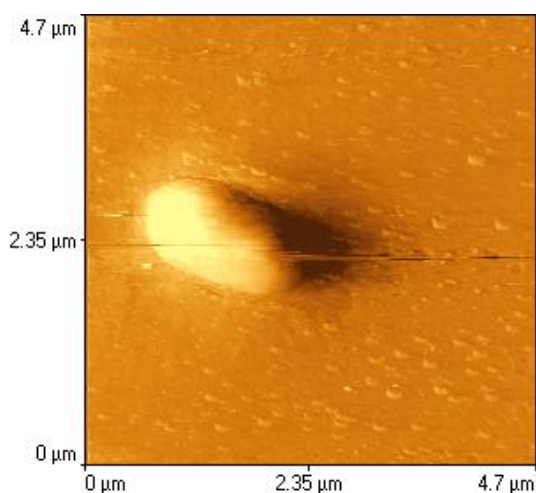
Κατά το tapping mode, ο βραχίονας ταλαντώνεται κοντά στην συχνότητα συντονισμού και έρχεται σε περιοδική επαφή με το δείγμα. Το πλάτος της ταλάντωσης παραμένει σταθερό μέσω ενός ηλεκτρικού συστήματος ανάδρασης. Οι δυνάμεις μεταξύ ακίδας και δείγματος μεταβάλλουν το πλάτος ταλάντωσης και η πληροφορία αυτή χρησιμοποιείται για την ανάδραση ενώ οι κάθετες ρυθμίσεις του πιεζοηλεκτρικού αισθητήρα καταγράφονται ως ύψος της εικόνας. Αυτός ο τρόπος λειτουργίας επιφέρει λιγότερο βλάβες στο δείγμα και ελαχιστοποιεί τις διατμητικές δυνάμεις.

5.3 Μέτρηση του μέτρου ελαστικότητας MB λιποσωμάτων με την τεχνική του AFM

Για την διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε η διάταξη AFM, diInnova της Veeco, του τομέα Φυσικής του Ε.Μ.Π, με μέγιστο εύρος σάρωσης 100 X 100 X 7.6 μm . Το δείγμα προς μελέτη είναι λιποσώματα, EggPC, χρωσμένα σε μπλε του μεθυλενίου, διαστάσεων 1-2 μικρόμετρα (σχήμα 5.3) (η παρασκευή περιγράφεται στην ενότητα 3.3). Για την σάρωση του δείγματος χρησιμοποιήθηκαν οι ακίδες της Innova, μοντέλο RTESPA-CP φτιαγμένες από Si_3N_4 με ντοπαρισμένο με (n) προσμίξεις. Ο βραχίονας ήταν σχήματος V με σταθερά ελατηρίου 0.02 N/m.

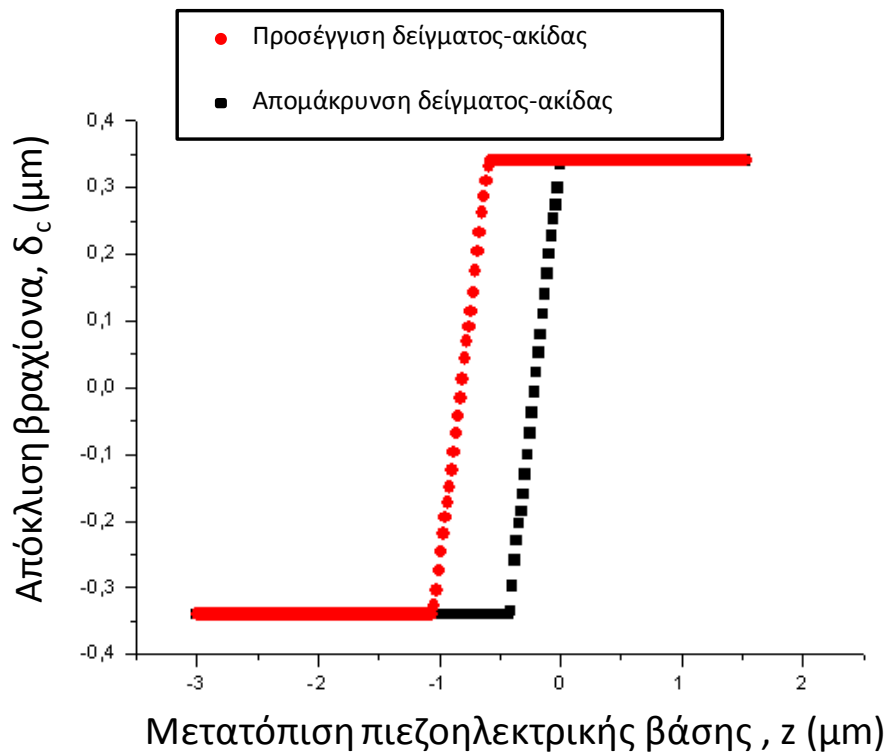
Η μέτρηση του μέτρου ελαστικότητας (Young modulus) δεν είναι μια άμεση διαδικασία αλλά προϋποθέτει επεξεργασία των διαγραμμάτων απόκλισης (δύναμης)-απόστασης για το λιπόσωμα αλλά και για την επιφάνεια της μίκας χωρίς κάποιο δείγμα επάνω και βασίζεται στη θεωρία επαφή του Hertz (Laney et al., 1997). Αρχικά λοιπόν μελετάται η επιφάνεια της μίκας και εξάγεται το διάγραμμα απόκλισης (D)-απόστασης (Z) για αυτήν με λειτουργία contact. Για μια σκληρή επιφάνεια όπως η μίκα, η κλίση της καμπύλης στην περιοχή επαφής (contact), όπου ο βραχίονας αποκλίνει από το δείγμα, είναι στην ιδανική περίπτωση ίση με τη μονάδα. Επομένως το διάγραμμα αυτό χρησιμοποιείται ως αναφορά για το αντίστοιχο του δείγματος που μελετάται.

Στη συνέχεια με τη χρήση μιας μικροπιπέτας, τοποθετείται μια μικρή ποσότητα λιποσωμάτων πάνω στην επιφάνεια μιας μίκας. Τα λιποσώματα προσροφούνται πάνω στην επιφάνεια της υδρόφιλης μίκας και παραμένουν ακινητοποιημένα καθώς αυτή ξεπλένεται με καθαρό νερό. Αυτό σημαίνει ότι επηρεάζεται η μορφολογία τους, όπως επίσης επηρεάζεται και από την εφαρμοζόμενη δύναμη από την ακίδα του AFM. Με λειτουργία contact εξάγεται το διάγραμμα απόκλισης της ακίδος, δ_c -μετατόπισης, z , του πιεζοηλεκτρικού, για το λιπόσωμα (σχήμα 5.4), το οποίο για μια μαλακή επιφάνεια όπως αυτή μιας μεμβράνης λιποσώματος, διαφέρει ως προς αυτό μιας σκληρής επιφάνειας.

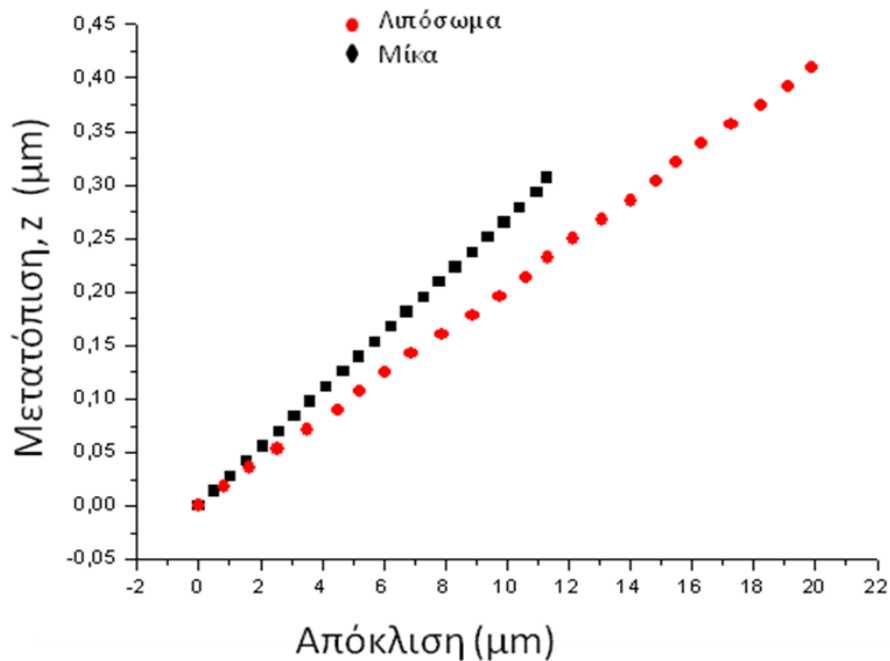


Σχήμα 5.3: Εικόνα ενός λιποσώματος μέσω AFM. Φαίνεται ότι το σχήμα του είναι ελλειψοειδές αλλά σε αυτό μπορεί να έχει επηρεάσει και η προσρόφηση του από την επιφάνεια της μίκας όπου είναι τοποθετημένο.

Για τον υπολογισμό του μέτρου ελαστικότητας αυτό που χρειάζεται από τα παραπάνω διαγράμματα είναι ο κλάδος της καμπύλης προσέγγισης (η καμπύλη στο σχήμα 5.4 που αποτελείται από τους κόκκινους κύκλους) και από αυτόν η περιοχή επαφής, που ξεκινάει από το επίπεδο μηδενικής δύναμης και σταματάει στην χαμηλότερη τιμή της απόστασης z (Salerno et al., 2006) (σχήμα 5.5). Από αυτό το διάγραμμα μπορεί τώρα να μετρηθεί η παραμόρφωση του δείγματος, δ_s , ως η διαφορά των τιμών της μετατόπισης z , για το λιπόσωμα και των αντίστοιχων τιμών για την μίκα για την ίδια απόκλιση, δ_c . Όπως ειπώθηκε προηγουμένως, αν πολλαπλασιαστεί η απόκλιση δ_c με τη σταθερά ελατηρίου του βραχίονα, k_c , προκύπτει η δύναμη F που αντιστοιχεί σε μια τέτοια απόκλιση και επομένως στο διάγραμμα του σχήματος 5.4, μπορεί κανείς να αντικαταστήσει την απόκλιση με την δύναμη.



Σχήμα 5.4: Διάγραμμα μετατόπισης, z , - απόκλισης, δ_c , για ένα λιπόσωμα για έναν ολόκληρο κύκλο, κατά την προσέγγιση της πιεζοηλεκτρικής βάσης (άρα του δείγματος) στην ακίδα (κόκκινοι κύκλοι) και καθώς αυτό απομακρύνεται από αυτήν (μαύρα τετράγωνα).



Σχήμα 5.5 : Διάγραμμα απόκλισης, δ_c – μετατόπισης, z , για την μίκα (μαύροι ρόμβοι) και για το λιπόσωμα (κόκκινοι κύκλοι). Από τις διαφορές στις τιμές μεταξύ των δυο προκύπτει η παραμόρφωση (indentation), δ_c του λιποσώματος από την ακίδα.

Θεωρώντας ότι η ακίδα είναι παραβολικού σχήματος και σύμφωνα με τα εκτεταμένα μοντέλα επαφής (μηχανικά μοντέλα για όταν δυο επιφάνειες έρχονται σε επαφή βασισμένα στο αντίστοιχο μοντέλο του Hertz(1881)) ισχύουν οι εξής σχέσεις (Salerno et al., 2006):

$$\delta_s = aF^b \quad 5.1$$

$$b = 0.67 \quad a = \left(\frac{3}{4E^*r^{1/2}}\right)^{2/3} \quad 5.2$$

E^* είναι το ανηγμένο μέτρο ελαστικότητας και δίνεται από τον τύπο:

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1-\nu_t^2}{E_t} + \frac{1-\nu_s^2}{E_s}, \quad 0 < \nu_{s,t} < 0.5 \quad 5.3$$

όπου E_t , E_s είναι τα μέτρα ελαστικότητας της ακίδας και του δείγματος αντίστοιχα και ν_s , ν_t οι σταθερές Poisson. Στην περίπτωση που $E_t \gg E_s$, όπως και εδώ η σχέση 5.2 γιανεται : $E_s \approx (1-\nu_s^2)E^*$. Από τις σχέσεις 5.1 και 5.2 και με $b=0.67 \approx 2/3$, προκύπτει ότι:

$$F = \frac{4}{3}E^*r^{1/2} \cdot \delta_s^{3/2} \quad 5.4$$

Προηγουμένως υπολογίστηκε το δ_s από το διάγραμμα του σχήματος 1.5, και είναι επίσης γνωστή η δύναμη F οπότε μπορεί να υπολογιστεί το διάγραμμα $F-\delta_s^{3/2}$ (σχήμα 5.6) από το οποίο προκύπτει η κλίσης της καμπύλης η οποία ισούται με

$$\text{Κλίση} = (4/3) \cdot E^*r^{1/2} \quad 5.5$$

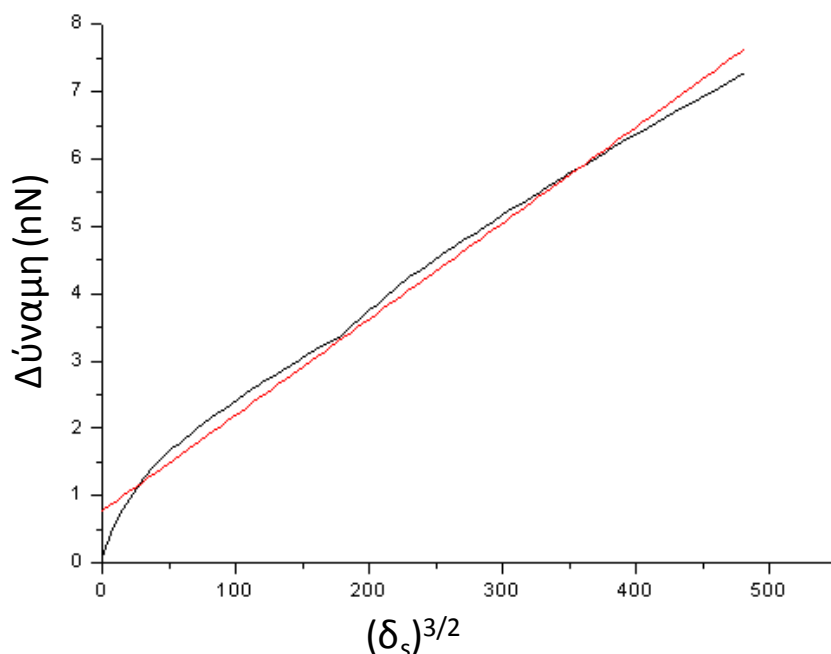
Από την βιβλιογραφία $\nu_s=0.5$ ενώ η ακτίνα καμπυλότητας της ακίδας είναι $r \approx 25 \text{ nm}$. Στη συνέχεια γνωρίζοντας την κλίση υπολογίζεται το E^* από την σχέση 5.5 και επομένως από την σχέση 5.3 και με την προσέγγιση $E_s \ll E_t$ υπολογίζεται το μέτρο ελαστικότητας του λιποσώματος E_s . Πραγματοποιώντας τα παραπάνω βήματα το μέτρο ελαστικότητας για λιποσώματα διαστάσεων 1-2 μm μετρήθηκε ίσο με 1.58 MPa.

Ως γνωστό για το μέτρο κάμψης κ ισχύει (Evans 1974):

$$\kappa = \frac{E_s h^3}{12(1-\nu_s^2)} \quad 5.6$$

όπου $h=3.5 \text{ nm}$ το πάχος της μεμβράνης του λιποσώματος. Συνεπώς γνωρίζοντας το μέτρο ελαστικότητας μπορεί να υπολογιστεί και το μέτρο κάμψης κ . Με αυτό τον

τρόπο το μέτρο κάμψης για τα MB λιποσώματα διαστάσεων 1-2 μm υπολογίστηκε ίσο με 0.71 piconergs.



Σχήμα 5.6: Διάγραμμα δύναμης, F , ως προς την παραμόρφωση, $(\delta_s)^{3/2}$ (μαύρη καμπύλη). Η κόκκινη ευθεία είναι η καμπύλη προσομοίωσης και από την κλίση της υπολογίζεται η αριθμητική ποσότητα της εξίσωσης 1.5, και στην συνέχεια το μέτρο ελαστικότητας E_s .

Στο κεφάλαιο 4 μετρήθηκε το μέτρο κάμψης με τη μέθοδο της οπτικής παγίδας για λιποσώματα με διάμετρο 4 και 5 μm με την τεχνική της οπτικής παγίδας γραμμής και βρέθηκε ίσο με 2.56 και 4.45 piconergs αντίστοιχα. Γενικά αναμένεται τα μικρότερα λιποσώματα να έχουν μεγαλύτερο μέτρο κάμψης (Laney et al., 1997-Lin et al., 2011). Συγκρίνοντας το κ ενός λιποσώματος με διάμετρο περίπου 1.5 μm όπως υπολογίστηκε μέσω του AFM και αυτό για τα μεγαλύτερα λιποσώματα όπως υπολογίστηκε μέσω της οπτικής παγίδας γραμμής βλέπει κανείς ότι δεν προκύπτει το αναμενόμενο αποτέλεσμα. Όμως μια ευθεία σύγκριση των μετρήσεων μέσω AFM και αυτών μέσω οπτικής παγίδας γραμμής δεν είναι ίσως εφικτή, γιατί πρόκειται για δυο διαφορετικές τεχνικές (Laney et al., 1997-Niegemann et al., 1995). Σε κάθε περίπτωση η τιμή που προέκυψε για το μέτρο κάμψης ταιριάζει με τις τάξεις μεγέθους που υπάρχουν στην βιβλιογραφία (Dimova et al., 2006-Liang et al., 2004).

Επίσης διαφορετικά είναι και τα μηχανικά μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν στην εκάστοτε περίπτωση για να εξαχθούν οι τιμές για το μέτρο κάμψης. Σύμφωνα με τους Dalome και Fery (2006) οι υπολογισμοί που βασίζονται στο μοντέλο επαφής του Hertz υποτιμούν το μέτρο ελαστικότητας και άρα και το μέτρο κάμψης. Ο Liang και οι συνεργάτες του (2004a) υπολόγισαν το μέτρο κάμψης SUV EggPC λιποσωμάτων μέσω του μέτρου ελαστικότητας με την χρήση AFM και βρήκαν ότι ισούται με 0.21 pN·m, μια τιμή που είναι σχετικά χαμηλή σε σύγκριση με άλλες αναφορές όπου έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικοί μέθοδοι. Έχει παρατηρηθεί γενικά ότι οι τιμές του μέτρου κάμψης που προκύπτουν από μετρήσεις με AFM είναι χαμηλότερες από αυτές που προκύπτουν με άλλες τεχνικές (Liang et al., 2004a-Mensah et al., 2008)

Ένας παράγοντας που επηρεάζει την μέτρηση με την τεχνική του AFM είναι το σχήμα της ακίδας, η ακτίνα της ή ακόμη η σταθερά ελατηρίου του βραχίονα και αυτά με τη σειρά τους επηρεάζουν την καμπύλη δύναμης-indentation και άρα και τις τιμές για την ελαστικότητα (Laney et al., 1997-Mensah et al., 2008). Επιπρόσθετα διαφέρει και το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται τα λιποσώματα, στην παγίδα γραμμής αιωρούνται σε υδάτινο διάλυμα εωσότου παγιδευτούν ενώ στο AFM επικάθονται στην μίκα και βρίσκονται σε ξηρό περιβάλλον.

5.4 Μέτρηση ελαστικότητας σε λιποσώματα συνδεδεμένα με υπερδιακλαδικά πολυμερή.

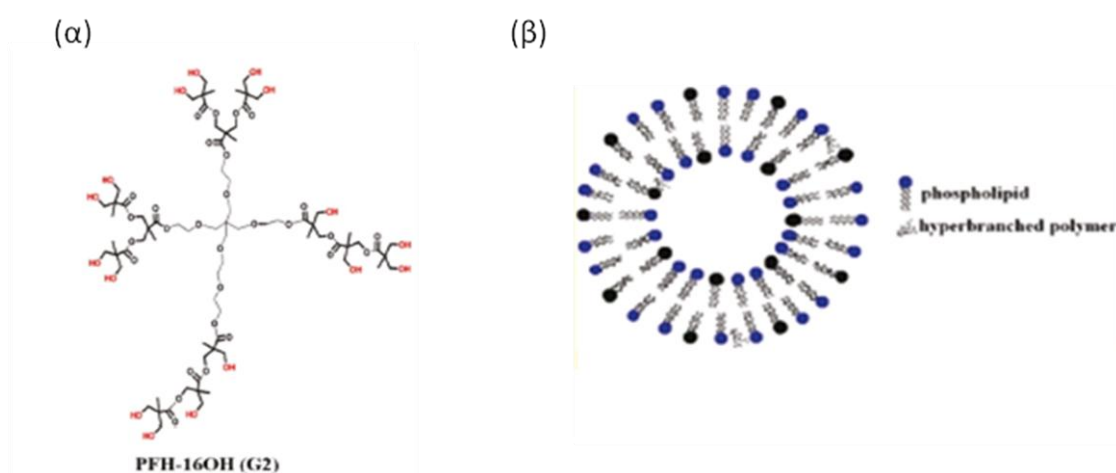
Η ολοένα αναπτυσσόμενη έρευνα για την δημιουργία αποτελεσματικών συστημάτων για την αποτελεσματική και στοχευμένη κατανομή φαρμάκων στον ανθρώπινο οργανισμό, έχει οδηγήσει στην δημιουργία των αναπτυγμένων νανο-συστημάτων μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών (advanced Drug Delivery nanoSystems, aDDnS). Μια σχετικά πρόσφατη εξέλιξη σε αυτό το πεδίο είναι τα aDDnS που συνδυάζουν τα λιποσώματα με δενδριτικά πολυμερή (δενδριμερή), τα οποία έχουν μελετηθεί και μεμονωμένα ως φορείς τέτοιων ουσιών. Αυτά τα πολυμερή χαρακτηρίζονται από διαδοχικές διακλαδώσεις και λαμβάνονται από δραστικά μονομερή υπό περισσότερο ή λιγότερο αυστηρές συνθήκες ελεγχόμενου πολυμερισμού.

Τα υπερδιακλαδικά πολυμερή (HyperBranched Polymers, HBPs) είναι μια υποκατηγορία των δενδριτικών πολυμερών και χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό διακλαδώσεων, τρισδιάστατη αρχιτεκτονική και πολλαπλές τερματικές λειτουργικές ομάδες. Η παρασκευή τους προκύπτει από αντιδράσεις ενός βήματος μέσω στατιστικού πολυμερισμού μονομερών τύπου AB_x με τη μέθοδο της συμπύκνωσης ή προσθετικών διαδικασιών, καθιστώντας τα ως προϊόντα χαμηλού κόστους, εύκολα στην παραγωγή και μεγάλης λειτουργικότητας (Mourelatou et al., 2010).

Στο τμήμα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών χρησιμοποιήθηκαν HBPs αλειφατικοί πολυεστέρες (PFH-16OH) χρησιμοποιώντας 2,2-διμεθυλολπροπιονικό οξύ ως μονομερές και μια πολυόλη (epoxyated pentaerythritol) ως πυρήνα, ώστε να συμπεριληφθούν στην παρασκευή των λιποσωμάτων (σχήμα 5.7). Τα νανοσωματίδια αυτά έχουν πολλαπλές τερματικές υδροξυλικές ομάδες, οι οποίες διευκολύνουν την αλληλεπίδραση τους με άλλες ομάδες δεκτών μέσω δεσμών υδρογόνου. Για τον σχηματισμό λιποσωμάτων με τη μέθοδο της ενυδάτωσης λεπτού υμενίου (TFM), χρησιμοποιήθηκε διστεροολφωσφατιδυλοχολίνη (distearoylphosphatidylcholine, DSPC) και διπαλμιτολ-φωσφατιδυλγλυκερόλη (dipalmitoylphosphatidylglycerol, DPPG). Στη συνέχεια δημιουργήθηκαν LUVs με την εξώθηση τους διαμέσου μιας πολυανθρακικής μεμβράνης με πόρους διαμέτρου 400 και 100 nm υπό πίεση (Mourelatou et al., 2010). Πριν τον σχηματισμό του λεπτού υμενίου, στο διάλυμα των λιπιδίων προστέθηκε ένα ποσοστό διαλύματος HBPs ώστε αυτά να ενσωματωθούν στα λιποσώματα. Από την μελέτη που κάνανε η Μουρελάτου και οι συνεργάτες της (2010) φαίνεται ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των HBPs και των φωσφολιπιδίων λαμβάνει χώρα στις πολικές κεφαλές, όπου η ενσωμάτωση των πολυμερών έχει ως αποτέλεσμα την ενυδάτωση των πολικών ομάδων και την μείωση της κινητικότητας τους.

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η μορφολογία και η ελαστικότητα λιποσωμάτων DSPC/DPPG 9:1, και αυτών συνδεδεμένων με υπερδιακλαδικά πολυμερή, DSPC/DPPG 9:1 PFH-16OH, μέσω της τεχνικής του AFM. Αρχικά πάρθηκαν εικόνες των παραπάνω με contact mode και με ακίδα σιλικόνης με (n) προσμίξεις φωσφόρου και τυπική σταθερά ελατηρίου 0.02N/m. Η ταχύτητα σάρωσης βελτιστοποιήθηκε μεταξύ 1.0 HZ και 2 H.Z, ανάλογα με το μέγεθος της σαρώμενης επιφάνειας. Στα σχήματα 5.8 και 5.9 φαίνονται οι εικόνες που προέκυψαν για τα

DSPC/DPPG 9:1 και DSPC/DPPG 9:1 PFH-16OH λιποσώματα αντίστοιχα και παρατηρείται ότι παρουσιάζουν διαφορετική μορφολογία. Τα DSPC/DPPG 9:1 απεικονίζονται με σφαιρικό κοίλο σχήμα, ενώ τα DSPC/DPPG 9:1 PFH-16OH απεικονίζονται ως δομές κοίλου σχήματος με πεπιεσμένο κέντρο και υπερυψωμένη περιφέρεια (σχήμα ντόνατς, pancake-like).



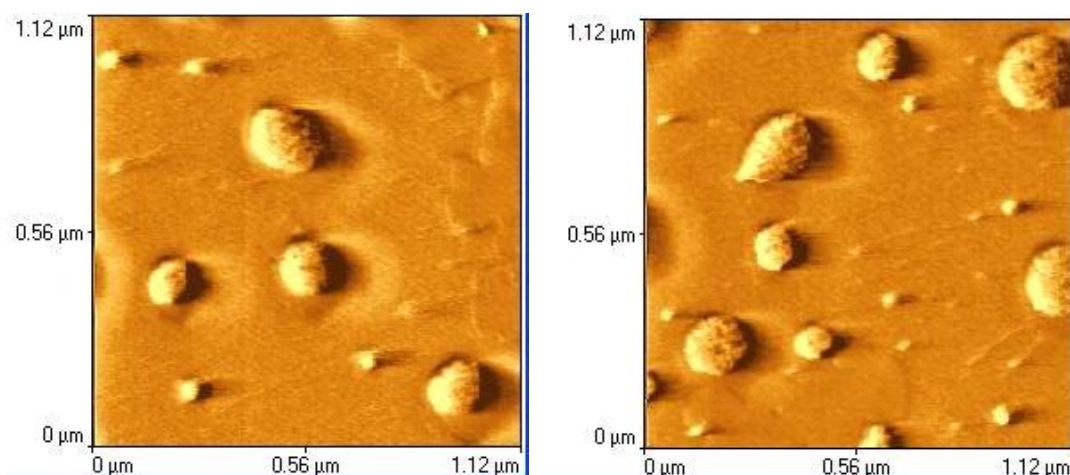
Σχήμα 5.7: Αριστερά (α) απεικονίζεται ένα αλειφατικός πολυεστέρας δεύτερης γενιάς ο οποίος περιέχει 16 υδροξυλικές ομάδες, ενώ δεξιά (β) είναι μια σχηματική αναπαράσταση ενός λιποσώματος στο οποίο έχουν προσδεθεί υπερδιακλαδικά πολυμερή. (Η εικόνες είναι από Mourelatou et al., 2010)

Επιπλέον, με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε στην προηγούμενη ενότητα, υπολογίστηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες δύναμης (F)-παραμόρφωσης ($\delta_s^{3/2}$) (σχήμα 1.10 και 1.11), και από την κλίση της εκάστοτε καμπύλης υπολογίστηκαν οι τιμές του μέτρου ελαστικότητας, οι οποίες παρατίθενται στον πίνακα 2. Από την σύγκριση της ελαστικότητας των DSPC/DPPG λιποσωμάτων με και χωρίς υπερδιακλαδικά πολυμερή, φαίνεται πως η προσθήκη των τελευταίων στη σύσταση των λιποσωμάτων συντελεί στην αύξηση της ακαμψίας τους.

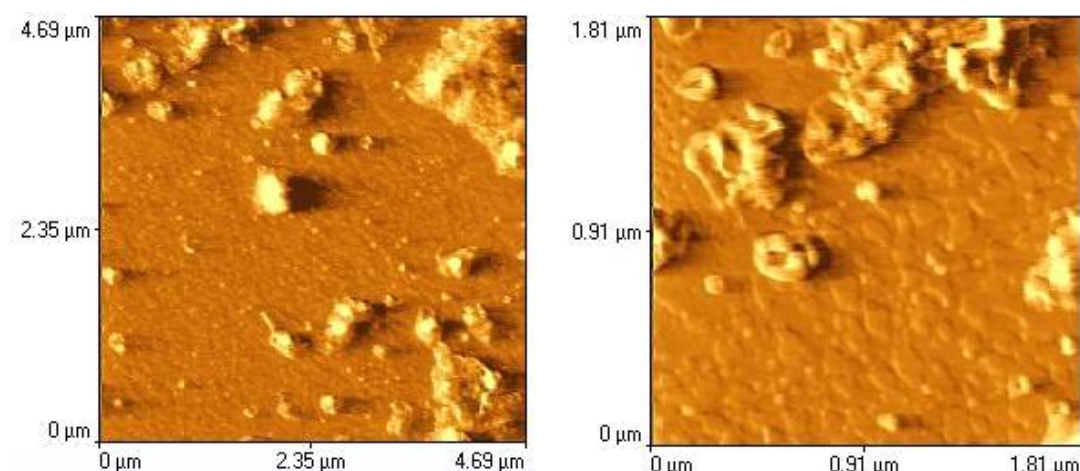
Πίνακας 2

Είδος λιποσώματος	Μέγεθος	Μέτρο ελαστικότητας (Mpa)
Egg PC	1000-2000 nm	1.58
DSPC/DPPG 9:1	≈ 200 nm	0.98
DSPC/DPPG 9:1 PFH-16OH	≈ 200 nm	1.35

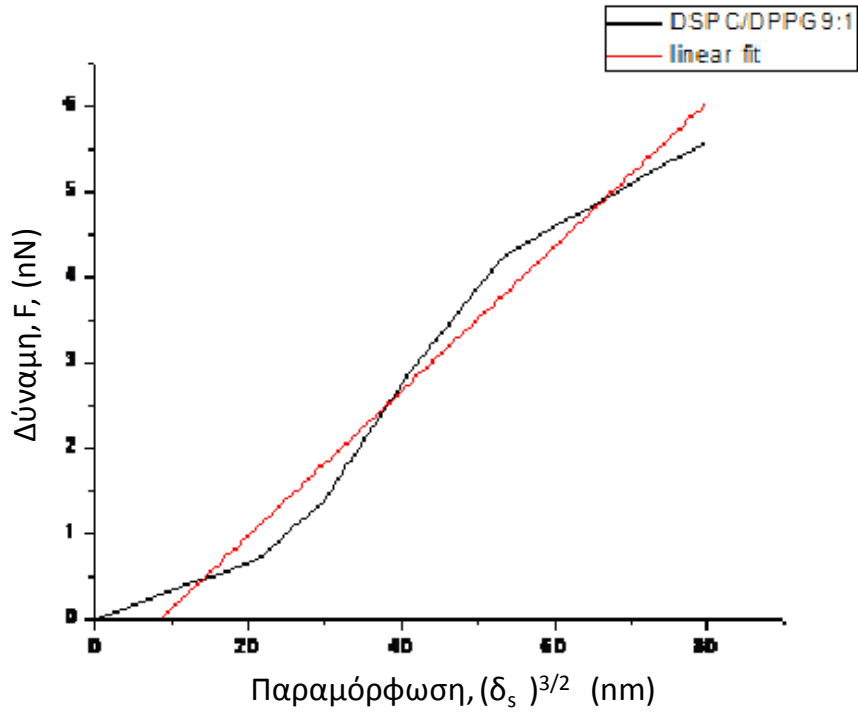
Συνοψίζοντας, με τη τεχνική της μικροσκοπίας ατομικών δυνάμεων μπορεί να κανείς να μελετήσει την μορφολογία των διαφόρων νανοσωματιδίων που χρησιμοποιούνται ως φορείς φαρμακευτικών ουσιών, αλλά και να μετρήσει την ελαστικότητα τους. Αυτό καθιστά αυτή τη τεχνική ένα πολύ χρήσιμο και αποτελεσματικό εργαλείο για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών των νανοσωματιδίων που είναι κρίσιμα για την λειτουργία τους ως φορείς φαρμάκων και καθορίζουν την συμπεριφορά τους στο κυκλοφορικό σύστημα. Με περαιτέρω διορθώσεις των θεωρητικών μοντέλων που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της ελαστικότητας ή με βελτιστοποιήσεις που αφορούν την επιλογή της ακίδας που χρησιμοποιείται, τα αποτελέσματα που προκύπτουν δύνανται να είναι πιο ακριβή και αξιόπιστα.



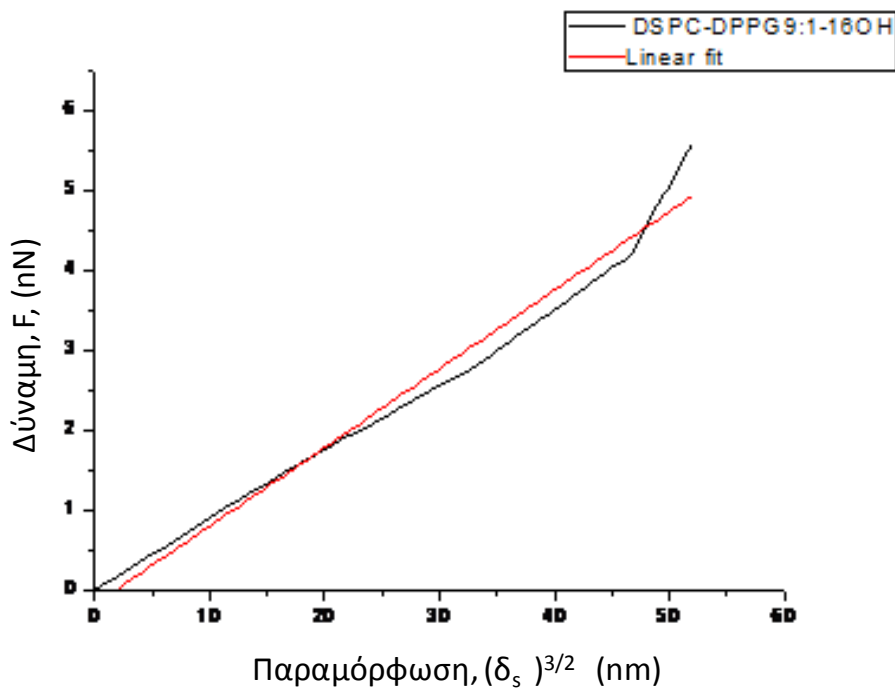
Σχήμα 5.8: Εικόνα DSPC/DPPG 9:1 λιποσωμάτων διαμέτρων περίπου 200 nm όπως αυτή αποκτήθηκε μέσω AFM.



Σχήμα 5.9: Εικόνα από DSPC/DPPG 9:1 HFP-16OH λιποσωμάτων με ενσωματωμένα υπερδιακλαδικά πολυμερή. Δεξιά φαίνεται μια εικόνα του δείγματος σε μεγαλύτερη ανάλυση.



Σχήμα 5.10: Διάγραμμα δύναμης- παραμόρφωσης (μαύρη καμπύλη) και η γραμμική προσέγγιση της, (κόκκινη ευθεία γραμμή) για DSPC/DPPG 9:1 λιποσώματα.



Σχήμα 5.11: Διάγραμμα δύναμης-παραμόρφωσης, (μαύρη καμπύλη) και γραμμική προσέγγιση της, (κόκκινη ευθεία καμπύλη) για λιποσώματα με υπερδιακλαδικά πολυμερή, DSPC/DPPG 9:1-16OH.

Βιβλιογραφία

- Addae-Mensah, K. A. and Wikswo, J. P., “Measurement techniques for cellular biomechanics in vitro”, *Exp. Biol. Med.* 233, 792-809, (2008).
- Arlt, J., Garces-Chavez, V., Sibbett, W. and Dholakia, K., “Optical micromanipulation using a Bessel light beam”, *Opt. Commun.* 197, 239-245, (2001).
- Ashkin, A., “Acceleration and trapping of particles by radiation pressure”, *Phys.Rev.Lett.* 24, 156-159 (1970).
- 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).
- Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Bjorkholm, J. E. and Chu, S., “Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles”, *Opt.Lett.* 11, 288-290, (1986)
- Barton, J. P, Alexander, D. R., Schaub, S. A., “Internal and nearsurface electromagnetic fields for a spherical particle irradiated by a focused laser beam”, *J.Appl.Phys.* 64, 1632-1639, (1988)
- Berndl, K., Kas, J, Lipowsky, R., Sackmann, E. and Seifert, U., “Shape transformations of giant vesicles: Extreme sensitivity to bilayer asymmetry”, *Europhys. Lett.* 13, 659-664, (1990).
- Biancaniello, P. L. and Crocker, J. C., “Line optical tweezers instrument for measuring nanoscale interactions and kinetics”, *Rev. Sci. Instrum.* 77, 113702 1-10, (2006).
- Bing-Huan, M., Jin-Hua, Z., Min-Cheng, Z., Yin-Mei, L., Jian-Guang, W. and Hong-Liang, R., “Improvement of transverse trapping efficiency of optical tweezers”, *Chin. Phys. Lett.* 25, 2300-2302, (2008).
- Block, S. M., “Optical tweezers: A new tool for biophysics”, *Noninvasive Techniques in Cell Biology*, 375-401, Wiley-Liss, New York, (1990).
- Canham, P. B, “The minimum energy of bending as a possible explanation of the bioconcave shape of the human red blood cell”, *J. Theoret. Biol.* 26, 61-81, (1970).
- Chu, S., “Laser manipulation of atoms and particles”, *Science* 253, 861-866, (1991).
- Crocker, J. C., Matteo, J. A., Dinsmore, A. D. and Yodh, A. G., “ Entropic attraction and repulsion in binary colloids probed with a line optical tweezer”, *Phys. Rev. Lett.* 82, 4352-4355, (1999).
- Dao, M., Lim, C. T. and Suresh, S., “Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers”, *J. Mech. Phys. Solids* 51, 2259-2280, (2003).

- Dasgupta, R., Ahlawat, S., Verma, R.S. and Gupta, P.K., “Optical orientation and rotation of trapped red blood cells with Laguerre-Gaussian mode”, *J. Opt. Soc. Am.* 19, 7680-7688, (2011).
- Dasgupta, R., Mohanty, S. K. and Gupta, P. K., “Controlled rotation of biological microscopic objects using optical line tweezers”, et al. 2003
- Delorme, N. and Fery, A., “Direct method to study membrane rigidity of small vesicles based on atomic force spectroscopy”, *Phys. Rev. E* 74, 030901-(1-4), (2006).
- 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).
- Dimova, R., Aranda, S., Bezlyepkina, N., Nikolov, V., Riske, K. A. and Lipowsky, R., “A practical guide to giant vesicles. Probing the membrane nanoregime via optical microscopy”, *J. Phys. Condens. Matter* 18, S1151-S1176, (2006).
- Dimova, R., Pouligny, B. and Dietrich, C., “Pretransitional Effects in Dimyristoylphosphatidylcholine vesicle membranes: optical dynamometry study”, *Biophysic. J.* 79, 340-356, (2000).
- Dimova, R., Pouligny, B. and Dietrich, C., “Pretransitional effects in dimyristoylphosphatidylcholine vesicle membranes: optical dynamometry study”, *Biophys. J.* 79, 340-356, (2000).
- Dobereiner, H.-G., Kas, J., Noppl, D., Sprenger, I. and Sackmann, E., “Budding and fission of vesicles”, *Biophys. J.* 65, 1396-1403, (1993).
- Duwe, H. P. and Sackmann, E., “Bending elasticity and thermal excitations of lipid bilayer vesicles: modulation by solutes”, *Physica A* 163, 410-428, (1990).
- Evans, E. A., “Bending resistance and chemically induced moments in membrane bilayers”, *Biophys. J.* 14, 923-931, (1974).
- Evans, E. A., “New membrane concept applied to the analysis of fluid shear-and micropipette-deformed red blood cells”, *Biophys. J.* 13, 941-954, (1973).
- Evans, E. and Rawicz, W., “Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes”, *Phys. Rev. Lett.* 17, 2094-2097, (1990).
- Fuhr, G., Schnelle, Th., Muller, T., Hitzler, H., Monajembashi, S. and Greulich, K.-O., “Force measurements of optical tweezers in electro-optical cages”, *Appl. Phys. A* 67, 385-390, (1998).
- Ganic, D., Gan, X., Gu, M., “Exact radiation trapping force calculation based on vectorial diffraction theory”, *J. Opt. Soc. Am.* 12, (2004)
- Ghislain, L. C., Switz, N. A. and Webb, W. W., “Measurement of small forces using an optical trap”, *Rev. Sci. Instrum.* 65, 2762-2768, (1994).
- Goater, A. D. and Pethig, R., “Electrorotation and dielectrophoresis”, *Parasitology* 117, S177-S189, (1998).
- 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)
- Grier, D. G., “A revolution in optical manipulation”, *Nature* 424, 21-27, (2003).
- Griffiths, D. J., “Εισαγωγή στην Ηλεκτροδυναμική, τόμος ΙΙ”, μτφ. Αρβανιτήδης Σ. και Λαυρέντζος Α., Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Κρήτη, (2004 [1989]).

- Helfer, E., Harlepp, S., Bourdieu, L., Robert, J., MacKintosh, C. and Chatenay, D., “Viscoelastic properties of actin-coated membranes” *Phys. Rev. E* 63, 021904- (1-13), (2001).
- Helfrich, W., “Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments”, *Z. Naturforsch* 28c, 693-703, (1973).
- Henon, S., Lenormand, G., Richert, A. and Gallet, F., “A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers”, *Biophys. J.* 76, 1145-1151, (1999).
- Hochmuth, R. M. and Waugh, R. E., “Erythrocyte membrane elasticity and viscosity”, *Annu. Rev. Physiol.* 49, 209-219, (1987).
- Huang, C.-H., “Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics”, *Biochemistry* 8, 344-352, (1969).
- Kachynski, A. V., Kuzmin, A. N., Pudavar, H. E., Kaputa, D. S., Cartwright, A. N. and Prasad, P. N., “Measurement of optical trapping forces by use of the two-photon-excited fluorescence of microspheres”, *Opt. Lett.* 28, 2288-2290, (2003).
- Kahn, M., Sood, A. K., Mohanty, S. K., Gupta, P. K., Arabale, G. V., Vijaymohan and Rao, C. N. R., “Optical trapping and transportation of carbon nanotubes made easy by decorating with palladium”, *Opt. Express* 14, 424-429, (2006).
- Kaler, K. V. I. S. and Jones, T. B., “Dielectrophoretic spectra of single cells determined by feedback-controlled levitation”, *Biophys. J.* 57, 173-182, (1990).
- Kumrow, M. and Helfrich, W., “Deformation of giant lipid vesicles by electric fields”, *Phys. Rev. A* 44, 8356-8360, (1991).
- Kuntsche, J., Freisleben, I. Steiniger, F. and Fahr, A., “Temoporfin-loaded liposomes: Physicochemical characterization”, *Eur. J. Pharm. Sci.* 40, 305-315, (2010).
- Laney, D. E., Garcia, R. A., Parsons, S. M. and Hansma, H. G., “Changes in the elastic properties of cholinergic synaptic vesicles as measured by atomic force microscopy”, *Biophys. J.* 72, 806-813, (1997).
- Lasic, D. D., “Novel applications of liposomes”, *Trends Biotechnol.* 16, 307-321, (1998).
- 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).
- Lee, C.-H., Lin, W.-C. and Wang, J., “Measuring the bending rigidity of giant unilamellar liposomes with differential confocal microscopy”, *CLEO*, 1-3, (1999).
- Liang, X., Mao, G. and Ng, K. Y. S., “Probing small unilamellar EggPC vesicles on mica surface by atomic force microscopy”, *Colloid Surface B* 34, 41-51, (2004)b.
- Liang, X., Mao, G. and Ng, S. K. Y., “Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy”, *J. Colloid Interf. Sci.* 278, 53-62, (2004)a.
- Lin, C.-M., Li, C.-S., Sheng, Y.-J., Wu, D. T. and Tsao, H.-K., “Size-dependent properties of small unilamellar vesicles formed by model lipids”, *Langmuir* 28, 689-700, (2011).
- Malagnino, N., Pesce, G., Sasso, A. and Arimondo, E., “Measurements of trapping efficiency and stiffness in optical tweezers”, *Opt. Commun.* 214, 15-24, (2002).

- 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).
- Miao, L., Seifert, U., Wortis, M. and Dobereiner, H.-G., “Budding transitions of fluid-bilayer vesicles: the effect of area-difference elasticity”, *Phys. Rev. E* 49, 5389-5407, (1994).
- Miles, R. B, Lempert, W. R. and Forkey, J. N, “Laser Rayleigh scattering”, *Meas. Sci. Technol.* 12, 33-51, (2001).
- Mohanty, S. K. and Gupta, P. K., “Transport of microscopic objects using asymmetric transverse optical gradient force”, *Appl. Phys. B* 81, 159-162, (2005)
- Molloy, J. E. and Padgett, M., “Lights, action: optical tweezers”, *Contemp. Phys.* 43, 241-258, (2002).
- Mourelatou, E. A., Libster, D., Nir, I., Hatziantoniou, S., Aserin, A., Garti, N. and Demetzos, C., “Type and location of interaction between hyperbranched polymers and liposomes. Relevance to design of a potentially advanced drug delivery nanosystem (aDDnS)”, *J. Phys. Chem. B* 3b2, A-I, (2011).
- Mutz, M. and Helfrich, W., “Bending rigidities of some biological model membranes as obtained from the Fourier analysis of contour sections”, *J. Phys. France* 51, 991-1002, (1990).
- Nahmias, Y. K., Odde, D. J., “Analysis of radiation forces in laser trapping and laser-guided-direct writing applications”, *IEEE J. Quantum Electron.* 38, 131-141, (2002).
- Nambiar, R. and Meiners, J. C., “Fast position measurements with scanning line optical tweezers”, *Opt. Lett.* 27, 836-838, (2002).
- Nambiar, R., Gajraj, A. and Meiners, J. C., “All optical constant-force laser tweezers”, *Biophys. J.* 87, 1972-1980, (2004).
- Needham, D. and Evans, E., “Structure and mechanical properties of giant lipid (DMPC) vesicle bilayers from 20 °C below to 10 °C above the liquid crystal-crystalline phase transition at 24 °C”, *Biochemistry* 27, 8261-8269, (1988).
- Neumann, K. C. and Block, S., “Optical trapping”, *Rev. Sci. Instrum.* 75, 2787-2809, (2004).
- Niegemann, G., Kummrow, M. and Helfrich, W., “The bending rigidity of phosphatidylcholine bilayers: dependence on experimental method, sample cell sealing and temperature”, *J. Phys. France* 5, 413-425, (1995).
- Nieminen, T. A., Knoner, G., Heckenberg, N. R. and Rubinsztein-Dunlop, H., “Physics of Optical Tweezers”, *Methods Cell Biol.* 82, 207-236, (2007).
- Papagiakoumou, E., Pietreanu, D., Makropoulou, M., Kovacs, E. and Serafetinides, A. A., “Evaluation of trapping efficiency of optical tweezers by dielectrophoresis”, *J. Biomed. Opt.* 11, 014035-014042, (2006).
- Paterson, L., MacDonald, M.P., Arlt, J., Sibbett, W., Bryant, P.E. and Dholakia, K., “Controlled rotation of optically-trapped microscopic particles”, *Science* 292, 912-914, (2001).
- Pethig, R. and Markx, G. H., “ Applications of dielectrophoresis in biotechnology”, *Trends Biotechnol.* 15, 426-432, (1997).
- Popescu, G., Ikeda, T., Goda, K., Best-Popescu, C. A., Laposata, M., Manley, S., Dasari, R. R., Badizadegan, K. and Feld, M. S., “Optical measurement of cell membrane tension”, *Phys. Rev. Lett.* 97, 218101- (1-4), (2006).
- Rawicz, W., Olbrich, K. C., McIntosh, T., Needham, D. and Evans, E., “Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers”, *Biophys. J.* 79, 328-339, (2000).

- Ren, K. F., Greha, G. and Gouesbet, G., “Radiation pressure forces exerted on a particle arbitrarily located in a Gaussian beam by using the generalized Lorenz-Mie theory, and associated resonance effects”, *Opt. Commun.* 108, 343-354, (1994).
- Rochal, S. B., Lorman, V. L. and Mennessier, G., “Viscoelastic dynamics of spherical composite vesicles”, *Phys. Rev. E* 71, 021905-(1-13), (2005).
- 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).
- Roosen, G. and Imbert, C., “Optical levitation by means of two horizontal laser beams: a theoretical and experimental study”, *Phys.Lett.* 59A, 6-8, (1976).
- Salerno, M. and Bykov, I., “Tutorial: mapping adhesion forces and calculating elasticity in contact-mode AFM”, *Microscopy and Analysis* 20, S5-S8, (2006).
- Sato, S., Ishigure, M. and Inaba, H., “Optical trapping and rotational manipulation of microscopic particles and biological cells using higher-order mode Nd:YAG laser beams”, *Electron. Lett.* 27, 1831 (1991).
- Seifert, U. and Lipowsky, R., “Morphology of vesicles” *Handbook of Biological Physics Volume I* Chapter 8, 403-462, *Elsevier Science*, (1995).
- 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).
- Simpson, N. B., McGloin, D., Dholakia, K., Allen, L. and Padgett, M. J., “Optical tweezers with increased axial trapping efficiency”, *J. Mod. Optic.* 45, 1943-1949, (1998).
- Sleep, J., Wilson, D., Simmons, R. and Gratzer, W., “Elasticity of the red cell membrane and its relation to hemolytic disorders: an optical tweezers study”, *Biophys. J.* 77, 3085-3095, (1999).
- Smith, S. P., Bhalotra, S. R., Brody, A. L., Brown, B. L., Boyda, E. K. and Prentiss, M., “Inexpensive optical tweezers for undergraduate laboratories”, *Am. J. Phys.* 67, 26-35, (1999).
- Spyratou, E., Mourelatou, E., Georgopoulous, A., Demetzos, C., Makropoulou, M. and Serafetinides, A. A., “Line optical tweezers : A tool to investigate stained liposomes transformations and to determine shear modulus”, *Colloid Surf. A* 349, 35-42, (2009).
- Stoicheva, N. G. and Hui, S. W., “Dielectrophoresis of cell-size liposomes”, *Biochim. Biophys. Acta* 1195, 39-44, (1994).
- Svetina, S. and Zeks, B., “Membrane bending energy and shape determination of phospholipid vesicles and red cell blood cells”, *Eur. Biophys. J.* 17, 101-111, (1989).
- Svoboda, K. and Block, S. M., “Biological applications of optical forces”, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23, 247-285, (1994).
- Tang, W., Xu, H., Kopelman, R. and Philbert, M. A., “Photodynamic characterization and in vitro application of methylene blue-containing nanoparticle platforms” *Photochem. Photobiol.* 81, 242-249, (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).
- Wang, M. D., Schnitzer, M. J., Yin, H., Landick, R., Gelles, J. and Block, S. M., “Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase”, *Science* 282, 902-907, (1998).

- Wang, X., Wang, X.-B. and Gascoyne, P. R. C., “General expressions for dielectrophoretic force and electrorotational torque derived using the Maxwell stress tensor method”, *J. Electrostatics* 39, 277-295, (1997).
- Waugh, R. and Evans, E. A., “Thermoelasticity of red blood cell membrane”, *Biophys. J.* 26, 115-132, (1979).
- Zeballos, N. C. L., Garcia Vior, M. C., Awruch, J. and Dicelio, L. E., “An exhaustive study of novel sulfur-linked adamantane tetrasubstituted zinc(II) phthalocyanine incorporated into liposomes”, *J. Photochem. Photobiol. A* 235, 7-13, (2012).
- Δάσιος, Κ. και Κυριάκη, Κ., “Μερικές Διαφορικές Εξισώσεις”, Αθήνα, (1994).
- Παπαγιάκουμου, Ε., “Διερεύνηση των φυσικών χαρακτηριστικών και του τρόπου διάδοσης σύμφωνης ακτινοβολίας για την κατανόηση των βασικών μηχανισμών οπτικής παγίδευσης”, Διδακτορική Διατριβή, τμήμα Φυσικής της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών του Ε.Μ.Π., Αθήνα (2005).
- Σπυράτου, Ε., “ Φωτο-βιοφυσικές εφαρμογές των laser και ανάπτυξη μεθοδολογίας μικροχειρισμού νανοσωματιδίων με χρήση οπτικής παγίδας laser”, Διδακτορική Διατριβή, τμήμα Φυσικής της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών του Ε.Μ.Π., Αθήνα (2010).