



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΔΥΤΙΚΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΟΠΤΙΚΗΣ & ΟΠΤΟΜΕΤΡΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Οπτικές λαβίδες: Θεωρία και εφαρμογές με έμφαση στη βιολογία

**Κόντου Βασιλική
Τσατσούρη Κωνσταντίνα**

**Δρ. Θανόπουλος Ιωάννης
Φυσικός Επίκουρος Καθηγητής**

Αίγιο, Ιούνιος 2015

Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η πτυχιακή αυτή εργασία αποτελεί την κορύφωση των σπουδών μας στο ΤΕΙ Δυτικής Ελλάδας, παράρτημα Αιγίου, τμήμα Οπτικής και Οπτομετρίας και είναι εργασία βιβλιογραφικής έρευνας, που περιγράφει αναλυτικά τη θεωρητική βάση των οπτικών λαβίδων και την εφαρμογή τους στην βιολογία. Η σημασία της παρούσας εργασίας είναι πολύ μεγάλη για μας, καθώς μας μύησε σε ένα συγκεκριμένο και σπουδαίο κομμάτι του τομέα της βιολογίας και της φυσικής που μέχρι πρότινος δεν γνωρίζαμε. Μας έκανε να ενδιαφερθούμε σημαντικά για να κατανοήσουμε πλήρως τα όσα πραγματευτήκαμε.

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά τον καθηγητή κ. Ιωάννη Θανόπουλο κυρίως για την εμπιστοσύνη που μας έδειξε, και την υπομονή που έκανε κατά τη διάρκεια υλοποίησης της πτυχιακής εργασίας. Όπως επίσης για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση της και για την επίλυση διάφορων θεμάτων. Τέλος, θα θέλαμε να απευθύνουμε τις ευχαριστίες μας στους γονείς μας, οι οποίοι στήριξαν τις σπουδές μας με διάφορους τρόπους, φροντίζοντας για την καλύτερη δυνατή μόρφωση μας.

Περίληψη

Το θέμα της συγκεκριμένης εργασίας είναι οι οπτικές λαβίδες και το πώς μπορούν να εφαρμοστούν στον τομέα της βιολογίας. Σκοπός της είναι να αναλύσει το θεωρητικό υπόβαθρο αυτής της τεχνικής έτσι ώστε να γίνει κατανοητός ο τρόπος λειτουργίας της αλλά και να περιγράψει το πώς έχει βοηθήσει στην εξέλιξη της βιολογίας.

Στο πρώτο κεφάλαιο αναφέρεται ο πρώτος ερευνητής που ασχολήθηκε επιτυχημένα με την μέθοδο των οπτικών λαβίδων. Ο Ashkin, το 1970, ήταν αυτός που δημιούργησε την πρώτη οπτική παγίδα μοναδικής δέσμης, με την οποία μικρά σωματίδια μπορούν να πιαστούν και να μετακινηθούν με τη χρήση μιας ορατής ακτίνας φωτός.

Στο δεύτερο κεφάλαιο γίνεται μια σύντομη περιγραφή των λείζερ, τον τρόπο λειτουργίας τους, τα χαρακτηριστικά τους και διάφορους τύπους αυτών.

Το τρίτο κεφάλαιο ασχολείται με όλη τη θεωρία που κρύβεται πίσω από τον τρόπο λειτουργίας των οπτικών λαβίδων. Περιγράφεται η μηχανική, οι δυνάμεις που παράγονται και ο σχεδιασμός τους.

Διάφοροι εναλλακτικοί τύποι των οπτικών λαβίδων αποτελούν το τέταρτο κεφάλαιο όπου παρουσιάζεται ο τρόπος λειτουργίας τους και πώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον.

Στο πέμπτο και τελευταίο κεφάλαιο αυτής της εργασίας περιγράφονται κάποια παραδείγματα από τις εφαρμογές αυτής της τεχνικής στο πεδίο της βιολογίας. Δηλαδή το πώς έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορα κύτταρα και ποια ήταν τα αποτελέσματα.

Συμπερασματικά, οι οπτικές λαβίδες είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την παρατήρηση και χειραγώγηση μικροσκοπικών κυττάρων. Ερευνείται εδώ και πολλά χρόνια από επιστήμονες και η εξέλιξη της έχει βοηθήσει σημαντικά σε διάφορους τομείς αλλά κυρίως στην βιολογία.

Abstract

The theme of this work is the optical tweezers and how they can be applied in biology. Its purpose is to analyze the theoretical background of this technique in order to understand the mode of operation and to describe how it has helped in the development of biology.

The first chapter discusses the first researcher who dealt successfully with the method of optical tweezers. Ashkin, in 1970, was the one who created the first single beam optical trap, by which small particles can be gripped and moved by a visible light beam.

In the second chapter there is a brief description of lasers, their mode of operation, their characteristics and various types thereof.

The third chapter deals with all the theory behind the optical tweezers. It describes the mechanics, the forces produced and their design.

Several alternative types of optical tweezers compose the fourth chapter where the operating mode is shown and how they can be used in the future.

The fifth and last chapter of this work describes some examples of the applications of this technique in the field of biology. That is how they have been used in various cells and what were the results.

In conclusion, the optical tweezers is a technique that has been used for observing and manipulating microscopic cells. It has been the subject of research over many years by scientists and its development has helped significantly in various sectors but mainly in biology.

Περιεχόμενα

Πρόλογος-ευχαριστίες.....	ii
Περίληψη.....	iii
Περιεχόμενα.....	v
Εισαγωγή.....	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	
1. Ιστορία.....	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	
2. Laser.....	6
2.1 Ιστορία των λέιζερ.....	6
2.2 Αρχή λειτουργίας των λέιζερ.....	7
2.3 Ιδιότητες της ακτινοβολίας των λέιζερ.....	9
2.4 Τύποι λέιζερ.....	10
2.5 Επικινδυνότητα των λέιζερ.....	12
2.6 Εφαρμογές των λέιζερ.....	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	
3. Θεωρητικό υπόβαθρο των οπτικών λαβίδων.....	15
3.1 Θεωρητική βάση της οπτικής παγίδευσης.....	15
3.2 Η μηχανική των οπτικών λαβίδων.....	15
3.3 Οι δυνάμεις που παράγονται από τις οπτικές λαβίδες.....	15
3.3.1 Οπτικές ακτίνες.....	15
3.3.2 Ηλεκτρομαγνητικό πεδίο.....	16
3.3.3 Παγίδευση σωματιδίων υψηλού και χαμηλού δείκτη διάθλασης.....	17
3.4 Σχεδιασμός μιας οπτικής παγίδας.....	17
3.4.1 Πηγές λέιζερ που χρησιμοποιούνται.....	17
3.4.2 Πως στήνεται μια παγίδα.....	19
3.5 Το πρότυπο σύνθεσης των οπτικών λαβίδων.....	20
3.5.1 Λήψη μιας καλά εστιασμένης δέσμης.....	20
3.5.2 Τρόπος καθοδήγησης των δεσμών σε μια οπτική παγίδα.....	21
3.6 Πολλαπλές λαβίδες.....	22
3.6.1 Ταχεία σάρωση θέσεων παγίδευσης.....	22
3.6.2 Χωριστές τροχιές φωτός.....	22
3.6.3 Ολογράμματα.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	
4. Η εξέλιξη των οπτικών λαβίδων.....	24
4.1 Οπτικά κλειδιά (περιστροφή σωματιδίων κατά τη διάρκεια της παγίδευσης.....	24
4.2 Συμβολομετρικές οπτικές λαβίδες.....	26
4.3 Οπτικές λαβίδες με λειτουργίες Gaussian υψηλής τάξης και άλλες δέσμες.....	27
4.4 Χρήση διοδικών λέιζερ στις οπτικές λαβίδες.....	27
4.5 Παγίδευση μεταλλικών σωματιδίων.....	27
4.6 Μελλοντικές χρήσεις των οπτικών λαβίδων.....	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	
5. Εφαρμογές με έμφαση στη Βιολογία.....	29
5.1 Έρευνες της δυναμικής μονών μορίων.....	29
5.1.1 Μοριακές μηχανές (κινητήρες).....	29
5.2 Έρευνες στα νουκλεϊκά οξέα.....	31
5.2.1 Η μεταγραφή του DNA.....	31
5.2.2 Η διάσπαση του DNA από ένζυμα περιορισμού.....	32
5.2.3. Η μεταφορά του DNA μέσω νανοπόρων.....	33

5.2.4 Η μετάφραση του RNA σε πρωτεΐνη.....	33
5.2.5 Αναδίπλωση πρωτεΐνης.....	34
5.3 Οπτική χειραγωγήση στο κυτταρικό επίπεδο.....	35
5.3.1 Βιωσιμότητα των οπτικά χειραγωγημένων κυττάρων.....	35
5.3.2 Οπτική επέκταση των κυττάρων.....	37
5.3.3 Παγίδευση για την κυτταρική βιολογία και το μικρορροϊκό περιβάλλον.....	38
5.3.4 Η χρήση των οπτικών λαβίδων στην νανοχειρουργική.....	39
5.3.5 Κυτταρική ταξινόμηση.....	40
5.3.6 Η σχηματομόρφωση των κυττάρων και η καθοδήγηση της ανάπτυξης.....	41
5.4 Οι μηχανικές ιδιότητες της μεμβράνης των ηπατοκυττάρων πλάσματος.....	42
5.5 Χρήση οπτικών παγίδων για την αξιολόγηση των τοξικών επιδράσεων ενός αντιμικροβιακού παράγοντα σε ένα μεμονωμένο βακτηριακό κύτταρο.....	44
5.6 Παρατήρηση της περιστροφικής δυναμικής σπερματοζωαρίων με τη χρήση οπτικών λαβίδων.....	48
5.7 Άλλες μελέτες πάνω στα σπερματοζωάρια.....	53
5.8 Μελέτη των ελαστικών ιδιοτήτων λιποσωμάτων χρωσμένων με μπλε του μεθυλενίου με οπτική παγίδα γραμμής.....	53
5.9 Τεχνική βασισμένη σε μια ενιαία οπτική παγίδα για τον προσδιορισμό του πρότυπου κολύμβησης βακτηρίων.....	55
Συμπεράσματα.....	62
Βιβλιογραφία.....	63

Εισαγωγή

Το αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι οι οπτικές λαβίδες. Ειδικότερα θα μελετήσουμε ξεχωριστά το θεωρητικό υπόβαθρο αυτής της τεχνικής, το πώς έχει βοηθήσει στον τομέα της βιολογίας και στις μέρες μας αλλά και παλιότερα. Επίσης, θα αναλυθούν συνοπτικά τα λέιζερ τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές φωτός για τις οπτικές λαβίδες, όπως επίσης και άλλες εναλλακτικές τεχνικές και διάφοροι τύποι των οπτικών λαβίδων.

Από άποψη δομής, η εργασία αποτελείται από πέντε κεφάλαια. Το πρώτο κεφάλαιο αποτελεί την ιστορία των οπτικών λαβίδων για να κατανοηθεί καλύτερα η αρχή αυτής της τεχνικής και να αναφερθεί ο πρωτεργάτης και ποιοι ακόμα συνεισέφεραν στην ανάπτυξη της. Στο δεύτερο κεφάλαιο γίνεται μια αναφορά για τα λέιζερ. Πιο συγκεκριμένα, δίνεται ο ορισμός, η αρχή λειτουργίας, η ιστορία των λέιζερ και αναλύονται οι τύποι, η επικινδυνότητα, οι ιδιότητες τους και αναφέρονται επιγραμματικά κάποιες από τις εφαρμογές τους. Το τρίτο κεφάλαιο αποτελείται από τη θεωρία των οπτικών λαβίδων και επεξηγείται αναλυτικά όλο το υπόβαθρο για να κατανοηθεί πλήρως το πώς λειτουργούν οι οπτικές λαβίδες. Στο τέταρτο κεφάλαιο παρατίθενται κάποιοι εναλλακτικοί τύποι των οπτικών λαβίδων καθώς και οι μελλοντικές χρήσεις αυτών. Στο πέμπτο, παρουσιάζεται η συνεισφορά των οπτικών λαβίδων στον τομέα της βιολογίας και αναλύονται οι εφαρμογές τους. Στο τελευταίο μέρος της πτυχιακής εργασίας δίνονται τα συμπεράσματα από όλη την μελέτη και η ξένη και ελληνική βιβλιογραφία.

Τα επιστημονικά πεδία στα οποία κινείται η συγκεκριμένη εργασία είναι η βιολογία και η οπτική φυσική. Η παρούσα εργασία δεν συνεισφέρει στον τομέα της Οπτομετρίας αλλά συνεισφέρει στον τομέα της Οπτικής καθώς ασχολείται με τον τομέα της οπτικής φυσικής. Επίσης, ακόμα περισσότερο συνεισφέρει στο τομέα της βιολογίας αφού εκεί βρίσκει συχνότερα χρήση και έχει λειτουργήσει σημαντικά στην ανάπτυξη του. Το αντικείμενο της εργασίας δεν θεωρείται πρωτότυπο σαν ιδέα μιας και έχουν ασχοληθεί πολλοί επιστήμονες και έχουν διενεργηθεί πολλά πειράματα για τη συγκεκριμένη τεχνική. Παρόλα αυτά είναι πολύ ενδιαφέρουσα και δίνει στους επιστήμονες τη δυνατότητα να μπορέσουν να πιάσουν και να μελετήσουν πολύ μικρά σωματίδια χωρίς να προκαλέσουν κάποια βλάβη σε αυτά. Αυτό από μόνο του αποτελεί ένα αξιοθαύμαστο γεγονός και είναι αυτό που είχε κάνει αρχικά εντύπωση στους επιστήμονες αλλά και σε εμάς έτσι ώστε να ασχοληθούμε με τη συγκεκριμένη μελέτη. Η μεθοδολογία της έρευνας που χρησιμοποιήθηκε είναι η βιβλιογραφία.

Γενικά με τον όρο “λαβίδα” εννοούμε ένα εργαλείο το οποίο μας δίνει τη δυνατότητα να χειριστούμε αντικείμενα που δεν μπορούμε να ακουμπήσουμε με γυμνό χέρι. Η ερμηνεία αυτή ταιριάζει καλύτερα σε καταστάσεις που μπορούμε να αντιμετωπίσουμε καθημερινά. Η επιστήμη όμως αναπτύσσεται κι έτσι πλέον με τις νέες τεχνικές μας δίνεται η δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε λαβίδες για έρευνα, μετακίνηση και χειρισμό μικροσωματιδίων. Αυτές οι λαβίδες στην επιστημονική κοινότητα αλλά και στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται ως “Οπτικές Λαβίδες”. Οι Οπτικές λαβίδες (ή αλλιώς “οπτική παγίδευση με δέσμη laser”) είναι επιστημονικά όργανα που χρησιμοποιούν μια πολύ εστιασμένη δέσμη λέιζερ για να παρέχουν μια δύναμη, ελκυστική είτε απωθητική και έτσι να ελέγχουν διηλεκτρικά σωματίδια μεγέθους μόλις κάποιων νανομέτρων έως μερικών δεκάδων μικρομέτρων, μέσω αυτής της δέσμης. Πλέον βρίσκουν εφαρμογή και σε αδιαφανή σωματίδια με χρήση λέιζερ Γκάους- Λαγκέρ. Με πιο απλά λόγια οι οπτικές λαβίδες παγιδεύουν το σωματίδιο με λέιζερ σε οποιαδήποτε θέση θέλει ο ερευνητής με σκοπό τη μελέτη του. Εισάγοντας την ίδια δέσμη σε ένα συμβατικό οπτικό μικροσκόπιο μπορούμε να παρατηρήσουμε την κίνηση των σωματιδίων στο μέσο. Οι δυνάμεις που ασκούνται στο σωματίδιο από το λέιζερ οφείλονται στην αλλαγή της ορμής του φωτός που προσπίπτει πάνω του και ονομάζεται πίεση ακτινοβολίας. Τα

φωτόνια που απορροφώνται ή σκεδάζονται από το σωματίδιο προσδίδουν ορμή σε αυτό. Είναι γνωστό ως σκέδαση δύναμης και έχει αποτέλεσμα την εκτόπιση του σωματιδίου.

Η αρχή της τεχνικής αυτής έγινε όταν ερευνητές προσπάθησαν να ελέγξουν ουδέτερα αντικείμενα ατομικού μεγέθους που σε αντίθεση με τα φορτισμένα αντικείμενα ήταν πιο δύσκολο να ελεγχθούν. Στα πιο πρόσφατα χρόνια οι ερευνητές κατόρθωσαν να ελέγξουν και να κινήσουν ουδέτερα σωματίδια με σκοπό τη διερεύνηση τους και χρήση τους ανάλογα με τις απαιτήσεις κι επιθυμίες της κάθε έρευνας. Αυτό που προκάλεσε την έκπληξη των επιστημόνων ήταν το γεγονός ότι με τη χρήση των οπτικών λαβίδων μας δίνεται η δυνατότητα να χειριστούμε διάφορους οργανισμούς, βακτήρια κ.α χωρίς να τους καταστρέψουμε. Αυτό φαίνεται ακόμα πιο θαυμαστό αν σκεφτούμε ότι η ένταση μιας ακτίνας Laser στο σημείο εστίασης της οπτικής λαβίδας είναι $10.000.000 \text{ Watt/cm}^2$. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές αναφορές σε αυτή τη τεχνική. Για αυτό το λόγο προβλέπεται λαμπρό μέλλον για αυτό το διεπιστημονικό πεδίο που αναπτύσσεται ολοένα και περισσότερο βρίσκοντας πολλές εφαρμογές στη σύγχρονη βιολογία και όχι μόνο.

Σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη, ανάλυση και κατανόηση της τεχνικής των οπτικών λαβίδων και επιπλέον η συνεισφορά τους στο επιστημονικό τομέα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1. Ιστορία

Οι πρώτες θεωρητικές βάσεις της μεθόδου των οπτικών λαβίδων τέθηκαν πριν από περίπου 45 χρόνια. Η καταγωγή των οπτικών λαβίδων προέρχεται από ένα ιστορικό πείραμα, το οποίο πραγματοποίησε το 1970, ο Αμερικανός ερευνητής A. Ashkin που εργαζόταν στα Εργαστήρια Μπελ (Bell Labs) στις ΗΠΑ. Η αιτία που οδήγησε τον Ashkin να ασχοληθεί με την τεχνική αυτή ήταν κάτι που είχε ακουστεί σε ένα συνέδριο από έναν φοιτητή. Στο πείραμα αυτό έγινε εφικτή η μετακίνηση μικροσκοπικών ελαστικών σφαιριδίων από καουτσούκ (με διαστάσεις μικρομέτρου), που αιωρούνταν στο νερό και έπεφτε πάνω τους μια δέσμη φωτός laser.[1] Όταν ο Ashkin άρχισε να πειραματίζεται με τις οπτικές λαβίδες είδε ότι μία ακτίνα laser που δεν είναι εστιασμένη θα δημιουργούσε αντικείμενα μεγάλου δείκτη διάθλασης στο κέντρο της ακτίνας και θα τα ωθούσε στην κατεύθυνση της διάδοσης του φωτός. Η χρήση δυο ακτινών κινούμενων σε αντίθετες κατευθύνσεις βοήθησε και επέτρεψε στον Ashkin να παγιδεύσει τα αντικείμενα σε τρεις διαστάσεις. Έτσι δόθηκε η δυνατότητα στον Ashkin να ξεπεράσει τις μεγάλες ραδιομετρικές επιπτώσεις του φωτός χρησιμοποιώντας σε ένα διαφανές μέσο σχετικά διαφανή αντικείμενα. Χρόνια αργότερα και συγκεκριμένα το 1978 ανακάλυψε ότι θα μπορούσε να πιάσει μικρά διηλεκτρικά σωματίδια με μία καλά εστιασμένη δέσμη φωτός, σταθερά, στις τρεις διαστάσεις. Έτσι δημιούργησε την πρώτη οπτική παγίδα μοναδικής δέσμης. Αυτή η τεχνική επιτρέπει στα μικρά σωματίδια να πιαστούν και να μετακινηθούν χρησιμοποιώντας μια ορατή ακτίνα φωτός. Δηλαδή αν μια απλή δέσμη εστιάζεται σε στενή περιοχή, η δύναμη επί των δίπολων αρκεί για να υπερνικήσει τη σκεδάζουσα δύναμη που σπρώχνει τα σωματίδια κατά τη διεύθυνση διάδοσης της. Ο Ashkin τελικά οδηγήθηκε στη δημιουργία της οπτικής παγίδας βαθμίδας μοναδικής δέσμης (single beam gradient optical trap) έπειτα από τις παρατηρήσεις του για την ύπαρξη δυνάμεων βαθμίδας και έτσι εξισορρόπησε την επίδραση της βαρύτητας πάνω στα σωματίδια (οπτική ανύψωση). Η χρήση μίας μόνο δέσμης προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα με το σημαντικότερο να είναι ότι μπορεί να μετακινήσει μικρά σωματίδια χρησιμοποιούμενη σαν λαβίδα. Οι οπτικές λαβίδες μπορούν άνετα να ολοκληρωθούν με τη χρήση ενός συμβατικού μικροσκοπίου. Το φως θα εισέλθει στο σώμα του μικροσκοπίου και θα εστιαστεί με τον αντικειμενικό φακό κι έτσι η εστιασμένη ακτίνα laser θα μετακινηθεί ώστε να κατευθύνει το δείγμα που είναι τοποθετημένο σε μια συνηθισμένη καλυπτρίδα μικροσκοπίου. Ταυτόχρονα με την καθοδήγηση του δείγματος, το δείγμα μπορεί και να παρατηρηθεί. [2]

Έπειτα, το 1980, ο S. Chu θα χρησιμοποιούσε τις οπτικές λαβίδες για την έρευνα του κατά την οποία ήθελε να ψύξει και να παγιδεύσει ουδέτερα άτομα. Με αυτή την έρευνα αρκετά χρόνια αργότερα, το 1997, ο Chu θα κερδίσει το νόμπελ Φυσικής με τους Cohen-Tannoudji και W. D. Phillips. Ο Steven Chu είναι καθηγητής φυσικής στην έδρα Theodore και Frances Geballe στο πανεπιστήμιο του Stanford. Σε μία συνέντευξη του ο Chu είπε πως πρώτος ο Ashkin είχε χρησιμοποιήσει τις οπτικές λαβίδες σαν μέθοδο για την παγίδευση ατόμων αλλά είχε μόνο την δυνατότητα να παγιδεύσει πιο μεγάλα σωματίδια (δηλαδή 10-10000 νανόμετρα σε διάμετρο). Ο Chu συντονίζοντας μια ακτίνα laser και μια μαγνητο-οπτική παγίδα κατόρθωσε να παγιδεύσει μικρότερα ουδέτερα άτομα (δηλαδή 0,1 νανόμετρα σε διάμετρο). Πιο συνοπτικά ο Chu κατάφερε να παγιδεύσει μικρά διηλεκτρικά σωματίδια και συγχρόνως να τα μετακινήσει σε μία πολύ μικρή περιοχή. Στα πρόσφατα πειράματα συνηθίζεται η χρήση υγρών όπως για παράδειγμα νερό για να γλιτώνουμε από την επίδραση της βαρύτητας.

Το 1986 ο A. Ashkin και ο J.M. Dziedzic έκαναν επίδειξη της πρώτης εφαρμογής της τεχνικής των οπτικών λαβίδων στη Βιολογία. Χρησιμοποίησαν οπτικές λαβίδες για την παγίδευση του κολλοειδούς ιού του καπνού και του βακτηρίου Escherichia coli.[3] Στο πείραμα με την παγίδευση του ιού του καπνού υπήρξαν σημαντικές παρατηρήσεις και ανακαλύψεις. Μέσα

στη παγίδα ο ιός κατευθυνόταν μόνος και μάλιστα οι ερευνητές παρατήρησαν και μία περίεργη σκεδαζόμενη ακτινοβολία προτού σταθεροποιηθεί η κατάσταση. Με τη χρήση μικροσκοπίου υψηλής ανάλυσης επιβεβαιώθηκε ότι κατόρθωσαν να παγιδεύσουν ζωντανά βακτήρια αλλά συγχρόνως παρατήρησαν και τον μετέπειτα θάνατο τους λόγω της ακτινοβολίας. Θέλοντας να αποφύγουν τον θάνατο των βακτηρίων αντικατέστησαν το πράσινο laser με ένα υπέρυθρο και κατάφεραν όχι μόνο να κρατήσουν στη ζωή το βακτήριο αλλά ακόμα και να το δουν να αναπαράγεται. Αυτό είναι μια σημαντική απόδειξη του εκπληκτικού φαινομένου της τεχνικής αυτής ,δηλαδή ότι δίνεται η δυνατότητα στους ερευνητές να δουλέψουν στο εσωτερικό των κυττάρων χωρίς να προκαλέσουν τον θάνατο τους ή οποιαδήποτε άλλη ζημιά. [4]

Οι οπτικές λαβίδες όμως αποδείχτηκαν χρήσιμες και σε άλλους τομείς της βιολογίας. Για παράδειγμα το 2003 οι οπτικές λαβίδες εφαρμόστηκαν στον τομέα της διαλογής κυττάρων. Τα κύτταρα μπορούν να ταξινομηθούν με τα εγγενή οπτικά χαρακτηριστικά τους με τη δημιουργία ενός μοτίβου μεγάλης οπτικής έντασης πάνω από τη περιοχή του δείγματος. Τέλος οι οπτικές λαβίδες χρησιμοποιήθηκαν για να ανιχνευθεί ο κυτταροσκελετός, να μετρηθούν οι βισκο-ελαστικές ιδιότητες των βιοπολυμερών και να μελετηθεί η κυτταρική κινητικότητα. [3]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2. Laser

“Ο όρος λέιζερ ή laser προέρχεται από το αγγλικό ακρωνύμιο Laser: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) που αποδίδεται στα ελληνικά ως ενίσχυση φωτός με εξαναγκασμένη εκπομπή ακτινοβολίας και καλύπτει τόσο τις συσκευές που την παράγουν όσο και την αντίστοιχη ακτινοβολία.”. Αυτός ο ορισμός περιγράφει περιληπτικά πως λειτουργεί ένα λέιζερ. Στην ουσία το λέιζερ είναι μια συσκευή που ελέγχει τον τρόπο με τον οποίο ενεργοποιημένα άτομα απελευθερώνουν φωτόνια. Τα λέιζερ παράγουν μονοχρωματικό, συμφασικό φως το οποίο διαδίδεται σε μία συγκεκριμένη διεύθυνση, δημιουργώντας στενές δέσμες. Αντίθετα ένας λαμπτήρας πυράκτωσης, δηλαδή μια συνηθισμένη πηγή φωτός, μπορεί να ακτινοβολεί περισσότερη ενέργεια από ένα λέιζερ χαμηλής ισχύος. Το φως του όμως είναι ασύμφωνο προς όλες τις κατευθύνσεις κι έχει μεγάλο φασματικό εύρος. Η λειτουργία των λέιζερ βασίζεται στη θεωρία της κβαντικής μηχανικής και της θερμοδυναμικής. [5]

Τα συστήματα λέιζερ εμφανίζουν χαρακτηριστικές ιδιότητες που κάνουν το λέιζερ μοναδικό και το ξεχωρίζουν από τις άλλες κλασσικές πηγές. Αυτές οι ιδιότητες είναι η κατευθυντικότητα, η μονοχρωματικότητα, η συμφωνία φάσης, η λαμπρότητα και η πόλωση. Οι επιστήμονες χρησιμοποιούν τις πολλές ιδιότητες των λέιζερ για πειράματα που προηγουμένως ήταν αδύνατα. Πλέον τα λέιζερ μπορούν να θεωρηθούν ως μια από τις πιο σημαντικές και ενδιαφέρουσες επιτεύξεις των τελευταίων εξήντα χρόνων αν και στην αρχή πέρασαν μία περίοδο μεγάλης αμφισβήτησης από τους επιστήμονες. Αυτό ήταν απόλυτα φυσικό αν σκεφτεί κανείς ότι οι πολύ σπουδαίες αυτές ιδιότητες των λέιζερ εντυπωσίασαν τους επιστήμονες κι έτσι χρειάστηκε για εκείνους μια περίοδος προσαρμογής. Έπειτα έγινε καθολικά αποδεκτή η υπεροχή των ιδιοτήτων των πηγών λέιζερ σε σχέση με των συνηθισμένων πηγών φωτός. Έτσι η περίοδος δυσπιστίας και προσαρμογής των ερευνητών αντικαταστάθηκε από μία περίοδο υψηλής δραστηριότητας στον τομέα των λέιζερ.

Το φως λέιζερ δεν είναι πάντα ορατό. Γι αυτόν τον λόγο όσοι ασχολούνται με λέιζερ θα πρέπει να φοράνε προστατευτικό ματιών. Το λέιζερ είτε ορατό είτε όχι μπορεί να βλάψει τα μάτια, ακόμη μέχρι και η ένταση του περιπλανώμενου φωτός μπορεί να τα βλάψει. Το λέιζερ επίσης μπορεί να βλάψει και το δέρμα κι έτσι σύμφωνα με την επικινδυνότητα τα λέιζερ είναι ταξινομημένα σε κατηγορίες και όλα τα λέιζερ πρέπει να χαρακτηρίζονται με έναν από αυτούς τους προσδιορισμούς που θα αναπτύξουμε παρακάτω. [6,7]

Τα λέιζερ ανάλογα με το ενεργό υλικό, το μήκος κύματος, τη χρονική διάρκεια και τη ζημία που προκαλείται στα μάτια ή στο δέρμα κατατάσσονται σε αντίστοιχες κατηγορίες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πολλών τύπων λέιζερ με ποικίλες ιδιότητες και χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται σε μεγάλο εύρος εφαρμογών.

2.1 Ιστορία των λέιζερ

Η εφεύρεση των λέιζερ θεωρείται μία από τις πιο σημαντικές του 20ου αιώνα. Όμως ενώ είχαν μπει τα θεμέλια για αυτή την εφεύρεση πολύ νωρίτερα, τα λέιζερ ανακαλύφθηκαν μόλις το 1960.

Τα πρώτα θεμέλια για την κατασκευή των λέιζερ είχαν μπει πριν και κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου πολέμου με τις έρευνες που είχαν γίνει για τα ραντάρ και τα τρανζίστορ. Ας δούμε όμως πιο αναλυτικά την ιστορική αναδρομή αυτής της εφεύρεσης.

Το 1917 ο Einstein έθεσε τα θεωρητικά θεμέλια της κατασκευής ενός ενισχυτή φωτός. Στην ουσία πρότεινε την ιδέα της εξαναγκασμένης εκπομπής φωτονίων όπου εκεί βασίζεται η αρχή λειτουργίας των λέιζερ. Από τότε και μέχρι το 1954 κι ενώ υπήρχε η αρχή λειτουργίας των λέιζερ οι επιστήμονες δεν ασχολήθηκαν ενεργά και δεν προχώρησαν στην πραγματοποίησή

της ιδέας. Ακόμη η τεχνολογία υλικών για να πραγματοποιηθεί το λέιζερ δεν ήταν διαθέσιμη καθώς πολύ αργότερα κατασκευάστηκαν ανακλαστικά κάτοπτρα.

Το 1954 ο Townes και οι συνεργάτες του κατασκεύασαν τα μείζερ, τον προκάτοχο των λέιζερ, που λέγεται στην κατασκευή τους στηρίχθηκε η εφεύρεση των λέιζερ. Το μείζερ είναι ένα σύστημα με πολύ μεγάλη ισχύ ταλαντωτή. Η λέξη MASER δημιουργήθηκε από τα αρχικά των λέξεων που περιγράφουν το φαινόμενο, δηλαδή Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation(=ενίσχυση μικροκυμάτων με εξαναγκασμένη εκπομπή της ακτινοβολίας).

Το 1958 οι Schawlow, Townes, Basov και Prokhorov θεμελίωσαν την αρχή λειτουργίας ενός οπτικού ταλαντωτή αναπτύσσοντας τη θεωρία της μικροκυματικής ενίσχυσης κι έτσι κατέστησαν για πρώτη φορά δυνατή την κατασκευή ενός λέιζερ. Ο Townes από τις Ηνωμένες Πολιτείες και οι Basov και Prokhorov από την Σοβιετική Ένωση επιβραβεύτηκαν για τις εργασίες τους στον τομέα της κατασκευής των λέιζερ και των μείζερ και τιμήθηκαν με το βραβείο Νόμπελ Φυσικής το 1964.

Το 1960 φτάνουμε στην εφεύρεση των λέιζερ. Ο Maiman κατασκευάζει τον πρώτο οπτικό ενισχυτή από κρύσταλλο ρουμπινίου. Αυτή η κατασκευή ονομάζεται LASER!

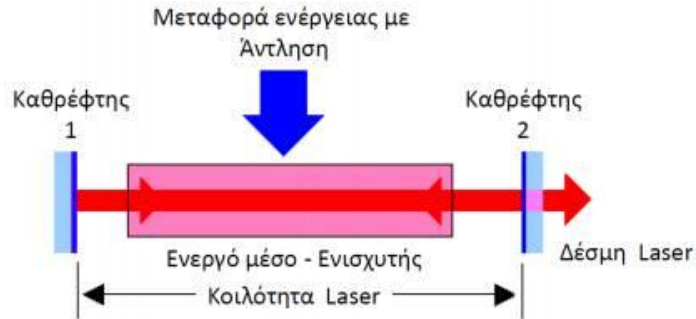
Από το 1961 και μέχρι σήμερα υπάρχει μεγάλη κινητικότητα στην ερευνητική κι επιστημονική κοινότητα για τα λέιζερ στα οποία έχει σημειωθεί μεγάλη ανάπτυξη. Επιγραμματικά θα αναφέρουμε κάποια από τα μεταγενέστερα επιτεύγματα. Το 1961 ο Javan και οι συνεργάτες του κατασκευάζουν το πρώτο λέιζερ αερίου το οποίο έμεινε στην ιστορία και υπάρχει μέχρι και σήμερα και είναι το λέιζερ Ηλίου-Νέου και το 1962 κατασκευάζεται το πρώτο διοδικό λέιζερ τύπου GaAs. Έπειτα το 1965 ο Kasper και οι συνεργάτες του αναπτύσσουν τα χημικά λέιζερ και το 1966 οι Sorokin, Lankard, Schufer και Hunsch κατασκευάζουν το πρώτο λέιζερ χρωστικών ουσιών. Το 1971 ο Basov κατασκευάζει το πρώτο λέιζερ υπεριώδους και τέλος κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 90' τα λέιζερ βρήκαν εφαρμογή και στον τομέα της ιατρικής και της τηλεπικοινωνίας. Γενικά μπορούμε να πούμε ότι μέχρι σήμερα τα λέιζερ έχουν βρει εφαρμογή στις θετικές επιστήμες, στη βιομηχανία, στην ιατρική και στην ηλεκτρονική. [7]

2.2 Αρχή λειτουργίας των λέιζερ

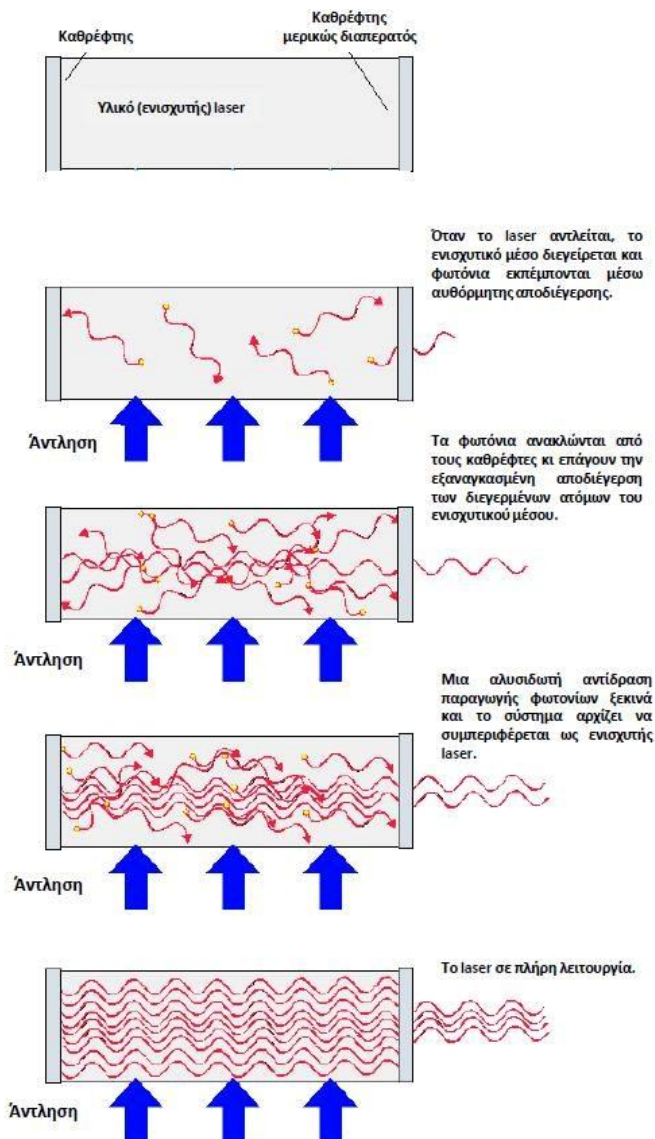
Τρία βασικά μέρη είναι αυτά που αποτελούν το λέιζερ: το ενεργό υλικό, ο μηχανισμός άντλησης ενέργειας και το οπτικό αντηχείο.

1. Ενεργό υλικό: Όταν ο αριθμός των σωματιδίων που βρίσκονται στη διεγερμένη κατάσταση είναι μεγαλύτερος από τον αριθμό των ατόμων που βρίσκεται στη βασική κατάσταση, επιτυγχάνεται αναστροφή πληθυσμών. Η αναστροφή πληθυσμών είναι απαραίτητη για να πραγματοποιηθεί η εκπομπή λέιζερ και επιτυγχάνεται με επιλεκτική απορρόφηση της ενέργειας, Αυτό σημαίνει ότι η χαμηλότερη στάθμη των ηλεκτρονίων μένει κενή ενώ τα ηλεκτρόνια σε υψηλότερες στάθμες διεγείρονται. Ενεργό υλικό ονομάζεται κάθε υλικό που παρουσιάζει τη λεγόμενη αναστροφή πληθυσμών και μπορεί να είναι είτε υγρό, είτε στερεό ή σε αέρια μορφή. Ανάλογα με τη μορφή που βρίσκεται το ενεργό υλικό, το λέιζερ ονομάζεται αντίστοιχα λέιζερ υγρών και ούτω καθεξής.
2. Μηχανισμός άντλησης ενέργειας: Η ύπαρξη ενός μηχανισμού άντλησης είναι απαραίτητη για τη δημιουργία της αναστροφής πληθυσμών. Το ενεργό υλικό αντλεί ενέργεια από μία εξωτερική πηγή. Τέτοιες πηγές μπορεί να είναι ηλεκτρικές ή φωτεινές, όπως η λυχνία έκλαμψης(flash lamp) ή από ηλεκτρική εκκένωση, από κάποια χημική αντίδραση ή από κάποια άλλη πηγή λέιζερ.
3. Οπτικό αντηχείο: Το οπτικό αντηχείο είναι στην ουσία μια κοιλότητα συντονισμού στην οποία εγκλωβίζεται τμήμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και αποτελείται

από δύο κάτοπτρα και το ενεργό υλικό. Το πρώτο κάτοπτρο χαρακτηρίζεται από υψηλή ανακλαστικότητα ενώ το δεύτερο είναι ημιδιαπερατό. Από τα χαρακτηριστικά αυτής της οπτικής κοιλότητας εξαρτώνται η μονοχρωματικότητα και η σταθερότητα της πόλωσης και το φως του λέιζερ που παράγει είναι σύμφωνο (εικόνα 2.1 και εικόνα 2.2) [7]



Εικόνα 2.1 Αρχή λειτουργίας των λέιζερ. [6]



Εικόνα 2.2 Παραστατική λειτουργία των λέιζερ. [6]

2.3 Ιδιότητες της ακτινοβολίας των λέιζερ

Τα συστήματα λέιζερ εμφανίζουν μοναδικά χαρακτηριστικά που τα έκαναν μία από τις πιο σημαντικές ανακαλύψεις και τα έκαναν να ξεχωρίζουν. Αυτές οι ιδιότητες είναι η μονοχρωματικότητα, η κατευθυντικότητα της δέσμης, η οπτική συμφωνία και η πόλωση. Όλα τα χαρακτηριστικά θα επεξηγηθούν παρακάτω.

A) Μονοχρωματικότητα

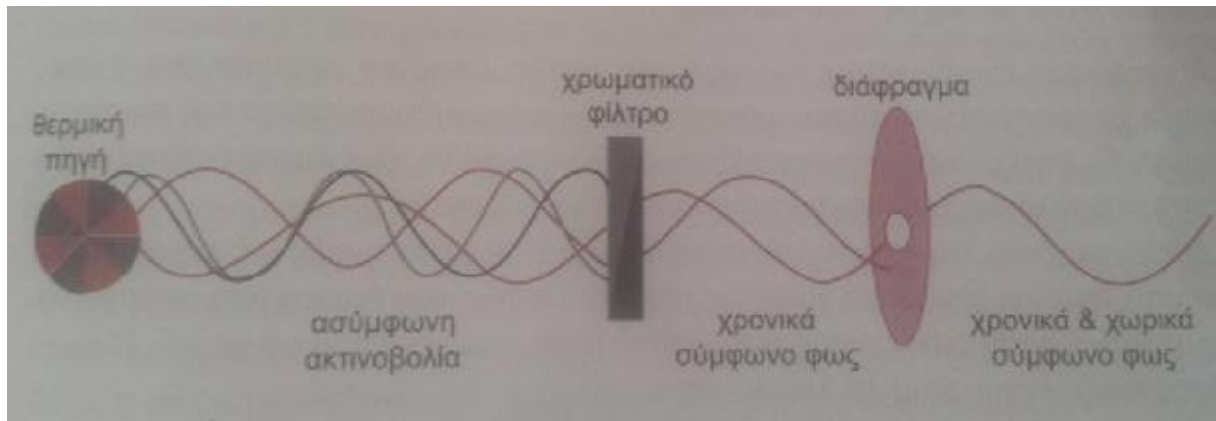
Οι μονοχρωματικές πηγές λέιζερ βοήθησαν στην έρευνα πολλούς επιστημονικούς χώρους όπως τη φασματοσκοπία, την φωτοχημεία και την πυρηνική Φυσική. Η μονοχρωματικότητα των πηγών λέιζερ είναι ίσως η πιο ενδιαφέρουσα και σημαντική ιδιότητα που έχουν να παρουσιάσουν. Απόλυτα μονοχρωματικό φως δεν μπορεί να δοθεί από μία πηγή φωτός, τα λέιζερ όμως πετυχαίνουν την ιδανικότερα υαρκτή προσέγγιση προς το ιδανικό μονοχρωματικό φως. Οι κλασσικές πηγές φωτός είναι πολυχρωματικές. Με την τοποθέτηση ενός χρωματικού φίλτρου μπορούν να περάσουν μερικά μήκη κύματος κι αυτές οι πηγές ονομάζονται ψευδομονοχρωματικές. Μονοχρωματικές πηγές ονομάζονται μόνο τα λέιζερ, των οποίων μάλιστα το εκπεμπόμενο φως είναι ενός ιδιαίτερου μήκους κύματος. Τα λέιζερ μπορούν να εκπέμψουν οποιαδήποτε συχνότητα συνεχόμενη και χωρίς κενά.

B) Κατευθυντικότητα της δέσμης

Η κατευθυντικότητα είναι χαρακτηριστική ιδιότητα των λέιζερ καθώς αν τα συγκρίνουμε με μία κλασσική πηγή φωτός τότε θα παρατηρήσουμε ότι με την κλασσική πηγή το φως διαχέεται παντού, πράγμα που δεν συμβαίνει με τα λέιζερ. Η διάχυση του φωτός έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται και η ένταση του φωτός. Κριτήριο για την κατευθυντικότητα είναι το λεγόμενο άνοιγμα της δέσμης, δηλαδή μερικά mrad. Η διάμετρος της δέσμης αυξάνεται κατά 1mm ανά μέτρο διαδρομής. Η κατευθυντικότητα επιτρέπει στα λέιζερ να βρίσκουν εφαρμογές σε μετρήσεις μεγάλων αποστάσεων και τηλεμετρήσεις τύπου LIDAR.

Γ) Οπτική συμφωνία

Η οπτική συμφωνία στην ουσία σημαίνει ότι τα φωτόνια της δέσμης έχουν όλα την ίδια φάση. Στα λέιζερ παρατηρούμε τον υψηλότερο δυνατό βαθμό συμφωνίας από οποιαδήποτε άλλη πηγή. Στις άλλες συμβατικές πηγές τα φωτόνια δεν έχουν την ίδια φάση καθώς ακολουθείται ο μηχανισμός αυθόρμητης εκπομπής. Επίσης δεν παρουσιάζουν χωρική και χρονική συμφωνία παρά μόνο αν τοποθετηθούν έγχρωμα φίλτρα ή διαφράγματα. Αυτό μας δείχνει ότι μπορεί να παρουσιαστεί συμφωνία και στις συμβατικές πηγές αλλά θα υπάρξει παράλληλα και μεγάλη μείωση της έντασης της δέσμης. Σε αντίθεση τα λέιζερ, που χρησιμοποιούν τον μηχανισμό εξαναγκασμένης εκπομπής παρουσιάζουν χωρική και χρονική συμφωνία με τα φωτόνια να βρίσκονται όλα στην ίδια φάση και για αυτό τα λέιζερ ονομάζονται πηγές σύμφωνης ακτινοβολίας. (εικόνα 2.3)



Εικόνα 2.3 Οπτική συμφωνία [7]

Δ) Λαμπρότητα της δέσμης

Τα λέιζερ είναι πηγές μεγάλης λαμπρότητας και έντασης ακτινοβολίας. Η λαμπρότητα της δέσμης είναι ίσως η πιο σημαντική ιδιότητα των λέιζερ. Ένας λαμπτήρας πυράκτωσης μπορεί να είναι πιο ισχυρός από άποψη ενέργειας από ότι ένα λέιζερ χαμηλής ισχύος αλλά το φως του είναι ασύμφωνο με μεγάλο φασματικό εύρος. Αυτό προκαλεί μειωμένη λαμπρότητα. Πολλά συστήματα λέιζερ υψηλής ισχύος λόγω των αποδόσεων τους που είναι σε υψηλά επίπεδα μπορούν να είναι χρήσιμα στον έλεγχο των θερμοπυρηνικών αντιδράσεων και στην παραγωγή λέιζερ ακτινών-X.

Ε) Πόλωση

Η ακτινοβολία των λέιζερ έχει και την ιδιότητα της πόλωσης σαν χαρακτηριστικό της. Το φως των άλλων συμβατικών φωτεινών πηγών πλην των λέιζερ είναι μη πολωμένο. Αντίθετα πολλά συστήματα λέιζερ μπορούν να παράξουν πολωμένο φως με την τοποθέτηση ενός οπτικού πολωτικού στοιχείου μέσα στο οπτικό αντηχείο. Κάποια παραδείγματα τέτοιων στοιχείων είναι τα πλακίδια Brewster, πρίσματα, φράγματα ανάκλασης κ.α. Έτσι το φως της εξερχόμενης δέσμης είναι γραμμικά πολωμένο. [7]

2.4 Τύποι λέιζερ

Τα λέιζερ μπορούν ακαδημαϊκά κυρίως να διαχωριστούν στις εξής κατηγορίες:

- Το ενεργό υλικό, δηλαδή τον ενισχυτή (θα αναλυθούν παρακάτω)
 - Laser στερεάς κατάστασης
 - Laser υγρών
 - Laser αερίων
 - Laser ημιαγωγών
- Το μήκος κύματος
 - Laser υπέρυθρης ακτινοβολίας
 - Laser ορατής ακτινοβολίας
 - Laser υπεριώδους ακτινοβολίας
 - Laser ακτινών X
- Τη χρονική διάρκεια
 - Laser συνεχούς (CW laser)
 - ns laser
 - ps laser
 - fs laser

- Τη ζημιά που προκαλεί η δέσμη laser στο μάτι ή/και το δέρμα (θα αναλυθούν παρακάτω)
 - CLASS I
 - CLASS II
 - CLASS III
 - CLASS IIIa
 - CLASS IIIb
 - CLASS IV

Ο διαχωρισμός που είναι πιο σαφής και χρησιμοποιείται πιο συχνά είναι αυτός που βασίζεται στο είδος του ενεργού υλικού. Ας δούμε πιο αναλυτικά την κάθε κατηγορία. [6]

A) Λείζερ στερεάς κατάστασης

Τα λέιζερ στερεάς κατάστασης προσφέρουν την παραγωγή υψηλότερης δύναμης. Χρησιμοποιούνται συνήθως με έναν παλλόμενο τρόπο παράγουν μια έκρηξη φωτός σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Έχουν χρησιμεύσει στην παρατήρηση και μελέτη φυσικών φαινομένων μικρής χρονικής διάρκειας και είναι αξιόλογο ότι έχουν επιτευχθεί χρόνοι όπως 10-15 sec. Το ρόλο του ενεργού υλικού λαμβάνουν οι προσμείξεις ιόντων μετάλλων που υπάρχουν μέσα στο γυαλί ή στους κρυστάλλους από τους οποίους αποτελείται το ενεργό μέσο. Τα λέιζερ στερεών χρησιμοποιούν την οπτική άντληση ως μέσο διέγερσης του ενεργού υλικού για παλμική και συνεχή λειτουργία. Η άντληση γίνεται επιτυχής με το φως από τους σωλήνες λάμψης ξένου, τους λαμπτήρες τόξων, ή τους λαμπτήρες μεταλλο-ατμών. Διακρίνονται σε κρυστάλλους, π.χ. YAG, Ruby, YVO, κ.τ.λ, τα οποία βρίσκονται σε μορφή δίσκου, ράβδου ή πλάκας και σε υάλου, π.χ. BK7, πυριτίου κ.τ.λ, τα οποία βρίσκονται σε μορφή ίνας ή ράβδου.

B) Λείζερ υγρών

Τα πιο κοινά και σπουδαία μέσα λέιζερ είναι τα λέιζερ χρωστικών ουσιών και η λειτουργία τους μπορεί να είναι παλμική ή συνεχής. Είναι δηλαδή ανόργανες χρωστικές ουσίες που περιλαμβάνονται στα περιβλήματα γυαλιού. Αυτά αντλούνται είτε από τους έντονους λαμπτήρες λάμψης με την πρώτη μορφή, τη μορφή της παλμικής λειτουργίας είτε από ένα λέιζερ αερίου με τη δεύτερη μορφή, τη μορφή της συνεχούς λειτουργίας. Τα λέιζερ υγρών βρίσκουν πολλές εφαρμογές όπως στη φασματοσκοπία, την αναλυτική χημεία κ.α. λόγω του ότι είναι λέιζερ που ανήκουν στη κατηγορία του μεταβλητού μήκους κύματος. Μακρομόρια που διαλύονται εντός υδατικών ή οργανικών διαλυμάτων αποτελούν το ενεργό μέσο. Παραδείγματα υγρών χρωστικών είναι οι Ροδαμίνη 6G, Φλουορεσκεΐνη, Κουμαρίνη κ.α

Γ) Λείζερ αερίων

Ο γνωστότερος και σπουδαιότερος εκπρόσωπος της κατηγορίας των λέιζερ αερίων είναι το λέιζερ Ηλίου-Νέου (He-Ne) το οποίο αναφέραμε επιγραμματικά στην ιστορική αναδρομή για τα λέιζερ. Κατασκευάστηκε το 1961 από τον Javan και ήταν το πρώτο λέιζερ αερίων. Το λέιζερ Ηλίου-Νέου φημίζεται για τη σταθερότητα υψηλής συχνότητας, την αγνότητα χρώματος και την ελάχιστη ακτίνα που διαδίδεται. Η άντληση της ενέργειας γίνεται επιτυχής με κρούσεις ηλεκτρονίων σε μία ηλεκτρική εκκένωση. Επίσης ανήκει στην κατηγορία χαμηλής ισχύος, η δημοφιλία του είναι αυξημένη και βρίσκει πολλές εφαρμογές στην καθημερινότητα. Κάποιες από αυτές τις εφαρμογές είναι ανάγνωση κώδικα barcode, επίδειξη για εκπαιδευτικούς λόγους, οπτική αποθήκευση δεδομένων κ.α.

Γενικά τα λέιζερ αερίων, πέρα από το Ηλίου-Νέου έχουν να επιδείξουν πολλές εφαρμογές όπως στην ψυχαγωγία, στην ιατρική(χειρουργική επέμβαση ματιών και σκλήρυνση των σφραγισμάτων των δοντιών) και τέλος στην ολογραφία. Σε όλα τα λέιζερ αερίων οπτική άντληση του ενεργού μέσου γίνεται μέσω της ηλεκτρικής εκκένωσης. Τα λέιζερ αερίου αντλούνται από το υπεριώδες φως, τις δέσμες ηλεκτρονίων, το ηλεκτρικό ρεύμα κ.α. Άλλοι

τύποι λέιζερ αερίων είναι τα λέιζερ ιόντων αργού ,τα λέιζερ διοξειδίου του άνθρακα και τα λέιζερ υπεριώδους για τα οποία θα αναφερθούμε συνοπτικά.

Τα λέιζερ ιόντων αργού παράγουν μια σειρά γαλαζοπράσινων μηκών κύματος φωτός. Αρχικά τα άτομα του αργού ιονίζονται και έπειτα τα ιονισμένα άτομα διεγείρονται σε πιο υψηλές ενεργειακές στάθμες. Μέσω κρούσεων των ηλεκτρονίων δημιουργούνται στην ηλεκτρική εκκένωση τα ιόντα. Τα ηλεκτρόνια αυτά μπορούν να διεγερθούν ξανά. Τα λέιζερ ιόντων αργού μπορούν να λειτουργήσουν και ως λέιζερ ενός ρυθμού.

Τα λέιζερ διοξειδίου του άνθρακα θεωρούνται τα ισχυρότερα λέιζερ συνεχών κυμάτων λόγω της υψηλής αποδοτικότητας τους. Ο βαθμός αποδοτικότητας τους ξεπερνάει τον βαθμό αποδοτικότητας των άλλων λέιζερ αερίων. Εκτός από αυτό παρουσιάζει και τη μέγιστη ισχύ εξόδου. Μια ηλεκτρική εκκένωση διεγείρει τα μόρια ενός μείγματος αερίων He,N₂ και CO₂ το οποίο αποτελεί το ενεργό υλικό. Διακρίνονται σε ηλεκτρικά: CO₂, N, Cu, Au και σε χημικά: O₂, I, H₂F. Το λέιζερ CO₂ ανήκει στην κατηγορία του μεταβλητού μήκους κύματος και μπορεί να υπάρξει είτε σε μορφή παλμικής λειτουργίας είτε σε συνεχούς λειτουργίας. Η επεξεργασία υλικών είναι μια σπουδαία εφαρμογή του συγκεκριμένου τύπου λέιζερ, όπως και η χρήση του στην ιατρική και πιο συγκεκριμένα στις εγχειρήσεις σαν νυστέρι υψηλής ακρίβειας.

Τα λέιζερ υπεριώδους ονομάζονται διαφορετικά και ως λέιζερ διεγερμένων διμερών και το ενδιαφέρον για αυτή τη κατηγορία λέιζερ είναι αξιοσημείωτο καθώς είναι τα πιο ισχυρά συστήματα λέιζερ στην υπεριώδη περιοχή. Ένα διεγερμένο διμερές μόριο, σταθεροποιημένο μόνο σε αυτή τη κατάσταση αποτελεί το ενεργό υλικό. Κατά την επιστροφή του μορίου στη βασική στάθμη υπάρχει διάσπαση του σε δύο άτομα. Η λειτουργία των λέιζερ υπεριώδους είναι μόνο παλμική και υπάρχουν πολύ ενδιαφέρουσες εφαρμογές για αυτόν τον τύπο λέιζερ. Οι εφαρμογές είναι η κατεργασία υλικών, η χάραξη μικροηλεκτρονικών διατάξεων και ο καθαρισμός εικόνων ή αρχαίων νομισμάτων. Επίσης χρησιμοποιούνται στη φασματοσκοπία και, πολύ σημαντικό, στην οφθαλμολογία και συγκεκριμένα στις επεμβάσεις που αφορούν την μυωπία και τον μυωπικό αστιγματισμό.

Δ) Λείζερ ημιαγωγών

Μία επαφή τύπου p-n ορθώς πολωμένη είναι το ενεργό μέσο για τα λέιζερ ημιαγωγών ή αλλιώς διοδικά λέιζερ. Ένας ημιαγωγός τύπου -n έχει πλεόνασμα ηλεκτρονίων σε αντίθεση με έναν ημιαγωγό τύπου -p που έχει έλλειμμα ηλεκτρονίων. Αυτά αποτελούν μια δίοδο ημιαγωγού και χωρίζονται από ένα φράγμα που δεν επιτρέπει τη διέλευση του ρεύματος. Αν χρησιμοποιήσουμε διαφορετικό υλικό στις p και n περιοχές τότε πετυχαίνουμε μεγαλύτερο βαθμό απόδοσης και το λέιζερ αυτό ονομάζεται λέιζερ διπλής ετεροεπαφής. Μπορούν ακόμη να χρησιμοποιηθούν συνεχών κυμάτων με πολύ υψηλή αποδοτικότητα. Τέλος τα λέιζερ ημιαγωγών χρησιμοποιούνται κυρίως σε CD players καθώς και σε εκτυπωτές λέιζερ. [7]

2.5 Επικινδυνότητα των λέιζερ

Τα λέιζερ μπορούν να γίνουν πολύ επικίνδυνα για τον ανθρώπινο οργανισμό και κυρίως για τα μάτια ή/και το δέρμα. Για αυτόν τον λόγο πρέπει να τηρούνται κατά τη χρήση τους κάποιιο κανόνες και οπωσδήποτε όλα τα λέιζερ πρέπει να φέρουν σε εμφανές σημείο σε ποια κατηγορία ανήκουν.

Τα λέιζερ χωρίζονται σε 4 κατηγορίες που θα αναπτύξουμε παρακάτω.

- CLASS I: Τα λέιζερ αυτά δεν θεωρούνται επικίνδυνα για τον άνθρωπο καθώς είναι χαμηλής ισχύος. Είναι ασφαλή ακόμα κι αν από ατύχημα πέσει η δέσμη απευθείας στο μάτι. Παρόλα αυτά καλό θα ήταν να αποφεύγετε το κοίταγμα της δέσμης συνεχώς.
- CLASS II: Είναι χαμηλής ισχύος ορατά λέιζερ που εκπέμπουν σε επίπεδα ανώτερα των class I. Η φυσιολογική αντίδραση αποστροφής στην φωτεινή δέσμη

ανοιγοκλείνοντας τα μάτια (για 0.25 sec) θα προστατεύσει ένα πρόσωπο. Όμως η παράταση του χρόνου και το επίμονο κοίταγμα προς τη φωτεινή δέσμη μπορούν να αποβούν επικίνδυνα.

- CLASS III: Τα λέιζερ αυτά είναι μέσης ισχύος και μπορούν να προκαλέσουν ζημιές στα μάτια ακόμα και στον φυσιολογικό χρόνο του ανοιγοκλεισίματος του ματιού αλλά δεν είναι επικίνδυνα για το δέρμα. Υπάρχουν δύο υποκατηγορίες για τα class III λέιζερ.
 1. CLASS IIIa: Είναι λέιζερ μέτριας ισχύος και είναι επικίνδυνα μόνο αν τα κοιτάξουμε με κάποιο οπτικό μέσο (π.χ φακό, τηλεσκόπιο κ.α) η απευθείας πέρα από τον επιτρεπόμενο χρόνο 0.25 sec.
 2. CLASS IIIb: Η απευθείας παρατήρηση είναι επικίνδυνη και μπορούν να προκληθούν ζημιές στα μάτια ακόμα κι αν υπάρξει κάποιο ατύχημα και κοιτάξουμε τη δέσμη απευθείας. Η διαχεόμενη δέσμη είναι ασφαλής εκτός κι αν υπάρξει παρατήρηση με κάποιο οπτικό μέσο.
- CLASS IV: Η ακτίνα είναι πολύ επικίνδυνη για τα μάτια και το δέρμα, ακόμη και η διαχεόμενη δέσμη. Η χρήση τους απαιτεί προσοχή καθώς είναι λέιζερ υψηλής ισχύος. Πρέπει να γίνονται πολύ σοβαροί έλεγχοι κατά την χρήση τέτοιων λέιζερ γιατί μπορεί να υπάρξει ακόμα και κίνδυνος πυρκαγιάς.

Οι κίνδυνοι από τα λέιζερ είναι πολλοί και κυρίως αφορούν τα μάτια και το δέρμα. Στα μάτια μπορούν να προκληθούν ζημιές όπως εγκαύματα στον κερατοειδή και τον αμφιβληστροειδή χιτώνα, εμφάνιση καταρράκτη και εάν πειραχθεί το οπτικό νεύρο ακόμη και μερική ή ολική τύφλωση. Στο δέρμα μπορούν να προκληθούν ζημιές όπως τραυματισμούς, κοκκίνισμα, κάψιμο και σε έκθεση πολλών χρόνων ακόμη και καρκίνος του δέρματος. Για όλα τα παραπάνω πρέπει απαραίτητα να τηρούνται οι κανονισμοί και να λαμβάνονται προστατευτικά μέτρα ανάλογα και με την κατηγορία που ανήκει το κάθε λέιζερ. Μερικά παραδείγματα τρόπων προστασίας από τις ακτίνες λέιζερ είναι η προστατευτική περιφραγή, οι προστατευτικές πινακίδες, η χρήση ειδικών προστατευτικών γυαλιών και ρουχισμού, η σωστή εκπαίδευση του προσωπικού κ.α [6,7]

2.6 Εφαρμογές των λέιζερ

Οι εφαρμογές των λέιζερ είναι τόσες πολλές που δεν μπορούν να βρεθούν ούτε να αναλυθούν όλες. Επιγραμματικά θα αναφέρουμε τις σπουδαιότερες από αυτές παρακάτω. Για περαιτέρω πληροφορίες μπορείτε να ενημερωθείτε από το ίντερνετ με μία απλή αναζήτηση στο μηχανισμό αναζήτησης www.google.com και γράφοντας Laser applications. Κάποιες από τις εφαρμογές των λέιζερ είναι λοιπόν:

- Στην καθημερινή ζωή (για ανάγνωση barcode, ανάγνωση cd κτλπ)
- Στη βιομηχανία (κοπή, συγκόλληση υλικών κτλπ)
- Στην Ιατρική (Σε αυτό το επιστημονικό πεδίο τα λέιζερ παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο ειδικά στην οφθαλμολογική χειρουργική. Χρησιμοποιείται για θεραπεία γλαυκώματος, θεραπεία μυωπίας και μυωπικού αστιγματισμού, θεραπεία αποκόλλησης αμφιβληστροειδή κ.α . Επίσης στη δερματολογία για καυτηριάσεις κ.α)
- Στη φωτοχημεία (για μελέτη της δομής των μορίων, μελέτη χημικών αντιδράσεων κ.α)
- Στην ολογραφία, δηλαδή μια τρισδιάστατη εικόνα ενός αντικειμένου.
- Στις μετρήσεις με λέιζερ (μετρήσεις μικρών αποστάσεων, μεγάλων αποστάσεων όπως και μέτρηση της ταχύτητας ενός κινούμενου σώματος), επίσης στις τηλεμετρήσεις (μετρήσεις μεσαίων αποστάσεων).

- Στον στρατό (σαν οπτικά ραντάρ, σε συστήματα τηλεπικοινωνιών αυξημένης ασφάλειας κ.α)
- Στην ψυχαγωγία (λείζερ σόου)
- Στην θερμοπυρηνική σύντηξη

Οι εφαρμογές των λείζερ είναι πολλές ακόμη και για αυτό τα λείζερ δικαιωματικά έχουν χαρακτηριστεί ως μία από τις σημαντικότερες, αν όχι η σημαντικότερη εφεύρεση των τελευταίων χρόνων. Έχουν βοηθήσει πολλούς επιστημονικούς κλάδους στην έρευνα, στην μελέτη και στην πραγματοποίηση πραγμάτων που ήταν φαινομενικά αδύνατα πριν την ανακάλυψη των λείζερ. [7,8]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3. Θεωρητικό υπόβαθρο των οπτικών λαβίδων

3.1 Θεωρητική βάση της οπτικής παγίδευσης

Με τον όρο οπτική χειραγώγηση εννοούμε την ικανότητα των οπτικών δυνάμεων να κινούν, να καθοδηγούν και να παγιδεύουν μεσοσκοπικά αντικείμενα. Οι οπτικές παγίδες στηρίζονται σε ένα χωρικό πεδίο υψηλής ανομοιογένειας της δέσμης και αυτό συμβάλλει στην δημιουργία μιας σημαντικής οπτικής δύναμης που δρα πάνω σε ένα διηλεκτρικό ή βιολογικό σωματίδιο κοντά στην εστία. Το σωματίδιο προσελκύεται προς το σημείο του πεδίου με την υψηλότερη ένταση μέσω της κλίσης της δυνάμεως και σταθερή ισορροπία μπορεί να προκληθεί όταν κάθε αντίθετη δύναμη που προέρχεται από σκέδαση είναι ίση και σε μέγεθος. Άρα, μπορούμε να παγιδεύσουμε ένα τέτοιο σωματίδιο όταν βρίσκεται κοντά στην εστία της δέσμης.

Οι θερμικές δυνάμεις μπορεί να προκαλέσουν βλάβες στα σωματίδια. Συνήθως προέρχονται από τη θερμοκρασία του μέσου που περιβάλλει το σωματίδιο και προκαλούνται από την απορρόφηση της ακτινοβολίας, δημιουργώντας ένα φαινόμενο που ονομάζεται φωτοφόρηση. Για αυτό το λόγο, οι οπτικές παγίδες κατασκευάστηκαν για να χρησιμοποιηθούν σε σχετικά διαφανή μέσα και σωματίδια όπου οι θερμικές επιδράσεις είναι αμελητέες. Ιδιαίτερα, στην βιοφωτονική η θερμότητα μπορεί να επιδράσει αρνητικά την βιωσιμότητα του κυττάρου. [9]

3.2 Η μηχανική των οπτικών λαβίδων

Όπως ανακάλυψε ο Ashkin, μια μη εστιασμένη ακτίνα λέιζερ εφιστά αντικείμενα υψηλού δείκτη διάθλασης προς το κέντρο της δέσμης και τα προωθεί στην κατεύθυνση της διάδοσης. Με το συνδυασμό δυο δεσμών κινούμενων σε αντίθετες κατευθύνσεις επιτυγχάνεται η παγίδευση των αντικειμένων σε τρεις διαστάσεις και με αυτόν τον τρόπο ο Ashkin κατάφερε να παρατηρήσει τα αποτελέσματα της πίεσης της ακτινοβολίας αλλά και με τη χρήση διάφανων αντικειμένων σε διάφανα μέσα κατάφερε να ξεπεράσει τις συνήθως μεγάλες ραδιομετρικές επιδράσεις του φωτός. Αργότερα ανακαλύφθηκε ότι μικρά σωματίδια μπορούν να παγιδευτούν σε τρεις διαστάσεις και να χειραγωγηθούν με τη χρήση μιας ενιαίας, καλά εστιασμένη δέσμης λέιζερ, τις οπτικές λαβίδες. [10]

3.3 Οι δυνάμεις που παράγονται από τις οπτικές λαβίδες

Για την κατανόηση των δυνάμεων που προέρχονται από τις οπτικές λαβίδες πρέπει να υιοθετηθούν δύο προσεγγίσεις, η μια βασίζεται στις οπτικές ακτίνες και η άλλη στο ηλεκτρικό πεδίο που σχετίζεται με το φως.

Κάθε φωτόνιο έχει ενέργεια $h\nu$ και ορμή h/λ , αν απορροφηθεί από ένα αντικείμενο, η ορμή που μεταφέρθηκε από την δέσμη του φωτός με ισχύ P , οδηγεί στην δημιουργία μιας δύναμης αντίδρασης F στο αντικείμενο

$$F = \frac{nP}{c}$$

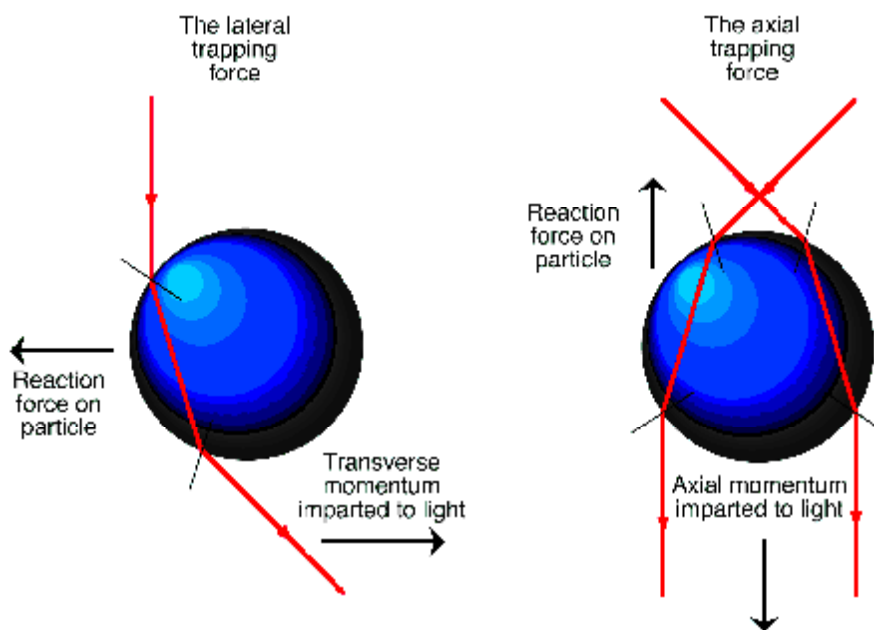
Όπου c είναι η ταχύτητα του φωτός και n ο δείκτης διάθλασης του μέσου. [10]

3.3.1 Οπτικές ακτίνες

Η ανάλυση των δυνάμεων για την επίτευξη των οπτικών λαβίδων είναι πολύ περίπλοκη αφού πρέπει να ληφθεί υπόψη η διανυσματική φύση των δυνάμεων αυτών.

Η διάθλαση του φωτός από ένα διάφανο αντικείμενο έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της ορμής των φωτονίων και μιας αντίστοιχης δύναμη αντίδρασης στο αντικείμενο, αυτό οφείλεται στην γραμμική ορμή h/λ ανά φωτόνιο που διαθέτει η ακτίνα φωτός. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για δυνάμεις που δημιουργήθηκαν από αντανάκλαση ή σκέδαση, αφού όμως το αντικείμενο βρίσκεται παγιδευμένο σε υγρό με παρόμοιο δείκτη διάθλασης, οι δυνάμεις Fresnel που προκύπτουν και οι αντίστοιχες δυνάμεις ανάκρουσης θεωρούνται αμελητέες.

Η εικόνα 3.1 δείχνει τις δυνάμεις που ασκούνται σε ένα διηλεκτρικό σφαιρίδιο και την διάθλαση των οπτικών ακτινών στην επιφάνεια του. Φαίνονται ξεκάθαρα οι αντίθετες πτυχές των οπτικών λαβίδων. Αρχικά, το προφίλ έντασης της δέσμης διατομής καταλήγει σε μια δύναμη που αναγκάζει το αντικείμενο να κινηθεί προς το κέντρο της δέσμης, αυτή είναι η δύναμη που προέρχεται από τη διάθλαση του φωτός και μπορεί να βρίσκεται σε αντίθετη έννοια από αυτή που προέρχεται από σκέδαση. Αν η δέσμη που προσπίπτει από ψηλά είναι καλά εστιασμένη τότε η δύναμη που θα προκύψει θα αναγκάσει το αντικείμενο να ανασηκωθεί προς την εστία, δημιουργώντας μια τριών διαστάσεων παγίδα με ένα λέιζερ ενιαίας δέσμης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι αντιστρέφοντας την κατεύθυνση της ακτίνας δεν αλλάζει η κατεύθυνση της δύναμης και αυτό αποδεικνύει ότι οι δυνάμεις που σχετίζονται με τη διάθλαση είναι συνδεδεμένες με την ένταση της δέσμης και όχι με την κατεύθυνση της διάδοσης. [10]



Εικόνα 3.1 Η προέλευση των οπτικών ακτινών σε μια πλευρική και μια αξονική παγίδευση δύναμης [10]

3.3.2 Ηλεκτρομαγνητικό πεδίο

Σε περιπτώσεις που το σωματίδιο έχει διαστάσεις πολύ μικρότερες από το μήκος κύματος της δέσμης λέιζερ, η προσέγγιση των οπτικών ακτινών δεν είναι καθόλου ικανοποιητική οπότε είναι καλύτερο να εξεταστούν οι δυνάμεις από άποψη ηλεκτρικού πεδίου κοντά στο παγιδευμένο σωματίδιο. Οι συνθήκες για σκέδαση ικανοποιούνται και μπορούν να υπολογιστούν οι οπτικές δυνάμεις θεωρώντας το σωματίδιο σαν ένα σημειακό δίπολο, το οποίο επάγεται από το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο του φωτός. Σε αυτή την προσέγγιση οι συνιστώσες σκέδασης και βαθμίδας διαχωρίζονται εύκολα. [11]

3.3.3 Παγίδευση σωματιδίων υψηλού και χαμηλού δείκτη διάθλασης

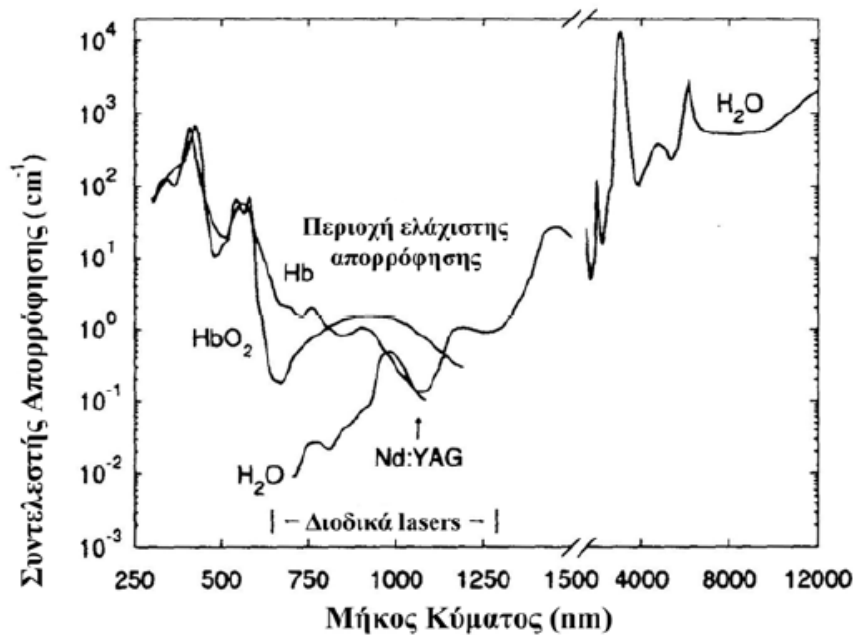
Μέχρι στιγμής τα σωματίδια είχαν δείκτη διάθλασης μεγαλύτερο από το αυτόν του μέσου που τα περιβάλλει. Αν κάποιο σωματίδιο, όπως μια φούσκα, βρίσκεται μέσα σε κλίση έντασης, τότε θα αντιστραφεί η κατεύθυνση της κλίσης της έντασης και το σωματίδιο θα δεχτεί μια δύναμη μακριά από τη μέγιστη περιοχή έντασης. [10]

3.4 Σχεδιασμός μιας οπτικής παγίδας

Τα περισσότερα βιολογικά εργαστήρια διαθέτουν μια βασική διάταξη οπτικής παγίδευσης που περιλαμβάνει μια χαμηλής ισχύος πηγή λέιζερ, συνήθως στο υπέρυθρο μέρος του φάσματος, για βιολογικές εφαρμογές, οπτικά στοιχεία όπως καθρέφτες και φακοί για την οδήγηση της δέσμης στον αντικειμενικό φακό ενός απλού μικροσκοπίου, ο οποίος θα εστιάσει τη δέσμη πάνω στο δείγμα και ένα σύστημα για την καταγραφή της εικόνας, το οποίο αποτελείται συνήθως από μια κάμερα CCD. Τέτοιες διατάξεις είναι ικανές να ακινητοποιούν τα κύτταρα ή τα σωματίδια και να τα οδηγούν σε διάφορες θέσεις. Όμως έχουν και κάποιους περιορισμούς όπως η χαμηλή ισχύς της δέσμης λέιζερ, η σταθερότητα που απαιτείται για μετρήσεις δυνάμεων και η σωστή οδήγηση και εστίαση της δέσμης για την παγίδευση μικρών σωματιδίων. Δυστυχώς, για πιο εξειδικευμένες μετρήσεις απαιτείται λέιζερ μεγάλης ισχύος, σταθερότητα και ένα ακριβές σύστημα ανάλυσης οπότε αυξάνεται και το κόστος της διάταξης. [11]

3.4.1 Πηγές λέιζερ που χρησιμοποιούνται

Οι οπτικές λαβίδες συνήθως λειτουργούν με λέιζερ συνεχούς λειτουργίας και μέτριες εντάσεις που αυτό τα διαφοροποιεί από τις πηγές λέιζερ που χρησιμοποιούνται στην βιολογία και την ιατρική με στενούς παλμούς μεγάλης ισχύος. Επίσης, για να διαπεράσει η δέσμη το υλικό χωρίς να απορροφήσει μεγάλα ποσά ενέργειας, πρέπει να είναι διάφανο στο μήκος κύματος του λέιζερ αλλιώς αυτή η ενέργεια μπορεί να μετατραπεί σε θερμότητα που θα προκαλέσει και την καταστροφή του. Ανάλογα με την εφαρμογή και το αντικείμενο προς μελέτη χρησιμοποιούμε και το κατάλληλο μήκος κύματος. Συνήθως στις οπτικές λαβίδες χρησιμοποιείται μήκος κύματος 0.6 έως 1.1 μm αφού εκεί βρίσκεται και το οπτικό παράθυρο απορρόφησης για τα περισσότερα βιολογικά υλικά.



Εικόνα 3.2 Γράφημα που απεικονίζει τη διαπερατότητα των βιολογικών υλικών σαν συνάρτηση του μήκους κύματος, στο κοντινό υπέρυθρο, δείχνοντας την καμπύλη απορρόφησης του νερού και κάποιων χρωστικών ουσιών. Το νερό απορροφά ισχυρά μετά τα 2 μm . Σημειώνονται τα μήκη κύματος του laser Nd:YAG και των διοδικών lasers [11]

Οι κύριοι απορροφητές στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος είναι το DNA και οι πρωτεΐνες ενώ στο ορατό φάσμα άλλες χρωστικές των ιστών. Στην εικόνα 3.2 φαίνεται ότι η αιμοσφαιρίνη (Hb) και η χλωροφύλλη απορροφούν όλο και λιγότερο φως καθώς μετακινούνται προς το υπέρυθρο φάσμα ενώ το νερό είναι αυτό που απορροφά το περισσότερο φως σε αυτό το μέρος του φάσματος. Έτσι λοιπόν αποδεικνύεται ότι το λέιζερ στερεάς κατάστασης Nd:YAG (Neodymium: Yttrium Aluminum Garnet) με μήκος κύματος εκπομπής στα 1064 nm, και το κοντινό του Nd:YLF (Neodymium: Yttrium Lithium Fluoride) με κορυφές εκπομπής στα 1047 και 1053 nm και αρκετά υψηλή ισχύ για παγίδευση είναι τα πιο κατάλληλα για οπτική παγίδευση βιολογικών δομών. Επιπλέον, υπάρχουν εμπορικά συστήματα υπέρυθρων διοδικών lasers, όπως το μεταβαλλόμενου μήκους κύματος Ti:sapphire (Titanium: sapphire) laser που μπορεί να εκπέμπει στην περιοχή 700-1100 nm. Μετά από μελέτες διαπιστώθηκε ότι η υπερβολική έκθεση ενός κυττάρου σε Nd:YAG laser στα 1064 nm θα προκαλέσει φωτοδυναμική βλάβη. Σε κάποια άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιώντας Ti:sapphire laser σε κύτταρα κατά τη διάρκεια της μίτωσης, παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα είναι λιγότερο ευαίσθητα στην ακτινοβολία γύρω από τα 700 nm και 820 nm, αλλά πολύ ευαίσθητα στα 760 nm, που αυτό δείχνει ότι η χρήση των διοδικών λέιζερ στα 820 nm είναι αξιόπιστη. Σύμφωνα με τον Ashkin, μια κυτταρική βλάβη δεν προέρχεται πάντα από την υπερθέρμανση του κυττάρου αλλά από τις δηλητηριώδεις φωτοχημικές αντιδράσεις που μπορεί να συμβούν. Το κατώφλι για την οπτική βλάβη (“*optical damage*”) είναι ο όρος που έχει αποδοθεί από τον Ashkin για αυτήν) καθορίζει το όριο στην φωτεινή ισχύ που μπορεί να ακτινοβολήσει το δείγμα και συνεπώς και στην οπτική δύναμη που μπορεί να παραχθεί.

Το Ti:sapphire laser έχει τρία πλεονεκτήματα. Πρώτον, μεταβάλλεται το μήκος κύματος οπότε είναι δυνατή η μελέτη πολλών διαφορετικών σωματιδίων σε διαφορετικές συνθήκες, δεύτερον, από κάποια κύτταρα απορροφούνται ελάχιστα κάποια μήκη κύματος και τρίτον, όλο το εύρος των μηκών κύματος που εκπέμπει εμπίπτει μέσα στο οπτικό παράθυρο των

βιολογικών υλικών. Ένα σημαντικό μειονέκτημα είναι το μεγάλο κόστος με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούν οι περισσότεροι διοδικά λέιζερ. [11]

3.4.2 Πως στήνεται μια παγίδα

Για να στηθεί μια οπτική παγίδα σε ένα συμβατικό μικροσκόπιο πρέπει να τηρηθούν δύο κανόνες. Πρώτον, μια μονορυθμική δέσμη λέιζερ πρέπει να εισαχθεί μέσα στο μικροσκόπιο χωρίς να επιδράσει τη λειτουργία του και δεύτερον, να εστιασθεί πολύ καλά πάνω στο δείγμα χρησιμοποιώντας έναν αντικειμενικό φακό με αριθμητικό άνοιγμα $NA \geq 1$. Η χρήση ενός διχρωϊκού καθρέπτη μας παρέχει τη σωστή λειτουργία του μικροσκοπίου ως όργανο παρατήρησης αφού ανακλά την δέσμη λέιζερ στις 45 μοίρες και την οδηγεί στον αντικειμενικό φακό ενώ το φως από το δείγμα διέρχεται από το διχρωϊκό στον προσοφθάλμιο φακό του μικροσκοπίου για παρατήρηση. Το μεγάλο αριθμητικό άνοιγμα του αντικειμενικού φακού βοηθάει στην μεγιστοποίηση της βαθμίδας του φωτός κοντά στην περιοχή εστίασης και εξασφαλίζει την ύπαρξη της παγίδας κατά την αξονική κατεύθυνση. Σημαντικό είναι να ρυθμίζεται η διάμετρος της δέσμης λέιζερ έτσι ώστε να γεμίζει ακριβώς ή και λίγο παρά πάνω την είσοδο του αντικειμενικού φακού.

Επιπλέον χαρακτηριστικά που μπορεί να διαθέτει είναι σύστημα που να διακόπτει το λέιζερ, ώστε να λειτουργεί η παγίδα επιλεκτικά αλλά και ρυθμιστή της ισχύος της δέσμης του λέιζερ. Ακόμα η παγίδα πρέπει να κινείται σε σχέση με το δείγμα και αυτό επιτυγχάνεται είτε κινώντας το δείγμα είτε κινώντας τη δέσμη. Για μετακινήσεις μεγάλης κλίμακας η παγίδα παραμένει σταθερή στον οπτικό άξονα και το δείγμα μετακινείται σε x - y επίπεδο μετακινώντας την αντικειμενοφόρο τράπεζα του μικροσκοπίου. Μηχανοκίνητη τράπεζα μικροσκοπίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μεγαλύτερη ακρίβεια ενώ 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 εκμεταλλευόμενοι το γεγονός ότι η δέσμη του laser εστιάζεται στο ίδιο επίπεδο με αυτό του δείγματος. Τέλος, αλλάζοντας τα οπτικά εστίασης η παγίδα μπορεί να μετατοπισθεί κάθετα σε σχέση με το επίπεδο του δείγματος.

Για γρήγορη και εύκολη μετακίνηση της παγίδας στο οπτικό πεδίο του φακού του μικροσκοπίου πρέπει η δέσμη λέιζερ να σαρώνει το δείγμα και ταυτόχρονα να διατηρείται ο φωτισμός όλου του ανοίγματος του αντικειμενικού φακού. Υπάρχουν τέσσερις τρόποι σάρωσης. Με μετακίνηση στις τρεις διαστάσεις ενός από τους εξωτερικούς φακούς εστίασης της δέσμης, με την περιστροφή γαλβανομετρικών κατόπτρων, με μετατόπιση στις τρεις διαστάσεις του άκρου μιας οπτικής ίνας (αυτή η τεχνική στην ουσία είναι παρόμοια με την πρώτη μόνο που η δέσμη μεταφέρεται μέσω μιας μονορυθμικής οπτικής ίνας) και με εκτροπή της δέσμης μέσω ακουστο-οπτικών διαμορφωτών.

Σε μια διάταξη οπτικής παγίδευσης, ο αντικειμενικός φακός είναι αυτός που εισάγει τις μεγαλύτερες απώλειες του φωτός. Οι αντικειμενικοί φακοί που κατασκευάζονται για τα μικροσκόπια διαθέτουν διαπερατότητα στο ορατό μέρος του φάσματος με αποτέλεσμα όλες οι αντανάκλαστικές επιστρώσεις να έχουν βέλτιστη απόδοση στο ορατό και να εξασθενούν ισχυρά, μήκη κύματος στο κοντινό υπέρυθρο, τα οποία είναι αυτά που χρησιμοποιούνται κυρίως στα lasers παγίδευσης για βιολογικές εφαρμογές. [11]

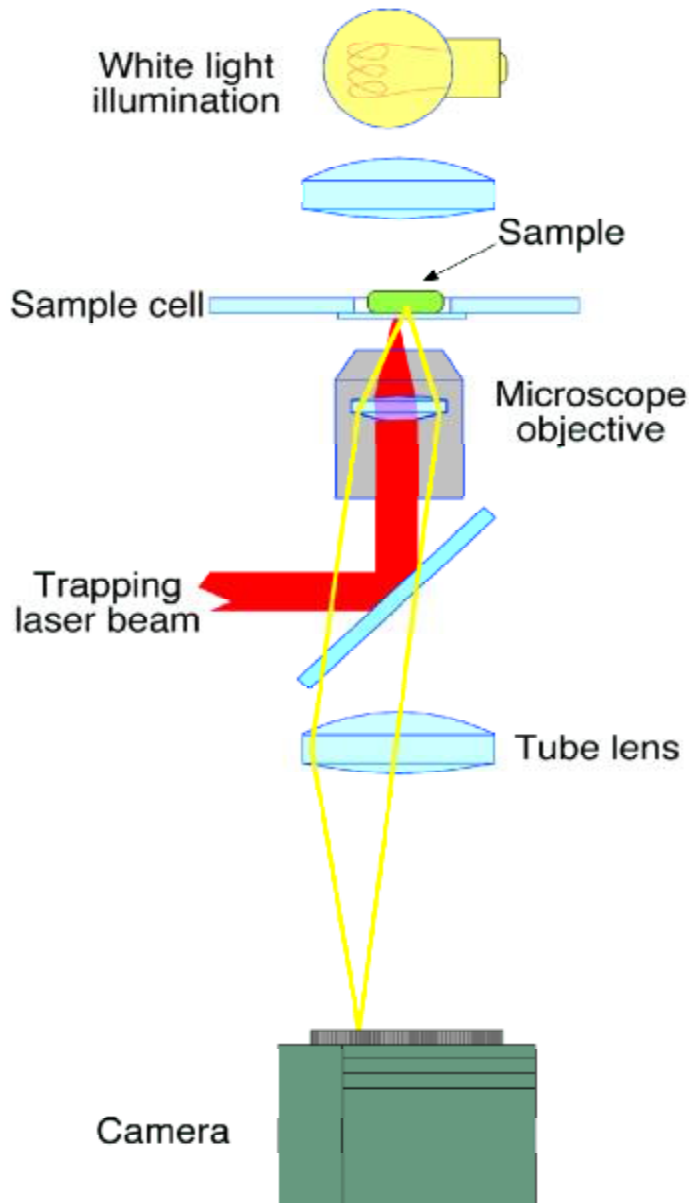
3.5 Το πρότυπο σύνθεσης των οπτικών λαβίδων

Οι οπτικές λαβίδες είναι πολύ εύκολο να συναρμολογηθούν από κάποιον που γνωρίζει πως δημιουργούνται τα οπτικά συστήματα αφού πολλά από τα εξαρτήματα τους είναι ίδια με αυτά των υψηλής μεγέθυνσης μικροσκοπίων. [10]

3.5.1 Λήψη μιας καλά εστιασμένης δέσμης

Για το σχηματισμό μιας καλά εστιασμένης δέσμης παγίδευσης πρέπει να χρησιμοποιηθεί ως οπτική πηγή ένα λέιζερ με υψηλή χωρική συνοχή. Συνήθως ως πηγή χρησιμοποιείται ένα διοδικό λέιζερ που αντλεί αλουμίνιο ύτριο και γρανάτη και αυτό συμβαίνει επειδή διαθέτει σταθερότητα και χαμηλό βαθμό απορρόφησης του υπέρυθρου από τα υλικά. Για να σχηματιστεί ένα εστιακό σημείο με περιορισμένη περίθλαση πρέπει να χρησιμοποιηθεί ως φακός εστίασης ένα μικροσκόπιο αντικειμενικών φακών υψηλής μεγέθυνσης με μεγάλο αριθμητικό άνοιγμα. Τέτοια μικροσκόπια είναι πολύ βολικά, αφού σχηματίζουν την εικόνα του δείγματος 160 mm πάνω από το πίσω μέρος της αντικειμενικής στέγασης και το μόνο επιπλέον εξάρτημα που απαιτείται είναι μία κάμερα ή ένα προσοφθάλμιο. Είναι τώρα συνηθισμένο να σχεδιάζονται αντικειμενικοί φακοί που σχηματίζουν το είδωλο στο άπειρο αλλά για αυτή τη λειτουργία απαιτείται ένας θετικός φακός. Μια οπτική λαβίδα θεωρείται κατάλληλη όταν μπορεί να εστιάσει μια παράλληλη δέσμη λέιζερ ακριβώς πάνω στο επίπεδο του δείγματος. (εικόνα 3.3)

Για την πρόληψη των μολύνσεων και των εκτροπών, το δείγμα βρίσκεται μέσα σε ένα υγρό που περιβάλλεται από μια γυάλινη λεπτή καλυπτρίδα και ο αντικειμενικός φακός είναι σχεδιασμένος να λειτουργεί με ένα λεπτό στρώμα ελαίου μεταξύ αυτού και της καλυπτρίδας, εξαλείφοντας τα πιθανά κενά αέρος. Οι φακοί είναι διαθέσιμοι με αριθμητικό άνοιγμα 1.3 έτσι ώστε να επιτυγχάνεται μέγιστη ανάλυση της εικόνας αλλά και μιας καλά εστιασμένης δέσμης λέιζερ. [10]

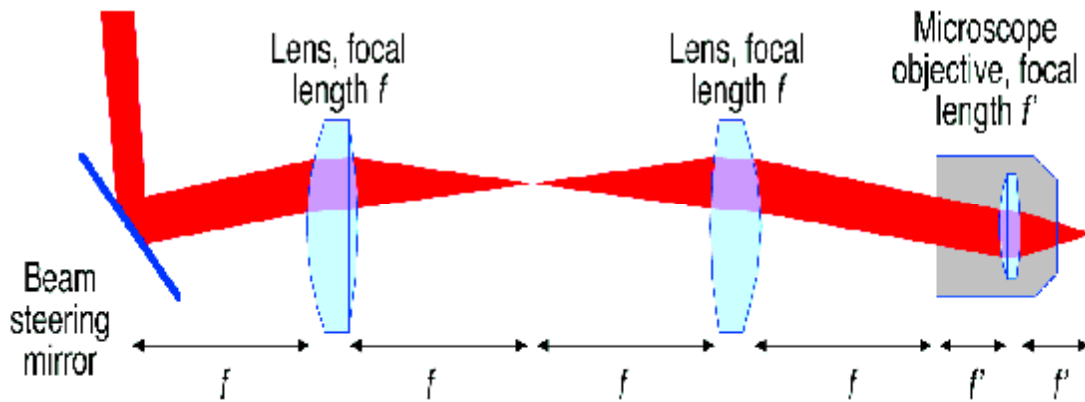


Εικόνα 3.3 Μια απλή διάταξη οπτικής λαβίδας βασισμένη στον αντικειμενικό φακό που σχηματίζει την εικόνα στο άπειρο. [10]

3.5.2 Τρόπος καθοδήγησης των δεσμών σε μια οπτική παγίδα

Κάτι πολύ χρήσιμο για τις οπτικές παγίδες είναι η δυνατότητα καθοδήγησης των δεσμών οπότε και ο χειρισμός του παγιδευμένου αντικείμενου από αυτές. Ένα οπτικά αποδοτικό όργανο αποτελεί ο μηχανισμός καθοδήγησης της δέσμης που παράγει μια παράλληλη δέσμη λέιζερ η οποία βρίσκεται πάντα εστιασμένη στο πίσω άνοιγμα του αντικειμενικού φακού. Μια γωνιακή μετατόπιση σχετικά με αυτό το σημείο θα έχει ως αποτέλεσμα την πλάγια μετατόπιση του εστιασμένου σημείου πάνω στο επίπεδο του δείγματος χωρίς την απώλεια επιπλέον φωτός. Στην εικόνα 3.4 βλέπουμε ένα απλό τέτοιο οπτικό σύστημα όπου η ευθυγραμμισμένη δέσμη λέιζερ προσπίπτει ακριβώς πάνω στον καθρέπτη καθοδήγησης της δέσμης. Μετά, αυτό το επίπεδο ξανά απεικονίζεται χρησιμοποιώντας ένα μη εστιακό τηλεσκόπιο στο πίσω άνοιγμα του αντικειμενικού φακού και με τη γωνιακή ρύθμιση της διεύθυνσης της δέσμης του καθρέπτη παράγεται μια πλάγια μετατόπιση του εστιακού

σημείου. Τέτοιου τύπου καθοδηγητές δέσμης μπορούν να αυτοματοποιηθούν και να χρησιμοποιηθούν για την απόλυτη αλλά και σχετική μετακίνηση του παγιδευμένου αντικειμένου με σεβασμό για το περιβάλλον που το περιβάλλει.[10]



Εικόνα 3.4 Ένα απλό οπτικό σύστημα με πλάγιο έλεγχο της θέσης της δέσμης στο επίπεδο του δείγματος των οπτικών λαβίδων [10]

3.6 Πολλαπλές λαβίδες

Για την ταυτόχρονη παγίδευση πολλών σωματιδίων δημιουργήθηκαν οπτικές παγίδες με πολλαπλές δέσμες. Αυτές υλοποιήθηκαν από την ταχεία σάρωση ενιαίας δέσμης μεταξύ δύο ή περισσότερων θέσεων παγίδευσης, με τον πρώτο διαχωρισμό της δέσμης μέσα στο οπτικό κύκλωμα όπου παράγονται δύο ξεχωριστές τροχιές φωτός που αργότερα ανασυνδέονται πριν εισέλθουν στο μικροσκόπιο και με τη χρήση ολογραμμάτων υπολογιστή που προκύπτουν ταυτόχρονες πολλαπλές δέσμες. Με τέτοιες παγίδες επιτυγχάνεται ανεξάρτητη τοποθέτηση διαφορετικών αντικειμένων ή μέρος αυτών. [10]

3.6.1 Ταχεία σάρωση θέσεων παγίδευσης

Αν η δέσμη λέιζερ που χρησιμοποιείται κινείται με μια συγκεκριμένη ταχύτητα τότε τα πολλαπλά αντικείμενα μπορούν να χειραγωγηθούν από τον χρονομετρισμό της ενιαίας δέσμης. Η τριβή των παγιδευμένων αντικειμένων παίζει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία πολλαπλών παγίδων. Επειδή είναι πολύ μεγάλη, παρέχει παραμονή θέσεων ενώ η δέσμη του λέιζερ βρίσκεται αλλού, σε κάποιο άλλο αντικείμενο. Κανονικά το λέιζερ έχει κατασκευαστεί για να κατοικεί σε έναν αριθμό διακριτών θέσεων που μπορούν να ελεγχθούν από έναν υπολογιστή. Στη περίπτωση δύο αντικειμένων, ο φόρος αναλογίας, δηλαδή ο χρόνος που δαπανάται από το λέιζερ σε κάθε θέση σε σχέση με το κύκλο του χρόνου, είναι 50%. Σε περίπτωση τριών αντικειμένων είναι 33% κ.ο.κ. Επίσης η δέσμη πρέπει να ξανά επισκεφτεί τη θέση του κάθε αντικείμενου τόσο συχνά έτσι ώστε το αντικείμενο να μη διαχυθεί σε μεγάλη απόσταση. [10]

3.6.2 Χωριστές τροχιές φωτός

Ένας απλός τρόπος παραγωγής μιας διπλής οπτικής παγίδας είναι η διαίρεση του λέιζερ σε δυο ξεχωριστές δέσμες. Όμως αυτή η μέθοδος απαιτεί δυο τροχιές φωτός με διαφορετικά x-y

συστήματα εκτροπής, οπότε ο έλεγχος γίνεται περίπλοκος, ακριβώς και η σταθερότητα της θέσης είναι πολύ δύσκολο να κατορθωθεί. [10]

3.6.3 Ολογράμματα

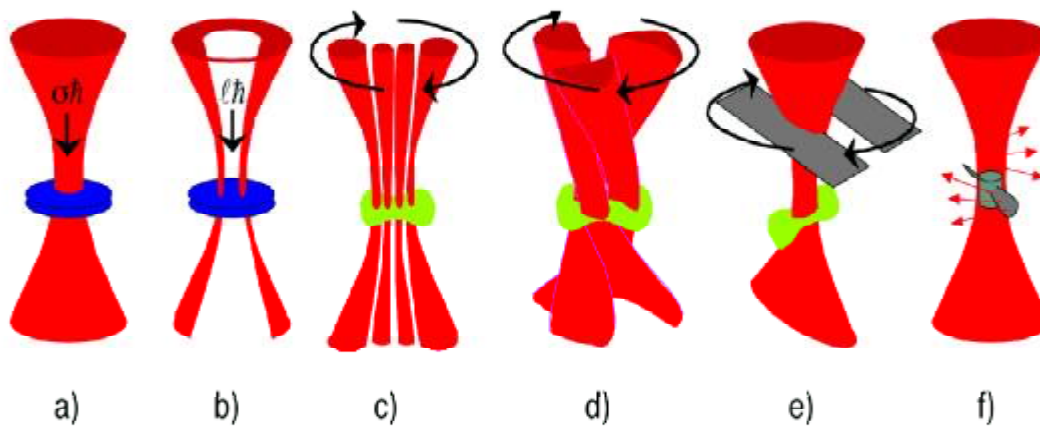
Τα ολογράμματα που δημιουργούνται από ένα υπολογιστή έχουν χρησιμοποιηθεί για την μετατροπή της Gaussian λειτουργίας των εμπορικών λέιζερ σε μια δέσμη με διαφορετική ένταση και φάση. Αυτά τα ολογράμματα παράγονται από το υπολογισμένο πρότυπο παρεμβολής που προκύπτει όταν η επιθυμητή δέσμη λέιζερ τέμνει τη φωτεινή δέσμη λέιζερ σε μια μικρή γωνία. Στη συνέχεια αυτό το πρότυπο μεταφέρεται σε ένα ολόγραμμα ταινίας υψηλής ανάλυσης και μόλις τοποθετηθεί στην αρχική δέσμη λέιζερ προκύπτει ένα πρότυπο εκτροπής, από το οποίο η πρώτη σειρά έχει τα επιθυμητά πλάτος και φάση. Μάλιστα, όταν επεξεργαστεί φωτογραφικώς σαν ένα ολόγραμμα φάσης, η απόδοση της μετατροπής μπορεί να φτάσει το 50%. [10]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4. Η εξέλιξη των οπτικών λαβίδων

4.1 Οπτικά κλειδιά (περιστροφή σωματιδίων κατά τη διάρκεια της παγίδευσης)

Στην εικόνα 4.1 φαίνονται οι μέθοδοι για την περιστροφή των σωματιδίων κατά τη διάρκεια της παγίδευσης.



Εικόνα 4.1 Διάφοροι μέθοδοι περιστροφής σωματιδίων σε οπτικές λαβίδες. Με μεταφορά (a)περιστροφής και (b)τροχιακής στροφορμής από τη φωτεινή δέσμη στο παγιδευμένο σωματίδιο, ροπή που παράγεται από τη κλίση δύναμης που δημιουργείται από (c)την περιστροφή της λειτουργίας υψηλής τάσης, (d)την περιστροφή του ασυμμετρικού πρότυπου παρεμβολής, (e)την περιστροφή του ανοίγματος και (f)την πίεση της ακτινοβολίας που δρα πάνω στα αντικείμενα με σχήμα έλικα [10]

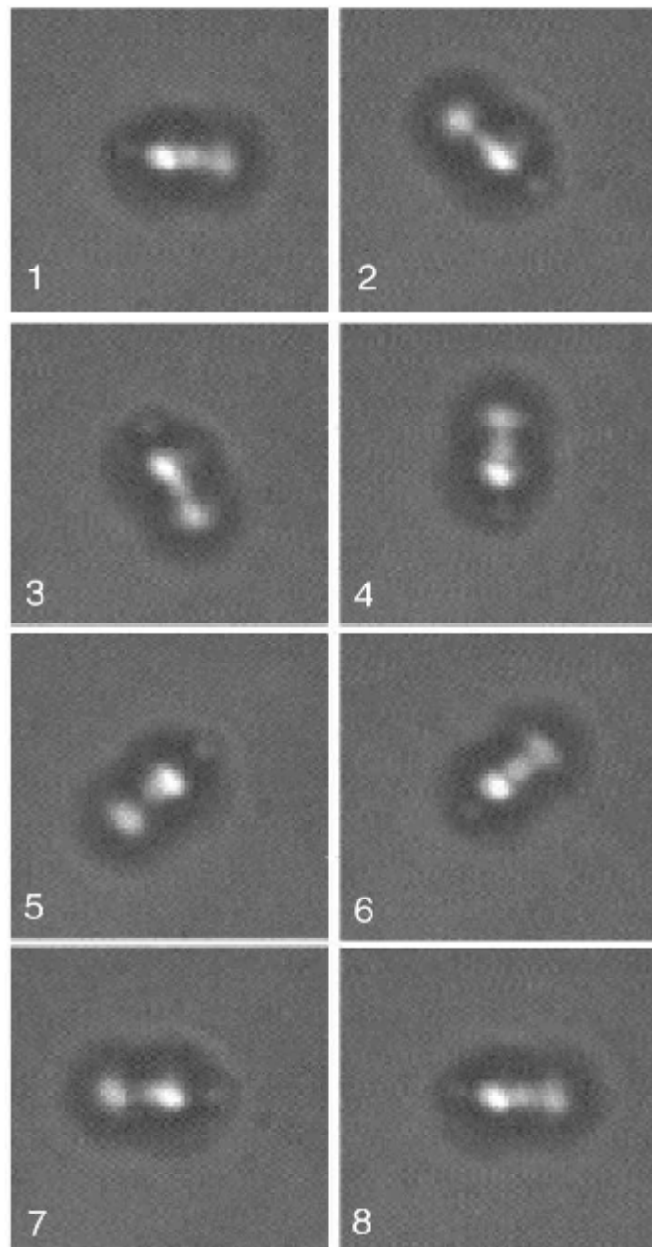
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι οπτικές λαβίδες χρησιμοποιήθηκαν σαν εργαλεία για τη μελέτη της μεταφοράς της στροφορμής στα σωματίδια. Έρευνες έδειξαν ότι για σωματίδια παγιδευμένα, η περιστροφή και η τροχιακή στροφορμή της δέσμης είναι αυτή που προκαλεί τη περιστροφή των διπλοθλαστικών και απορροφητικών σωματιδίων αντίστοιχα. Συγκεκριμένα για τα απορροφητικά σωματίδια, η περιστροφή και η τροχιακή στροφορμή μπορούν ταυτόχρονα να μεταφερθούν και με την ίδια αποδοτικότητα έτσι ώστε να είναι ανάλογη με την ολική στροφορμή η ροπή που εφαρμόστηκε. Επίσης, με τέτοιων ειδών οπτικές λαβίδες μπορεί να μελετηθεί η ενδογενή και η εξωγενή φύση της στροφορμής της φωτεινής δέσμης, μελετώντας την κίνηση των σωματιδίων που έχουν παγιδευτεί μακριά από τη δέσμη. (a,b)

Ο Sato, το 1991, για να μπορέσει να προκαλέσει την περιστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων χρησιμοποίησε μια περιστρεφόμενη υψηλής τάξης λειτουργία Hermite-Gaussian που σχετίζεται με τις δυνάμεις κλίσης. Έτσι, οι δυνάμεις κλίσεις που ασκούνται σχηματίζουν ένα διηλεκτρικό αντικείμενο προς τη μέγιστη ένταση. Σε περιπτώσεις που η δέσμη είναι ορθογωνική και συμμετρική, ένα ασύμμετρο σωματίδιο όπως το κύτταρο στρέφεται προς ένα συγκεκριμένο προσανατολισμό. (c)

Οπότε η περιστροφή ενός σωματιδίου επιτυγχάνεται με την περιστροφή της λειτουργίας του λέιζερ. Παρόλο που σαν ιδέα ακούγεται εύκολη, στην πράξη η περιστροφή της δέσμης λέιζερ γύρω από τον άξονα της είναι πιο δύσκολη.

Ένας τρόπος σχηματισμού ενός περιστρεφόμενου ασυμμετρικού πρότυπου έντασης είναι μια φωτεινή δέσμη Laguerre-Gaussian με ελικοειδή μέτωπα κύματος να παρέμβει με ένα επίπεδο κύμα. Το πρότυπο σπινάλ παρέμβασης που προκύπτει μπορεί να περιστραφεί αλλάζοντας τη διαφορά της απόστασης που διένυσαν οι δύο δέσμες. Αυτή η τεχνική προσαρμόζεται εύκολα διότι με την αλλαγή των δεικτών Laguerre-Gaussian αλλάζει η περιστροφική συμμετρία του πρότυπου παρεμβολής και έτσι βελτιώνεται το σχήμα του πρότυπου έντασης προς το σχήμα του αντικειμένου που περιστρέφεται. (d)

Με την εισαγωγή ενός ανοίγματος στην οπτική διαδρομή παράγεται μια ασυμμετρική δέσμη. Όταν το άνοιγμα τοποθετείται στο στάδιο περιστροφής, το οποίο βρίσκεται ήδη σε x-y στάδιο μετάφρασης, τότε ο άξονας περιστροφής ευθυγραμμίζεται πολύ εύκολα με τον άξονα της δέσμης. Πράγματι, με την τοποθέτηση ενός περιστρεφόμενου ορθογώνιου ανοίγματος στη δέσμη της λαβίδας προκαλείται τέτοιου είδους περιστροφή. (e) Παράδειγμα, με αυτόν τον τρόπο τοποθετήθηκε ένα ορθογώνιο άνοιγμα με μέγεθος 4mm σε μια δέσμη με μέγεθος 10 mm και έτσι παράχθηκε ένα εστιασμένο σημείο πάνω στο επίπεδο του δείγματος με ελλειπτικότητα 2:1. Έτσι, σφαιρίδια πυριτίου με διάμετρο 2μm παγιδεύτηκαν σε τρεις διαστάσεις και μπορούσαν να περιστραφούν συγχρονισμένα με το άνοιγμα.(εικόνα 4.2) Αυτή η μέθοδος μπορεί εύκολα να εφαρμοστεί ή να αφαιρεθεί από μια συσκευή οπτικών λαβίδων. Η τελευταία μέθοδος περιστροφής είναι ανάλογη με την κατασκευή του ανεμόμυλου, όπου το σχήμα των πτερυγίων καθορίζει την αποδοτικότητα της περιστροφής. Η λειτουργία αυτής της μεθόδου βασίζεται στο σχήμα του παγιδευμένου αντικειμένου και στην αντανάκλαση ή σκέδαση της γραμμικής ορμής της δέσμης, που είναι η πίεση ακτινοβολίας. (f) [10]



Εικόνα 4.2 Σφαιρίδια πυριτίου που περιστρέφονται με τη χρήση περιστρεφόμενου ανοίγματος [10]

4.2 Συμβολομετρικές οπτικές λαβίδες

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί κρόσσους συμβολής για την οπτική παγίδευση και μικροχειραγώγηση για τα μικροσκοπικά αντικείμενα. Τα κρόσσια μπορούν να παραχθούν είτε με την συμβολή δύο φωτεινών δεσμών είτε με τη προβολή μιας μειωμένης εικόνας της απόφασης του Ronchi στο επίπεδο του δείγματος. Σωματίδια μικρής διαμέτρου μπορούν να παγιδευτούν και να κρατηθούν σε μια φωτεινή περιοχή ενός συνόλου κρόσσων συμβολής και έπειτα να μετακινηθούν σε μια καθορισμένη θέση με τη σάρωση των κρόσσων κατά μήκος του οπτικού πεδίου. [12]

4.3 Οπτικές λαβίδες με λειτουργίες Gaussian υψηλής τάξης και άλλες δέσμες

Πολλοί επιστήμονες ενδιαφέρθηκαν να δημιουργήσουν από ολογράμματα υπολογιστή φωτεινές δέσμες Laguerre-Gaussian ώστε να τις χρησιμοποιήσουν στις οπτικές λαβίδες. Αυτές οι δέσμες είναι ικανές να έχουν ελικοειδή μέτωπα κύματος τα οποία φέρουν μια τροχιακή στροφορμή. Τα ελικοειδή μέτωπα κύματος συνδέονται με την οπτική δίνη, δηλαδή την δακτυλοειδή κατανομή έντασης με μηδενική ένταση στον άξονα και η δακτυλοειδή φύση αυτών των δεσμών οδηγούν σε κάποιες εφαρμογές στις οπτικές λαβίδες. Όταν τα σωματίδια έχουν δείκτη διάθλασης πολύ μικρότερο από το μέσο που τα περιβάλλει, η κατεύθυνση της δύναμης κλίσης αντιστρέφεται και αντί να έλκονται από την περιοχή με την υψηλότερη ένταση, απωθούνται από τον άξονα της δέσμης. Αυτό όμως για την λειτουργία Laguerre-Gaussian δεν αποτελεί πρόβλημα. Οι παγίδες δίνης όπως αποκαλούνται, δηλαδή οπτικές παγίδες που βασίζονται στην Laguerre-Gaussian λειτουργία, επέτρεψαν τον τρισδιάστατο περιορισμό κοίλων γυάλινων σφαιρών με διάμετρο 2 έως 50μm.

Επίσης στις οπτικές παγίδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν φωτεινές δέσμες Bessel. Αυτές οι δέσμες δεν προκαλούν περίθλαση και αποτελούνται από ένα κεντρικό φωτεινό σημείο το οποίο περιβάλλεται από ομόκεντρους δακτυλίους φθίνουσας έντασης. Από περιορισμένο εύρος και πάνω, όταν διαδίδεται η κεντρική περιοχή της δέσμης το σχήμα της δεν αλλάζει και έτσι δημιουργείται μια κατανομή έντασης που δεν έχει κλίση προς την κατεύθυνση διάδοσης. Παράδειγμα, τέτοιες δέσμες χρησιμοποιήθηκαν για την παγίδευση σωματιδίων σε δυο διαστάσεις, ώστε να αποκτήσουν στοίβαγμα και να οδηγηθούν κατά μήκος του κεντρικού πυρήνα της δέσμης. [10]

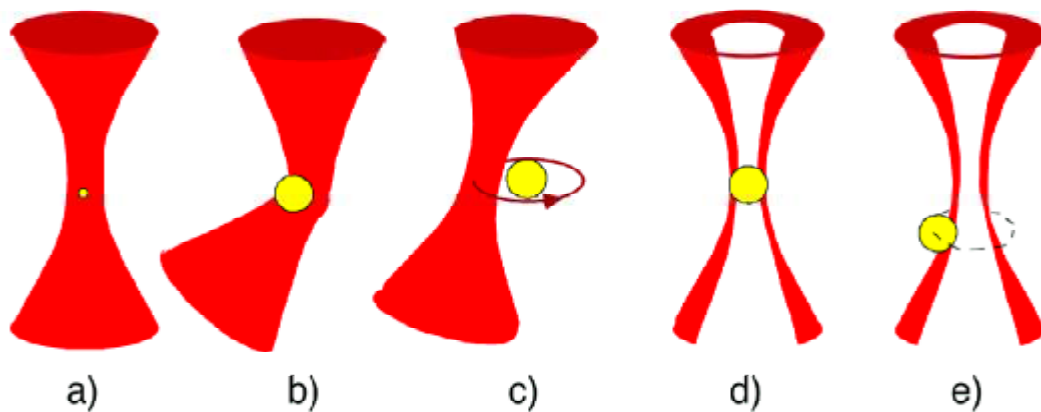
4.4 Χρήση διοδικών λέιζερ στις οπτικές λαβίδες

Στις μέρες μας οι οπτικές λαβίδες έχουν δημιουργηθεί σε εξειδικευμένα εργαστήρια και κάνουν χρήση πιο περίπλοκων αλλά περισσότερο προσαρμοστικό σύστημα λέιζερ. Όμως με τη χρήση διοδικών λέιζερ, οι οπτικές παγίδες μετατρέπονται σε εργαλεία ρουτίνας και αυτό είναι πολύ ελκυστικό και επιθυμητό από πολλούς. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα που προσφέρουν τα διοδικά λέιζερ είναι ότι δεν υπάρχει κίνδυνος κυτταρικού θανάτου αφού τα δείγματα είναι εξαιρετικά διαφανή στο υπέρυθρο, και η απουσία του φωτός απορρόφησης και η αντίστοιχη θέρμανση μειώνει αυτόν τον κίνδυνο. [10]

4.5 Παγίδευση μεταλλικών σωματιδίων

Στην εικόνα 4.3 απεικονίζονται οι τρόποι οπτικής παγίδευσης των μεταλλικών σωματιδίων. Η παγίδευση αυτών είναι πιο δύσκολη από την παγίδευση των διάφανων σωματιδίων. Τα μεταλλικά σωματίδια αντανακλούν, σκεδάζουν και απορροφούν περισσότερο και υπάρχει διάφορα στην ισορροπία μεταξύ της δύναμης σκέδασης και της κλίσης δύναμης. Η απορρόφηση αντιστοιχεί σε μια φανταστική συνιστώσα του δείκτη διάθλασης. Μικρά Rayleigh σωματίδια παγιδεύονται σε τρεις διαστάσεις όπου σε αυτό το μέγεθος η σκέδαση από το μέταλλο και η σκέδαση από τα διηλεκτρικά σωματίδια είναι παρόμοιες. Μεγάλα σωματίδια Mie παγιδεύονται σε δυο διαστάσεις και οι δυνάμεις δημιουργούνται από ένα υπέρπυουσα κύμα που προκαλείται από μια επιφάνεια πλασμονίου. Επίσης, τα μεταλλικά σωματίδια φυλακίζονται από δακτυλοειδής δακτυλίους ή περιστρεφόμενες δέσμες και παγιδεύονται σε δυο διαστάσεις λόγω μιας δύναμης που παράγεται από τη σκέδαση του

φωτός. Τέλος, τρισδιάστατη παγίδευση μπορεί να επιτευχθεί σε μια δακτυλοειδή περιοχή γύρω από το εξωτερικό της Laguerre –Gaussian λειτουργίας. [10]



Εικόνα 4.3 (a) μικρά σωματίδια που παγιδεύονται στην εστία της δέσμης από τη δύναμη που παράγεται από τη σκέδαση του φωτός, (b) Mie σωματίδια παγιδευμένα από την επιφάνεια πλασμονίου, παγίδευση μεγάλων σωματιδίων (c) από περιστρεφόμενες δέσμες, (d) από δακτυλοειδής δέσμες και (e) από σκέδαση του φωτός γύρω από το εξωτερικό της λειτουργίας Laguerre –Gaussian [10]

4.6 Μελλοντικές χρήσεις των οπτικών λαβίδων

Η ανάπτυξη των διαμορφωτών χωρικού φωτός έχει πολύ μεγάλο αντίκτυπο στην εξέλιξη των οπτικών λαβίδων. Η κατασκευή απλών πολυδεσμικών λαβίδων θα γίνει πιο εύκολη και χωρίς τα προβλήματα που σχετίζονται με τον περιορισμένο χρόνο παραμονής. Τα στατικά ολογράμματα θα αντικατασταθούν από εναλλακτικούς τρόπους παραγωγής δέσμης και οι χρήστες θα είναι ικανοί να αλλάζουν μεταξύ διαφόρων δεσμών παγίδευσης, όπου θα μπορούν να ελέγχουν ανεξάρτητα την αξονική και την πλευρική δύναμη παγίδευσης.

Κυρίως έχουν εξερευνηθεί οι βιολογικές εφαρμογές των οπτικών λαβίδων και όχι τόσο οι μη βιολογικές. Οι βιολόγοι επιθυμούν περισσότερες μηχανικές και βιομηχανικές πληροφορίες για το πώς λειτουργούν τα μεμονωμένα μόρια αλλά και μεγαλύτερη πρόοδο στην κατασκευή των λαβίδων. Θέλουν με την χρήση ενιαίων βιολογικών μορίων να ανιχνεύσουν τις δονήσεις μεμονωμένων πεδίων και πλευρικών αλυσίδων με υψηλό χρόνο και υψηλή χωρική ανάλυση. Λόγω αυτής της επιθυμίας τους οι φυσικοί ήταν αυτοί που επινόησαν νέους τύπους οπτικών λαβίδων, πιο έντονους και επιδέξιους από αυτούς που χρησιμοποιούνται σήμερα. [10]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5. Εφαρμογές με έμφαση στη Βιολογία

5.1 Έρευνες της δυναμικής μονών μορίων

Οι οπτικές λαβίδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλές εφαρμογές για την μελέτη των μονών μορίων. Είναι κατάλληλες για αυτό τον σκοπό επειδή οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών και οι δυνάμεις που παράγονται από περιστροφικές και γραμμικές μοριακές μηχανές κυμαίνονται μεταξύ 1-50 pN.

Παρακάτω παρουσιάζονται κάποιες μελέτες στα μονά μόρια με τη βοήθεια των οπτικών λαβίδων. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η γεωμετρία της οπτικής παγίδευσης πρέπει να αλλάζει και να προσαρμόζεται κάθε φορά στη συγκεκριμένη μελέτη. [9]

5.1.1 Μοριακές μηχανές (κινητήρες)

Οι οπτικές παγίδες βοήθησαν στην κατανόηση της λειτουργίας των γραμμικών μηχανών όπως η κινεσίνη, η μυοσίνη και η δυνεΐνη και των περιστροφικών μηχανών όπως τα βακτηριδιακά μαστίγια αφού παρέχουν τα κατάλληλα μέσα για την ανάλυση της μοριακής κίνησης, των δυνάμεων πως αυτές οι μηχανικές κινήσεις συνδέονται με την βιοχημεία. Οι πρώτες έρευνες ξεκίνησαν το 1980 ενώ πριν από αυτόν τον καιρό η ανάλυση των μοριακών μορίων περιοριζόταν στα βιοχημικά δεδομένα και η παρακολούθηση των σφαιριδίων γινόταν με βίντεο μικροσκόπιο.

Οι μοριακές μηχανές χωρίζονται σε επεξεργαστικές και μη επεξεργαστικές στη φύση. Επεξεργαστικές είναι για παράδειγμα η DNA και η RNA πολυμεράση, η κινεσίνη και η μυοσίνη V ενώ μη επεξεργαστικές είναι η μυοσίνη II. Η διαφορά τους είναι στον αριθμό των βημάτων μέχρι το δεσμευμένο πολυμερές.

Κάποιες από τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν την κινεσίνη. Η κινεσίνη είναι ένζυμο με μικροσωληνίσκους υπεύθυνα για την πρόσω μεταφορά κυστιδίων, για τη μύωση και τη μίτωση. Είναι ένα ομοδιμερές μόριο με ένα συσπειρωμένο στέλεχος συνδεδεμένο με δύο επικεφαλή πεδία και είναι επεξεργαστική.

Για επεξεργαστικές μηχανές όπως η κινεσίνη είναι κατάλληλη η χρήση οπτικών λαβίδων μονών σφαιριδίων. Τέτοιες λαβίδες χρησιμοποίησε ο Svoboda, όπου μια μικροσφαίρα επικαλλημένη με κινεσίνη τοποθετήθηκε σε κομμάτια μικροσωληνίσκων που ήταν δεσμευμένα με μια καλυπτρίδα. Αργότερα, ενσωμάτωσε ένα συμβολόμετρο διπλής δέσμης σε μια οπτική λαβίδα για την ανάλυση των κινήσεων των σφαιρών και χρησιμοποίησε ένα πρίσμα για να χωρίσει το λέιζερ σε δύο ορθογωνικά πολωμένες δέσμες, οι οποίες αργότερα εστιάστηκαν πάνω στο υπόδειγμα ως περιοχές ανίχνευσης περιορισμένες σε περίθλαση. Όταν η κινεσίνη εισήλθε στην περιοχή ανίχνευσής, παρουσιάστηκε μία μετατόπιση φάσης μεταξύ των δύο δεσμών, η οποία μετά τον ανασυνδυασμό με ένα άλλο πρίσμα εκδηλώθηκε ως ελλειπτική. Αυτή η ελλειπτικότητα μετρήθηκε με τη διέλευση της δέσμης από μια πλάκα κύματος, με ένα πολωτικό διαχωριστή δέσμης και ένα διαφορικό ενισχυτή. Το αποτέλεσμα ήταν ευαισθησία στην ανίχνευση μικρότερη του 1nm και μετά την βαθμονόμηση θα μπορούσαν να γίνουν μετρήσεις των δυνάμεων των μοριακών μηχανών. Επίσης, από την συγκεκριμένη έρευνα συλλέχτηκαν πολλά στοιχεία που αφορούν την βιοφυσική κίνηση με την βιοχημική δραστηριότητα.

Η μυοσίνη είναι άλλη μια μοριακή μηχανή με δύο κεφαλές και μια ουρά. Η ενζυματική πέψη της μυοσίνης μπορεί να την υποδιαιρέσει σε μικρότερα μέρη, το HMM (heavy meromyosin), το οποίο έχει μια ακρωτηριασμένη ουρά αλλά μια πλήρης λειτουργική διπλή κεφαλή και το υπόθραυσμα 1(S1), το οποίο έχει εξίσου μια ακρωτηριασμένη ουρά και μόνη κεφαλή. Η

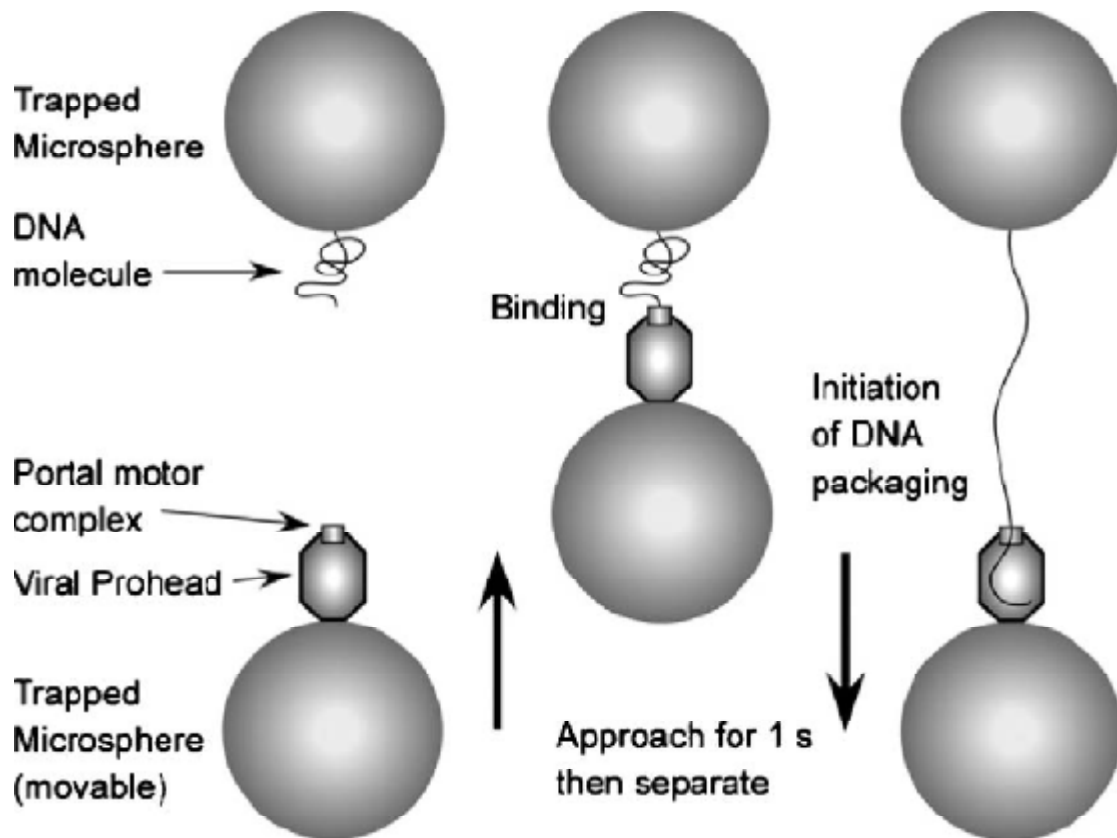
δράση της με μονομερή ακτίνης οδηγεί στη σύσπαση των μυών. Επειδή η μυοσίνη ανήκει στις μη επεξεργαστικές μηχανές, για την μελέτη του συστήματος ακτίνης-μυοσίνης απαιτείται διαφορετική πειραματική γεωμετρία. Ο Finer ήταν ο πρώτος που θέλησε να μελετήσει ένα τέτοιο σύστημα. Στο πείραμα του ένα μόριο ακτίνης τοποθετημένο μεταξύ δυο σφαιριδίων, έρχεται σε επαφή με ένα τρίτο σφαιρίδιο λειτουργοποιημένο με μυοσίνη. Με τη χρήση βαθμονομημένων οπτικών λαβίδων μετρήθηκαν οι δυνάμεις πάνω σε αυτά τα σφαιρίδια. Μόλις έκαναν επαφή η μυοσίνη και η ακτίνη, η φωσφορική αδενοσίνη υδρολύεται μέσα στο μέσο και προκαλείται κίνηση της ακτίνης. Τέτοιες κινήσεις μπορούν να παρακολουθηθούν με την απεικόνιση ενός από τα δύο σωματίδια σε ένα φωτοδιόδο. Οι δυνάμεις που μετρήθηκαν είχαν μέγεθος 3-6 pN και το μέγεθος των βημάτων ήταν 11nm.

Σημαντικές πληροφορίες για το συγκεκριμένο σύστημα φανέρωσε και το πείραμα του Molloy, ο οποίος απέδειξε ότι κεφαλές μονής μυοσίνης S1 μπορούν να λειτουργήσουν ως ανεξάρτητες γεννήτριες ισχύος αν κινηθούν κατά μήκος με νημάτια ακτίνης. [9]

Οι οπτικές λαβίδες βοήθησαν στην κατανόηση των βιοφυσικών χαρακτηριστικών της δυνεΐνης. Η δυνεΐνη είναι μια πρωτεϊνική μηχανή των κυττάρων που μετατρέπει την χημική ενέργεια που βρίσκεται στην ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) σε μηχανική ενέργεια κίνησης. Επίσης, μεταφέρει κυτταρικά φορτία "προχωρόντας" μαζί με τους μικροσωληνίσκους του κυτταροσκελετού προς το μικρότερο τέλος του μικροσωληνίσκου, το οποίο βρίσκεται στο κέντρο του κυττάρου. Αυτή είναι η διαφορά της με την κινεσίνη. [13]

Ο Shingyoji έκανε ένα πείραμα με την δυνεΐνη και κατάφερε να παγιδεύσει οπτικά μονούς μικροσωληνίσκους με λαβές σφαιριδίων και μέτρησε τις δυνάμεις που ασκούνται πάνω τους από τα συνδεδεμένα μόρια δυνεΐνης. Χρησιμοποιήθηκε UV flash φωτόλυση για την ενεργοποίηση της δυνεΐνης και αποδείχτηκε ότι εκδήλωσε μέγιστη δύναμη 6 pN. Χρόνια μετά, ο Hirakawa με ένα πείραμα του έδειξε ότι οι μικρές συγκεντρώσεις της ATP επιτρέπουν στην δυνεΐνη να κάνει επεξεργαστικές κινήσεις.

Τέλος, μια άλλη μοριακή μηχανή είναι η αχθοφόρος (porter motor), η οποία κατά τη διάρκεια μιας μόλυνσης βακτηρίων, μαζί με τα ιογενή βακτηριοφάγα φ29 πακετάρει το DNA σε πρώιμα καψίδια. Το πείραμα που πραγματοποιήθηκε αποτελούταν από δυο λαβίδες, η μια ελεγχόταν από έναν ακουστο-οπτικό εκτροπέα και η άλλη ήταν στατική. Με τη χρήση, λοιπόν, ενός ανιχνευτή θέσης μετρήθηκαν οι δυνάμεις εκτροπής στην στατική παγίδα. Το πείραμα εκτελέστηκε από τον Rickgauer και τους συνεργάτες του, οι οποίοι μέτρησαν τη δύναμη με την οποία η μηχανή πακετάρει το dsDNA σε ιογενή καψίδια. (εικόνα 5.1)



Εικόνα 5.1 Το πείραμα του Rickgauer ο οποίος μέτρησε τη δύναμη με την οποία η μηχανή πακετάρει το dsDNA σε ιογενή καψίδια [9]

Εδώ παρουσιάζεται η αξιολόγηση της μοριακής μηχανής με τη χρήση των οπτικών λαβίδων. Μια μηχανή πυλών (portal motor complex) συνδεδεμένη με ένα μικροσφαιρίδιο, το οποίο χειραγωγείται από έναν οπτικο-ακουστικό εκτροπέα, πλησιάζει αυτό το μικροσφαιρίδιο με ένα DNA συνδεδεμένο με μια σφαίρα για ένα δευτερόλεπτο ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία του πακεταρίσματος. Με την εκκίνηση αυτής της διαδικασίας μπορούν να μετρηθούν οι δυνάμεις του DNA που είναι συνδεδεμένο με τη σφαίρα καταγράφοντας την εκτροπή του λέιζερ στην κορυφή της σφαίρας. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων ήταν ισχύς της μοριακής μηχανής ίση με 700 zW, με φορτίο 30 pN και ταχύτητα 65bp/s.

Αυτές οι μελέτες είναι χρήσιμες για τους ανθρώπους, βοηθάνε στην κατανόηση των βακτηριοφάγων, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν θεραπευτικώς ενάντια των βακτηρίων που είναι ανθεκτικά σε πολλά φάρμακα. [9]

5.2 Έρευνες στα νουκλεϊκά οξέα

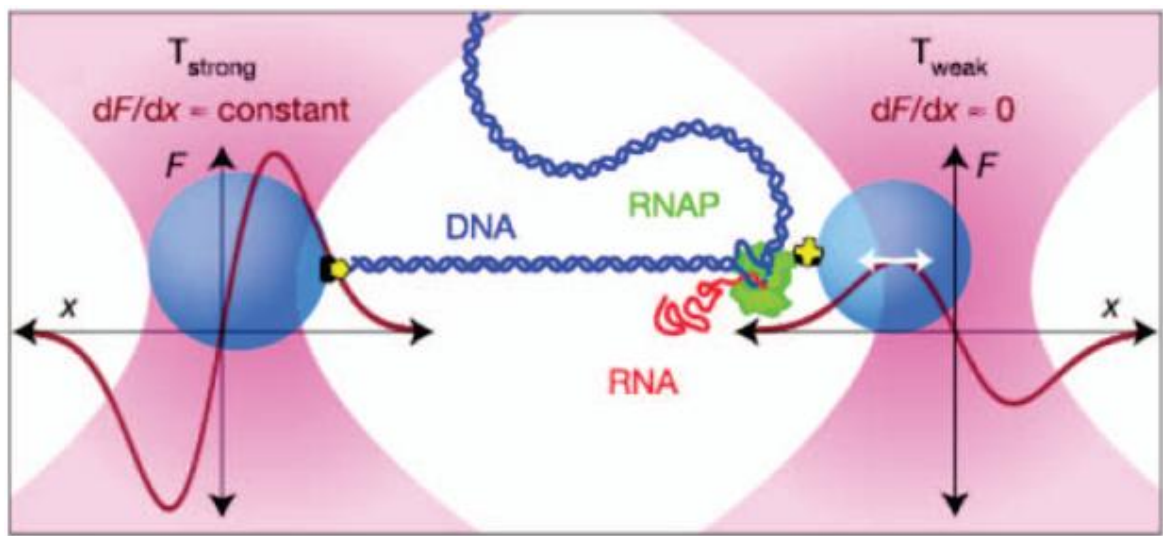
5.2.1 Η μεταγραφή του DNA

Ο όρος μεταγραφή περιγράφει την διαδικασία κατά την οποία δημιουργείται ένα μόριο RNA με τη χρήση μιας αλυσίδας του DNA ως προτύπου, της οποίας είναι συμπληρωματικό. Ανήκει στο πρώτο στάδιο της γονιδιακής έκφρασης. Αυτός ο όρος χρησιμοποιείται γιατί η γενετική πληροφορία, στη γλώσσα του DNA, μεταγράφεται στη γλώσσα του RNA από το ένζυμο RNA πολυμεράση. [14]

Πειράματα που έγιναν με οπτικές λαβίδες έδειξαν ότι η RNA πολυμεράση ασκούσε μια δύναμη ίση με 14pN κατά τη διάρκεια της μεταγραφής. Η ανάλυση της δύναμης της RNA

πολυμεράση κατά τη διάρκεια μεταγραφής της σε αγγελιοφόρο RNA απέδειξε ότι το μέγεθος του βήματος(step size) της RNA πολυμεράση ισούται με την απόσταση ενός ζεύγους μονών βάσεων. Αυτό το πείραμα βοήθησε πολύ αφού επέτρεψε την ανάλυση θέσεων σε επίπεδο angstrom. Για να γίνουν πράξη όλα αυτά κατασκευάστηκε μια υπερσταθερή συσκευή παγίδευσης που περιλαμβάνει τα εξής:

- Μια παθητική δύναμη σύσφιξης οπτικής διάταξης, όπου ένα από τα σφαιρίδια συγκρατούνται κοντά στην κορυφή της καμπύλης επέκτασης της δύναμης (εικόνα 5.2)
- Τη χρήση του ήλιου για να μην ξεφύγει από την κατεύθυνση της η δέσμη λέιζερ
- Μια διάταξη που μειώνει τα προβλήματα που σχετίζονται με το στάδιο της παράσυρσης [9]



Εικόνα 5.2 Αριστερά το μόριο του DNA συνδεδεμένο με ένα σφαιρίδιο, συγκρατείται από μία ισχυρή οπτική παγίδα, είναι συζευγμένο με την RNA πολυμεράση που είναι και αυτή συνδεδεμένη με ένα σφαιρίδιο και συγκρατείται από μια αδύναμη οπτική παγίδα. Ο εκτοπισμός μετριέται ενώ η RNA πολυμεράση εκτείνεται κατά μήκος του μορίου. [9]

5.2.2 Η διάσπαση του DNA από ένζυμα περιορισμού

Επειδή το DNA μπορεί να ζήσει σε διάφορες καταστάσεις, και υπερτυλιγμένο και ξετυλιγμένο, τα ένζυμα περιορισμού βρίσκουν και διασπών την ακολουθία που θέλουν. Σε πειράματα που έγιναν in vitro αποδείχτηκε ότι αυτά τα ένζυμα βρίσκουν και διασπών το στόχο πολύ πιο γρήγορα όταν το DNA είναι υπερτυλιγμένο και τα ίδια αποτελέσματα προέκυψαν όταν το εφάρμοσαν σε μεμονωμένα μόρια DNA εκτεθειμένα σε συγκεντρώσεις κορεσμού ενός ενζύμου περιορισμού. Με την οπτική παγίδευση ενός γραμμικού dsDNA μεταξύ δυο λαβών σφαιρών και την εισαγωγή ενός ενζύμου περιορισμού, επικυρώθηκε ότι ο μέσος χρόνος για να συμβεί η διάσπαση ήταν μεγαλύτερος όταν το μόριο ήταν τεντωμένο παρά όταν ήταν χαλαρό. [9]

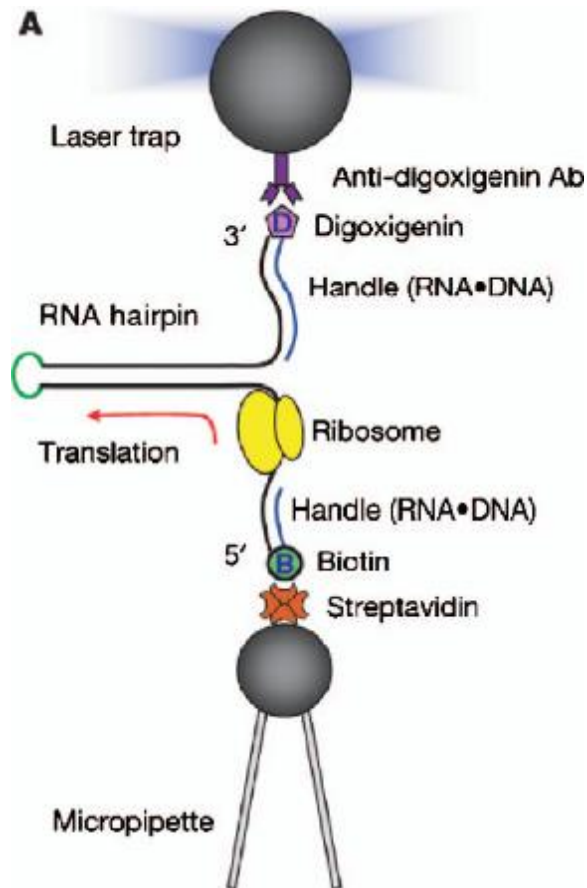
5.2.3. Η μεταφορά του DNA μέσω νανοπόρων

Εξαιτίας της ηλεκτροφόρησης είναι πιθανό να μετρηθεί η δύναμη που ασκείται πάνω σε ένα μεμονωμένο μόριο DNA καθώς αυτό διαπερνά ένα νανοπόρο. Σε πείραμα που διεξήχθη από επιστήμονες, ένα μεμονωμένο γραμμικό μόριο dsDNA κολλήθηκε στη μια άκρη με μια λαβή σφαίρας και τοποθετήθηκε κοντά στην είσοδο ενός πόρου. Με την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού, το μόριο φορτίστηκε και κινήθηκε μέσα από τη μεμβράνη του πόρου και έτσι η δύναμη που ασκήθηκε στη λαβή σφαίρας μετρήθηκε. Επίσης, μπορεί να υπολογιστεί η θέση του μορίου μεταξύ της ανάλυσης του πόρου σε νανόμετρα και να μετρηθεί το φορτίο του μορίου. Αυτό το πείραμα έγινε η αρχή για την εξερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεΐνης και DNA και για την εφαρμογή αλληλουχίας μεμονωμένων μορίων DNA. [9]

5.2.4 Η μετάφραση του RNA σε πρωτεΐνη

Η μετάφραση είναι μια διαδικασία στην οποία τα κυτταρικά ριβοσώματα δημιουργούν πρωτεΐνες. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, το αγγελιοφόρο RNA αποκωδικοποιείται από ένα ριβόσωμα και παράγεται ένα πολυπεπτίδιο το οποίο αργότερα τυλίγεται σε μια ενεργή πρωτεΐνη. [15]

Η χρήση οπτικών λαβίδων βοήθησε πολύ στην παρατήρηση του ριβοσώματος κατά τη διάρκεια της μετάφρασης. Σε πείραμα που πραγματοποίησε ο Wen με τους συνεργάτες του, ακολούθησαν ένα ριβόσωμα καθώς αυτό μετέφραζε το αγγελιοφόρο RNA σε πρωτεΐνη κατά μήκος μιας hairpin loop, δηλαδή ζεύγη βάσεων που σχηματίζουν μια διπλή έλικα και καταλήγουν σε μια θηλιά. Με δυο λαβές σφαιρών στα άκρα τερματισμού παγίδευσαν οπτικά το αγγελιοφόρο RNA μόριο εφαρμόζοντας μια σταθερή ένταση ισχύος 20pN και κατά τη διάρκεια της μετάφρασης το ριβόσωμα χαλάρωσε τη θηλιά. Αυτό εκδηλώθηκε στο αγγελιοφόρο RNA μόριο που εκτείνεται. Αυτή η επέκταση σε συνάρτηση του χρόνου αποκάλυψε τη ποσότητα του χρόνου που χρειάζεται ένα ριβόσωμα για να μεταφράσει ένα κωδικόνιο και απέδειξε ότι κάθε βήμα μετατόπισης ισοδυναμεί με τρία ζεύγη βάσεων ή αλλιώς ένα κωδικόνιο. (εικόνα 5.3) [9]

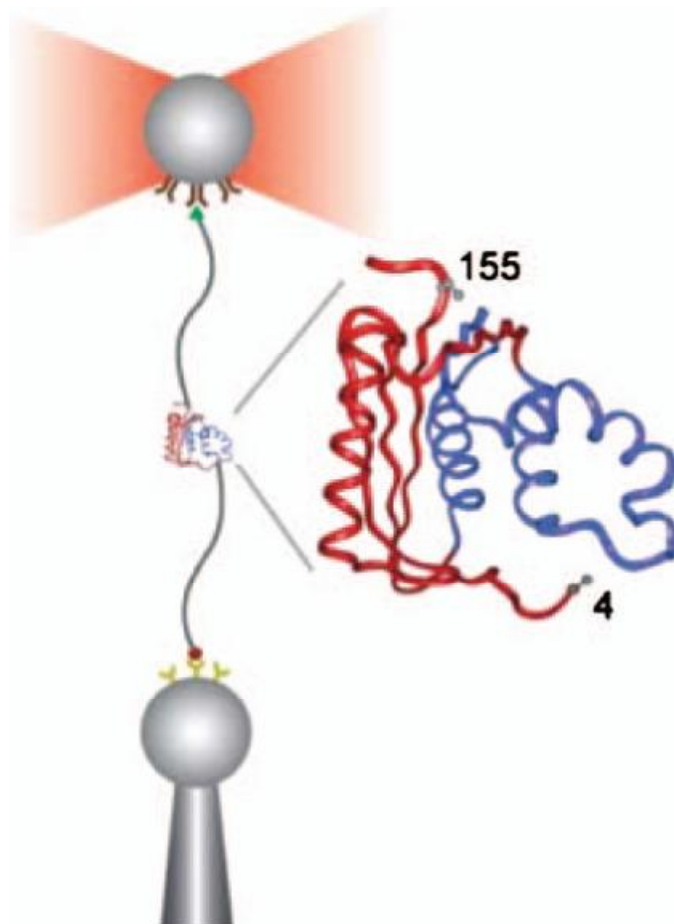


Εικόνα 5.3 Το πείραμα για την παρατήρηση του χρόνου ενός ριβοσώματος κατά τη διάρκεια της μετάφρασης. Η αλληλουχία του RNA που διαθέτει μια hairpin loop είναι συνδεδεμένη με δυο λαβές σφαιρών και τροφοδοτείται με σταθερή τάση ισχύος 20pN. Με τη χρήση μικροσταγονόμετρων και των οπτικών λαβίδων μετρήθηκαν οι δυνάμεις που ασκούνται στο RNA καθώς η θηλιά χαλαρώνει εξαιτίας της κίνησης του ριβοσώματος. [9]

5.2.5 Αναδίπλωση πρωτεΐνης

Σε αυτή τη διαδικασία η δομή της πρωτεΐνης αναλαμβάνει το λειτουργικό της σχήμα ή τη διαμόρφωση της. Ένα πολυπεπτίδιο αναδιπλώνεται σε μια λειτουργική τρισδιάστατη δομή από ένα τυχαίο σπείρωμα. Η κάθε πρωτεΐνη ζει σαν ένα μη διπλωμένο πολυπεπτίδιο όταν μεταφράζεται από μια αλληλουχία αγγελιοφόρου RNA σε μια αλυσίδα αμινοξέων. Αυτά τα αμινοξέα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν μια τρισδιάστατη αναδιπλωμένη πρωτεΐνη. Για αυτό το λόγο η αλληλουχία των αμινοξέων επηρεάζει τη δομή της πρωτεΐνης. Αν δεν γίνει σωστή αναδίπλωση μπορεί να προκληθούν βλάβες. [16]

Οι οπτικές λαβίδες βοήθησαν πολύ στην παρακολούθηση αυτής της διαδικασίας. Ο Cecconi με τους συνεργάτες του παρακολούθησαν την αναδίπλωση μιας πρωτεΐνης που ονομάζεται RNAase H, η οποία δέθηκε με δυο λαβές σφαιρών χρησιμοποιώντας δυο dsDNA συνδετήρες 500bp. Με τη μέτρηση των δυνάμεων που ασκήθηκαν στη μια σφαίρα αποδείχθηκε η ύπαρξη μιας ενδιάμεσης κατάστασης αναδίπλωσης μεταξύ της αρχικής και της τελικής κατάστασης. Αυτή η τεχνική μπορεί να δώσει πολλές πληροφορίες πάνω στην δυναμική της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης. (εικόνα 5.4) [9]



Εικόνα 5.4 Η πρωτεΐνη RNAase H δεμένη με τους δύο συνδετήρες οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με δύο σφαιρίδια. [9]

5.3 Οπτική χειραγώγηση στο κυτταρικό επίπεδο

Οι οπτικές λαβίδες δεν εστιάζονται μόνο στον κόσμο των μορίων, αντίθετα μπορεί να είναι χρήσιμες στην παγίδευση και οργάνωση των κυττάρων. Αυτό μας επιτρέπει να καταλάβουμε αναρίθμητες όψεις της κυτταρικής βιολογίας. Τα τελευταία χρόνια μάλιστα έχει παρατηρηθεί μια σημαντική πρόοδος στις μελέτες για τις οπτικές λαβίδες για κύτταρα. Οι επιστήμονες έχουν ξεφύγει πλέον από τις οπτικές λαβίδες μοναδικής δέσμης κι έχουν περάσει στη χρήση πολλαπλών οπτικών λαβίδων που μπορούν να κατασκευαστούν με διάφορους τρόπους όπως οι timeshared traps που μπορούν να φτιαχτούν με ακουστο-οπτικούς εκτροπείς ή γκαλβανόμετρα. Στην επιφάνεια έχει έρθει η χρήση των δυναμικών οπτικών στοιχείων διάθλασης που επιτρέπουν στους επιστήμονες να τα χρησιμοποιήσουν ως δυναμικά ολογραφικά στοιχεία ή να φτιάξουν πιο άμεσες εικόνες με τη τεχνική της αντίθετης φάσης. Περνώντας από το πεδίο της Γκαουσιανής ακτίνας σε άλλες ακτίνες όπως η ακτίνα Λάγκερ-Γκάους και Μπέσελ, μπορούν κι αυτά τα πεδία να προσφέρουν σαφή πλεονεκτήματα. [9]

5.3.1 Βιωσιμότητα των οπτικά χειραγωγημένων κυττάρων

Είναι πολύ σημαντικό για οποιοδήποτε πείραμα με κύτταρα να εξασφαλισθεί η βιωσιμότητα του κυττάρου έτσι ώστε να υπάρχουν σωστά αποτελέσματα. Η βιωσιμότητα του κυττάρου

είναι μείζονος σημασίας και εξαρτάται από το μήκος κύματος, τη διάρκεια του χειρισμού του κυττάρου, τη παρουσία οξυγόνου και το εάν το κύτταρο έχει προενταθεί.

Με τα ευκαρυωτικά κύτταρα ασχολήθηκε σε επιστημονική έρευνα ο Λιάνγκ κ.α για να εξερευνήσει τυχόν αλλοιώσεις των κυττάρων από το λέιζερ. Χρησιμοποιώντας κύτταρα από κινέζικα χάμστερ και με μήκη κύματος που διέφεραν ανακάλυψαν ότι το βέλτιστο μήκος κύματος για χρήση των οπτικών λαβίδων είναι στα 990nm. Σε αντίθεση, ανακάλυψαν ότι στα 760nm υπήρχε ολική απώλεια της βιωσιμότητας των κυττάρων σε διάρκεια έκθεσης στην ακτίνα λέιζερ γύρω στο 1 λεπτό. Μία άλλη έρευνα ασχολήθηκε με την ανταπόκριση των κυττάρων για πολλά λεπτά σε μήκος κύματος 980 nm και χαμηλή ισχύς λέιζερ.

Από την άλλη τα προκαρυωτικά κύτταρα δείχνουν μια αξιοσημείωτα παρόμοια αντίδραση όσον αφορά τη βιωσιμότητα σε διάφορα μήκη κύματος. Μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε για τη βιωσιμότητα της *Eschericia Coli* έδειξε ότι το βέλτιστο μήκος κύματος ήταν στα 970nm. Σε αυτό το μήκος κύματος τα κύτταρα μπορούσαν να υποστούν χειρισμό χωρίς να χάσουν όμως τη βιωσιμότητα τους. Επίσης οι επιστήμονες ανακάλυψαν ότι η παρουσία οξυγόνου έκανε τα κύτταρα να χάνουν τη βιωσιμότητα τους. Σε μια άλλη έρευνα με χαμηλότερης ισχύος λέιζερ για παγίδευση χρησιμοποιήθηκε η διατήρηση του ενδοκυτταρικού pH ως ένδειξη επιβίωσης των κυττάρων κατά τη χρήση των οπτικών λαβίδων. Σε αυτή την έρευνα χρησιμοποιήθηκε λέιζερ εκπομπής στα 1064 nm μήκος κύματος και συγκρίθηκαν τέσσερα διαφορετικά βακτήρια. Αυτά τα βακτήρια ήταν τα *Eschericia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* και *Bacillus Subtilis*. Όλα τα βακτήρια κάτω από αερόβιες συνθήκες εκτός από το *B. Subtilis* παρέμειναν ζωντανά ενώ σε αντίθεση κάτω από αναερόβιες συνθήκες το βακτήριο *B.innocua* μόνο παρέμεινε στη ζωή για 10 λεπτά. Από την παραπάνω έρευνα προέκυψε ότι: (α)τα διαφορετικά είδη βακτηρίων έχουν και διαφορετικές αντοχές στη μέθοδο των οπτικών λαβίδων (β)υπάρχουν παραλλαγές ακόμα και εντός των διαφορετικών ειδών βακτηρίων όπου κάποιοι υποπληθυσμοί κυττάρων σε ένα είδος είναι πιο ανθεκτικοί στην έκθεση τους στο λέιζερ (γ)οι αερόβιες συνθήκες είναι οι καταλληλότερες για να αποτρέψουν μεταγενέστερη απώλεια της βιωσιμότητας που προκαλείται από τον χειρισμό των κυττάρων με οπτικές λαβίδες. Παρόλα αυτά η έρευνα του Neuman φαίνεται να έρχεται σε αντίθεση με το τελευταίο. Οι συνθήκες στην έρευνα αυτή ήταν πολύ διαφορετικές καθώς υπήρχε μια πολύ σημαντική διαφορά στη δύναμη του λέιζερ που χρησιμοποιήθηκε όπως και στα είδη των βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για χειρισμό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από τη συγκεκριμένη έρευνα οι επιστήμονες πρότειναν ότι τα οξειδωτικά τονισμένα βακτήρια θα μπορούσαν να προσφέρουν προστασία από μετέπειτα τονισμό τους από χειρισμό με οπτικές λαβίδες. Όμως υπήρχε και μια πιθανότητα η ευαισθησία των κυττάρων στις οπτικές λαβίδες να οφειλόταν στην υποξία.

Σε μία ακόμη πιο πρόσφατη έρευνα μελετήθηκε κύτταρα ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του μαστού. Σε αυτή την έρευνα τονίστηκε παραπάνω η ιδέα της προέντασης ενός κυττάρου για να επιτευχθεί η βιωσιμότητα του κατά τη διάρκεια της τεχνικής. Όταν τα κύτταρα είχαν προακτινοβοληθεί με μία μικρότερη ισχύ λέιζερ τότε μόνο ένας σημαντικά μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων επιβίωσε από μετέπειτα ακτινοβολή τους με μεγαλύτερης ισχύς λέιζερ. Προτάθηκε επίσης ότι η παραπάνω τεχνική για την προστασία των κυττάρων θα μπορούσε να συμπεριλαμβάνει την ενεργοποίηση του κυτοχρώματος c. Στα κύτταρα των θηλαστικών, τα μήκη κύματος των ακτινών των οπτικών λαβίδων έδειξαν να προκαλούν την εμφάνιση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ. Αυτές οι πρωτεΐνες, που στην ουσία είναι συνοδευτικά μόρια, ίσως να μπορούσαν να βοηθήσουν το κύτταρο να φτιάξει τις μετουσιωμένες από την ακτίνα πρωτεΐνες.

Γενικά οι οπτικές λαβίδες υπήρξαν πολύ χρήσιμο “εργαλείο” στα χέρια των επιστημόνων καθώς κατάφεραν επιτυχώς να χειριστούν βιολογικό υλικό που παλιότερα θα ήταν αδύνατο να γίνει εφικτό. Αν και υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί η συμβολή των οπτικών λαβίδων είναι αδιαμφισβήτητη. Δυνατότητα για να μειωθεί η ζημιά των βιολογικών δειγμάτων υπάρχει και

κάποιοι τρόποι επιγραμματικά είναι: (α) μειώνοντας τον χρόνο που το κύτταρο παραμένει υπό κατάσταση οπτικής παγίδευσης (β) επιλέγοντας το κατάλληλο μήκος κύματος (γ) χρησιμοποιώντας νέες διαμορφώσεις των οπτικών λαβίδων όπως για παράδειγμα την ακτίνα Λαγκέρ-Γκάους. Η ακτίνα αυτή θα μπορούσε να προσφέρει την οπτική παγίδευση των κυττάρων με μικρότερη ισχύ από όσο θα μπορούσε να προσφέρει μια αντίστοιχη Γκαουσιανή ακτίνα. Ακόμη θα μπορούσε να εκθέσει λιγότερο από τον κυτταρικό όγκο του κυττάρου σε υψηλές πυκνότητες ροής. Σε γενικές γραμμές, μέσα από αυτές τις έρευνες φαίνεται η σημασία της επιλογής του μήκους κύματος αλλά και της ακτίνας. Πολύ περιληπτικά θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι ενώ το “θεραπευτικό παράθυρο” των οπτικών λαβίδων σε μήκος κύματος υπολογίζεται να είναι ανάμεσα στα 700 με 1064nm, η βιωσιμότητα των παγιδευμένων κυττάρων αλλάζει κατά πολύ με την αλλαγή του μήκους κύματος. Για τα κύτταρα των θηλαστικών, η βιωσιμότητα εξασφαλίζεται σε μεγαλύτερο βαθμό ανάμεσα στα 950 και 990nm, ακόμη και στα 800 με 850nm σε λίγο μικρότερο βαθμό και τέλος σε χαμηλότερο βαθμό στα 740 με 760nm. Για τα προκαρυωτικά κύτταρα που παγιδεύονται οπτικά σε ένα εύρος από 790 μέχρι 1064nm η βιωσιμότητα σε μεγαλύτερο βαθμό εξασφαλίζεται στα 970nm και σε λίγο μικρότερο στα 830nm ενώ σε χαμηλότερο βαθμό στα 870 με 930nm. Τέλος αν η μετέπειτα υποκαλλιέργεια είναι επιθυμητή η χρήση του λέιζερ Nd:YAG με μήκος κύματος 1064nm δεν προτείνεται σαν την καταλληλότερη επιλογή. [9]

5.3.2 Οπτική επέκταση των κυττάρων

Η οπτική επέκταση των κυττάρων συμπεριελήφθη σε πρόσφατες μελέτες που έγιναν σε μονοκυτταρικό επίπεδο. Η διάταξη της διπλής αντιπολλαπλασιαστικής παγίδας οδηγεί στη διόγκωση ενός παγιδευμένου παραμορφωμένου αντικειμένου με μεγαλύτερο δείκτη διάθλασης από το περιβάλλον του. Αυτό είναι αποτέλεσμα της αλλαγής στην ορμή του φωτονίου που συμβαίνει κατά τη διάρκεια του περάσματος από ένα μέσο με χαμηλότερο δείκτη διάθλασης σε ένα μέσο με υψηλότερο. Η κατεύθυνση της δύναμης στην επιφάνεια του κυττάρου μπορεί εύκολα να εξαχθεί χρησιμοποιώντας τη διατύπωση του Minkowski. Οι Moller και Oddershede παρουσίασαν μια σε βάθος συζήτηση που βασικό της θέμα ήταν η παραμόρφωση των μαλακών υλικών από τις οπτικές λαβίδες. Στην περίπτωση των κυττάρων η κατάσταση του κυτταροσκελετού μπορεί να κατανοηθεί από το διογκωμένο και ελλειπτικό σχήμα. Το οπτικό τέντωμα επιτρέπει την καταγραφή της ελλειπτικότητας του κυττάρου αλλά επιπλέον και την ενημέρωση όταν αλλάξει κάτι. Η οπτική επέκταση πρόσφατα άρχισε να θεωρείται σαν σημάδι του καρκίνου ενώ παλιότερα η χρήση της ήταν για την ελαστικότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα νοσούντα κύτταρα παρουσιάζουν διαφορές από τα υγιή. Ο κυτταροσκελετός των νοσούντων είναι πιο αδύναμος και για αυτόν τον λόγο παρουσιάζει περισσότερες παραμορφώσεις και ελλειπτικότητα από τα υγιή κύτταρα. Η ελλειπτικότητα των κυττάρων μπορεί να είναι ενδεικτική για την εμφάνιση της νόσου. Ο Guck κ.α πραγματοποίησαν μία έρευνα το 2005 κατά την οποία συγκρίθηκε η ελαστικότητα των καρκινικών κυττάρων και των μη καρκινικών και αποδείχθηκε ότι τα καρκινικά κύτταρα ήταν πιο παραμορφωμένα από τα μη καρκινικά. Στα καρκινικά κύτταρα που συμπεριλήφθησαν στην έρευνα υπήρχαν και μοντέλα καρκινικών κυττάρων του μαστού. Επιπλέον, στα καρκινικά κύτταρα όταν αυξανόταν η παραμόρφωση τους υπήρχε και μία αντίστοιχη αύξηση στην μεταστατική τους ικανότητα ενώ αντίθετα όταν μειωνόταν η παραμόρφωση μειωνόταν και η μεταστατική ικανότητα. Μετέπειτα έρευνα αποκάλυψε σημαντική αύξηση στη παραμόρφωση των κυττάρων της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας και του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μη καρκινικά τους κύτταρα. Αυτό επιβεβαίωσε τη διαγνωστική δυνατότητα αυτής της τεχνικής.

Η οπτική επέκταση μπορεί να πραγματοποιηθεί και με οπτικές λαβίδες μοναδικής δέσμης όπως και η διπλή αντιπολλαπλασιαστική παγίδα. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα κύτταρα

ζύμης ανήκουν στα πιο κοινά κύτταρα που χειρίζονται με τη τεχνική των οπτικών λαβίδων. Σε έρευνα ο Liao κ.α για να εξετάσουν προσεκτικά το επίκεντρο των οπτικών λαβίδων ανάμεσα στις δυο άκρες ενός ερυθρού αιμοσφαιρίου στη τιμή των 100 Hz χρησιμοποίησαν ένα “εργαλείο” οπτικής επέκτασης βασισμένο σε έναν οπτικο-ακουστικό ρυθμιστή. Έρευνες όπως του Bronkorst κ.α και Sleep κ.α έδειξαν ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια είχαν τεντωθεί οπτικά από τους επιστήμονες που χρησιμοποιώντας μικροσφαίρες ως “λαβές” στις αντίθετες άκρες του κυττάρου. Έπειτα αυτό χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί η ελαστικότητα των μεμβρανών των ερυθρών αιμοσφαιρίων μετά από χημική διάσπαση της σπεκτρίνης, αγκυρίνης και ακτίνης. Σε μια πρόσφατη μελέτη ο Suresh κ.α χρησιμοποίησαν τις οπτικές λαβίδες για να μετρήσουν την ελαστικότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά τη διάρκεια μόλυνσης τους από το παράσιτο της ελονοσίας *Plasmodium falciparum* και παρατήρησαν ότι καθώς η μόλυνση επεκτεινόταν τα κύτταρα παρουσίαζαν μία εικόνα πιο παραμορφωμένη και κολλώδης.

Ακόμη είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι μπορούν να αναλυθούν και οι οι μηχανικές ιδιότητες των μικρών ενδοκυτταρικών ειδών. Έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τον Wei κ.α για την βισκοελαστικότητα των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων χρησιμοποιώντας οπτικές λαβίδες με πιεζοηλεκτρικό γνώμονα ταλάντωσης, σύγκρινε δύο μεθόδους. Οι μέθοδοι που συγκρίθηκαν ήταν ο χειρισμός με οπτικές λαβίδες ενδοκυτταρικά δεσμευμένων σφαιρών και ενδογενών ενδοκυτταρικών κόκκων. [9]

5.3.3 Παγίδευση για την κυτταρική βιολογία και το μικρορροϊκό περιβάλλον

Τα τελευταία χρόνια η γενετική τεχνολογία έχει αναπτυχθεί πολύ κι έχει ανοίξει νέους δρόμους. Αυτή η ανάπτυξη δίνει τη δυνατότητα στους επιστήμονες να μετατρέψουν τη λειτουργία ενός κυττάρου. Η δυνατότητα που δίνεται να μελετηθούν περαιτέρω οι κυτταρικές λειτουργίες είναι πολύ σημαντική. Επίσης δρόμους για επιπρόσθετη κατανόηση και μάθηση ανοίγει και η αντίδραση των μονών κυττάρων σε μία ποικιλία γενετικού χειρισμού. Επιτρέποντας στα κύτταρα να εκτεθούν σε διαφορετικά βιοχημικά μέσα, μέσω μικρορροϊκών συστημάτων μπορεί να υπάρξει μίμηση των συνθηκών ζωής και να βοηθηθούν σημαντικά οι επιστήμονες στις μελέτες τους. Τα μικρορροϊκά συστήματα στην ουσία είναι μια σειρά από κανάλια με διάμετρο μέχρι 100 μm, των οποίων η φυσική επιτρέπει την ελασματώδη ροή με μία μικρή μίξη. Κεντρικό ρόλο μπορούν να παίξουν οι οπτικές δυνάμεις επειδή μπορούν ελεγχόμενα να μεταφέρουν κύτταρα σε διαφορετικά χημικά περιβάλλοντα. Για παράδειγμα μπορούμε να αναφέρουμε ότι τα κύτταρα μπορούν να χειριστούν με οπτικές λαβίδες από διαφορετικούς θαλάμους ή μεταξύ ρευμάτων στρωτής ροής με σκοπό να τους δοθούν διαφορετικά αντιδραστήρια. Όλα αυτά συμβαίνουν κατά τη διάρκεια μιας επιστημονικής μελέτης. Διαφορετικά, θα μπορούσαν να χειριστούν με οπτικές λαβίδες μικροσταγονίδια για να μεταφέρουν αντιδραστήρια σε ένα συγκεκριμένο κύτταρο ή για να εξάγουν, παραδώσουν ή αναλύσουν υποκυτταρικά κυστίδια ή λύματα.

Άλλα κυτταρικά πειράματα έγιναν εκθέτοντας τα κύτταρα σε διαφορετικά μέσα αλλά χωρίς μικρορροϊκά συστήματα. Ο Brown κ.α θέλοντας να επωφεληθούν από τον χαμηλό ρυθμό διάχυσης των διαλυμένων ουσιών έξω από τις τριχοειδείς σωλήνες παρουσίασαν τη χρήση οπτικών λαβίδων σε HL60 κύτταρα με τρία διαφορετικά αντιδραστήρια: στερεωτικό, ρυθμιστή διαπερατότητας και Trypan Blue. Παρόλα αυτά πρόσφατες μελέτες έχουν γίνει χρησιμοποιώντας οπτικές δυνάμεις με έναν νέο τρόπο. Δηλαδή με παραβολικές τροχιές μετέφεραν κύτταρα από ένα μέσο σε ένα άλλο με πλήρη απουσία οποιουδήποτε μικρορροϊκού συστήματος.

Τα λιποσώματα και άλλα μικροσωματίδια και νανοσωματίδια έχουν επίσης τη δυνατότητα να χειριστούν με οπτικές λαβίδες. Μόλις πραγματοποιηθεί ο χειρισμός τους με εγγύτητα, τα περιεχόμενα μπορούν είτε να αφεθούν είτε να εισέλθουν εντός των κυττάρων. Σε ένα πείραμα

χημικής ελευθέρωσης, τα οπτικά χειρισμένα σωματίδια που περιείχαν καρβαχόλη, λύθηκαν με την εγγύτητα ενός κυττάρου που εκφράζει τον υποδοχέα χρησιμοποιώντας ένα παλμικό UV λέιζερ. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα έγινε με φθορισμό. Η ελεγχόμενη ελευθέρωση μίας χημικής ένωσης με αυτόν τον τρόπο είναι σημαντικά επιθυμητή ως διαβάθμιση τοπικής συγκέντρωσης των διαχεόμενων χημειοτακτικών παραγόντων που αποτελούν σήμα κυτταρικής μετανάστευσης, διαφοροποίησης, αναπτυξιακής βιολογίας και του ανοσοποιητικού συστήματος. Το πλεονέκτημα της χρήσης των οπτικών λαβίδων έγκειται στο ότι προσφέρουν πολύ περισσότερο χωρικό και προσωρινό έλεγχο του ελευθερωμένου αντιδραστήρα.

Τέλος, να αναφέρουμε ότι η χρήση οπτικών λαβίδων είναι εφικτή και για να μελετηθεί η δυναμική ενεργοποίησης του υποδοχέα της μεμβράνης χρησιμοποιώντας μικροσφαιρίδια που είναι επικαλυμμένα με συνδέτες. Ο Monneret κ.α χρησιμοποίησαν ολογραφικές οπτικές παγίδες για να δημιουργήσουν ελιγμούς διαφόρων μικροσωματιδίων σε συγκεκριμένες περιοχές των ατομικά στοχευμένων κυττάρων COS-7 που είναι εξαρτημένα από ένα μικρορροϊκό περιβάλλον. [9]

5.3.4 Η χρήση των οπτικών λαβίδων στην νανοχειρουργική

Ο συνδυασμός οπτικών λαβίδων με πεδία φωτός τα οποία έχουν σχεδιαστεί για να εκτελέσουν μια κοπή με μεγάλη ακρίβεια είναι πολύ επωφελής στον τομέα της νανοϊατρικής και νανοτεχνολογίας. Τέτοια πεδία φωτός λειτουργούν σαν οπτικά ψαλίδια και συνήθως απαρτίζονται από πεδία λέιζερ UV, παλμικό λέιζερ Nd:YAG και παλμικές fs δέσμες με σκοπό τη μελέτη των ενδοκυτταρικών οργανιδίων. Ο Steubing, το 1991, χρησιμοποίησε μια οπτική παγίδα για να φέρει σε επαφή δυο κύτταρα και ύστερα έκοψε το κοινό τους τοίχωμα με μια μικροδέσμη λέιζερ UV και αυτά συγχωνεύτηκαν. Το αποτέλεσμα αυτού του πειράματος ήταν να δημιουργηθούν υβριδικά κύτταρα τα οποία διατηρούσαν την κυτταρική τους λειτουργία. Από την άλλη, ο Seeger με τους συνεργάτες του, συγκέντρωσε με μια οπτική παγίδα χρωμοσώματα, τα διαμέλισε με μια μικροδέσμη λέιζερ και στη συνέχεια σύλλεξε τα τμήματα τους ένα γυάλινο τριχοειδή. Με παρόμοια μέθοδο μπορούν, επίσης, να διαμελιστούν κυτταροσκελετικά σωματίδια και κυτταρικά σωματίδια και να διαχωριστούν μεμονωμένα κύτταρα από συστάδες κυττάρων.

Μια ικανότητα των μεγάλων λιποσωμάτων είναι να εκτελούν χημικές αντιδράσεις μέσα σε νανοφαλίδια με τη χρήση πικολίτρων του αντιδραστήριου. Αυτό το χαρακτηριστικό το εκμεταλλεύτηκε ο Kulín, ο οποίος με μια οπτική λαβίδα παγίδευσε δυο λιποσώματα και τα έφερε σε επαφή ενώ στη συνέχεια με τα συγχώνευσε με ένα μονό παλμό του υπεριώδους λέιζερ. Αυτό επέτρεψε στα αντιδραστήρια που βρίσκονταν μεταξύ των λιποσωμάτων να αναμιχθούν και να αντιδράσουν το ένα με το άλλο.

Μια άλλη δυνατότητα της νανοχειρουργικής είναι η ανάλυση των υποκυτταρικών συστατικών. Για παράδειγμα τα κυστίδια, τα οποία μπορούν να εξαχθούν από τα κύτταρα και να παγιδευτούν σε ένα προορισμό για γονιδιοματική και πρωτεομική ανάλυση. Άλλο ένα παράδειγμα είναι τα σταγονίδια ελαίου επικαλυμμένα με λιπίδια, τα οποία παγιδεύονται στη μεμβράνη πλάσματος του κυττάρου και χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση συστατικών της μεμβράνης. Μετά την εκχύλιση το υποκυτταρικό υλικό μπορεί να υποστεί περαιτέρω επεξεργασία. Η χρήση των οπτικών λαβίδων για το χειρισμό των μεμονωμένων υποκυτταρικών συστατικών, όπως τα μιτοχόνδρια, παίζει πολύ μεγάλο ρόλο στην μεταφορά και στην ανάλυση αυτών. [9]

5.3.5 Κυτταρική ταξινόμηση

Για το διαχωρισμό κυττάρων που έχουν φθορισμό χρησιμοποιείται η τεχνική ταξινόμησης κυττάρων που ενεργοποιούν το φθορισμό. Σε αυτή τη τεχνική τα κύτταρα είναι εστιασμένα υδροδυναμικά έτσι ώστε να περάσουν από μια ορθογώνια κατευθυνόμενη δέσμη λέιζερ που περιβάλλεται από ανιχνευτές και υπολογίζεται η πρόσθια σκέδαση, η πλάγια σκέδαση και ο φθορισμός. Έπειτα το ρεύμα ροής χωρίζεται σε σταγονίδια και ένα ηλεκτροστατικό φορτίο ανάλογο προς τον φθορισμό που έχει μετρηθεί τοποθετείται σε ένα κύτταρο που περιέχει σταγονίδιο και έτσι μπορούν να διαχωριστούν τα φορτισμένα σταγονίδια.

Η ταξινόμηση των κυττάρων αποτελεί άλλη μια εφαρμογή των οπτικών δυνάμεων στην κλίμακα των μεμονωμένων κυττάρων. Σε αυτή την περίπτωση οι λαβίδες μπορούν να τραβήξουν βιολογικά κύτταρα από ένα ρεύμα ροής, σχηματίζοντας ένα διαλογέα κυττάρων που ενεργοποιεί τον φθορισμό ή στοχεύουν στην ταξινόμηση των κυττάρων σε ένα τοπίο ενέργειας στηριζόμενοι στις διαφορετικές φυσικές ιδιότητες ενός τύπου κυττάρου σε σύγκριση με ένα άλλο. Ο Peroud χρησιμοποίησε ένα πληθυσμό διαφόρων κυττάρων και μέσα από αυτό ήθελε να διαχωρίσει τα μακροφάγα με φθορισμό. Για αυτό το λόγο χρησιμοποίησε ένα μικροροϊκό σύστημα σε συνδυασμό με τις οπτικές λαβίδες. Σε αυτή τη μελέτη αναφέρθηκε υψηλή καθαρότητα. Μια άλλη τεχνική για την ταξινόμηση των κυττάρων είναι βάση του σχήματος και του μεγέθους τους. Συστοιχίες οπτικών παγίδων μπορούν να σχηματίσουν οπτικά τοπία ενέργειας, τα οποία βρίσκονται στην κατάλληλη θέση για να βοηθήσουν στην τάση σμίκρυνσης ιδιαίτερα στον τομέα του οπτικού διαλογισμού και διαχωρισμού. Σε ένα τέτοιο τοπίο η κίνηση του βιολογικού υλικού εξαρτάται από την αλληλεπίδραση των φυσικών χαρακτηριστικών των σωματιδίων και των δυνάμεων που ασκούνται από το ίδιο το τοπίο, το οποίο εξαρτάται από την ισχύς του λέιζερ και από την οπτική του μορφή. Μια δέσμη Bessel μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένα τέτοιο τοπίο αφού το προφίλ αυτής της χαρακτηρίζεται από κεντρικό μη διαθλαστικό μέγιστο φως που περιβάλλεται από μια σειρά ομόκεντρων δακτυλίων. Μπορεί να παραχθεί από ένα χωρικό διαμορφωτή φωτός ή με την αποστολή μιας δέσμης Gaussian μέσω ενός περιθλαστικού οπτικού στοιχείου. Για την ταξινόμηση ερυθροκυττάρων και λεμφοκυττάρων, ο Paterson χρησιμοποίησε μια τέτοια δέσμη, όπου τα ερυθροκύτταρα παγιδεύτηκαν στους ομόκεντρους δακτυλίους ενώ τα λεμφοκύτταρα μεταφέρθηκαν στον κεντρικό πυρήνα της δέσμης και οδηγήθηκαν κατά μήκος του άξονα του.

Μια τελευταία τεχνολογία διαχωρισμού είναι η οπτική χρωματογραφία που διαχωρίζει σωματίδια και κύτταρα. Βασίζεται στην πίεση της ακτινοβολίας του λέιζερ και σε μια δύναμη αντίστασης από μια ροή ρευστού. Καθώς τα σωματίδια ρέουν στο διάλυμα προς την εστιασμένη δέσμη, παγιδεύονται από αυτή και επειδή εξαρτώνται από το μέγεθος και τον δείκτη διάθλασης παγιδεύονται σε διαφορετικές θέσεις επιτρέποντας ταυτόχρονα τον διαχωρισμό να συμβεί. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό του *B. Anthracis* από το *B. thuringiensis* σπόρο. Στην έρευνα χρησιμοποίησαν έναν σύνολο σπορίων και από τα δυο είδη, το οποίο έρρεε κατά μήκος ενός μικροροϊκού καναλιού κατά της οπτικής πίεσης από μια ελαφρώς εστιασμένη δέσμη λέιζερ των 850 nm. Το *B. Anthracis* επηρεάστηκε πολύ περισσότερο από την πίεση ακτινοβολίας του λέιζερ και διαχωρίστηκε σε πολλά εκατοντάδες μικρόν από ότι ο σπόρος *B. thuringiensis*. Τέλος, η οπτική χρωματογραφία μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σαν ανοσοανίχνευση, ιδιαίτερα ευαίσθητη. Όταν σφαιρίδια επικαλλημένα με αντισώματα έρχονται σε επαφή με αντιγόνα, δένονται μεταξύ τους σαν δίστιχα και αυτά τα δίστιχα μπορούν να διαχωριστούν με την οπτική χρωματογραφία από τα μη συνδεδεμένα σφαιρίδια. Η ποσότητα του αντιγόνου είναι ανάλογη με την αναλογία των διαχωρισμένων απλών και δίστιχων σφαιριδίων. [9]

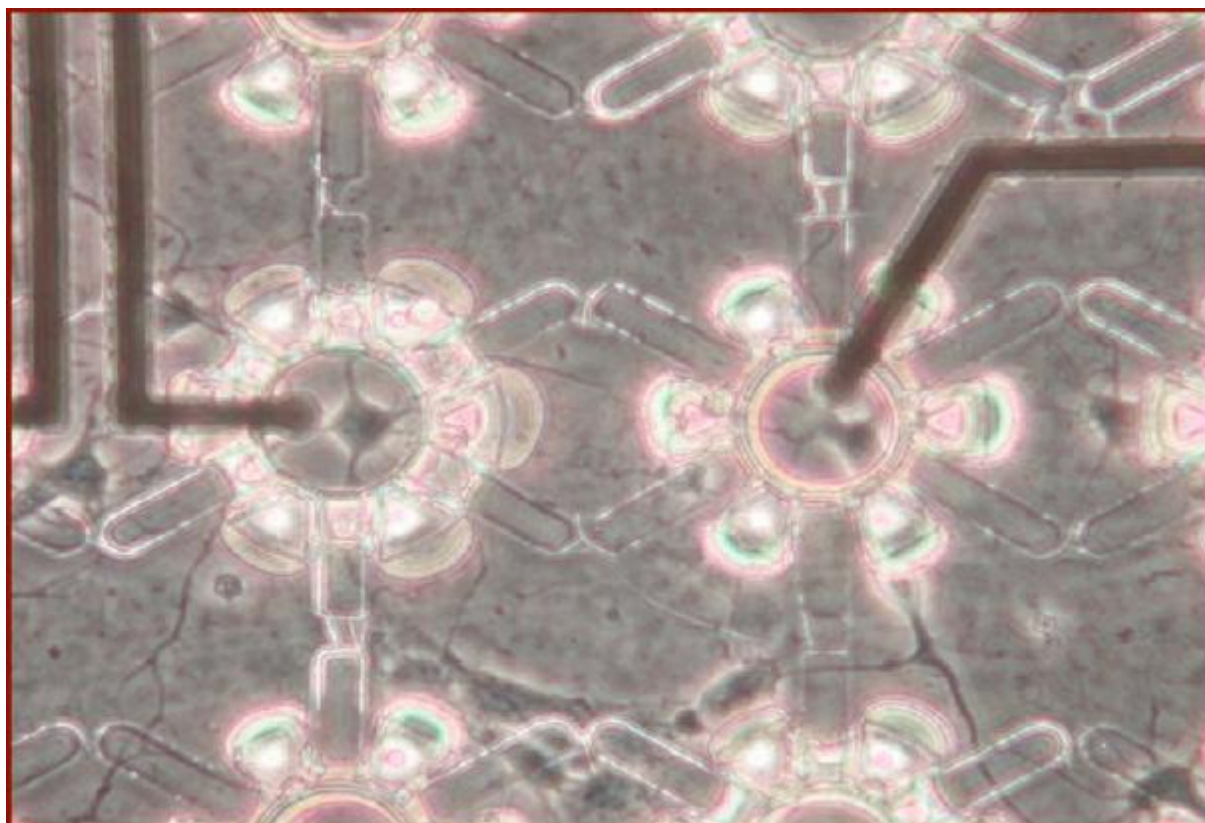
5.3.6 Η σχηματομόρφωση των κυττάρων και η καθοδήγηση της ανάπτυξης

Η οπτική χειραγώγηση είναι πλέον πολύ χρήσιμη στη μηχανική των ιστών και στη νευροεπιστήμη αφού σε αυτούς τους τομείς η διαμόρφωση και η οργάνωση των βιολογικών υλικών έχουν σημασία. Έχουν αποδειχτεί πρότυπα νευρών, τρισδιάστατα και δισδιάστατα, με στόχο τη δημιουργία τεχνητών νευρωνικών δικτύων. Ο Townes-Anderson παγίδευσε, το ένα δίπλα στο άλλο, ραβδία, κονία και άλλα κύτταρα του αμφιβληστροειδή και στη συνέχεια σχηματίστηκαν διεργασίες για τη διασύνδεση αυτών των κυττάρων. Οι οπτικές λαβίδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παράδοση μονών κυττάρων σε μικροκατασκευασμένους αισθητήρες όπως απέδειξαν οι Pine και Chow το 2009, οι οποίοι παρέδωσαν αρουραίου ιππόκαμπου νευρώνες σε πλαστικά κλουβιά parlene που περιείχαν ηλεκτρόδια για την τόνωση και την καταγραφή. (εικόνα 5.5) Σε άλλες μελέτες που έχουν γίνει έχει ερευνηθεί η ετεροτυπική σχηματομόρφωση μεταξύ των κυττάρων σε μια μεγαλύτερη κλίμακα για τη μηχανική των ιστών. Ο Akselrod με τους συνεργάτες του χρησιμοποίησαν SLM και AOD για να παράγουν συστοιχίες ζώντων κυττάρων σε μια διακρυλική πολυαιθυλενογλυκόλη υδρογέλης. Παράχθηκαν τρισδιάστατες και δισδιάστατες συστοιχίες βακτηρίων *P. aeruginosa*, οι οποίες θα μπορούσαν να καθοριστούν σε θέσεις με τη χρήση φωτοπολυμερίσιμου τζελ.

Επίσης, οι οπτικές λαβίδες μπορούν να ελέγξουν τους άξονες της άκρης των υφών των μυκήτων και ενός νευρώνα που αυξάνετε σε μέγεθος. Ο Burnham χρησιμοποίησε μηχανικά πεδία φωτός για τη συστολή και την επαγωγή διακλαδώσεων με ένα πολύ αναπαραγωγικό τρόπο και έτσι κατάφερε να ελέγξει την ανάπτυξη των υφών των μυκήτων.

Η χρήση λέιζερ για την κυτταρική σχηματομόρφωση και παράδοση έχουν μεγάλη σημασία στην μηχανική των ιστών αφού ο ακριβής έλεγχος της επαφής μεταξύ των κυττάρων αποτελεί μεγάλη πρόκληση. Παράδειγμα, το πρώιμο υπατοκύτταρο, μόλις αφαιρεθεί από το φυσικό του περιβάλλον χάνει δείκτες υπατοκυττάρων όπως το κυτόχρωμα P-450. Με τη συγκαλλιέργεια μη παρεγχυματικών κυττάρων μπορεί να βελτιωθεί αυτή η απώλεια. Οπότε ο Nahmias με τους συνεργάτες του, χρησιμοποιώντας μια εστιασμένη δέσμη 830 nm, τοποθέτησαν πολύ προσεχτικά ομοτυπικά κύτταρα, δηλαδή κύτταρα του ίδιου τύπου και ετεροτυπικά κύτταρα, δηλαδή κύτταρα διαφορετικού τύπου σε γραμμικές συστοιχίες και αυτά άρχισαν να συγκεντρώνονται σε δομές τύπου ιστών. Στην πρώτη περίπτωση, το λέιζερ τοποθέτησε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιας φλέβας (HUVEC) αυτοσυναρμολογούμενα σε αγγειακές δομές ενώ στη δεύτερη, ο συνδυασμός πρωτογενών ηπατοκυττάρων αρουραίου που σχηματομορφώθηκαν με κύτταρα HUVEC είχαν σαν αποτέλεσμα σωληνοειδή δομές που θυμίζουν την ηπατική ημιτονοειδή, ένα εξειδικευμένο αιμοφόρο αγγείο του ήπατος.

Από την άλλη, ο Arneborg για να παρακολουθήσει τη δυναμική των οικοσυστημάτων της συνεργιστικής μαγιάς χρησιμοποίησε την κυτταρική σχηματομόρφωση. Με τους συνεργάτες του λοιπόν, οργάνωσαν δυο είδη κυττάρων μαγιάς για να μπορέσουν να παρακολουθήσουν τα χαρακτηριστικά της ανάπτυξης τους χρησιμοποιώντας μια γενικευμένη τεχνική αντίθεσης φάσης ως πολλαπλή παγίδα. Τα *Uvarum Hanseniaspora* κύτταρα ήταν περικυκλωμένα από τα *Saccharomyces cerevisiae* κύτταρα και πράγματι τα δεύτερα επηρέασαν την ανάπτυξη των πρώτων. Ο χρόνος παραγωγής των *H. uvarum* ήταν 15% μεγαλύτερος από τα κύτταρα που δεν ήταν περικυκλωμένα. Ο περιορισμός που επιβάλλουν τα κύτταρα *S. cerevisiae* στα κύτταρα *H. Uvarum* οδήγησε στον πολλαπλασιασμό των δεύτερων και το συμπέρασμα που βγήκε ήταν ότι τέτοιος περιορισμός καθορίζει την ανάπτυξη σε ένα μικροβιακό οικοσύστημα. [9]



Εικόνα 5.5 Νευροκλουβιά Parlene τα οποία είναι σχεδιασμένα για να κρατήσουν, να τονώσουν ηλεκτρικά και να καταγράψουν την δραστηριότητα των νευρώνων. Σπέρνονται ένα κύτταρο τη φορά με τη χρήση οπτικών λαβίδων. [9]

5.4 Οι μηχανικές ιδιότητες της μεμβράνης των ηπατοκυττάρων πλάσματος

Η κυτταρική μεμβράνη των ηπατοκυττάρων παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ομοιοστάση των κυττάρων εξαιτίας την επιρροής της στα συστήματα υποδοχής και στα ένζυμα συνδεδεμένα με μεμβράνη. Συνήθως για την μελέτη της μηχανικής αυτής της μεμβράνης χρησιμοποιούνται μέθοδοι όπως η αποπόλωση φθορισμού και ο παραμαγνητικός συντονισμός. Σε αυτή την έρευνα όμως περιγράφεται η τεχνική σχηματισμού πρόσδεσης της μεμβράνης για τη μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων με τη χρήση οπτικών παγίδων και έτσι μπορούν να ερευνηθούν οι μηχανικές ιδιότητες αυτής της μεμβράνης στο επίπεδο του ενός κυττάρου.

Η οπτική παγίδα αποτελούταν από υπέρυθρο λέιζερ Spectra-Physics BL-106C 1064 nm, εστιασμένο από ένα αντικειμενικό φακό με αριθμητικό άνοιγμα 1.46. Για την μετακίνηση του δείγματος υπήρχε ένα Piezo stage P-561 3DD και το μικροσκόπιο ήταν AxioImager Z1. Για την λήψη των φωτογραφιών χρησιμοποιήθηκε μια κάμερα CCD. Η έρευνα έγινε πάνω στα ανθρώπινα κύτταρα HepG2. Τα κύτταρα, πρώτα, καλλιεργούνται σε καλυπτρίδες που είναι καλυμμένες με πολυ-L-λυσίνη, εφαρμόζεται και στις δύο καλυπτρίδες μια μικρή ποσότητα υδατικού διαλύματος πολυ-L-λυσίνης και επωάζονται για τριάντα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από αυτό, η καλλιέργεια HepG2, η οποία αναπτύχθηκε σε πιάτο καλλιέργειας με μέγεθος 60 mm, συλλέγεται με επιπλέον θρυψίνη, μεταφέρεται σε καλυπτρίδες επικαλύμενες με πολυ-L-λυσίνη και αναπτύσσεται.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, οι καλυπτρίδες των κυττάρων προσκολλούνται με τα πλακίδια του μικροσκοπίου σχηματίζοντας ένα κανάλι, το οποίο αργότερα γεμίζεται με

μικροσφαιρίδια πολυστυρενίου. Η θερμοκρασία του δείγματος μένει σταθερή στους 37 °C με αντικειμενικούς δακτυλίους θέρμανσης.

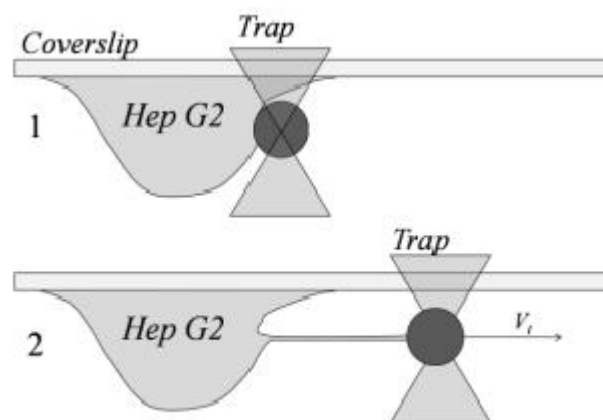
Η μικροσφαίρα λαμβάνεται από την οπτική παγίδα και έρχεται σε επαφή με την μεμβράνη του κυττάρου ενώ περίπου δέκα δευτερόλεπτα αργότερα, η μικροσφαίρα κινείται με μια συγκεκριμένη ταχύτητα σε κατεύθυνση μακριά από την επιφάνεια του κυττάρου και έτσι σχηματίζεται η πρόσδεση της μεμβράνης. Η λήψη των εικόνων γίνεται με κάμερα CCD και με την απενεργοποίηση της οπτικής παγίδας συνεχίζεται η λήψη των εικόνων για την καταγραφή της συστολής της μικροσφαίρας στην επιφάνεια του κύτταρου. (εικόνα 5.6)

Στο τέλος του πειράματος, πραγματοποιείται βαθμονόμηση δύναμης με τη χρήση της δύναμης τριβής και για αυτό το λόγο το δείγμα κινείται επανειλημμένα σε αντίθετες κατευθύνσεις σε σχέση με το παγιδευμένο μικροσφαιρίδιο. Η μικροσφαίρα μεταφέρεται από το κέντρο της παγίδας στο σημείο όπου η δύναμη της τριβής που δρα στη μικροσφαίρα αντισταθμίζεται με τη δύναμη της παγίδευσης. Με τη χρήση της κάμερας που αναφέραμε καταγράφεται η τροχιά των μικροσφαιριδίων και η σχέση μεταξύ της μετατόπισης της σφαίρας και της τριβής είναι εφοδιασμένη με μια γραμμή για το προσδιορισμό της ακαμψίας της παγίδας.

Με την μετατόπιση της σφαίρας από το κέντρο της παγίδας μπορεί να υπολογιστεί η δύναμη τάσης πρόσδεσης, όπου στη δικιά μας περίπτωση αποδείχτηκε ότι η δύναμη τάσης της μεμβράνης πρόσδεσης δεν εξαρτάται πάντα από το μήκος της. Με διαδοχικές μετρήσεις της δύναμης τάσης παρέχεται η στατική δύναμη τάσης πρόσδεσης που είναι συνδεδεμένη με την ένταση της μεμβράνης. Με τη μέτρηση της ακτίνας έντασης μπορεί να υπολογιστεί η ένταση της μεμβράνης αλλά αυτό μπορεί να περιπλέξει περισσότερο το πείραμα.

Όπως αναφέραμε πιο πάνω, τα μικροσφαιρίδια έρχονται σε επαφή με την μεμβράνη του κυττάρου και μετά από δέκα δευτερόλεπτα κινούνται σε κατεύθυνση μακριά από την επιφάνεια του κυττάρου και έτσι σχηματίζεται η πρόσδεση της μεμβράνης. Μόλις η σφαίρα απελευθερωθεί από την παγίδα, η πρόσδεση συμπύσσεται και τραβά τη σφαίρα στην κυτταρική επιφάνεια. Κατά τη διάρκεια αυτής της σύμπτυξης, η δύναμη που ασκείται πάνω στο σφαιρίδιο αυξάνεται μέχρι να φτάσει τη μέγιστη τιμή του που αντιστοιχεί στη στιγμή του σχηματισμού πρόσδεσης της μεμβράνης. Μετά από αυτό πέφτει στην ενδιάμεση τιμή και παραμένει σχεδόν σταθερή μέχρι το τέλος επιμήκυνσης της πρόσδεσης.

Με αυτό το πείραμα αποδείχτηκε ότι ο σχηματισμός πρόσδεσης της μεμβράνης είναι μια πάρα πολύ επιτυχημένη μέθοδος για τη μελέτη της μηχανικής της μεμβράνης των ηπατοκυττάρων και για τη μέτρηση των παραμέτρων που χαρακτηρίζουν αυτές τις μεμβράνες. [17]



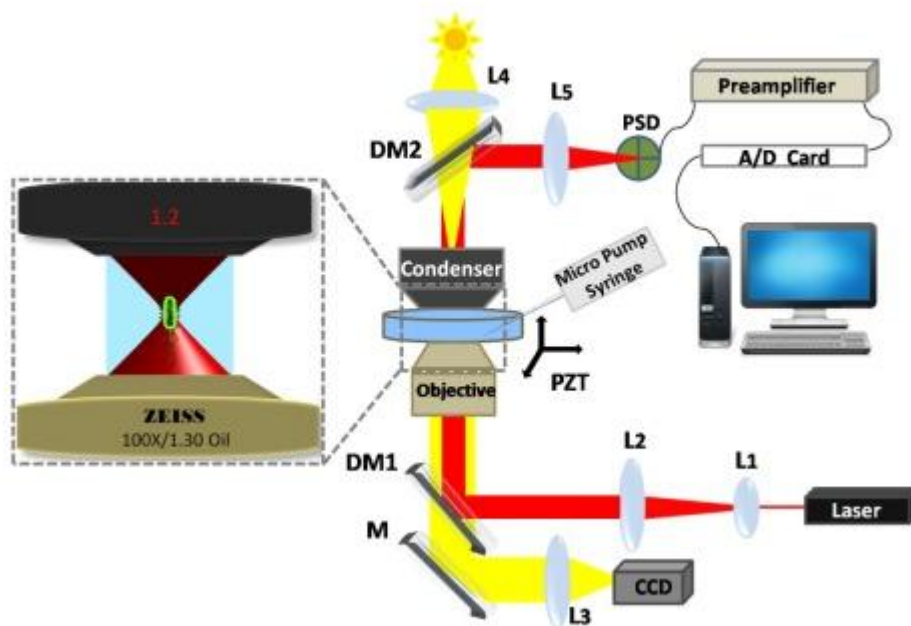
Εικόνα 5.6 Στην πρώτη εικόνα φαίνεται η στερέωση της μικροσφαίρας πάνω στην κυτταρική μεμβράνη και στην δεύτερη φαίνεται ο σχηματισμός της πρόσδεσης. [17]

5.5 Χρήση οπτικών παγίδων για την αξιολόγηση των τοξικών επιδράσεων ενός αντιμικροβιακού παράγοντα σε ένα μεμονωμένο βακτηριακό κύτταρο

Εδώ και πολλά χρόνια αποτελεί μεγάλο πρόβλημα για τη δημόσια υγεία η ανθεκτικότητα των αντιβιοτικών με αποτέλεσμα να απαιτούνται περισσότερες έρευνες για την σύνθεση παραγόντων με βελτιωμένες αντιμικροβιακές δραστηριότητες. Οι μέθοδοι διάγνωσης της μικροβιακής αντοχής και οι μέθοδοι μέτρησης της ευαισθησίας των βακτηρίων έχουν πολύ μεγάλη σημασία για τον έλεγχο των λοιμώξεων και για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων. Η πιο συνηθισμένη μέθοδος για τη μέτρηση της αντιμικροβιακής ευαισθησίας είναι αυτή που σχετίζεται με την καλλιέργεια αλλά υπάρχουν και εναλλακτικοί τρόποι που προσφέρουν βελτιωμένη ακρίβεια, χαμηλότερο κόστος, βραχύτερο χρόνο δοκιμής και μειωμένο μέγεθος του δείγματος. Οι οπτικές λαβίδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αυτό το σκοπό.

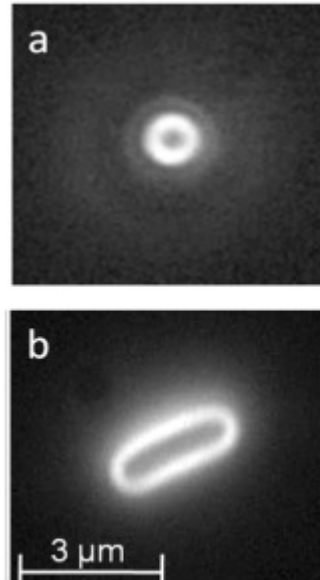
Στη συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιούνται οι οπτικές λαβίδες για την εξέταση των θανατηφόρων επιδράσεων διαφόρων συγκεντρώσεων της αιθυλικής αλκοόλης σε ένα κύτταρο *Escherichia coli*. Με παρακολούθηση και προσεχτική ανάλυση της δυναμικής του παγιδευμένου κύτταρου μπορεί να υπολογισθεί ο χρόνος θανάτωσης για τις διάφορες συγκεντρώσεις της αιθυλικής αλκοόλης.

Το σύστημα της οπτικής λαβίδας που χρησιμοποιήθηκε διέθετε ένα ανεστραμμένο μικροσκόπιο και μια ακτίνα λέιζερ συνεχούς κύματος επεκτεινόταν προτού όμως μεταδοθεί στο μικροσκόπιο μέσω των πλευρικών θυρών. Αυτή η δέσμη αργότερα συνδέεται μέσω ενός διχρωματικού καθρέπτη στην οπτική οδό του μικροσκοπίου και εστιάζεται στο θάλαμο του δείγματος με τη χρήση ενός αντικειμενικού φακού με αριθμητικό άνοιγμα 1.3. Ο θάλαμος που τοποθετείται το δείγμα είναι ένα γυάλινο πιάτο με ανοιχτό το πάνω μέρος και βρίσκεται πάνω σε ένα ειδικό σύστημα που επιτρέπει τον έλεγχο της θέσης της παγίδας. Η παγίδα βρίσκεται 10 μ m μακριά από τον πάτο του πιάτου για να μην υπάρξουν υδροδυναμικές επιδράσεις από το τοίχωμα του θαλάμου και η ισχύς του λέιζερ δεν ξεπερνάει τα 40mW για να αποκλειστούν τεχνήματα που μπορεί να προκληθούν από φωτοβλάβη και θέρμανση. Ένας συγκεντρωτικός φακός, μετά, συλλέγει το σκεδασμένο και μη φως από το παγιδευμένο βακτήριο, αυτό ανακλάται στην οπτική οδό του μικροσκοπίου από ένα άλλο διχρωματικό καθρέπτη και εστιάζεται σε ένα ανιχνευτή ευαισθησίας θέσης (PSD). Τα σήματα από το PSD, πριν μεταφερθούν και αναλυθούν στον υπολογιστή, ενισχύονται από προενισχυτές χαμηλού θορύβου. Τέλος, για την εισαγωγή της αιθυλικής αλκοόλης με μεγάλη ακρίβεια στο δείγμα χρησιμοποιήθηκε μια αντλία σύριγγας και ο έλεγχος του παγιδευμένου βακτηρίου γινόταν με μια κάμερα CCD. (εικόνα 5.7)



Εικόνα 5.7 Σχηματική απεικόνιση του συστήματος της οπτικής λαβίδας. Μια διευρημένη δέσμη λέιζερ συνδέεται στο μικροσκόπιο μέσω ενός διχρωματικού καθρέπτη(DM1) και εστιάζεται στο πιάτο του δείγματος. Το σκεδασμένο φως από το παγιδευμένο αντικείμενο συλλέγεται από ένα συγκεντρωτικό φακό μέσω της αντανάκλασης από άλλον ένα διχρωματικό φακό(DM2). Μικροσύριγγες χρησιμοποιούνται για την εισαγωγή της αλκοόλης στο δείγμα και προενυσχιτές χαμηλού θορύβου και κάρτα A/D για την προετοιμασία του σήματος και την απόκτηση των δεδομένων. Τέρμα αριστερά φαίνεται σε μεγέθυνση το βακτήριο που έχει παγιδευτεί από τις οπτικές λαβίδες. [18]

Ένα βακτήριο μέσα στο θάλαμο του δείγματος μπορεί να κολυμπήσει και κινηθεί όπου θέλει μέσα στο υδατικό περιβάλλον, όμως ένα παγιδευμένο βακτήριο ευθυγραμμίζεται κατά μήκος του οπτικού άξονα και καθοδηγείται από την κίνηση Brownian και τα μαστίγια προώθησης. Αφού το τελευταίο απαιτεί κυτταρική ενέργεια, η κίνηση ενός νεκρού ή μεταβολικά ανενεργού βακτηρίου στην παγίδα οφείλεται στην κίνηση Brownian. Με την στατιστική ανάλυση των σημάτων θέσεων που καταγράφονται δίνονται πολλές πολύτιμες πληροφορίες, όπως αν το βακτήριο είναι ζωντανό, που αυτό επιτρέπει την ακριβή αξιολόγηση των επιπτώσεων των αντιμικροβιακών παραγόντων. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα σήματα PSD σχετίζονται με αρκετούς παράγοντες, δηλαδή την ακαμψία της παγίδας, το μέγεθος του κυττάρου κ.α. Επίσης, η παρουσία περισσότερων από ένα βακτήριο στην παγίδα μπορεί να εισαγάγει ένα περίπλοκο θόρυβο στα σήματα PSD. Οπότε για την αποφυγή αυτού, το παγιδευμένο βακτήριο κινείται κοντά στο τοίχωμα του θαλάμου και στη συνέχεια πιέζεται ενάντια του τοιχώματος, που αυτό αλλάζει τον προσανατολισμό του. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να αποδειχτεί αν στην παγίδα βρίσκεται ένα ή περισσότερα βακτήρια.(εικόνα 5.8)

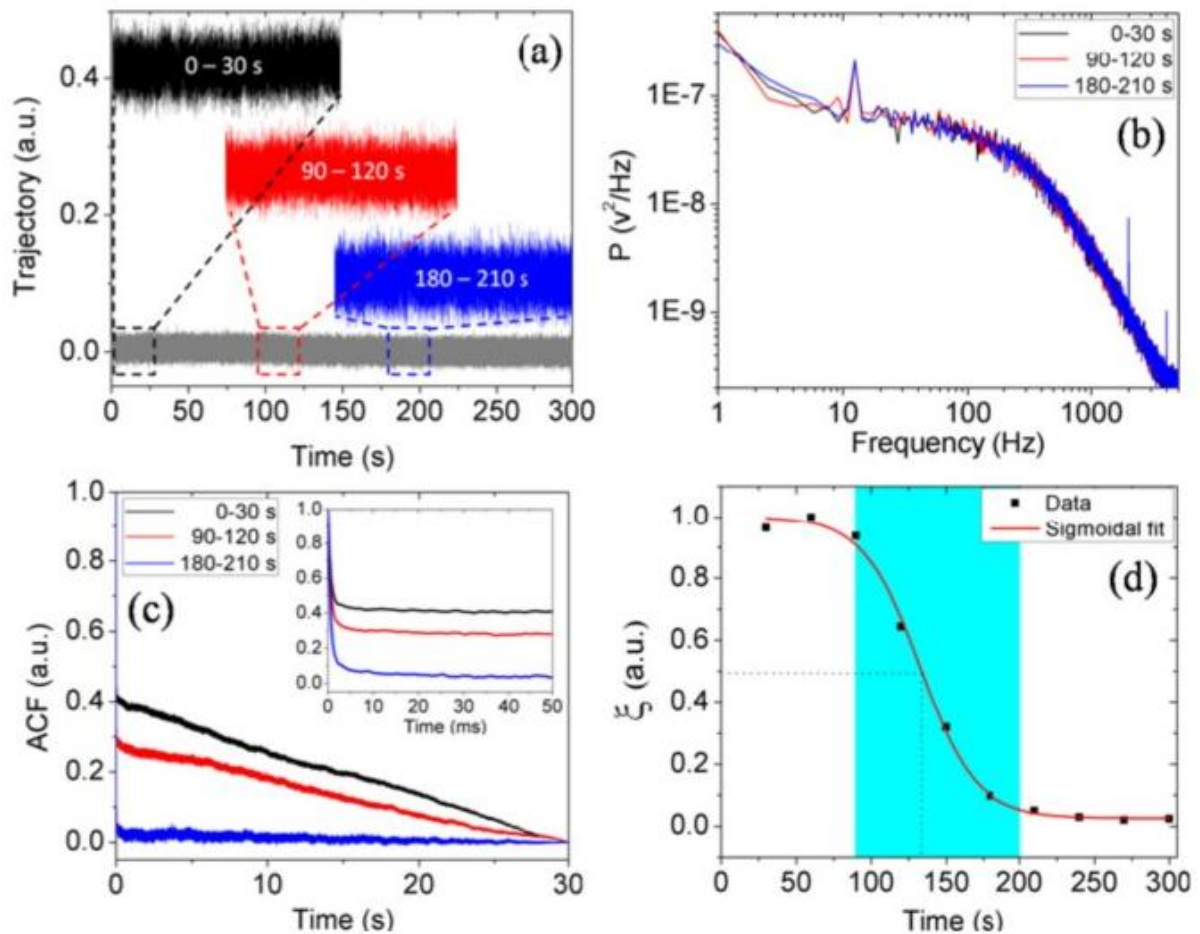


Εικόνα 5.8 a) όταν το βακτήριο είναι παγιδευμένο στο εσωτερικό του θαλάμου του δείγματος, το βακτήριο ευθυγραμμίζεται κατά μήκος του άξονα της δέσμης λείζερ έτσι ώστε να φαίνεται μια εγκάρσια προβολή b) όταν ωθείται ενάντια στο τοίχωμα του θαλάμου αλλάζει προσανατολισμό [18]

Σκοπός, λοιπόν, αυτού του πειράματος είναι η παγίδευση ενός βακτηρίου με οπτικές λαβίδες και η παρακολούθηση και καταγραφή των αλλαγών στις θέσεις μετά την εισαγωγή κάποιου αντιβακτηριακού παράγοντα. Για την επαλήθευση της σκοπιμότητας αυτής της τεχνικής χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις αιθυλικής αλκοόλης ως αντιβακτηριακού παράγοντα, συγκεκριμένα 20%, 22,5% και 25% για να μην καταστραφεί το κυτταρικό σώμα και υπάρξουν μορφολογικές αλλαγές που επηρεάζουν τα σήματα θέσης.

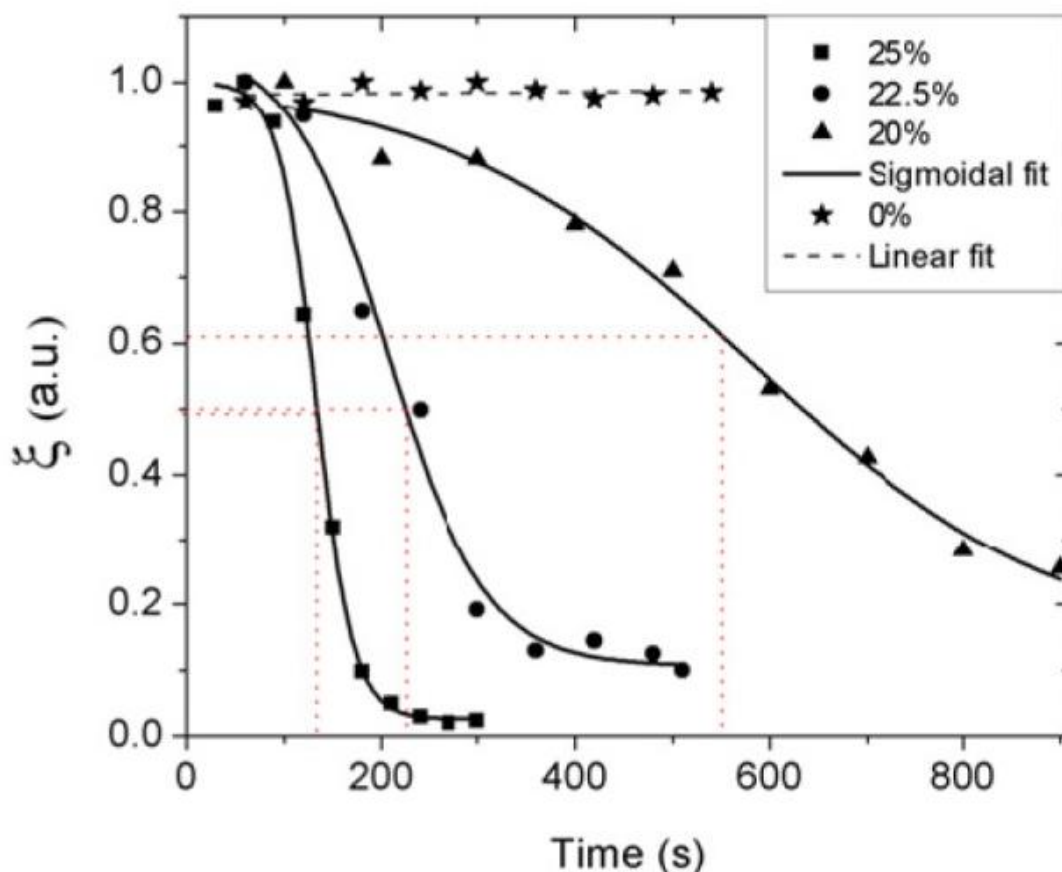
Στους παρακάτω πίνακες(εικόνα 5.9) φαίνονται οι χρονοσειρές θέσεων μετά την έκθεση του βακτηρίου σε 25% αιθυλική αλκοόλη και τα αποκτηθέντα δεδομένα χωρίζονται σε ακολουθίες των 30 δευτερολέπτων. Ο πρώτος πίνακας(trajjectory) δείχνει τις αντιπροσωπευτικές ακολουθίες χρόνου στα διαφορετικά στάδια της απόκτησης και για την κάθε ακολουθία υπολογίζεται η πυκνότητα φάσματος ισχύος(P) και η λειτουργία αυτόματης συσχέτισης(ACF), που τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους δυο επόμενους πίνακες. Στους δυο πρώτους πίνακες δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές αλλά στον τρίτο είναι φανερές, και από την αρχική τιμή αλλά και από τον φθίνοντα ρυθμό που έχουν οι καμπύλες. Η μαύρη καμπύλη αντιπροσωπεύει ένα ζωντανό, μη τραυματισμένο βακτήριο και η μπλε καμπύλη αντιπροσωπεύει μια τυχαία κίνηση Browniam, που αυτό δείχνει ότι το βακτήριο έχει χάσει τελείως την δραστηριότητα των μαστιγίων.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι το ACF ενός ζωντανού βακτηρίου έχει τη μεγαλύτερη περιοχή κάτω από το γράφημα, ορίζεται το κανονικοποιημένο ACF(ξ) ως η περιοχή κάτω από το γράφημα ACF που διαιρείται από αυτό του ζωντανού βακτηρίου. Ο τέταρτος πίνακας δείχνει το ξ σε συνάρτηση με το χρόνο. Όσο περνάει ο χρόνος, το ξ μειώνεται από το μέγιστο οροπέδιο στο ελάχιστο σημείο αναφοράς. Ως χρόνο θανάτωσης, ορίζεται ο χρόνος που χρειάζεται το ξ για να φτάσει στο μισό μέγιστο. Αυτή η παράμετρος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να χαρακτηρίσει αν η έκθεση του βακτηρίου στην αλκοόλη είναι θανατηφόρα και πόσο.



Εικόνα 5.9 a) θέσεις χρονοσειρών για ένα παγιδευμένο βακτήριο κατά την εγκάρσια κατεύθυνση για 300s b) υπολογιζόμενο φάσμα ισχύος c) λειτουργία αυτοσυσχετισμού(ACF) d) κανονικοποιημένο ACF(ξ), υπολογίστηκε για κάθε χρονοσειρά των 30s και λήφθηκε σε διαφορετικούς χρόνους μετά την πρόσθεση της αλκοόλης [18]

Όπως αναφέραμε πιο πάνω, εκτός από 25% συγκέντρωση της αλκοόλης χρησιμοποιήθηκε 22.5% και 20%. Επίσης, το πείραμα εκτελέστηκε και χωρίς την προσθήκη αλκοόλης για να εξαλειφτούν οι πιθανότητες θανατηφόρων επιδράσεων που οφείλονται στη θέρμανση και στη φωτογήρανση. Τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται στην εικόνα 5.10. Αυτό που αποδείχτηκε ήταν ότι ο χρόνος θανάτωσης είναι μεγαλύτερος όταν η συγκέντρωση της αλκοόλης είναι χαμηλότερη. Οπότε ο χρόνος θανάτωσης για συγκεντρώσεις 25%, 22.5% και 20% κυμαίνεται στα $130 \pm 20s$, $230 \pm 35s$ και $550 \pm 50s$ αντίστοιχα. Άρα, μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της αλκοόλης οδηγούν σε πιο γρήγορο θάνατο, ο οποίος δεν οφείλεται στην φωτογήρανση αφού το βακτήριο παραμένει ζωντανό όλη την διάρκεια άμα δεν προστεθεί καθόλου αλκοόλη. [18]



Εικόνα 5.10 Κανονικοποιημένο ACF σε συνάρτηση με το χρόνο για διαφορετικές συγκεντρώσεις της αλκοόλης. Για συγκέντρωση 25% ο χρόνος θανάτωσης είναι 130s, για 22.5% είναι 230s και για 20% είναι 550s, ενώ για 0% συγκέντρωση το κανονικοποιημένο ACF δεν αλλάζει αισθητά με το χρόνο και αυτό αποδεικνύει ότι η θανατηφόρος δράση δεν οφείλεται στην φωτογήρανση. [18]

5.6 Παρατήρηση της περιστροφικής δυναμικής σπερματοζωαρίων με τη χρήση οπτικών λαβίδων

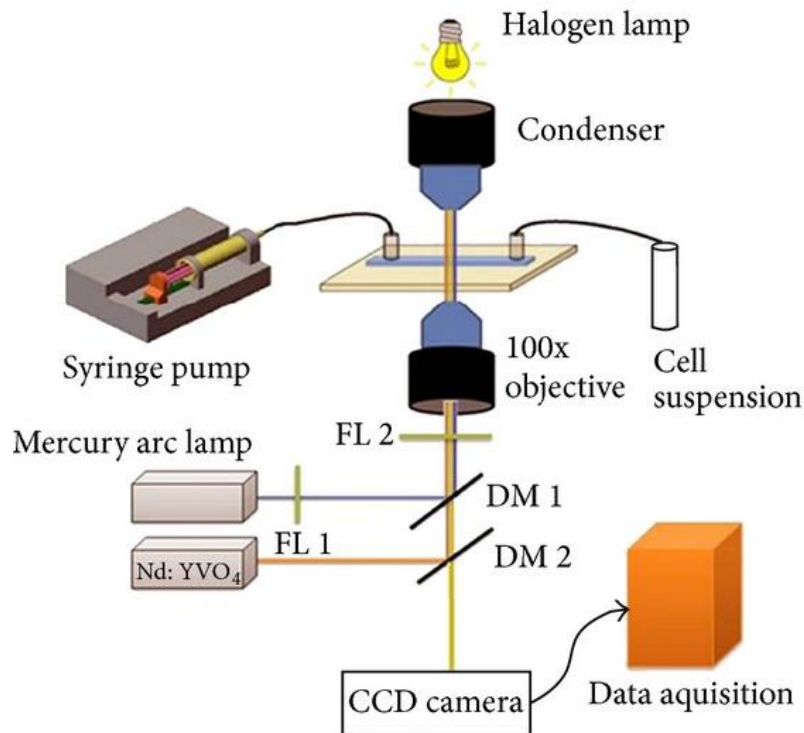
Οι οπτικές λαβίδες έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για τη μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων, της συμπεριφοράς και της φυσιολογίας πολλών κυττάρων και για τη χειραγώγηση τους. Έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της δυναμικής των σπερματοζωαρίων, ειδικότερα για τις δυνάμεις κίνησης που παράγονται και σε φυσιολογικά και σε αφύσικα σπερματοζωάρια. Με τη μέτρηση της κινητικότητας του σπέρματος και των δυνάμεων κολύμβησης, αποδείχτηκε ότι αυτοί οι δυο παράμετροι έχουν μια στενή σχέση μεταξύ τους, η οποία βοηθάει σημαντικά στο προσδιορισμό του ποσοστού γονιμοποίησης.

Παρόλο που έχουν γίνει αρκετές έρευνες παλιότερα για την παρατήρηση της ταχύτητας κολύμβησης και των δυνάμεων κολύμβησης των σπερματοζωαρίων πριν και μετά την οπτική τους παγίδευση, έρευνες πάνω στην περιστροφική δυναμική τους δεν έχουν γίνει πολλές. Στη συγκεκριμένη παρατηρούνται οι αλλαγές στην περιστροφική δυναμική αφύσικων σπερματοζωαρίων και αργότερα συγκρίνονται με αυτή των κανονικών σπερματοζωαρίων.

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τρία είδη σπερματοζωαρίων. Πενήντα σπερματοζωάρια από άντρες οι οποίοι δεν έχουν κάποιο πρόβλημα γονιμότητας και οι σύντροφοι τους είχαν

γεννήσει υγιές παιδιά, πενήντα ασθενοζωοσπερμικά και πενήντα ολιγοζωοσπερμικά τα οποία προέρχονταν από άντρες με υπογονιμότητα.

Το σύστημα της οπτικής παγίδας παρουσιάζεται στη εικόνα 5.11. Αποτελείται από ένα διοδικό λέιζερ Nd:YVO_4 , του οποίου η δέσμη συνδέεται με ένα ανεστραμμένο μικροσκόπιο φθορισμού. Για την αποφυγή τυχόν βλαβών πάνω στα παγιδευμένα σπερματοζωάρια, η ισχύς του λέιζερ ήταν λιγότερη από 20 mW και για να υπάρξει σίγουρη παγίδευση του δείγματος, το λέιζερ εστιάστηκε σε έναν αντικειμενικό φακό 100x με αριθμητικό άνοιγμα 1.3. Για την απεικόνιση και την καταγραφή της δυναμικής του σπέρματος χρησιμοποιήθηκε μια κάμερα CCD συνδεδεμένη με έναν υπολογιστή.

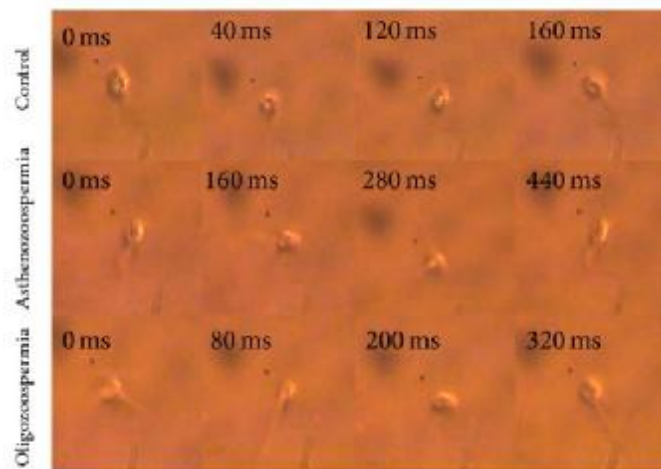


Εικόνα 5.11 Σχηματική απεικόνιση του συστήματος της οπτικής παγίδας που χρησιμοποιήθηκε για τα σπερματοζωάρια. Διαθέτει μια πηγή λέιζερ Nd:YVO_4 , η δέσμη της οποίας είναι συνδεδεμένη με ένα αντικειμενικό φακό. Καταγραφή των αποτελεσμάτων γίνεται με μια κάμερα CCD. [19]

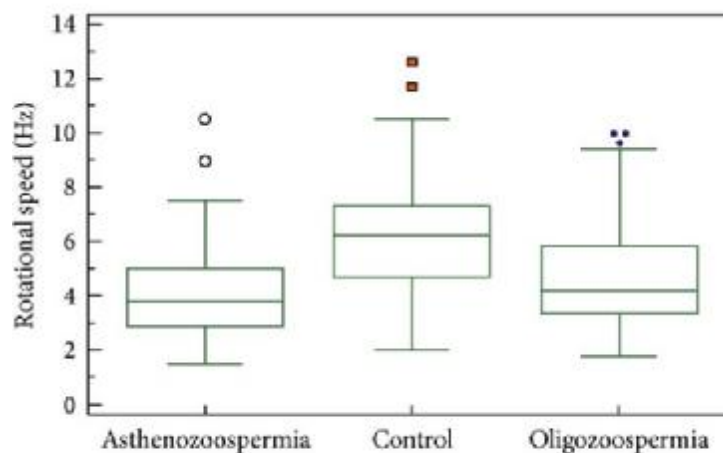
Ο όρος "αποδοτικότητα της παγίδευσης" αναφέρεται στο πόσο επηρέασε η παγίδευση την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Παράδειγμα, η αποδοτικότητα θα είναι 100%, αν η παγίδευση δεν έχει επηρεάσει καθόλου το δείγμα και οι ταχύτητες είναι ίδιες πριν και μετά. Αν πάλι υπάρχουν διαφορές στην ταχύτητα πριν και μετά την παγίδευση, τότε η αποδοτικότητα θα μειωθεί.

Τα αποτελέσματα του πειράματος απεικονίζονται στις παρά κάτω εικόνες. Η κανονική γραμμική κίνηση μετατόπισης όλων των σπερματοζωαρίων έχει σταματήσει μετά τη παγίδευση τους. Τα κύτταρα που διαθέτουν μια λειτουργική ουρά, αρχίζουν να περιστρέφονται κάτω από την παγίδα σύμφωνα με τη φορά του ρολογιού ή αντίθετα. Η περιστροφική κίνηση οφείλεται στη ροπή που αναπτύχθηκε από τη δύναμη της ουράς των σπερματοζωαρίων που ενεργεί εφαπτομενικά με την δύναμη που δημιουργείται στο εσωτερικό της οπτικής παγίδας που καρφώνει κάτω το κεφάλι του σπέρματος. (εικόνα 5.12(a)) Ακόμα, η ταχύτητα περιστροφής εμφανίστηκε λιγότερη για τα ασθενοζωοσπερμικά

και ολιγοζωοσπερμικά όταν συγκρίθηκε με αυτή των φυσιολογικών σπερματοζωαρίων. (εικόνα 5.12(b))



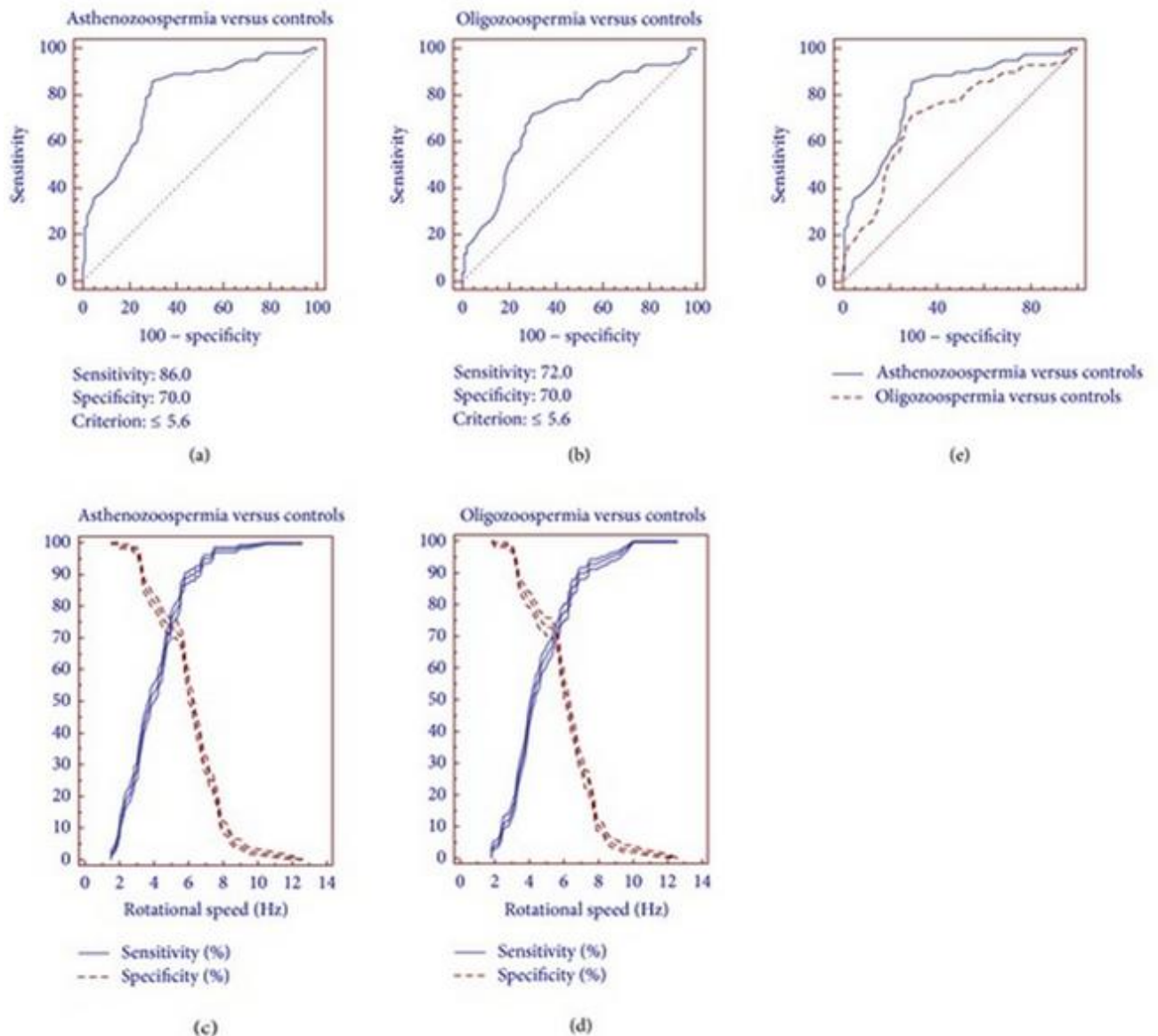
(a)



(b)

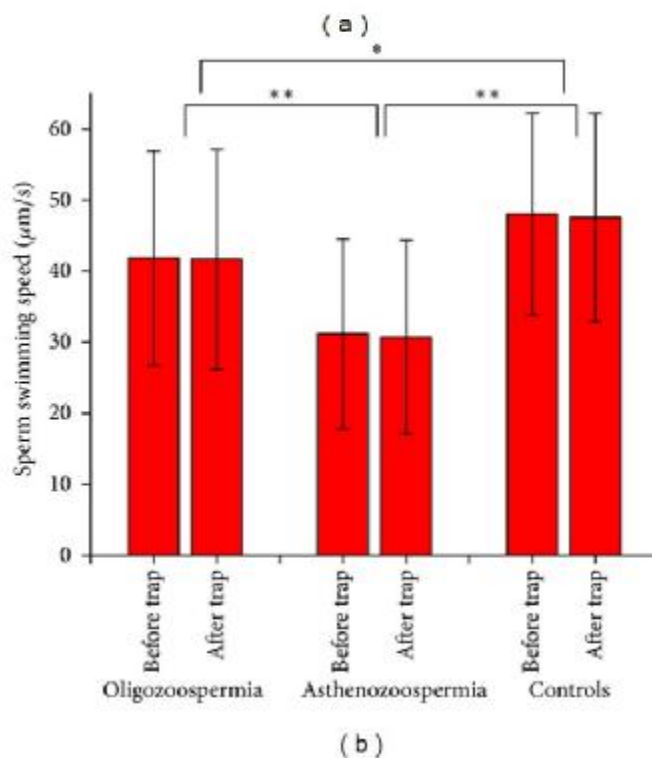
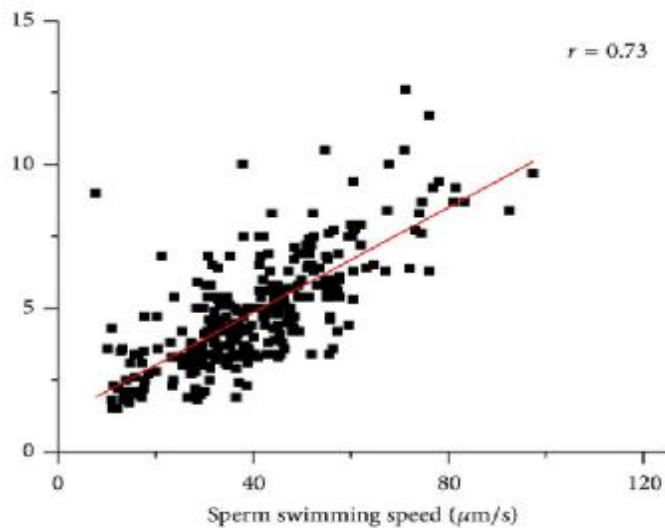
Εικόνα 5.12 a) η περιστροφική δυναμική των σπερματοζωαρίων σε διάφορες χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια της παγίδευσης b) η περιστροφική ταχύτητα των σπερματοζωαρίων [19]

Η ανάλυση της καμπύλης ROC (receiver operating characteristic) έδειξε ότι η τιμή του ρυθμού συχνότητας αποκοπής κυμαίνεται στα 5.6Hz για τη διαφοροποίηση των φυσιολογικών και μη σπερματοζωαρίων. (εικόνα 5.13(a) και 5.13(b)). Στις εικόνες (c) και (d) φαίνονται οι τιμές ευαισθησίας και ειδικότητας για τη διαφοροποίηση των ανώμαλων σπερματοζωαρίων από τα κανονικά σε διάφορους ρυθμούς της συχνότητας και οι τιμές τους είναι 72%, 70%, 86% και 70% αντίστοιχα για τα ολιγοζωοσπερμικά και ασθενοζωοσπερμικά κύτταρα.



Εικόνα 5.13 Στην (e) εικόνα συγκρίνονται οι ROC καμπύλες των μη φυσιολογικών σπερματοζωαρίων [19]

Αποδείχτηκε, επίσης, ότι η ταχύτητα περιστροφής των διαφόρων κατηγοριών των σπερματοζωαρίων συσχετίζεται θετικά με την ταχύτητα κολύμβησης του σπέρματος και ότι οι ταχύτητες κολύμβησης των ανώμαλων σπερματοζωαρίων ήταν πολύ χαμηλότερες από αυτές των φυσιολογικών. Τέλος, δεν παρουσιάστηκε κάποια διαφορά μεταξύ των ταχυτήτων κολύμβησης πριν και μετά την παγίδευση για καμία από τις κατηγορίες σπέρματος, οπότε το σύστημα της οπτικής παγίδας δεν προκάλεσε κάποια βλάβη στα σπερματοζωάρια. (εικόνα 5.14)



Εικόνα 5.14 a) συσχέτιση της ταχύτητας κολύμβησης και της περιστροφικής ταχύτητας για τα κανονικά και ανώμαλα σπερματοζωάρια b) υπολογισμός και σύγκριση των ταχυτήτων κολύμβησης πριν και μετά την παγίδευση και για τις τρεις κατηγορίες [19]

Οι τελικές παρατηρήσεις αυτού του πειράματος είναι ότι η γραμμική, μεταγραφική κίνηση των σπερματοζωαρίων μετατρέπεται σε περιστροφική όταν αυτά είναι παγιδευμένα, χωρίς την ύπαρξη δυσμενών επιπτώσεων. Επίσης, η περιστροφική κίνηση των δειγμάτων που προέρχονταν από άντρες με υπογονιμότητα ήταν πολύ χαμηλότερη από αυτή των φυσιολογικών σπερματοζωαρίων. Οι οπτικές λαβίδες αποτελούν σωστά εργαλεία για τη συλλογή και τη ταξινόμηση σπερματοζωαρίων, βασιζόμενες στην περιστροφική δυναμική και την κινητικότητα και είναι κατάλληλες για την επιλογή καλής ποιότητας σπερματοζωαρίων που επιδεικνύουν ρυθμό συχνότητας 5.6 Hz όταν είναι παγιδευμένα. Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου θα φέρει πολλές βελτιώσεις στην τεχνική της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. [19]

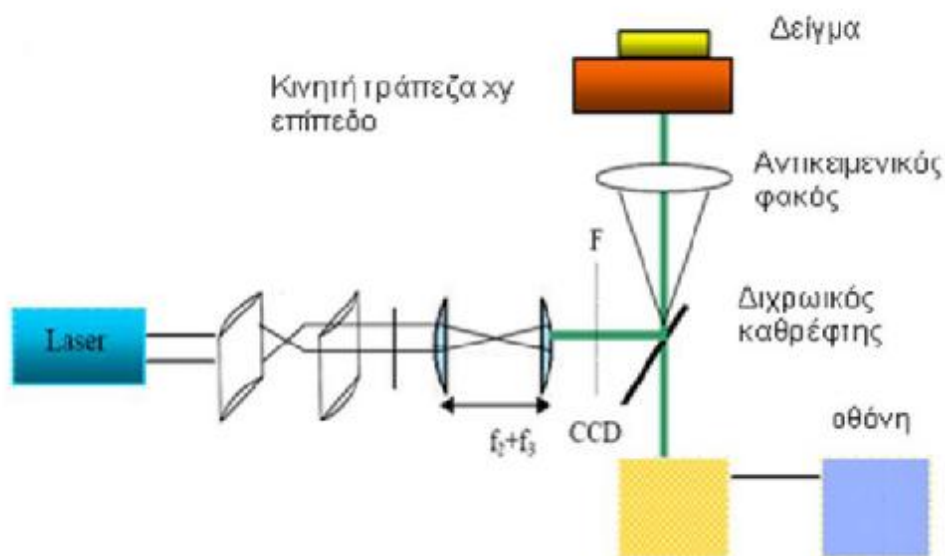
5.7 Άλλες μελέτες πάνω στα σπερματοζώαρια

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλά πειράματα για την παγίδευση και χειραγώγηση σπερματοζωαρίων με τη χρήση οπτικών λαβίδων. Παράδειγμα, ο πρώτος που ασχολήθηκε με αυτόν τον τομέα ήταν ο Tadir το 1990, ο οποίος με τη χρήση ενός λέιζερ CW Nd:YAG το οποίο λειτουργούσε συνεχώς στα 1064 nm απέδειξε ότι ένα σπέρμα το οποίο κολυμπάει σαν ζικ ζακ έχει περισσότερη δύναμη από ένα που κολυμπάει ευθεία.

Επίσης, έρευνες έγιναν για την μελέτη των επιδράσεων των λέιζερ πάνω στα σπερματοζώαρια κατά τη διάρκεια της παγίδευσης. Το 1993, ο Westphal, μέτρησε τη δύναμη κολύμβησης των σπερματοζωαρίων πριν και αφού αντιμετωπίσουν το ωάριο και απέδειξε ότι αυτή η δύναμη αυξάνεται μόλις το σπερματοζώαριο αλληλεπιδράσει με το ωάριο. Από τον Dantas το 1995, έγιναν παρόμοιες μετρήσεις των δυνάμεων σπερματοζωαρίων που ανήκαν σε ανθρώπους πριν και μετά την κρυοπαρακολούθηση και το αποτέλεσμα ήταν ότι οι δυνάμεις δεν διέφεραν όταν χρησιμοποιήθηκε σαν κρυοπροστάτης ένα μέσο ψύξης. Σε ένα πείραμα από τον Araujo το 1994, μελετήθηκαν οι δυνάμεις κολύμβησης επιδιδυμικού σπέρματος σε σχέση με το κανονικό σπέρμα και αποδείχτηκε ότι η δύναμη κολύμβησης του επιδιδυμικού είναι πολύ χαμηλότερη από αυτή του κανονικού. Τέλος, με την χρήση του ίδιου συστήματος ο Patrizio ανακάλυψε ότι αν το σπέρμα εκτεθεί σε πεντοξιφυλλίνη θα αυξηθούν οι δυνάμεις κολύμβησης και στο κανονικό αλλά και στο ασθενικό σπέρμα. Με αυτό το πείραμα επιβεβαιώθηκε ότι οι οπτικές λαβίδες μπορούν να παρέχουν ένα ακριβή προσδιορισμό της δύναμης σε πειράματα που γίνονται in vitro. [20]

5.8 Μελέτη των ελαστικών ιδιοτήτων λιποσωμάτων χρωσμένων με μπλε του μεθυλενίου με οπτική παγίδα γραμμής

Η οπτική παγίδα γραμμής ανήκει στις σύγχρονες τεχνικές οπτικής παγίδευσης. Μια απλή τεχνική για τη δημιουργία της είναι η τοποθέτηση δυο κυλινδρικών φακών στον οπτικό δρόμο της δέσμης πριν αυτή εισέλθει στον αντικειμενικό φακό. Η ιδιότητα των κυλινδρικών φακών είναι να μη διαθλούν τις ακτίνες στην διεύθυνση του οπτικού τους άξονα αλλά μόνο στην κάθετη σε αυτόν, με αποτέλεσμα στο επίπεδο εστίασης του αντικειμενικού φακού το προφίλ της δέσμης να έχει σχήμα γραμμής. Με αυτό τον τρόπο το δυναμικό της παγίδας είναι συμμετρικό, όπως επίσης είναι συμμετρική και η κατανομή της έντασης κατά μήκος της γραμμής γύρω από τον κεντρικό άξονα της. (εικόνα 5.15)



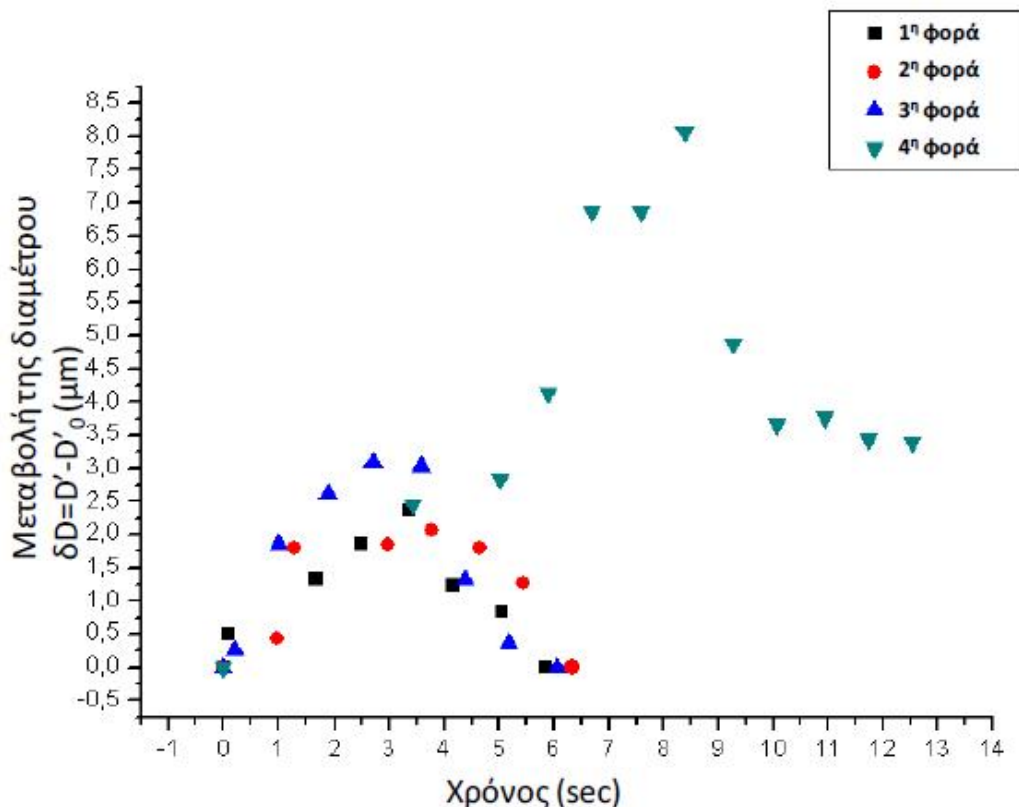
Εικόνα 5.15 Σχηματική απεικόνιση μιας οπτικής παγίδας γραμμής. [21]

Τα λιπосώματα είναι κολλοειδή σωματίδια αποτελούμενα από μια ή περισσότερες διπλοστιβαδικές μεμβράνες φωσφολιπιδίων που περικλείουν στο εσωτερικό τους κάποιο υδατοειδές διάλυμα. Τα συστατικά της μεμβράνης είναι όμοια με αυτά των βασικών δομικών στοιχείων των φυσικών μεμβρανών των κυττάρων και οι διεργασίες στις οποίες υπόκεινται τα λιπосώματα θυμίζουν κατά πολύ αυτές των κυττάρων.

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι η οπτική παγίδευση λιπосωμάτων χρωσμένων με μπλε του μεθυλενίου (MB) για την παρατήρηση των ελαστικών ιδιοτήτων τους. Τα λιπосώματα χρησιμοποιούνται ως φορείς φωτοευαίσθητων ουσιών στην φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου και το μπλε του μεθυλενίου, που είναι μια τέτοια ουσία, μελετάται πολύ τα τελευταία χρόνια. Διεγείρεται στα 660 nm και με την παραγωγή μονήρους οξυγόνου προκαλεί τη δημιουργία ελεύθερων ριζών με αποτέλεσμα την καταστροφή των παθολογικών κυττάρων. Επειδή το μπλε του μεθυλενίου διεγείρεται στα 660 nm, το λέιζερ που χρησιμοποιείτε έχει το ίδιο μήκος κύματος και με αυτό τον τρόπο διεγείρεται και η φωτοευαίσθητοποιός ουσία αλλά ταυτόχρονα παγιδεύονται τα λιπосώματα για να μελετηθούν.

Για τη μελέτη των ελαστικών ιδιοτήτων, τα λιπосώματα παρέμειναν στην οπτική παγίδα για πολύ μικρό χρονικό διάστημα, περίπου για 3-4 δευτερόλεπτα και παρατηρήθηκε ότι με την αποκοπή της δέσμης λέιζερ αυτά επανήλθαν στο αρχικό τους σχήμα. Μόλις, όμως, τα άφησαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από αυτό που αναφέρθηκε παρά πάνω, αυτά παρουσίασαν φαινόμενα υστέρησης και δεν επανήλθαν στις αρχικές τους διαστάσεις. (εικόνα 5.16)

Βέβαια δεν παρατηρήθηκαν σε όλα τα λιπосώματα ελαστικές ιδιότητες. Κάποια που παρέμειναν στην οπτική παγίδα για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα δεν υπέστησαν κάποια τροποποίηση και αυτό οφείλεται μάλλον στο ότι αποτελούνταν από πολλές στοιβάδες. Επίσης, σε κάποια λιπосώματα που παρέμειναν για περισσότερο χρόνο στην παγίδα παρατήθηκαν μη ελαστικοί μετασχηματισμοί όπως οι περισταλτικές αστάθειες (pearling) και η διαδικασία μολιάσματος (budding). [21]



Εικόνα 5.16 Διάγραμμα που δείχνει την μεταβολή της οριζόντιας διαμέτρου, ενός λιπώματος 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. Αυτή η διαδικασία γίνεται τέσσερις φορές και την τέταρτη φορά το λιπόσωμα μένει για περισσότερο χρονικό διάστημα στην παγίδα και παρατηρείται υστέρηση, οπότε δεν επιστρέφει στην αρχική του μορφή. [21]

5.9 Τεχνική βασιζόμενη σε μια ενιαία οπτική παγίδα για τον προσδιορισμό του πρότυπου κολύμβησης βακτηρίων

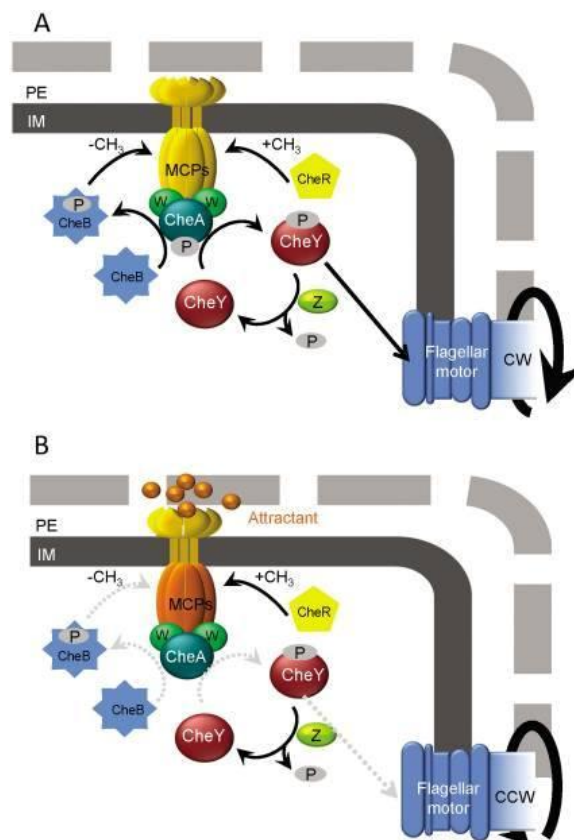
Η βακτηριακή κινητικότητα συνδέεται με ένα ευρύ φάσμα των βιολογικών διεργασιών και αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στην μολυσματικότητα πολλών παθογόνων. Παρακάτω θα περιγράψουμε αρχικά πολύ περιληπτικά και μετά αναλυτικά μια μέθοδο για να διακρίνει τις δυναμικές ιδιότητες των βακτηρίων αναλύοντας τις στατιστικές συναρτήσεις που προέρχονται από τις τροχιές ενός βακτηριδίου και παγιδεύονται από μία μόνο οπτική δέσμη. Η προσέγγιση στηρίζεται στο μοντέλο της περιστροφής μίας στερεάς, οπτικά παγιδευμένης σφαίρας. Η τεχνική μπορεί εύκολα να εφαρμοστεί σε ένα βιολογικό εργαστήριο, αφού χρειάζεται ένας μικρός αριθμός οπτικών και ηλεκτρονικών εξαρτημάτων και ένα απλό βιολογικό μικροσκόπιο. Μόνο αυτά είναι απαραίτητα για να μετατραπεί στον απαιτούμενο αναλυτή. Για να δείξουν τη λειτουργικότητα αυτής της μεθόδου, οι επιστήμονες εξέτασαν διεξοδικά σε έρευνα που έγινε, το βακτήριο *Salmonella enterica* του είδους *Typhimurium* που διέφερε από του άγριου τύπου σε σχέση με τα πρότυπα κολύμβηση τους. Εκτός από αυτό, εξετάστηκε και χαρακτηριστικό και η δυναμική κινητικότητα του μεταλλαγμένου *S.Typhimurium* Che V.

Ας δούμε όμως λίγο πιο αναλυτικά αυτή τη τεχνική και να την περιγράψουμε. Η μετακίνηση των μονοκύτταρων οργανισμών σε υδατικά μέσα διενεργείται από αρκετούς διαφορετικούς μηχανισμούς, ένας εκ των οποίων είναι το βακτηριακό μαστίγιο, το οποίο είναι ο

αναλυτικότερα μελετημένος. Αυτή η σύνθετη δομή αποτελείται από διάφορα στοιχεία τα οποία δρουν από κοινού για να παράγουν ελικοειδή περιστροφή. Το μαστίγιο αποτελείται από τρία μέρη ανάλογα με το τεχνητό μηχανικό σύστημα δηλαδή το βασικό σώμα, το οποίο παρέχει μια άγκυρα και περιέχει τον κινητήρα, το νήμα το οποίο ενεργεί ως έλικα και το άγκιστρο, το οποίο συνδέει το βασικό κυτταρικό σώμα στο νήμα, και δρα ως καθολική άρθρωση. Τα μαστίγια έχουν μελετηθεί διεξοδικά σε εντερικά βακτηρίδια όπως το *Salmonella enterica* Typhimurium (που θα αναφέρεται στο εξής ως *S.Typhimurium*) και είναι το βακτήριο που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη της μεθόδου στην οποία αναφερόμαστε. Το Typhimurium έχει πολλά μαστίγια πάνω από την επιφάνειά του. Υπάρχουν περίπου πέντε και δέκα μαστίγια αρκετών μικρομέτρων σε μήκος, αλλά μόνο περίπου 20 nm σε διάμετρο. Αυτά μπορούν να περιστρέφονται τόσο δεξιόστροφα όσο και αριστερόστροφα.

Η βακτηριακή κίνηση μπορεί συνοπτικά να περιγραφεί ως ένας συνδυασμός δύο τύπων συμπεριφοράς, των τρεξίματος και πεσίματος. Κατά τη διάρκεια της λειτουργίας, τα μαστίγια σχηματίζουν μια δέσμη που ωθεί το κύτταρο κατά μήκος διότι περιστρέφονται αριστερόστροφα. Η δέσμη καταρρέει όταν ένας ή περισσότεροι κινητήρες της στροφής των μαστιγίων γυρίζουν με δεξιόστροφη κατεύθυνση. Σε αυτήν την περίπτωση το βακτηρίδιο καταπίπτει και προσανατολίζεται σε μια άλλη κατεύθυνση. Ενώ στην αρχή, το κύτταρο κινείται σε μια τυχαία κατεύθυνση, ο συνδυασμός των δύο κινήσεων, δηλαδή, ευθείες γραμμές (τρέξιμο) και τυχαίες αλλαγές (πέσιμο), επιτρέπουν στο κύτταρο να εξερευνησει το περιβάλλον του.

Το τρέξιμο και το πέσιμο διέπουν τη διαδικασία της χημειοταξίας παρέχουν τα μέσα με τα οποία τα βακτηριακά κύτταρα μεταναστεύουν προς ευνοϊκές χημικές ουσίες (προσελκυστικές ουσίες) ή μακριά από τις δυσμενείς ουσίες (απωθητικές ουσίες). Στο *S.Typhimurium* και σε άλλα βακτήρια, η παρουσία ελκυστικών/απωθητικών χημικών ουσιών ανιχνεύεται από διαμεμβρανικούς υποδοχείς. Η χημειοταξία επιτρέπει στο να βρεθεί ένα καλύτερο περιβάλλον για την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων και παρουσιάζεται πιο αναλυτικά στην εικόνα 5.17.



Εικόνα 5.17 Η διαδικασία της χημειοταξίας. [22]

Η χημειοταξία και η κολύμηση είναι επίσης σημαντικοί παράγοντες για την τοξικότητα πολλών παθογόνων. Για αυτό τον λόγο, η κίνηση του μαστιγίου έχει μελετηθεί εκτενώς, μέσω μικρορροϊκών δοκιμασιών αλλά κυρίως μέσω δύο διαφορετικών στρατηγικών, με την απευθείας απεικόνιση των ελεύθερα μετακινούμενων βακτηριδίων και τις έρευνες για την περιστροφή των συνδεδεμένων κυττάρων. Αυτό τυπικά περιλαμβάνει τη χρήση σκοτεινού πεδίου, μικροσκοπία αντίθεσης διαφορικής επαφής ή μικροσκοπία φθορισμού για φθορισμένα κύτταρα. Εναλλακτικά, όσον αφορά τα συνδεδεμένα κύτταρα, τα βακτήρια παραμένουν σε μία επιφάνεια μέσω του μαστιγίου τους και ανάλογα με την κατεύθυνση περιστροφής του μαστιγίου υπάρχει δεξιόστροφη ή αριστερόστροφη περιστροφή του βασικού σώματος. Αυτές οι αναλύσεις βασίζονται συνήθως σε συσκευές εγγραφής βίντεο υψηλής ταχύτητας και σε προγράμματα λογισμικού επεξεργασίας εικόνας που προσδιορίζουν την ταχύτητα κολύμησης, το χρονικό διάστημα μεταξύ της λειτουργίας του τρεξίματος και του πεσίματος κλπ.

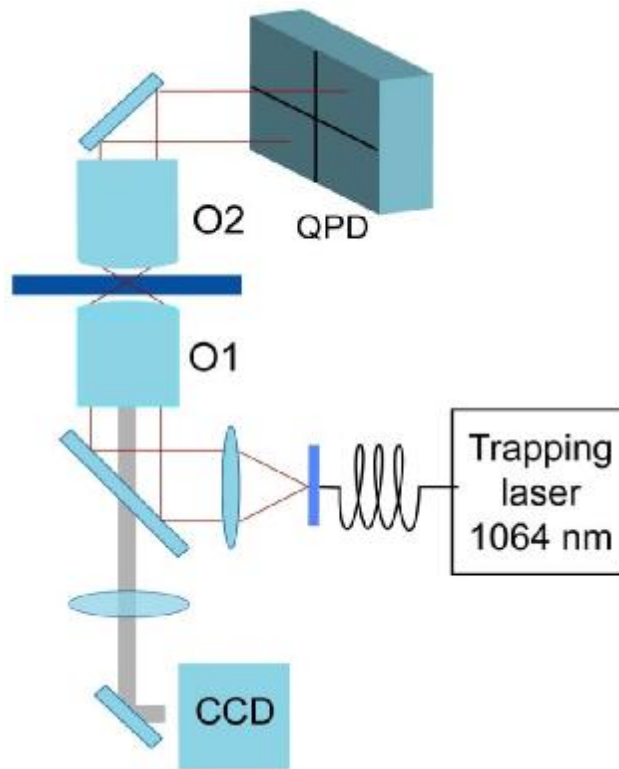
Μεταξύ των άλλων πειραματικών προσεγγίσεων που χρησιμοποιούνται για να χαρακτηρίσουν την χημειοταξία και την περιστροφή του μαστιγίου υπάρχουν και εκείνες που βασίζονται στη τεχνική της οπτικής παγίδευσης. Αυτή η μέθοδος εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι ο εσωτερικός δείκτης διάθλασης (κυτταρόπλασμα) του βακτηρίου είναι μεγαλύτερος από εκείνον του περιβάλλοντος μέσου, έτσι ώστε με την παρουσία μίας σφικτά εστιασμένης οπτικής δέσμης παράγεται μια δύναμη που κατευθύνεται προς την εστίαση της δέσμης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ακινητοποίηση των βακτηρίων, τα οποία στην παγιδευμένη θέση που βρίσκονται μπορούν να εξεταστούν χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές που παρέχουν χωρικές αναλύσεις νανόμετρων σε ελάχιστο χρόνο. Πιο λεπτομερείς πληροφορίες για τη χημειοταξία επιτυγχάνονται όταν η περιστροφή του μαστιγίου και η περιστροφή του σώματος του κυττάρου αναλύονται ταυτόχρονα. Ωστόσο, μέχρι τώρα, αυτό ήταν δυνατό μόνο με τη

χρήση συστήματος διπλής οπτικής παγίδευσης, στην οποία το βακτήριο παγιδεύεται σε κάθε άκρο του με δύο ορθογώνια πολωμένες οπτικές δέσμες. Το σκεδαζόμενο φως και των δύο ακτινών, στη συνέχεια, αναλύεται χωριστά από ευαίσθητους ανιχνευτές δύο θέσεων. Η φασματική πυκνότητα ισχύος από τα σήματα εξόδου των ανιχνευτών δίνει δύο σημεία που αντιστοιχούν στην περιστροφή του μαστιγίου και στην περιστροφή του σώματος του κυττάρου. Μια ανάλυση της φάσης μεταξύ των σημάτων του ανιχνευτή παρέχει μία περιγραφή της περιστροφής.

Ένα σημαντικό βήμα προς την απλούστευση αυτής της πειραματικής διάταξης (αλλά χωρίς απώλεια πληροφοριών) αναφέρθηκε πρόσφατα, όπου μία μόνο οπτική παγίδα χρησιμοποιήθηκε για να συλλάβει ένα βακτήριο με ένα μόνο πολικό μαστίγιο που πραγματοποιούσε είτε αριστερόστροφη είτε δεξιόστροφη περιστροφή. Οι επιστήμονες χρησιμοποίησαν έναν ευαίσθητο φωτοανιχνευτή και μπόρεσαν να ανιχνεύσουν τις χαρακτηριστικές συχνότητες της κίνησης του βακτηρίου αναλύοντας την φασματική πυκνότητα ισχύος της θέσης του κυττάρου. Επιπλέον, θα μπορούσαν να μετρήσουν το ρυθμό μεταγωγής του μαστιγίου υπό διαφορετικές χημικές προσομοιώσεις.

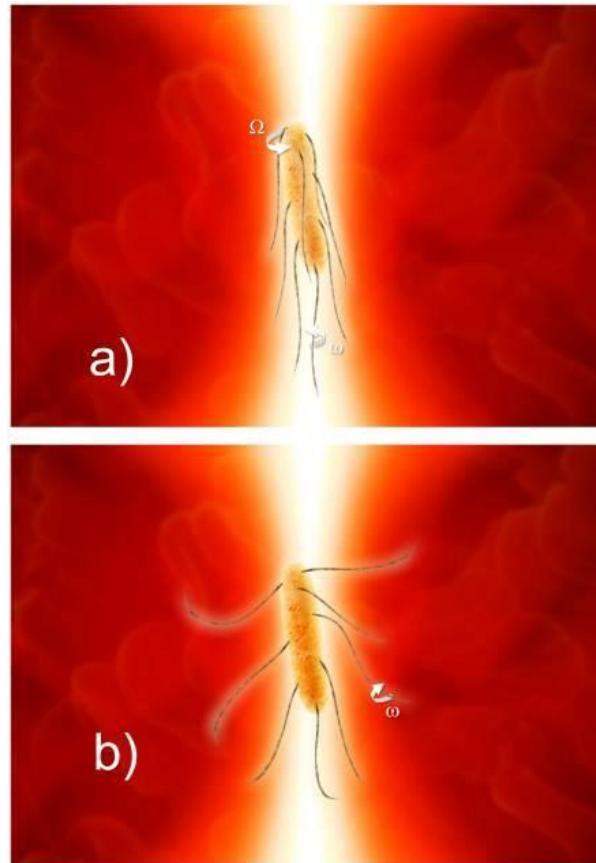
Στη συνέχεια θα περιγράψουμε την περαιτέρω βελτίωση της απλής αλλά κατατοπιστικής τεχνικής της οπτικής παγίδευσης. Έχει αποδειχτεί ότι οι πρόσθετες πληροφορίες μπορούν να ληφθούν, εάν η ανάλυση της χρονικής θέσης του βακτηρίου περιλαμβάνει επίσης υπολογισμούς της συνάρτησης αλληλοσυσχέτισης της τροχιάς των κυττάρων σε επίπεδο κάθετο προς τον οπτικό άξονα. Με την εφαρμογή αυτής της προσέγγισης σε ένα βακτήριο που χρησιμοποιεί το μοτίβο για κολύμπι τρεξίματος-πεσίματος για να περιηγηθεί στο περιβάλλον του, οι επιστήμονες ήταν σε θέση να μελετήσουν τα πρότυπα κολύμβησης διαφορετικών μεταλλαγμένων στελεχών σε ολόκληρο το φάσμα της κίνησης των βακτηρίων μέσα στην οπτική παγίδα. Η διαδικασία εφαρμόστηκε σε νεκρές, σε τρεξίματος (cheY, cheW), πεσίματος(μεταλλαγμένα cheB) και σε άγριου τύπου κατηγορίες του *Typhimurium*. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ως παράδειγμα των πιθανών εφαρμογών της, για τον προσδιορισμό του ρόλου της πρωτεΐνης cheV στην περιστροφή των μαστιγίων του *Typhimurium*.

Η οπτική παγίδευση διεξήχθη χρησιμοποιώντας οπτική δέσμη 1064nm από ένα λέιζερ σε συνδυασμό με μία ίνα μονής κατάστασης που επεκτάθηκε έως 10 mm και στη συνέχεια εστιάστηκε από ένα στόχο. Αυτό εξηγείται και στην εικόνα 5.18. Η ένταση της οπτικής παγίδευσης κατά τη διάρκεια των πειραμάτων (25 mW) κρατήθηκε όσο το δυνατόν πιο χαμηλά, προκειμένου να ακινητοποιήσει τα βακτήρια ενώ ταυτόχρονα να ελαχιστοποιήσει οποιαδήποτε οξειδωτική βλάβη. Τα προκύπτοντα σήματα μεταφέρθηκαν στη συνέχεια σε έναν υπολογιστή μέσω ενός μετατροπέα από αναλογική μορφή σε ψηφιακή. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, και ειδικά κατά την έναρξη και το τέλος των μετρήσεων, τα βίντεο καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας μια μηχανή CCD.



Εικόνα 5.18 Μια δέσμη λέιζερ επεκτείνεται από ένα φακό για να γεμίσει την κόρη εισόδου του αντικειμενικού φακού O1 και να αυξηθεί η δύναμη παγίδευσης. Η θέση του παγιδευμένου αντικειμένου ανιχνεύεται με την παρακολούθηση της χωρικής κατανομής της δέσμης που σκεδάζεται από το αντικείμενο. Αυτό το σκεδαζόμενο φως συλλέγεται από ένα αντικειμενικό φακό O2 και σε έναν τεταρτοκυκλίου θέση ανιχνευτή. [22]

Η τροχιά των οπτικά παγιδευμένων βακτηρίων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Υπάρχουν οι φυσικοί παράγοντες (όπως η ακαμψία της παγίδας, το μέγεθος του κυττάρου, και το μέσο) και βιολογικοί (όπως η ένταση της κίνησης μαστιγίου). Επιπλέον, κύτταρα που είναι κατά τα άλλα παρόμοια, μπορεί να ωθήσουν τους εαυτούς τους με διαφορετικές ταχύτητες, πράγμα που επηρεάζει, επίσης, τις τροχιές. Λόγω του κυλινδρικού σχήματος των βακτηρίων, ένα κύτταρο παγιδευμένο στην οπτική παγίδα μοναδικής δέσμης ευθυγραμμίζεται κατά μήκος του οπτικού άξονα. Εκτός από τη κίνηση Brown, η ροπή που παράγεται από τα μαστίγια μεταβάλλει τη δυναμική του κυττάρου λόγω της δυνατότητας μονών ή διπλών περιστροφών, όπως φαίνεται σχηματικά στην εικόνα 5.19.



Εικόνα 5.19 a) το κύτταρο περιστρέφεται αριστερόστροφα και δίνει ταχύτητα μετάφρασης στο βακτήριο, το οποίο τρέχει. Η κίνηση του βακτηρίου χαρακτηρίζεται από την κίνηση του σώματος με συχνότητα Ω και των μαστιγίων με συχνότητα περιστροφής ω . b) το κύτταρο περιστρέφεται δεξιόστροφα, έτσι παρέχεται περισσότερη ενέργεια στην δυναμική του κυττάρου αλλά δεν παράγεται περιστροφή γύρω από τον οπτικό άξονα του συστήματος παγίδευσης. [22]

Η απλή οπτική παγίδα μοναδικής δέσμης που χρησιμοποιείται σε αυτή τη μελέτη για να αναλύσει το μοτίβο κολύμβησης του *S.typhimurium* και διάφορων μεταλλαγμένων μπορεί να εφαρμοστεί ευρέως για να μετρήσει το πλήρες φάσμα της βακτηριακής κινητικότητας και των μετατροπών. Ο πυρήνας της μεθόδου βασίζεται σε μία άλλη μελέτη, που περιέγραφε την κίνηση ενός μικρού αντικείμενου που περιορίζεται σε μια οπτική παγίδα υπό την παρουσία μιας ροπής που ασκείται ή παράγεται από το αντικείμενο. Η συγκεκριμένη μελέτη που παρουσίαζε δέκα ανεξάρτητα κύτταρα από τέσσερις ανεξάρτητες καλλιέργειες έδειξε ότι η κατανομή των ιστογραμμάτων παρέμεινε πολύ παρόμοια, έτσι ώστε να μπορεί να διακριθεί ο ατομικός φαινότυπος ενός ενιαίου βακτηρίου. Η σημασία των διαφόρων παραμέτρων είναι πιο εύκολη να εκτιμηθεί, στην περίπτωση των μεταλλαγμένων του τρεξίματος. Για ορισμένα βακτήρια, μπορούσαν να επιτευχθούν τιμές κοντά στα 100 Hz. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι σε αυτές τις περιπτώσεις, τα πλάτη του ιστογράμματος είναι παρόμοια με εκείνα που ελήφθησαν για τους μεταλλαγμένους του τρεξίματος με μόνο 10 Hz.

Η φωτογήρανση στο παγιδευμένο βακτήριο έχει ληφθεί υπόψη, δεδομένου ότι το υπέρυθρο φως υπό τη παρουσία οξυγόνου παράγει ελεύθερες ρίζες μέσα στο κύτταρο, το οποίο επάγει το θάνατο μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Στο παρών σύστημα οπτικής παγίδευσης, αυτό το πρόβλημα αποφεύγεται συμπεριλαμβάνοντας ένα σύστημα καθαρισμού οξυγόνου στο μέσο προετοιμασίας του δείγματος, το οποίο εγγυάται ένα σταθερά χαμηλό επίπεδο

οξυγόνου και, κατά συνέπεια, την επιβίωση των κυττάρων κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Τα ληφθέντα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τη χρησιμότητα αυτού του συστήματος οπτικής παγίδευσης για να χαρακτηριστεί η βακτηριακή κινητικότητα. Η ανάλυση των νεκρών κυττάρων, καθώς και των κυττάρων τρεξίματος και πεσίματος και τα στελέχη άγριου τύπου *S.Typhimurium* αποδεικνύει τη δυνατότητα να συσχετιστούν τα χαρακτηριστικά κινητικότητας αυτών των κυττάρων. Έτσι, η τροχιά των μεταλλαγμένων τρεξίματος χαρακτηρίζεται από μία μέση τιμή διαφορετική από το μηδέν και των μεταλλαγμένων του πεσίματος με μία μέση τιμή κοντά στο μηδέν με μια ορισμένη τυπική απόκλιση στην τελευταία περίπτωση, λόγω της τυχαίας διάταξης των μαστιγίων και την απουσία μίας θέσης ισορροπίας.

Αλλαγές στο σχηματισμό δέσμης, από την ουρά προς το κεφάλι και αντίστροφα, πρέπει επίσης να ληφθούν υπόψη. Αυτή η επίδραση είναι απίθανο να είναι σταθερή επειδή τα βακτήρια πρέπει να εργαστούν ενάντια στην πίεση της ακτινοβολίας στην οπτική παγίδα, κι έτσι δεν είναι δυνατόν να καθοριστεί μια σταθερή θέση ισορροπίας.

Στη μελέτη, βρέθηκε ότι τα μαστίγια αυτών των κυττάρων περιστρέφονται σε δεξιόστροφη κατεύθυνση και ότι, όπως και στου άγριου τύπου και στου τρεξίματος, οι βακτηριακές δυνάμεις διαφέρουν από εκείνες των νεκρών βακτηρίων. Ένα νεκρό βακτήριο συμπεριφέρεται σαν ένα στερεό σώμα, ως εκ τούτου, όταν εφαρμόζεται μια επιπλέον δύναμη, ολόκληρη η σφαίρα περιστρέφεται γύρω από το σημείο παγίδευσης. Το άθροισμα αυτών των ροπών θα είναι ομοιόμορφο, όταν ο μέσος όρος ξεπερνάει ένα μεγάλο χρονικό διάστημα. Για ένα κύτταρο κατηγορίας πεσίματος, ενώ η μέση τιμή του είναι κοντά στο μηδέν, το ιστόγραμμα θα είναι ευρύτερο από εκείνα που λαμβάνονται από ένα νεκρό βακτηρίδιο, δεδομένου ότι η κίνηση που ανιχνεύεται στην τελευταία περίπτωση είναι η κίνηση Brown.

Ορισμένα είδη βακτηρίων χρησιμοποιούν τη πρωτεΐνη CheV αντί της CheW, ενώ σε άλλα, όπως στο *S.Typhimurium*, και οι δύο πρωτεΐνες είναι παρόντες. Στην τελευταία περίπτωση, ο ρόλος των CheV είναι άγνωστος. Έχει προταθεί ότι η CheV παίζει ένα ρόλο στη σύζευξη του υποδοχέα και στην προσαρμογή της χημειοτακτικής αντίδρασης. Επιπλέον, μία μεταλλαγμένη CheV πρωτεΐνη

φάνηκε να επιδεικνύει τους ίδιους χημειοτακτικούς φαινότυπους και φαινότυπους κολύμβησης όπως τα στελέχη άγριου τύπου. Παρ'όλα αυτά, η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με την οπτική παγίδα μοναδικής δέσμης μας έδειξε σαφώς τον φαινότυπο πεσίματος της μεταλλαγμένης CheV. Θα πρέπει να σημειωθεί, ωστόσο, ότι τα πειράματα με οπτική παγίδα μοναδικής δέσμης εκτελούνται υπό αναερόβιες συνθήκες, για να αποφευχθεί βλάβη των κυττάρων, ενώ στις προηγούμενες μελέτες οι πειραματικές συνθήκες περιελάμβαναν την παρουσία οξυγόνου. Αυτό αποτελεί σημαντική παράμετρο, διότι η έκφραση της CheV ελέγχεται από τις παγκόσμιες ρυθμιστικές Fnr και ArcA, οι οποίες και οι δύο εμπλέκονται στην ανίχνευση και προσαρμογή του οξυγόνου. Έτσι, όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου μειώνεται, οι ArcA και Fnr ενεργοποιούν άμεσα την έκφραση της CheV, αυξάνοντας σε μεγάλο βαθμό τη συγκέντρωση της CheV στο εσωτερικό του κυττάρου. Ως εκ τούτου, κάτω από αναερόβιες συνθήκες, όπως χρησιμοποιείται στην οπτική παγίδα μοναδικής δέσμης, η πρωτεΐνη CheV μεγεθύνεται κατά πολύ. Επιπλέον, το γεγονός ότι οι CheV και CheB μεταλλαγμένες μοιράζονται τον φαινότυπο πεσίματος υποδηλώνει ότι ο ρόλος των CheV στο *S. Typhimurium* είναι πιο στενά συνδεδεμένος με την προσαρμογή από ότι με τη σύζευξη του υποδοχέα. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω μελέτη για να διαλευκανθεί ο ρόλος της έκφρασης της CheV του *S.Typhimurium* στη χημειοτακτική οδό και τη σχέση της με τον αναερόβιο μεταβολισμό. Σε μια επίδειξη χρησιμότητας της μεθόδου αυτής, προσδιορίστηκε από τους επιστήμονες το προφίλ κινητικότητας της μεταλλαγμένης CheV του *S. Typhimurium* κάτω από αναερόβιες συνθήκες, όπου εμφανίζει συμπεριφορά πεσίματος. Αυτή η παρατήρηση θα συμβάλει στην αποσαφήνιση του ρόλου της πρωτεΐνης CheV στο χημειοτακτικό μονοπάτι του κυττάρου. [22]

Συμπεράσματα

Στο τέλος της παρούσας εργασίας, θα ήταν σημαντικό να αναφέρουμε συνοπτικά τα πιο σπουδαία κομμάτια από τα οποία απαρτίστηκε η εργασία καθώς και κάποια συμπεράσματα αλλά και μελλοντικές προτάσεις. Μια απλή οπτική λαβίδα αποτελείται από μια πηγή λέιζερ, διάφορα οπτικά στοιχεία όπως καθρέφτες και φακούς για την οδήγηση της δέσμης στον αντικειμενικό φακό ενός απλού μικροσκοπίου και τέλος από ένα σύστημα για την καταγραφή της εικόνας. Μια τέτοια διάταξη είναι ικανή να ακινητοποιήσει ένα σωματίδιο και να το οδηγήσει σε ποικίλες θέσεις ώστε να μελετηθεί. Το λέιζερ που χρησιμοποιείται συνήθως είναι λέιζερ συνεχούς λειτουργίας και το μήκος κύματος του πρέπει να είναι διάφανο έτσι ώστε να μην προκληθεί κάποια βλάβη στα προς μελέτη σωματίδια. Είναι σημαντικό η δέσμη λέιζερ να εισαχθεί στο μικροσκόπιο χωρίς να επηρεάσει τη λειτουργία του και να εστιαστεί πολύ καλά πάνω στο δείγμα.

Δε θα ήταν παρακινδυνευμένο να πούμε ότι πλέον αλλά και στο μέλλον πολύ περισσότερο, οι οπτικές δυνάμεις συνεισφέρουν σημαντικά στη βιολογική έρευνα. Το φως είναι ένα ισχυρό εργαλείο. Μπορεί να φτάσει σε σημεία όπου υπάρχουν βιολογικά στοιχεία αποκομμένα από το περιβάλλον τους, στο εσωτερικό ζωντανών κυττάρων για την παγίδευση και το μικροχειρισμό τους. Μικρομετατοπίσεις και δυνάμεις που δημιουργούνται από το φως μπορούν να ελέγχονται με εξαιρετική χωρική και χρονική ακρίβεια. Αυτές οι ιδιότητες παρέχουν μοναδικά πλεονεκτήματα στις μεθόδους που στηρίζονται στις οπτικές δυνάμεις, σε σύγκριση με τις συμβατικές μηχανικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται στην έρευνα μικροσωματιδίων.

Τέλος, οι βιολόγοι επιθυμούν να λαμβάνουν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τα διάφορα μόρια και είναι αναμφισβήτητο ότι θα ήθελαν να υπάρξει περαιτέρω ανάπτυξη αυτής της τεχνικής. Αυτό θα τους έδινε σίγουρα σπουδαιότερες και περισσότερες δυνατότητες από όσες μπορούν να έχουν προς το παρόν. Για τους παραπάνω λόγους οι βιολόγοι αλλά και οι φυσικοί θα πρέπει να συνεχίσουν τις έρευνες έτσι ώστε να επινοηθούν επιπλέον νέοι τύποι οπτικών λαβίδων, πιο έντονοι και πιο επιδέξιοι από αυτούς του παρελθόντος αλλά και του παρόντος.

Βιβλιογραφία

1. <http://www.rizospastis.gr/story.do?id=297357> (διαβάστηκε 31/3/2015)
2. <http://reocities.com/grphysics/laser5.html> (διαβάστηκε 31/3/2015)
3. http://en.wikipedia.org/wiki/Optical_tweezers (διαβάστηκε 31/3/2015)
4. http://www.physics.ntua.gr/pdf_doc_files/seminario_fysikhs_2006/group2/Stiliannou.pps (διαβάστηκε 31/3/2015)
5. <http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9B%CE%AD%CE%B9%CE%B6%CE%B5%CF%81> (διαβάστηκε 4/4/2015)
6. http://users.uoi.gr/mbenis/index_files/Classes/LASER_ALL.pdf (διαβάστηκε 4/4/2015)
7. Ζευγώλης, Δ. (2007) Εφαρμοσμένη οπτική με θέματα οπτικοηλεκτρονικής και laser. Β' έκδοση. Θεσσαλονίκη: Τζιόλα.
8. <http://users.auth.gr/~katsiki/kefalaio%2013%20%20laser.pdf> (διαβάστηκε 4/4/2015)
9. Stevenson, D. J., Gunn-Moore, F., & Dholakia, K. (2010) Light forces the pace: optical manipulation for biophotonics. Journal of biomedical optics. 15 (4), 041503-1-041503-21
10. Molloy, J. E., & Padgett, M. J. (2002) Lights, action: optical tweezers. Contemporary physics. 43 (4), 241-258.
11. Παπαγιάκουμου Ι. Ειρήνη-Χρυσοβαλάντη, Διδακτορική διατριβή (2005) Διερεύνηση των φυσικών χαρακτηριστικών και του τρόπου διάδοσης σύμφωνης ακτινοβολίας για την κατανόηση των βασικών μηχανισμών της οπτικής παγίδευσης, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (διαβάστηκε 5/3/2015)
12. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0030401896004567> (διαβάστηκε 5/5/2015)
13. <http://en.wikipedia.org/wiki/Dynein> (διαβάστηκε 8/5/2015)
14. [http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9C%CE%B5%CF%84%CE%B1%CE%B3%CF%81%CE%B1%CF%86%CE%AE_\(%CE%B2%CE%B9%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%AF%CE%B1\)](http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9C%CE%B5%CF%84%CE%B1%CE%B3%CF%81%CE%B1%CF%86%CE%AE_(%CE%B2%CE%B9%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%AF%CE%B1)) (διαβάστηκε 8/5/2015)
15. [http://en.wikipedia.org/wiki/Translation_\(biology\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Translation_(biology)) (διαβάστηκε 8/5/2015)
16. http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_folding (διαβάστηκε 7/5/2015)
17. http://iopscience.iop.org/1742-6596/572/1/012016/pdf/1742-6596_572_1_012016.pdf (διαβάστηκε 17/4/2015)
18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4317123/> (διαβάστηκε 6/5/2015)
19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3926395/> (διαβάστηκε 1/5/2015)
20. <https://books.google.gr/books?id=N9JxJ7jJ2ikC&pg=PA87&lpg=PA87&dq=Colon+et+al.+1992+optical+tweezers&source=bl&ots=gG87jJZ2O8&sig=qm7zk56V5aiLWu1fhY3yqD3W6no&hl=el&sa=X&ei=9wtPVYyhJcm0Uc-2gaAN&ved=0CDMQ6AEwAg#v=onepage&q=Colon%20et%20al.%2C%201992%20optical%20tweezers&f=false> (διαβάστηκε 20/4/2015)
21. https://dSPACE.lib.ntua.gr/dSPACE2/bitstream/handle/123456789/7140/cunaje_liposome.pdf?sequence=3 (διαβάστηκε 10/4/2015)
22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3639288/> (διαβάστηκε 1/5/2015)