



**ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ LASER ΣΤΗ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΤΟ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ:
Εφαρμογές των laser στη Βιοϊατρική έρευνα**

Μυρσίνη Μακροπούλου

*Αναπλ. Καθηγήτρια Τομέα Φυσικής, Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και
Φυσικών Επιστημών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα*



**ΣΕΜΦΕ, 9ο εξάμηνο
ΑΘΗΝΑ, Ακαδ. Έτος 2008-9**

❖ ΟΠΤΙΚΗ ΠΑΓΙΔΕΥΣΗ ΜΙΚΡΟΔΟΜΩΝ ΜΕ LASER

Η ακτινοβολία laser είναι, σε αντίθεση με το φυσικό φως, μια **μονοχρωματική, σύμφωνη και κατευθυντική δέσμη φωτονίων**. Οι ιδιότητες αυτές είναι απαραίτητες για μικροχειρισμούς στο εσωτερικό του κυττάρου ή άλλων μικροδομών (μόρια, άτομα, διηλεκτρικά σφαιρίδια), δεδομένου ότι το φως laser μπορεί να διεισδύσει στο κύτταρο χωρίς να καταστρέψει κυτταρικά τοιχώματα ή μεμβράνες και με τη βοήθεια των δυνάμεων που επάγει η πίεση ακτινοβολίας να παγιδεύσει κάποιες δομές. Η επαγωγή δυνάμεων σε μικροδομές κατά την ακτινοβολή τους με laser οφείλεται στη μεταβολή της ορμής των φωτονίων κατά την αλληλεπίδρασή τους με το στόχο, σύμφωνα με τον **θεμελιώδη νόμο της Φυσικής $F=dP/dt$** (όπου F = δύναμη και P = ορμή).

Έτσι έχει κανείς **το πλεονέκτημα μιας μεθόδου ανέπαφης, μη-επεμβατικής και πολύ μεγάλης ακρίβειας**. Τα κυτταρικά οργανίδια και τα κύτταρα ως σύνολο μπορούν να «παγιδευτούν» και να μεταφερθούν με τη βοήθεια φωτός laser (που εκπέμπει π.χ. στο υπέρυθρο), ενσωματωμένου σε κατάλληλο μικροσκόπιο, η τεχνική αυτή δε ονομάζεται **«τσιμπίδα laser»**, ή **"οπτική λαβίδα"** αν μεταφράσουμε ελεύθερα τον διεθνώς καθιερωμένο αγγλικό όρο **optical tweezer**.

Βασικές αρχές οπτικής παγίδευσης

Τι είναι;

Οπτική λαβίδα: Μη επεμβατικό εργαλείο που χρησιμοποιεί μια ή περισσότερες δέσμες laser για τη δημιουργία δυνάμεων της τάξης των μερικών pN, ικανές να παγιδεύουν σωματίδια.

Βασίζεται σε δυνάμεις πίεσης ακτινοβολίας που προέρχονται από τη μεταβολή της ορμής των φωτονίων.

Σχηματίζεται από ισχυρή εστίαση μιας δέσμης laser μέσα από αντικειμενικό φακό μικροσκοπίου μεγάλου NA.

Μέγεθος παγιδευμένων σωματιδίων: από μερικές δεκάδες nm έως μερικές δεκάδες μm.

$$\vec{F}_{optic} = \frac{d\vec{P}_{tot}}{dt}$$

Βασικές αρχές οπτικής παγίδευσης

Περιγραφή δυνάμεων

Οπτική δύναμη - Δυνάμεις πίεσης ακτινοβολίας

Δύναμη σκέδασης στη διεύθυνση διάδοσης του φωτός, μη συντηρητική.

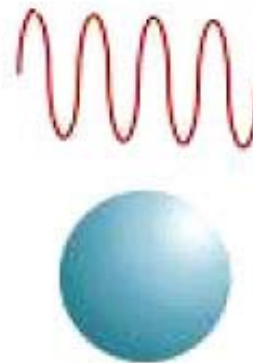
Δύναμη βαθμίδας στη διεύθυνση της χωρικής βαθμίδας (αξονικής και εγκάρσιας) του φωτός, συντηρητική.

Σταθερή παγίδα στις 3D **συνιστώσα βαθμίδας > συνιστώσα σκέδασης**

$r \ll \lambda$ δυνάμεις μέσω ηλεκτροδυναμικής προσέγγισης



Σωματίδιο Rayleigh



Σωματίδιο Mie

$r \gg \lambda$ δυνάμεις μέσω γεωμετρικής οπτικής

Σκέδαση Mie $r \gg \lambda$

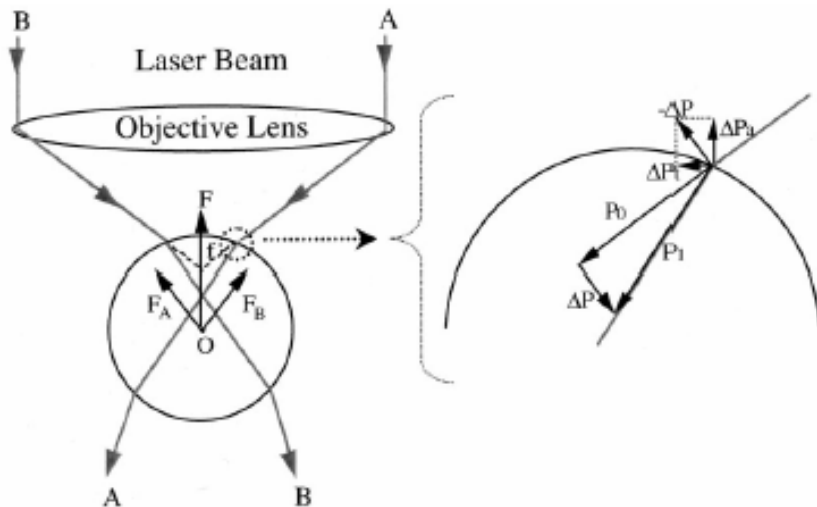
Περιγραφή δυνάμεων

Οπτική δύναμη



Δύναμη σκέδασης

Προέρχεται από την απορρόφηση και την κατοπτρική ανάκλαση της δέσμης στο παγιδευμένο σωματίδιο.

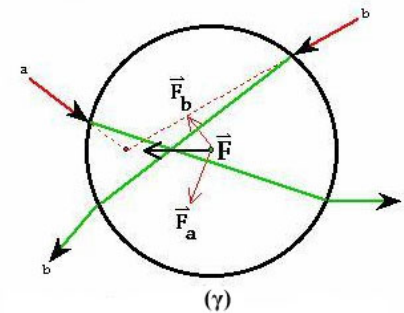
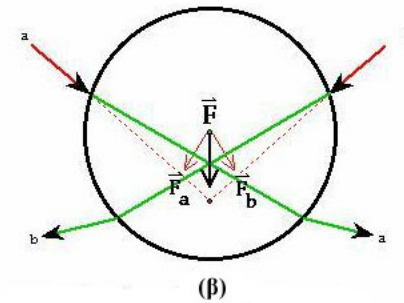
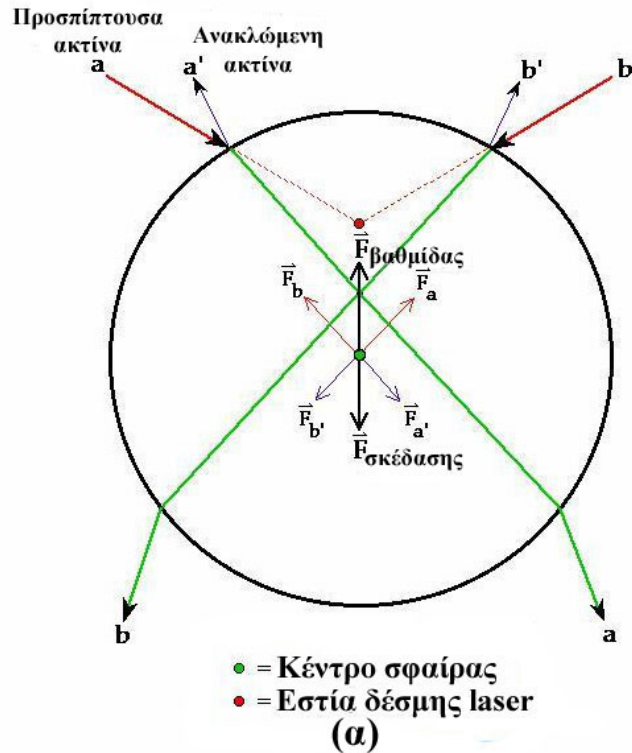


Δύναμη βαθμίδας

Η διάθλαση του προσπίπτοντος φωτός από τη σφαίρα αντιστοιχεί σε μεταβολή της ορμής ΔP του φωτός και στη δημιουργία μίας ίσης και αντίθετης φοράς ΔP μεταδίδεται στο σωματίδιο. Η δύναμη που δίνεται από το ρυθμό μεταβολής της ορμής είναι ανάλογη της έντασης του φωτός.

Σωματιδιακή προσέγγιση Mie

Περιγραφή δυνάμεων

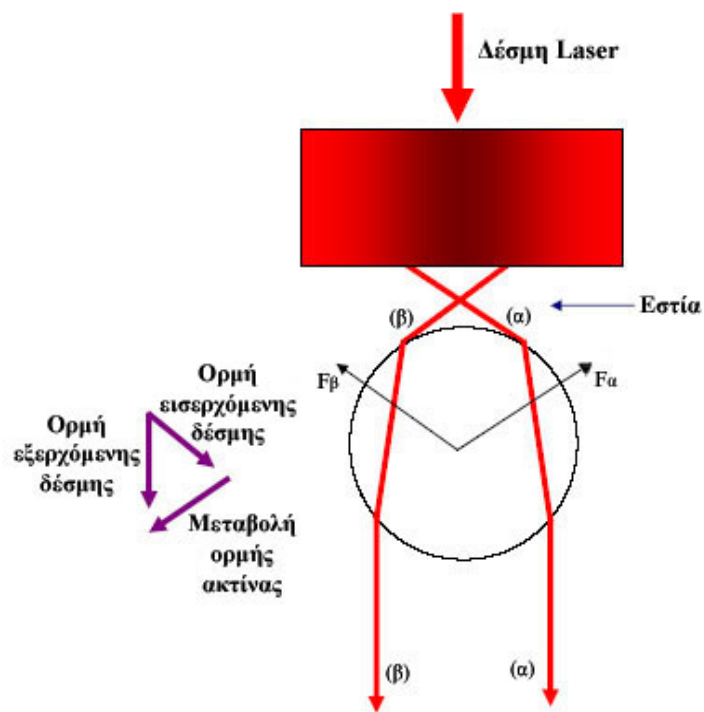
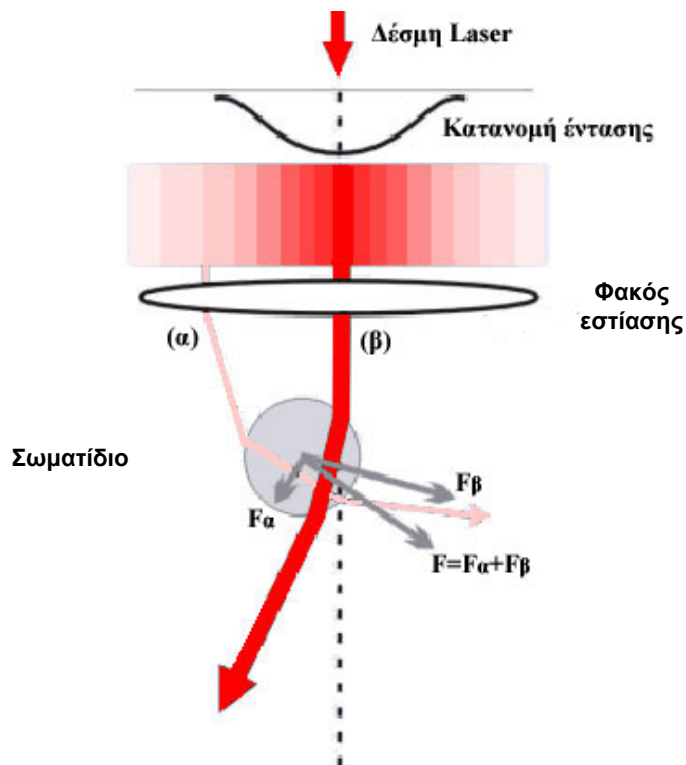


Οπτική δύναμη στη διεύθυνση βαθμίδας (για $n_p > n_m$).

Ακραίες ακτίνες \square αξονική δύναμη βαθμίδας.

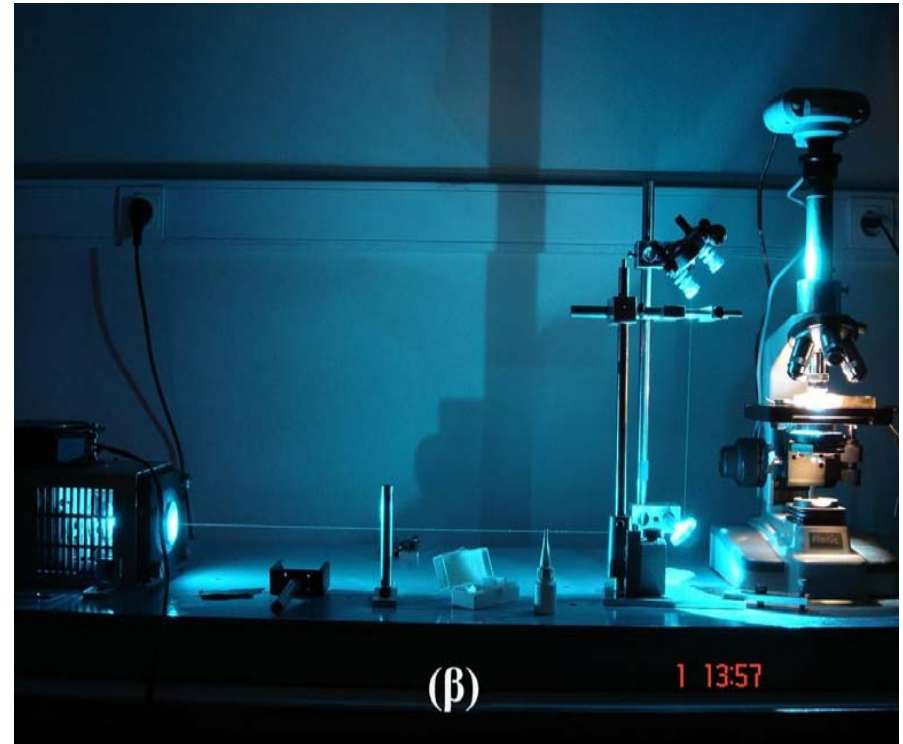
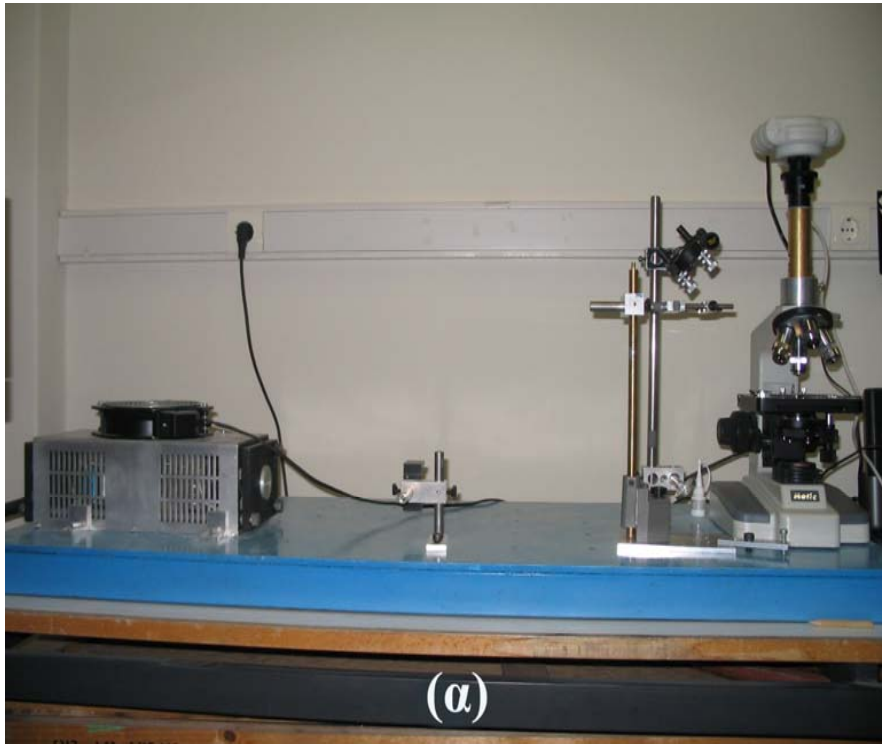
Κεντρικές ακτίνες \square συνιστώσα σκέδασης.

Για να πετύχω οπτική παγίδευση θέλω μία ισχυρά εστιασμένη δέσμη



Ανάπτυξη συστημάτων οπτικής παγίδευσης Λαβίδα laser Ar⁺

Στόχος: ανάπτυξη απλής και ευέλικτης πειραματικής διάταξης



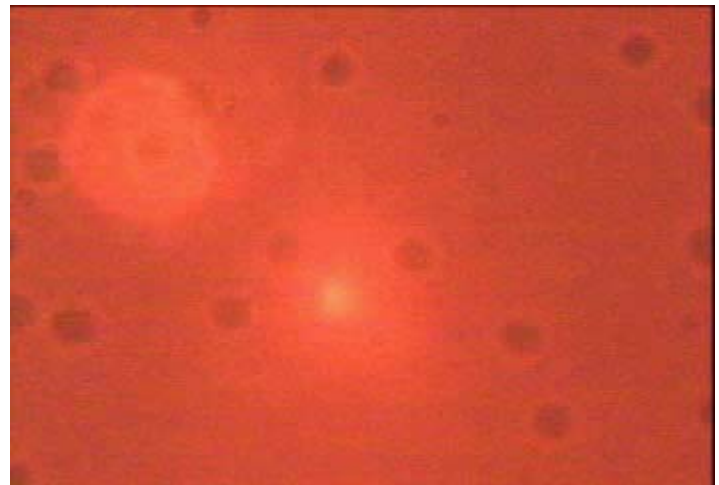
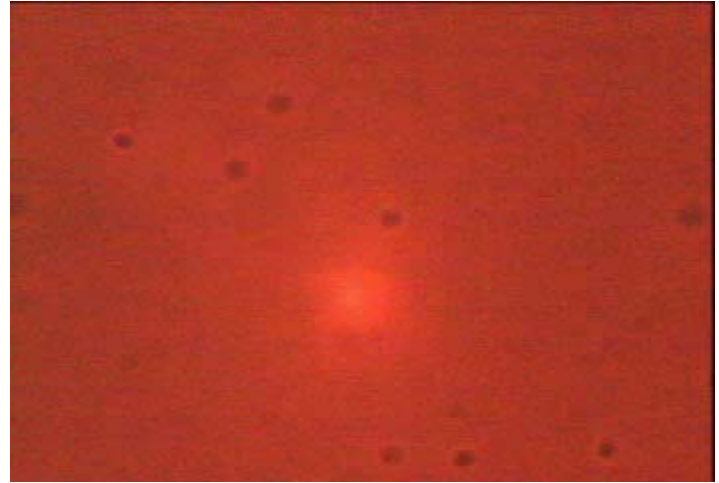
Μέγιστη ισχύς ακτινοβολίας laser Ar⁺: 35 mW

Οπτική παγίδευση - Λαβίδα laser Ar⁺

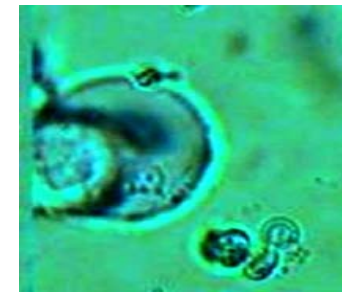
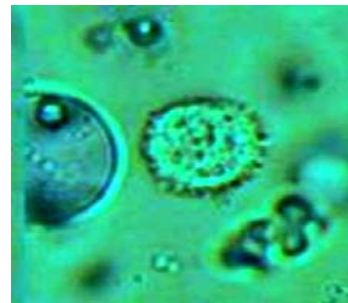
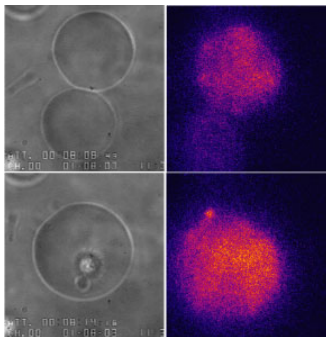
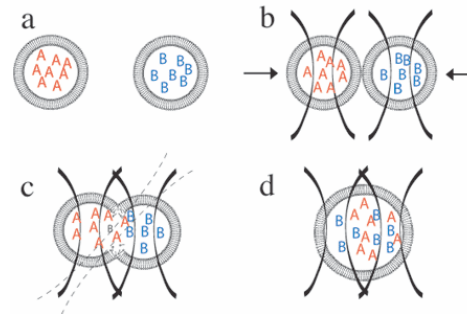
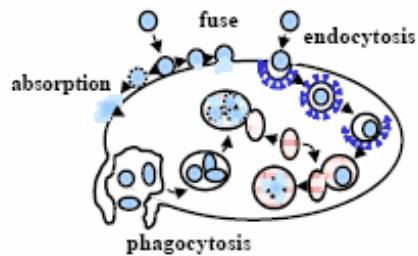
Δείγματα: σφαίρες
πολυστυρένιου 0,6 μm, 1,1 και
8,0 μm και κύτταρα μαγιάς.

Γιατί σφαίρες πολυστυρένιου;

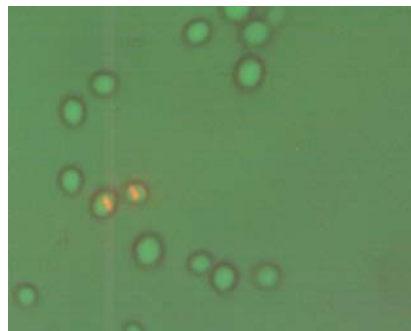
- εύκολη διεξαγωγή αναλυτικού μοντέλου για τον υπολογισμό των δυνάμεων
- γενικές κατευθύνσεις εφαρμόσιμες σε όλα τα σωματίδια
- πρόσδεση σε βιολογικά δείγματα που διευκολύνει την παγίδευση αυτών.



παγίδευση ενός καρκινικού κυττάρου και ενός λιποσώματος με τη χρήση διπλής οπτικής παγίδας, με αποτέλεσμα την εντοπισμένη καταστροφή του κυττάρου.



Δυο στιγμιότυπα από την καταγραφή σε video της αλληλεπίδρασης λιποσώματος – καρκινικού κυττάρου (πειραματικά αποτελέσματα στο Βουκουρέστι).



Παγίδευση δύο κυττάρων μαγιάς με τη χρήση διπλής οπτικής παγίδας (πειραματικά αποτελέσματα στο ΕΜΠ).

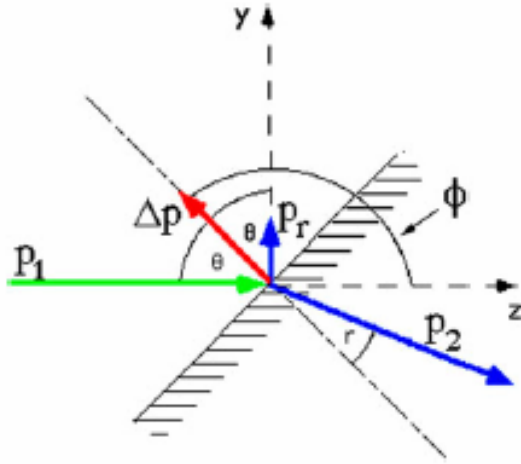


Figure 1. Momentum of light rays at the interface between two media.

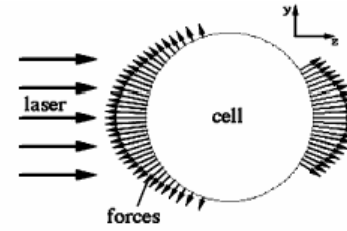


Figure 2. Stress profile on a sphere due to one laser beam.

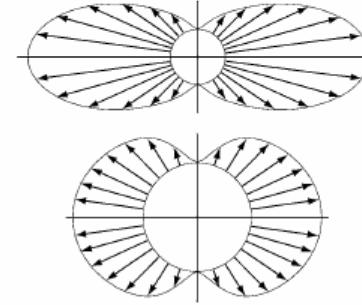


Figure 3. Deforming stresses on a cell trapped between two counter-propagating laser beams. In the upper picture the laser beam has the same radius as the cell ($\rho/w = 1$), whereas in the picture below the laser beam is twice as wide ($\rho/w = 1/2$).

The components of the resulting change in momentum in z and y directions, as functions of the incident angle θ , are

$$\begin{aligned}\Delta p_z &= \Delta p \cdot \cos \phi = p_1 \cos(0) - p_2 \cos(2\pi - \theta + r) - p_r \cos(\pi - 2\theta) \\ &= 1 - T(\theta) \cdot n \cdot \cos(\theta - r) + R(\theta) \cdot \cos(2\theta)\end{aligned}\quad (6)$$

and

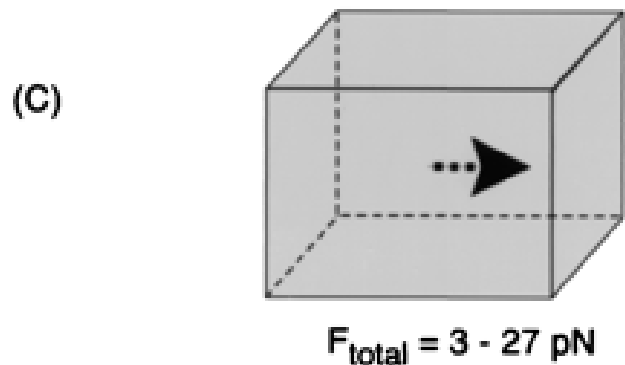
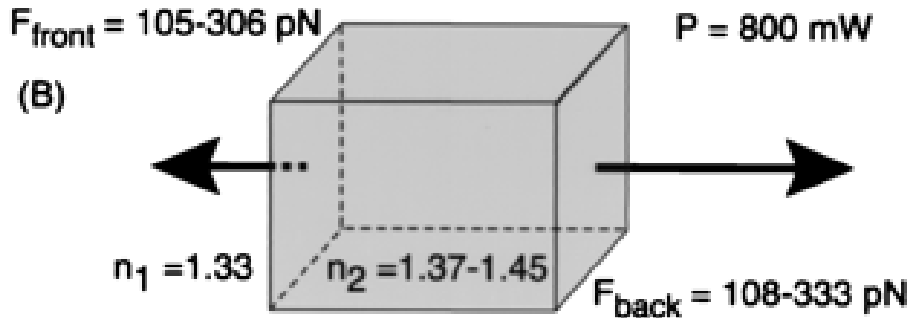
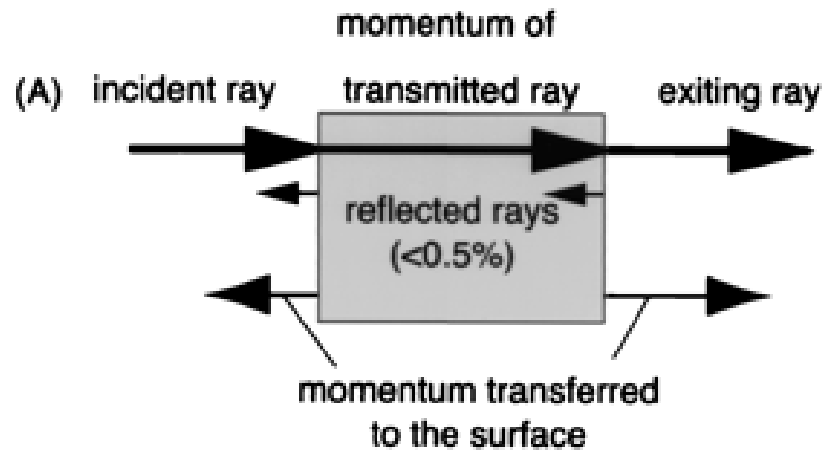
$$\begin{aligned}\Delta p_y &= \Delta p \cdot \sin \phi = p_1 \sin(0) - p_2 \sin(2\pi - \theta + r) - p_r \sin(\pi - 2\theta) \\ &= T(\theta) \cdot n \cdot \sin(\theta - r) + R(\theta) \cdot \sin(2\theta).\end{aligned}\quad (7)$$

The magnitude of Δp is then given by

$$\Delta p = \sqrt{\Delta p_z^2 + \Delta p_y^2}\quad (8)$$

and its direction is

$$\phi = \arctan\left(\frac{\Delta p_y}{\Delta p_z}\right).\quad (9)$$



Momentum transfer and resulting forces on a dielectric box due to one laser beam incident from the left. (A) A small portion of the incident light is reflected at the front surface. The rest enters the box and gains momentum due to the higher refractive index inside. On the back, the same fraction is reflected and the exiting light loses momentum. The lower arrows indicate the momentum transferred to the surface. (B) The resulting forces for a light power of 800 mW at the front and the back are $F_{\text{front}} = 105\text{-}306 \text{ pN}$ and $F_{\text{back}} = 108\text{-}333 \text{ pN}$, respectively, depending on the refractive index of the material. Note that the force on the back is larger than the force on the front. (C) Due to the difference between forces on front and back, there is a total force, $F_{\text{total}} = F_{\text{back}} - F_{\text{front}} = 3\text{-}27 \text{ pN}$, acting on the center of gravity of the box. This total force pushes the box away from the light source. An elastic material will be deformed by the forces acting on the surface, which are an order of magnitude larger than the total force.

Μέτρηση οπτικών δυνάμεων

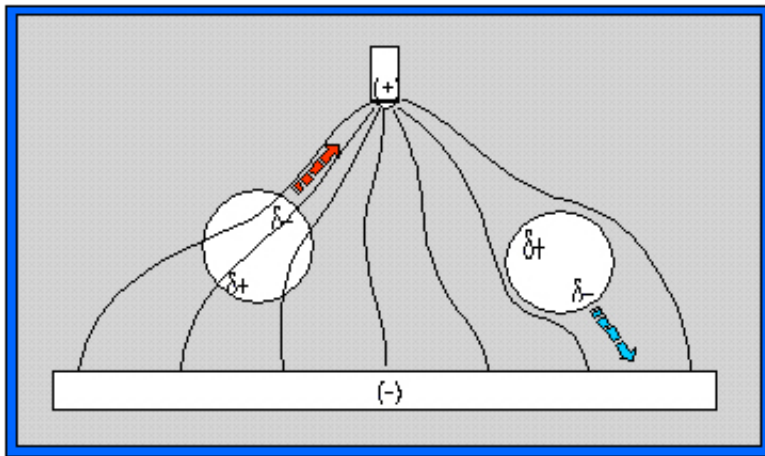
Μέθοδοι βαθμονόμησης

- **Μέθοδος διαφυγής** (escape force method): η οπτική δύναμη εξισορροπείται από τη **δύναμη ιξώδους** που ασκείται στο σωματίδιο από τη σχετική κίνηση του περιβάλλοντος μέσου. Καταγράφεται η ταχύτητα του σωματιδίου τη στιγμή που διαφεύγει της παγίδας.
- **Μέθοδος «ακαμψίας» της παγίδας** (trap stiffness): η οπτική παγίδα θεωρείται σαν **σύστημα ελατηρίου-μάζας**, με τη σταθερά του ελατηρίου να χαρακτηρίζεται σαν ακαμψία της παγίδας. Η σφαίρα διεγείρεται σε ταλάντωση από μια εξωτερική πηγή. Η χρονική υστέρηση της κίνησης της σφαίρας σε σχέση με τη διέγερση αποτελεί μέτρο για την ακαμψία της παγίδας.
- Βαθμονόμηση με βάση την **κίνηση Brown**: στην ουσία ίδια με τη μέθοδο ακαμψίας της παγίδας μόνο που χρησιμοποιεί ως δύναμη διέγερσης αυτή από την **κίνηση Brown** του σωματιδίου μέσα στο μέσον.

Μέτρηση οπτικών δυνάμεων

Μέθοδος διηλεκτροφόρησης

Διηλεκτροφόρηση: κίνηση που προκαλείται σε σωματίδια από την πόλωσή τους όταν αυτά βρίσκονται σε ανομοιογενές ηλεκτρικό πεδίο (H.A. Pohl, 1958). Δεν απαιτείται το σωματίδιο να είναι φορτισμένο.



Η κίνηση γίνεται προς την ίδια κατεύθυνση, ανεξάρτητα της κατεύθυνσης του πεδίου, ανάλογα με την πολωσιμότητα του σωματιδίου.

Μέτρηση οπτικών δυνάμεων

Δύναμη διηλεκτροφόρησης

$$\vec{F} = \vec{p} \cdot \vec{\nabla} \vec{E}$$

Δύναμη λόγω της βαθμίδας του πεδίου.

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

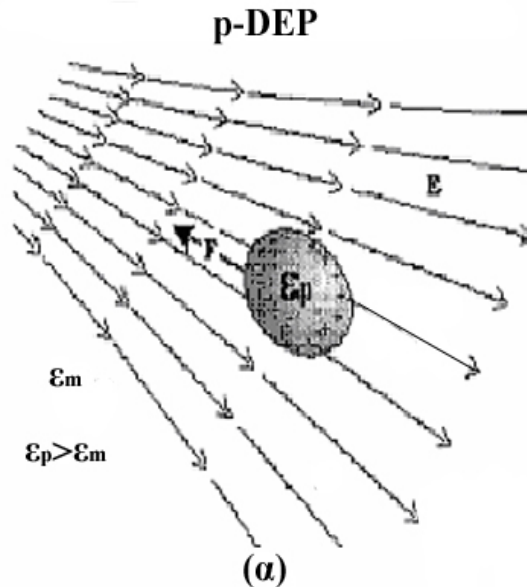
$$f_{CM} = \left[\frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \right]$$

Παράγοντας
Clausius-Mossotti

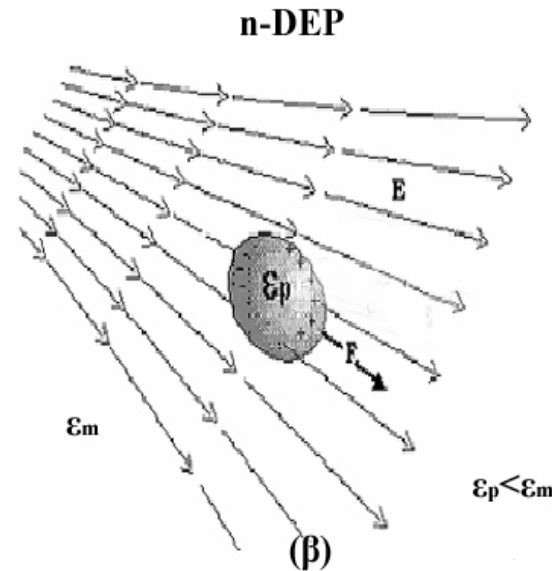
$$\epsilon^* = \epsilon - i(\sigma/\omega)$$

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

$$\operatorname{Re}(f_{CM}) > 0$$



$$\operatorname{Re}(f_{CM}) < 0$$

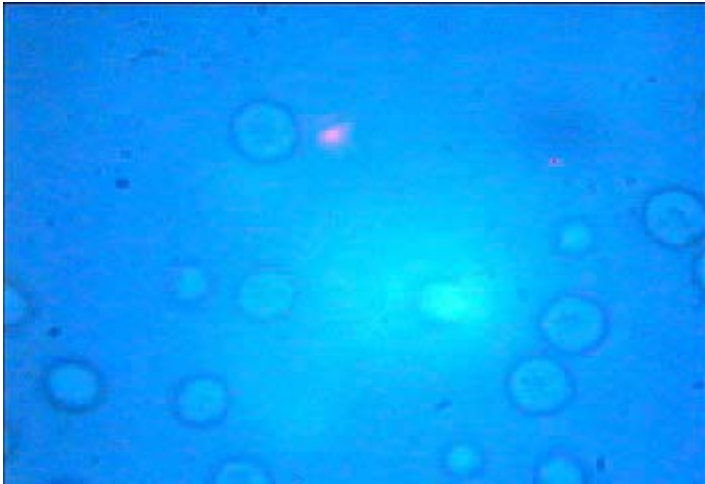


Ανάπτυξη συστημάτων οπτικής παγίδευσης

Λαβίδα laser He-Ne

633 nm: δεν απορροφάται από την πλειοψηφία των βιολογικών ιστών

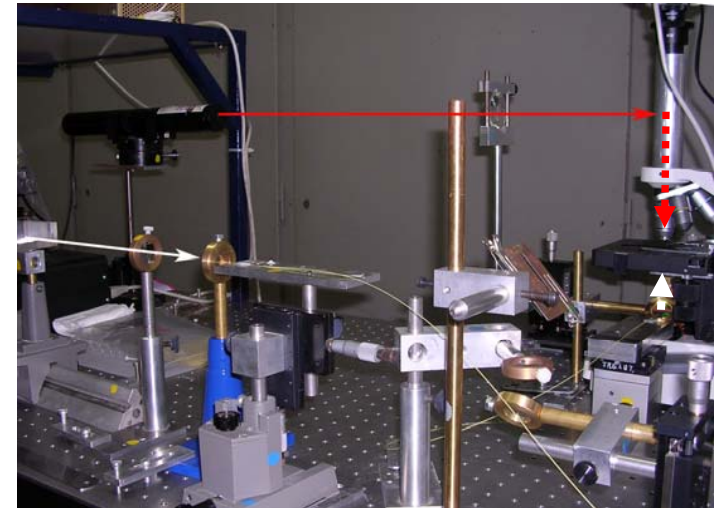
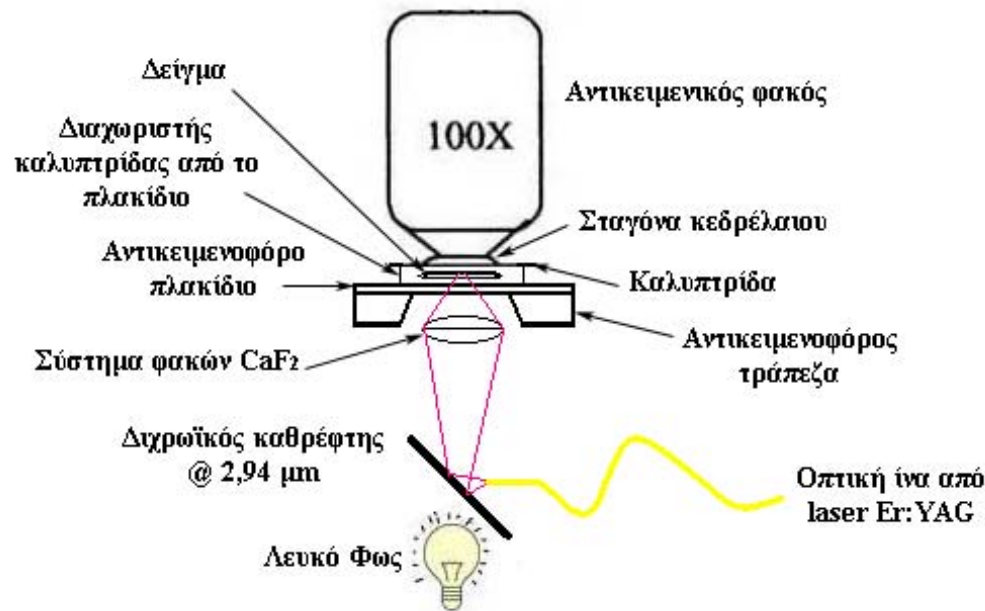
Μέγιστη ισχύς δέσμης laser 8 mW.



Παρόλο που η τιμή της ισχύος της δέσμης laser είναι μικρή έχουμε σταθερή παγίδα.

Συνδυασμός παγίδας He-Ne – μικροδέσμης laser Er:YAG

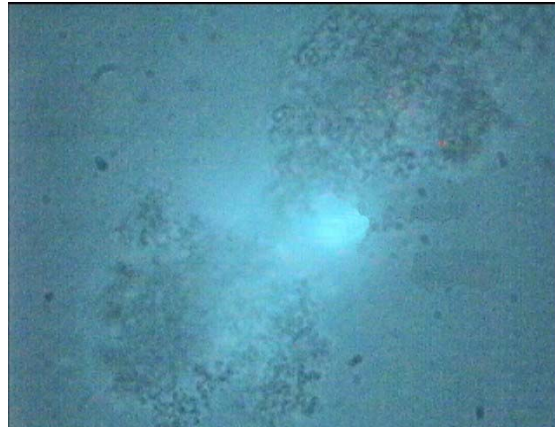
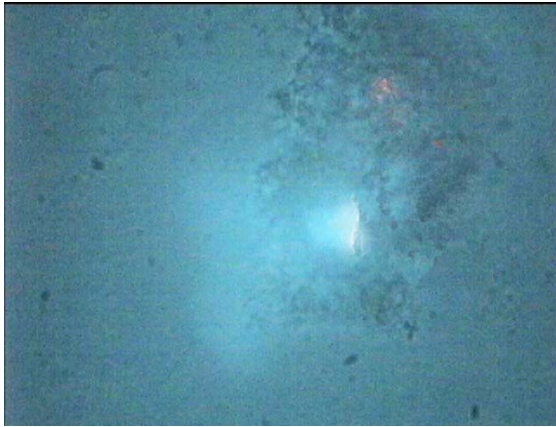
Πειραματική διάταξη



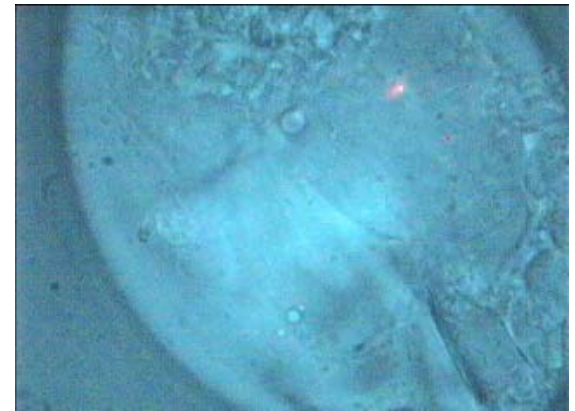
Συνδυασμός παγίδας He-Ne – μικροδέσμης laser Er:YAG

Αποτελέσματα

Μύκητες



Επιθηλιακά κύτταρα



Klebsormidium



✚ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ LASER ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ



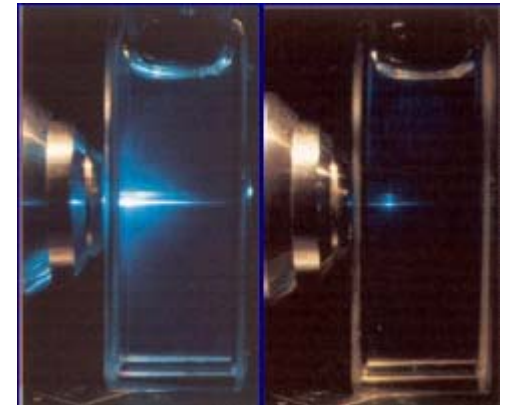
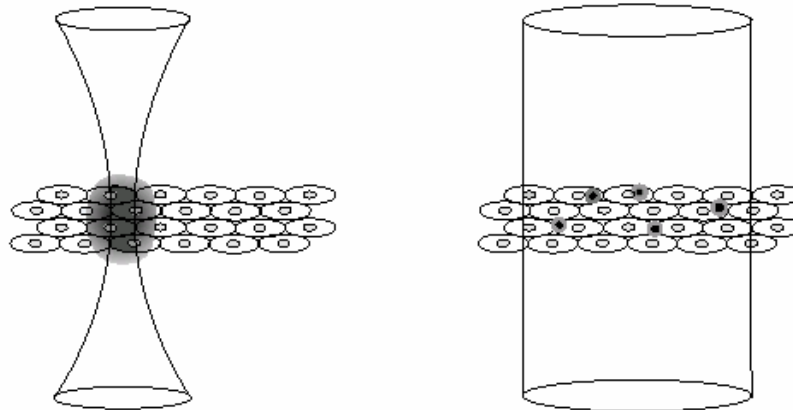
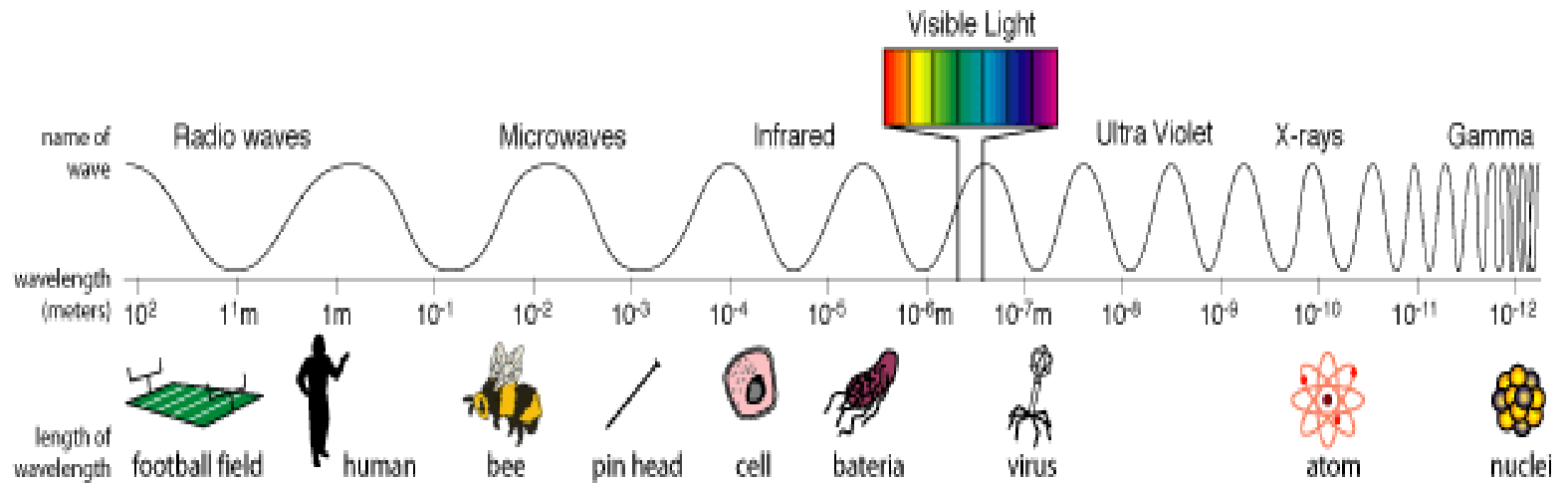
Οι χρήσεις των laser στη βιοτεχνολογία διακρίνονται κύρια σε:

- **διαγνωστικές εφαρμογές** (in vivo και in vitro, σε μοριακό ή κυτταρικό επίπεδο),
- **επεμβατικές εφαρμογές** (μικροχειρισμός βιοδομών, νανοχειρουργική, φωτοδυναμική δράση κ.ά.),
- **βασική εργαστηριακή έρευνα** (μικροσκοπία, φθοριομετρία, κυτταρομετρία κ.ά.).

Οι **οπτικές διαγνωστικές μέθοδοι** χρησιμοποιούν την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία laser είτε ως **φωτεινή πηγή** ή ως **πηγή διέγερσης** φωτοεπαγόμενων αντιδράσεων.

Οι **θεραπευτικές μέθοδοι** χρησιμοποιούν την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία laser είτε ως «**οπτικό νυστέρι**» ή ως **πηγή διέγερσης** φωτοβιοχημικών αντιδράσεων.

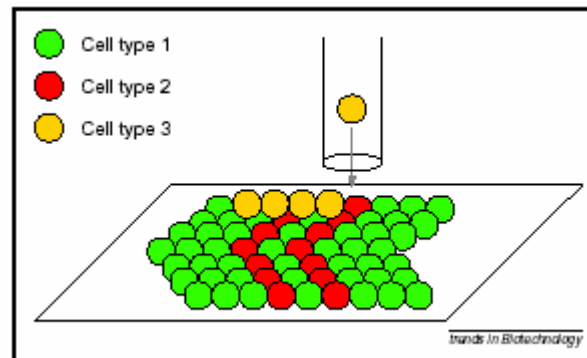
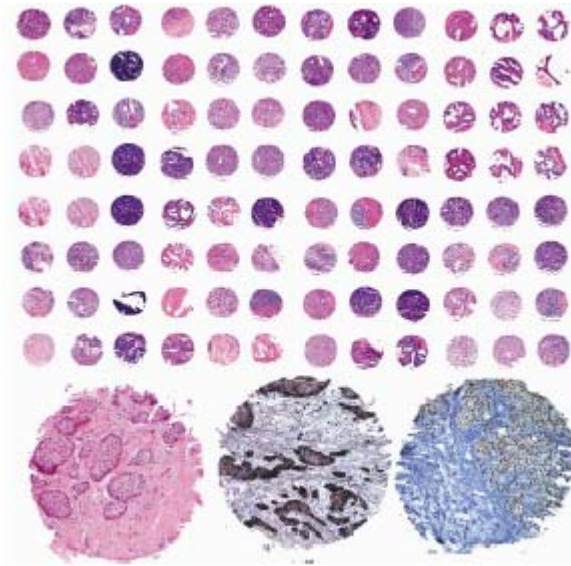
❖ Συσχέτιση μήκους κύματος - έμβιου στόχου



✚ Μερικά παραδείγματα εφαρμογών των laser στη βιοτεχνολογία

- Κυταρρομετρία ροής και διαχωρισμός κυττάρων
- Μικροσκοπία σάρωσης με ακίδα
- Μικροσκοπίας ατομικής δύναμης
- Μικροχειρισμός βιοδομών με laser – οπτική παγίδευση
- Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης
- Εναπόθεση βιοϋλικών σε διεπιφάνειες – βιοαισθητήρες
- Φασματομετρία – φασματοσκοπία φθορισμού
- Συντονισμός πλασμονίων επιφανείας

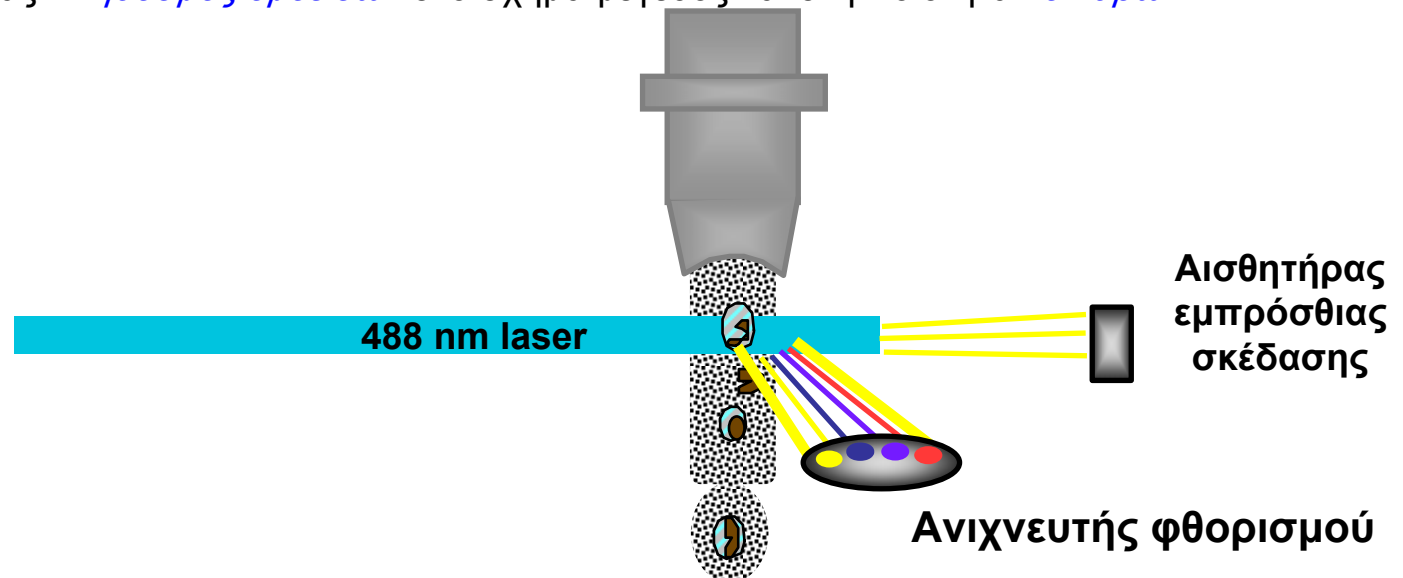
✚ Μερικά παραδείγματα εφαρμογών των Laser στη βιοτεχνολογία



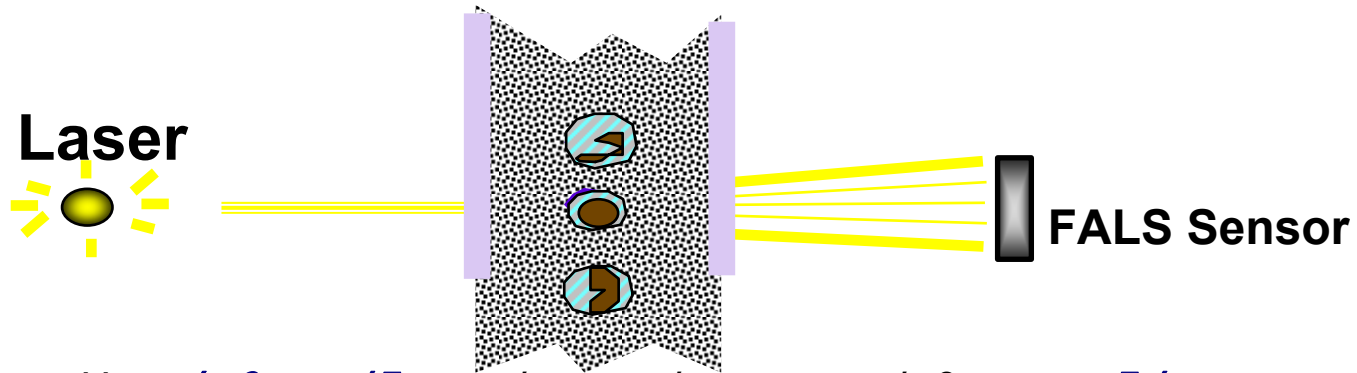
✚ Κυταρομετρία ροής (Flow cytometry) και Fluorescence

Activated Cell Sorting (FACS)

Η κυταρομετρία ροής είναι μια *τεχνική ταυτοποίησης, ανάλυσης και διαχωρισμού κυττάρων*, τα οποία βρίσκονται σε εναιώρημα. Τα κύτταρα, που βρίσκονται διαλυμένα σε κάποιο βιολογικό υγρό, επωάζονται με κατάλληλα αντισώματα, συνδεδεμένα με μια *φθορίζουσα ουσία*. Το όλο διάλυμα περνά από έναν υπερηχητικό αναδευτήρα και βγαίνει από το ακροφύσιό του σε *νηματική, ομοαξονική ροή (jet)*. *Δέσμη laser* κατάλληλου μήκους κύματος προσπίπτει στη συνέχεια στις σταγόνες που πέφτουν και ένα σύστημα ανιχνευτών της φωτεινής ακτινοβολίας καταγράφει τη *πρόσθια και εγκάρσια σκεδαζόμενη ακτινοβολία*, καθώς και την *ακτινοβολία φθορισμού* από τα κύτταρα τα επισημασμένα με τα αντισώματα. Συγχρονίζοντας και συγκρίνοντας τις παραπάνω μετρήσεις - μέσω υπολογιστή - μπορεί να ανιχνευθεί και καταγραφεί ένας *πληθυσμός ομοειδών* στο σχήμα-μέγεθος και στη ποιότητα *κυττάρων*.



✚ Κυταρρομετρία ροής - Forward Angle Light Scatter, FALS



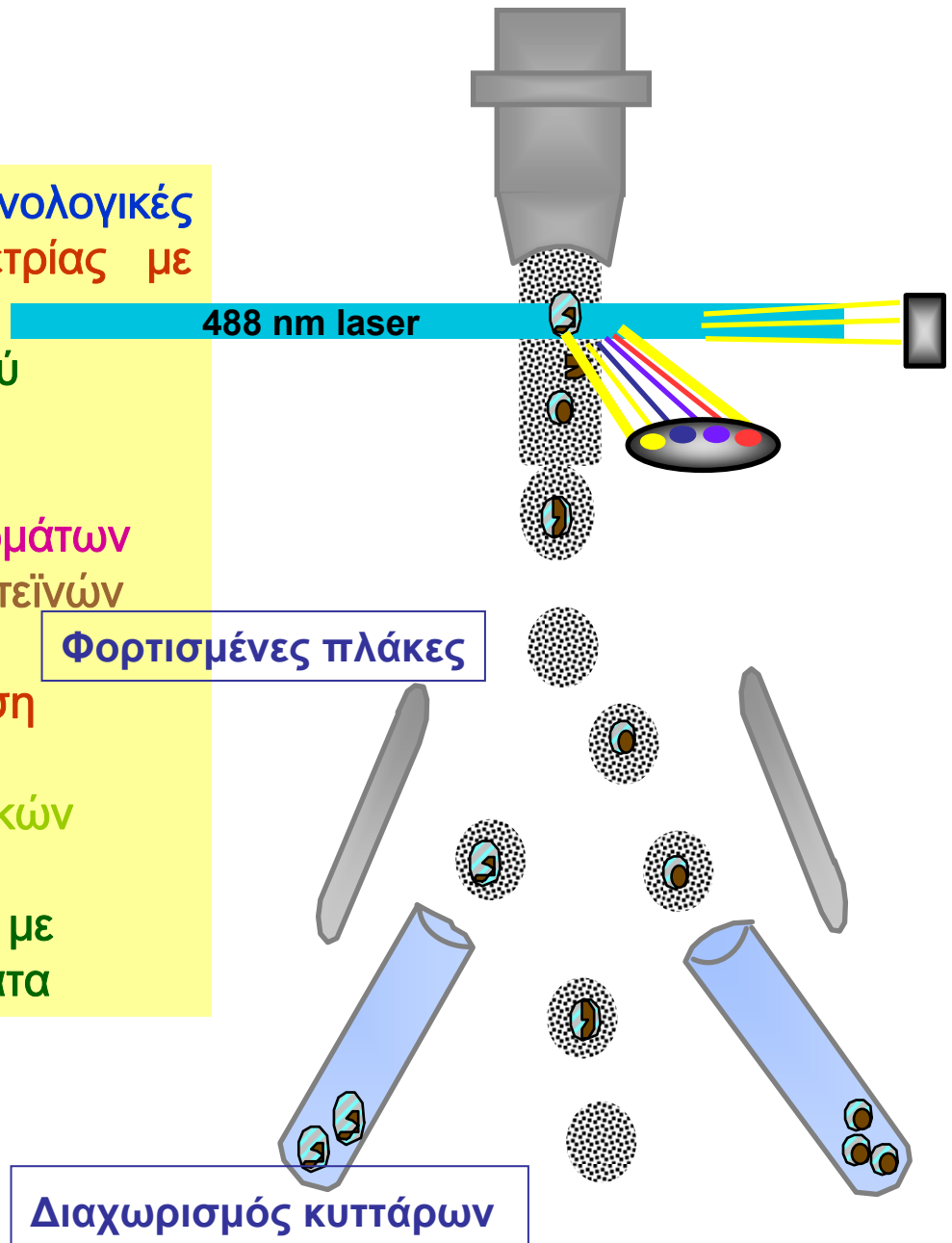
Η **πρόσθια σκέδαση** τείνει να είναι πιο ευαίσθητη σε **ιδιότητες επιφανείας** των σωματιδίων - κυττάρων, απ' ό τι η πλευρική σκέδαση. Μπορεί επομένως να χρησιμοποιηθεί για τη **διάκριση των ζωντανών κυττάρων** από τα νεκρά.

- Η **πλάγια σκέδαση** τείνει να είναι πιο ευαίσθητη σε **δομές που βρίσκονται στο εσωτερικό των κυττάρων**, απ' ό τι η πρόσθια σκέδαση. Μπορεί επομένως να χρησιμοποιηθεί για τη **διάκριση κοκκιωμάτων**.

Η διακριτική ικανότητα της τεχνικής αυτής φθάνει στην ανάλυση ή/και διαχωρισμό 1 κυττάρου από 10^6 διαφορετικά κύτταρα!!

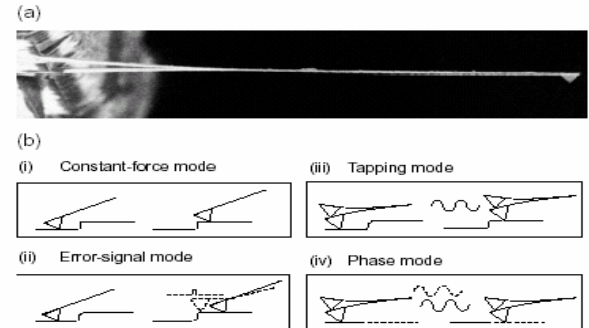
Οι κυριότερες βιοτεχνολογικές εφαρμογές της κυτταρομετρίας με laser είναι επιγραμματικά:

- ❖ Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου
- ❖ Διαχωρισμός κυττάρων
- ❖ Διαχωρισμός χρωμοσωμάτων
- ❖ Ανάλυση DNA και πρωτεϊνών
- ❖ Ανάλυση φαινοτύπου
- ❖ Πολυχρωματική ανάλυση φθορισμού
- ❖ Χαρακτηρισμός καρκινικών κυττάρων
- ❖ Αναγνώριση αντιγόνων με μονοκλωνικά αντισώματα





ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ ΜΕ ΑΚΙΔΑ



Η *μικροσκοπία σάρωσης με ακίδα* είναι μια πολύ σύγχρονη τεχνολογία, η οποία άρχισε να εφαρμόζεται εργαστηριακά από το 1990. Παρέχει *τρισδιάστατες απεικονίσεις επιφανειών*, επεκτείνοντας θεαματικά τα πεδία της οπτικής και της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι λειτουργίας, όπως:

- ✱ Atomic Force Microscopy, contact mode (AFM)
- ✱ Atomic Force Microscopy, non-contact mode (NC-AFM)
- ✱ Atomic Force Microscopy, tapping mode (AFM)
- ✱ Lateral Force Microscopy, (LFM)
- ✱ Scanning Tunneling Microscopy, (STM)
- ✱ Magnetic Force Microscopy, (EFM)
- ✱ Near Field Scanning Optical Microscopy, (NSOM)
- ✱ Electrostatic Force Microscopy, (EFM)
- ✱ Confocal Laser Scanning Microscopy, (CLSM)

❖ Γενικά χαρακτηριστικά της μικροσκοπίας σάρωσης με ακίδα

- Οι παραπάνω μέθοδοι εφαρμόζονται σε:
 - ατμοσφαιρικές συνθήκες περιβάλλοντος
 - συνθήκες υπερυψηλού κενού
 - υγρό περιβάλλον
- Δεν απαιτείται ειδική επεξεργασία και άρα πιθανή καταστροφή του δείγματος
- Δεν έχει σημασία αν το δείγμα είναι ηλεκτρικά αγώγιμο
- Μπορούν να γίνουν μετρήσεις με προσέγγιση του δείγματος, σε επαφή

Οι εφαρμογές στη Βιοτεχνολογική έρευνα καλύπτουν τομείς όπως έρευνα του DNA και άλλων μακρομορίων, έρευνα βιοσυμβατών συνθετικών πολυμερών και άλλων πολυμερών, κυτταρική έρευνα, καθώς και μετρήσεις φυσικών παραμέτρων (π.χ. κατανομή ηλεκτροστατικού φορτίου) σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές (π.χ. σε συνδυασμό με Υπολογιστική Τομογραφία).

Η διακριτική ικανότητα της μεθόδου είναι μικρότερη ή ίση των Å και, ανάλογα με τις δεξιότητες του χρήστη, μπορεί να φθάσει σε επίπεδα:

Ατομικής κλίμακας, Μοριακής κλίμακας, Μικρομετρικής κλίμακας

❖ Scanning Tunnelling Microscopy

Η τεχνική *scanning tunnelling microscopy (STM)* είναι ο «πρόγονος» όλων των άλλων τεχνικών μικροσκοπίας σάρωσης. Ανακαλύφθηκε το 1981 από τους Gerd Binnig και Heinrich Rohrer στα εργαστήρια της IBM Zurich. Πέντε χρόνια αργότερα πήραν το βραβείο Nobel Φυσικής για αυτήν την ανακάλυψη. Βασίζεται στο φαινόμενο «σήραγγας» της Κβαντικής Φυσικής.

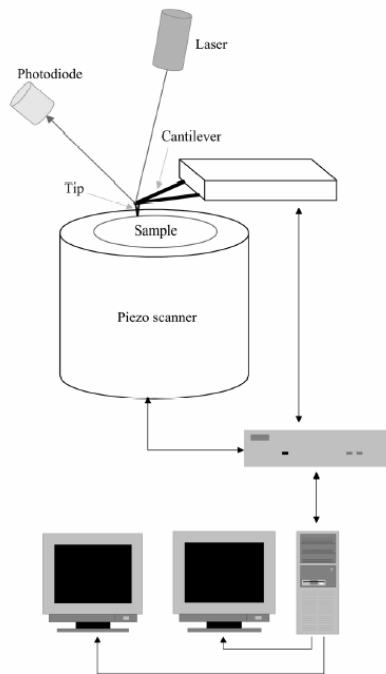


Fig. 2. Schematic representation of the components of the equipment for atomic force microscopy.

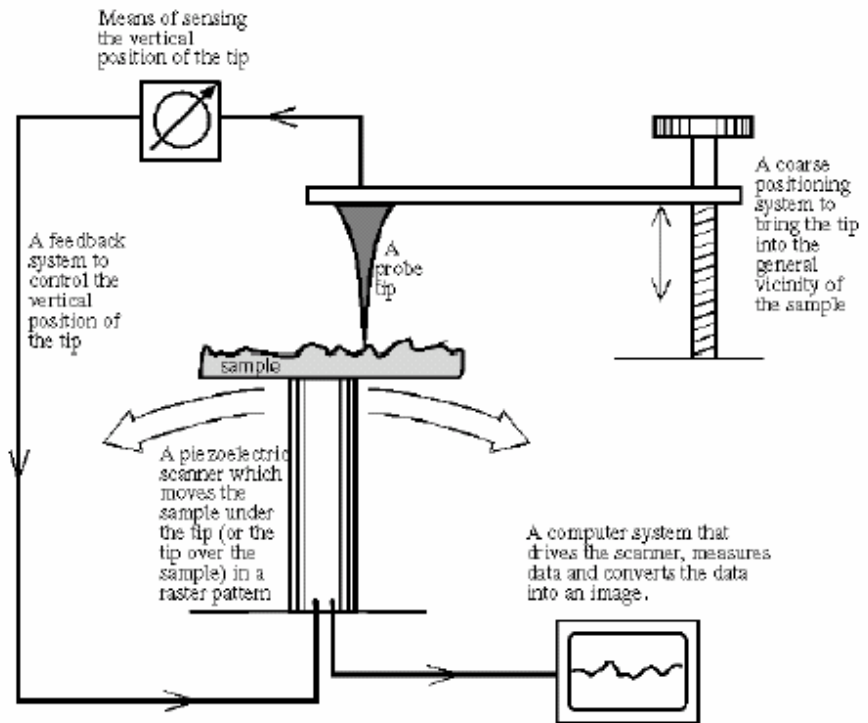
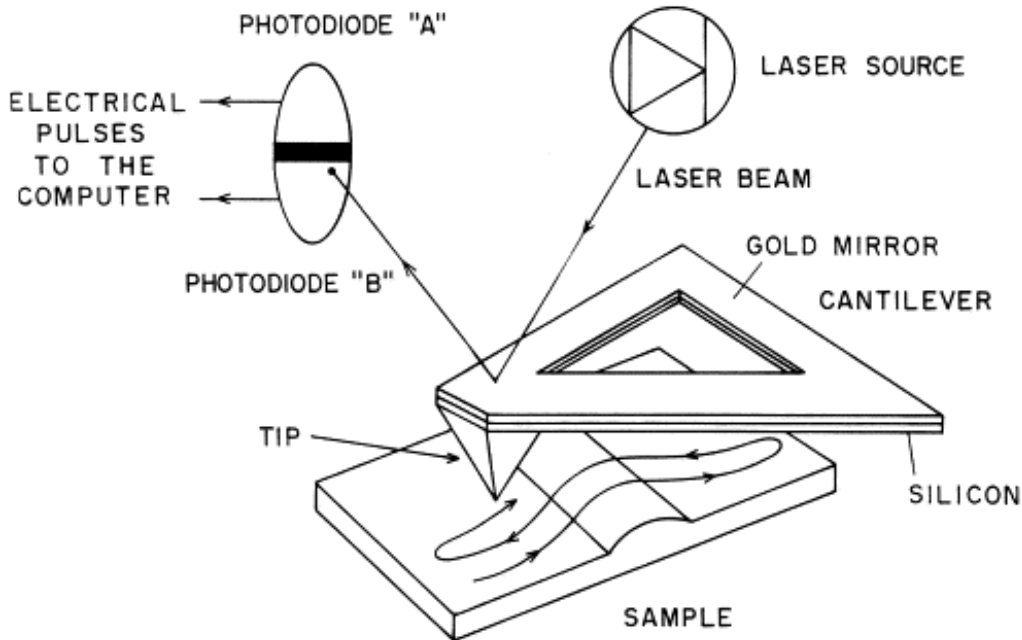
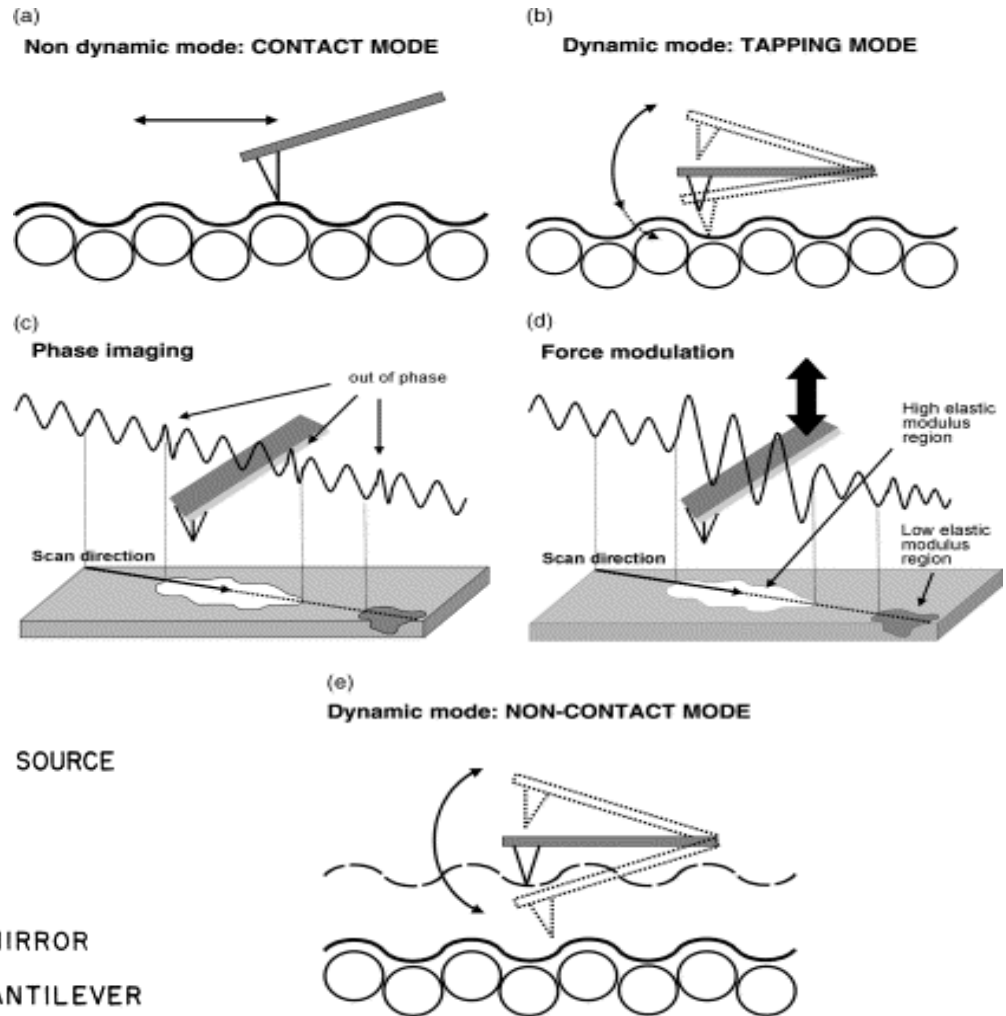
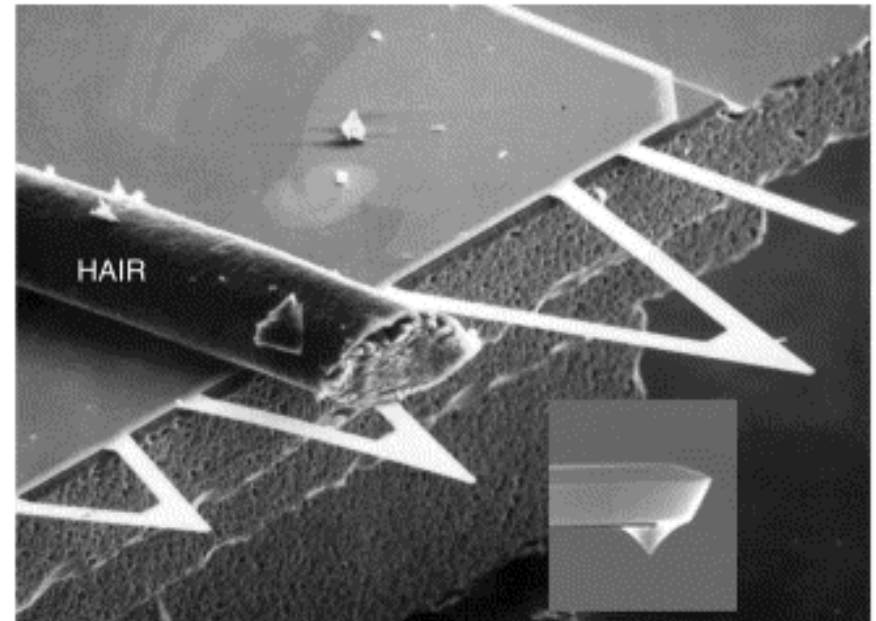
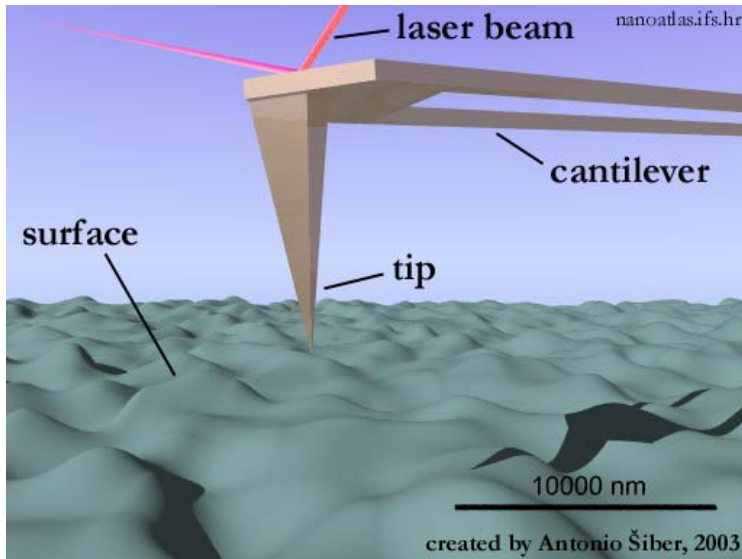


Figure 1-1. Schematic of a generalized SPM.

Σχηματική αναπαράσταση των διαφόρων ειδών μικροσκοπίας ατομικής δύναμης



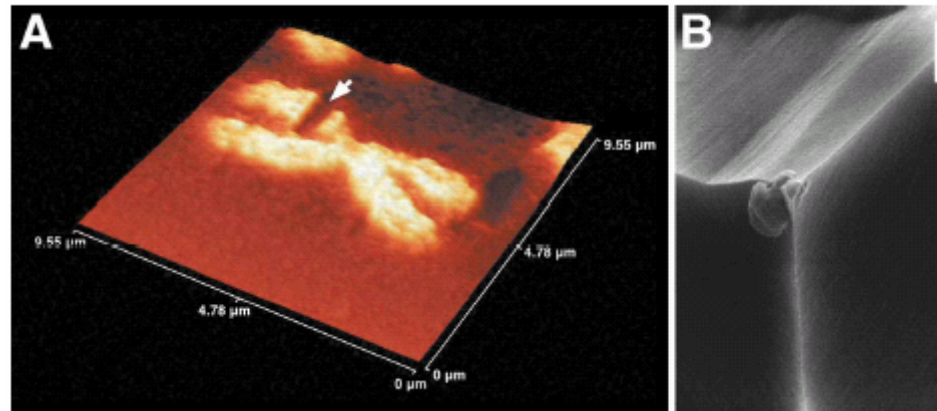


Current Opinion in Biotechnology

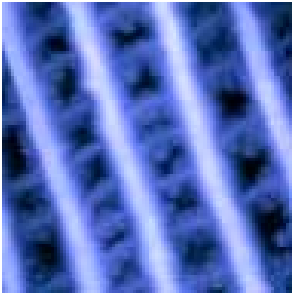
- Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης μερικών εμπορικών εφαρμογών AFM (cantilevers).
- Στην εικόνα περιλαμβάνεται και μια ανθρώπινη τρίχα διαμέτρου $\sim 100 \mu\text{m}$ για σύγκριση.
- Στο ένθετο φαίνεται μια μεγέθυνση του άκρου του εφαρμογέα που έχει ακτίνα καμπυλότητας $\sim 10 \text{ nm}$.

❖ Ένα παράδειγμα στη μικροχειρουργική χρωμοσωμάτων

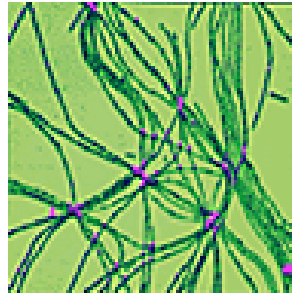
D. Fotiadis et al. / Micron 33 (2002) 385–397



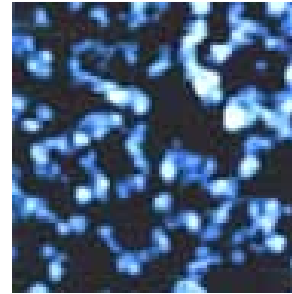
(A) AFM τοπογράφημα του ανθρώπινου χρωμοσώματος 2, ληφθέν μετά από εκτομή. Η περιοχή της εκτομής και αποκοπής του DNA σημειώνεται με ένα βέλος. Το τοπογράφημα κατεγράφη στον αέρα, με χρήση μικροσκοπίας AFM σε tapping mode. Η αποκοπή του DNA έγινε σε contact mode. Το τοπογράφημα εμφανίζεται ανάγλυφο και δείχνει μια κατακόρυφη κλίμακα λαμπρότητας περίπου 190 nm. **(B)**, Εικόνα SEM (Scanning Electron Microscopy) του στυλεού του AFM μετά την αποκοπή του DNA. Η μπάρα στο B αντιστοιχεί σε 1 μm.



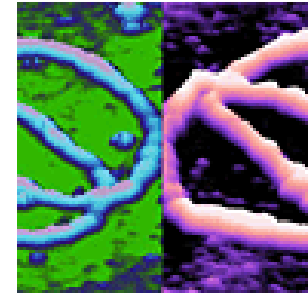
A Butterfly Wing
Imaged in
TappingMode AFM



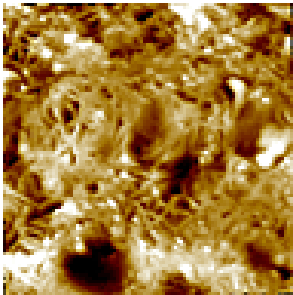
Actin Filaments



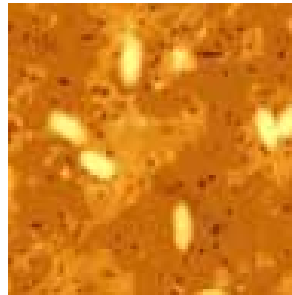
AFM Image of
Avidin Molecules
on Mica



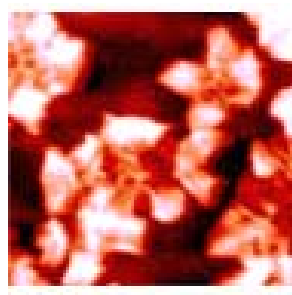
AFM images of
catenated DNA (a
"catenane")



Agarose Gel



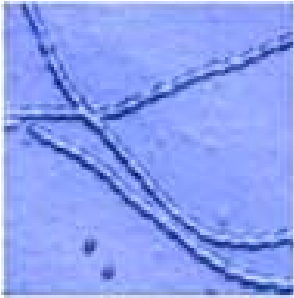
Bacteria on Filter
Membrane



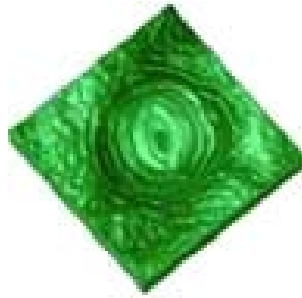
Basement
Membrane Matrix



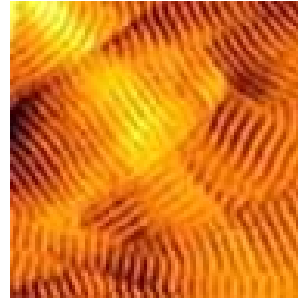
Bdellovibrio
Bacteriovorus and
Prey



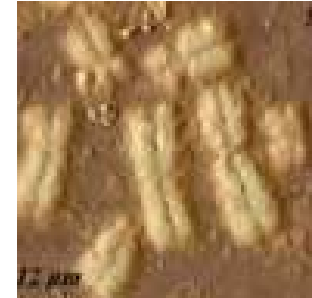
Biomolecular
Ultrastructure:
Non-Contact AFM
of F-actin



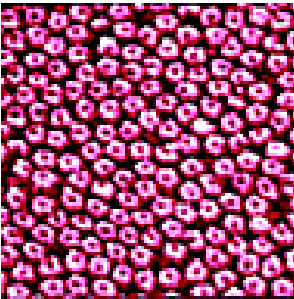
C-AFM image of a
pore or stomata
on the underside
of an ivy leaf



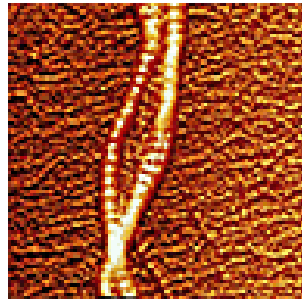
C-AFM image of
collagen fibers in
air



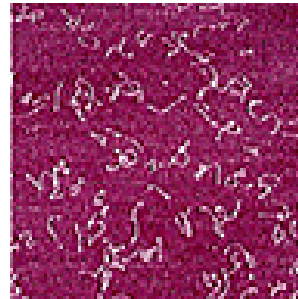
C-AFM image of
irradiated
chromosomes



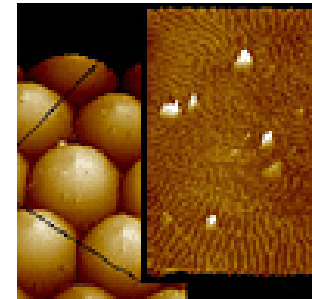
Cholera Toxin
Oligomers on Lipid
Bilayer



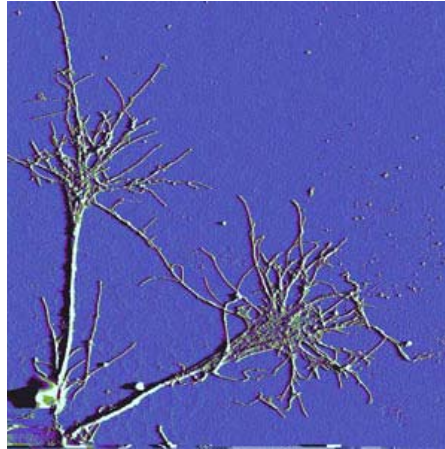
Collagen Fibers



Collagen
Molecules



Compound eye of
a housefly



FIBER STRUCTURE OF A HIPPOCAMPUS NEURON NETWORK



Field of view $15\mu\text{m} \times 15\mu\text{m}$

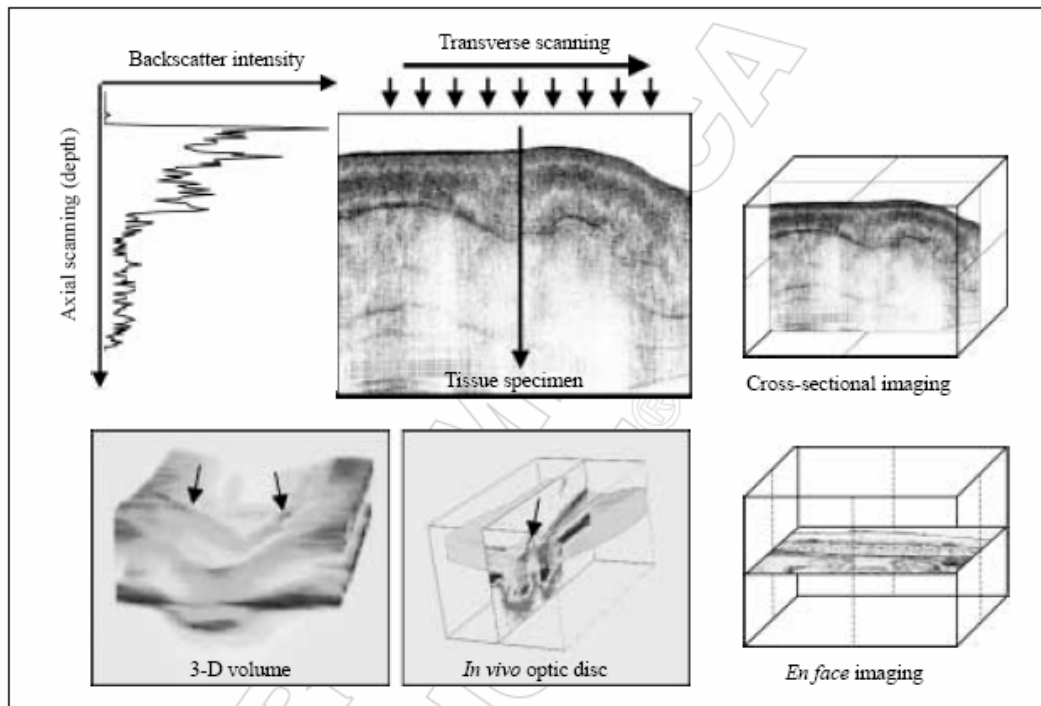
Hippocampus neurons grown 21 days in DEM media on coverslips coated by laminin at 37°C in CO_2/air (5%/95%). This sample was fixed in PBS culture with glutaraldehyde and washed with PBS. Coverslips were transferred onto the Explorer™.

Image Courtesy of Dr. Ed Monosov, The Burnham Institute, San Diego, CA

Digital Instruments MultiMode SPM retinoic acid-induced differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells (Dendrites). 100 micron scan courtesy of Hong You, University of

Οπτική Τομογραφία (Optical Coherence Tomography, OCT)

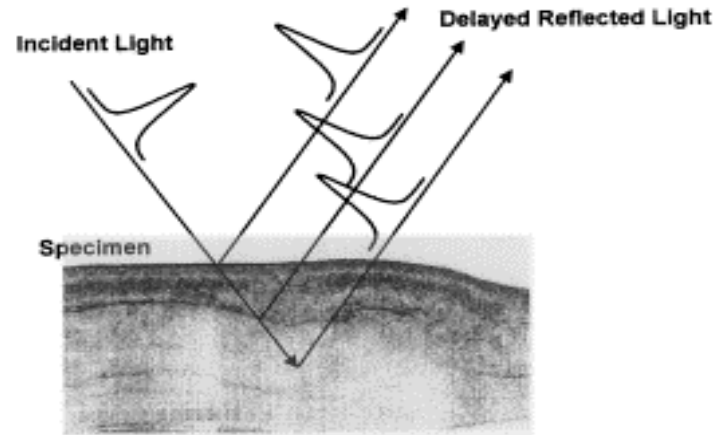
- Η οπτική τομογραφία δημιουργεί εικόνες της μικροδομής ενός ιστού σε τομές, σε συνθήκες *in vivo* και σε πραγματικό χρόνο.
- Καταγράφοντας την καθυστέρηση του χρόνου "ηχούς" του φωτός, το οποίο ανακλάται από εσωτερικές δομές του ιστού, μπορεί κανείς να δημιουργήσει τις αντίστοιχες εικόνες.
- Η τομογραφία παράγεται κατά τη σάρωση του ιστού από τη δέσμη φωτονίων και ενώ ο υπολογιστής καταγράφει τις αξονικές κατανομές ανάκλασης σε κάθε εγκάρσια θέση.
- Το αποτέλεσμα είναι μια διδιάστατη απεικόνιση της οπτικής οπισθοσκέδασης μιας διατομής του ιστού στην κλίμακα του φαιού.



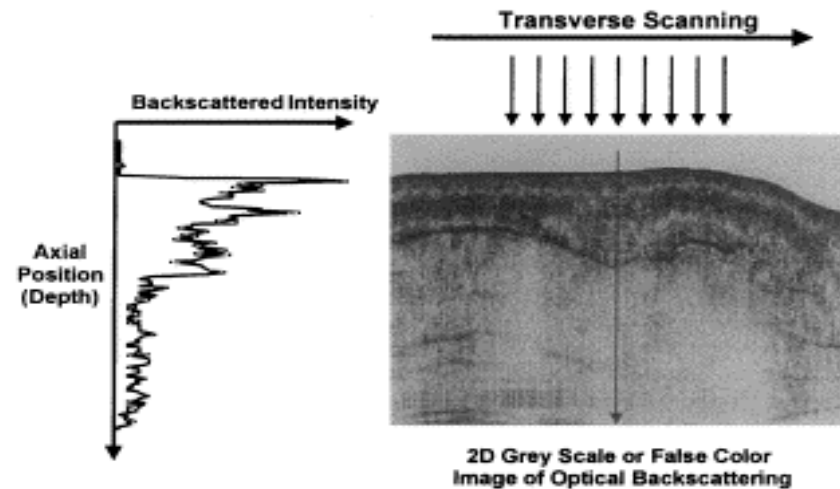
Το ελάχιστο μέγεθος δομής που μπορεί να ανιχνευτεί με οπτική τομογραφία κατά μήκος είναι περίπου όσο προβλέπει το μήκος συμφωνίας της πηγής,

$\Delta z \cong \lambda^2 / \Delta \lambda$, όπου λ είναι το μήκος κύματος και $\Delta \lambda$ το εύρος του.

•Καταγράφοντας την καθυστέρηση του χρόνου "ηχούς" του φωτός, το οποίο ανακλάται από εσωτερικές δομές του ιστού, μπορεί κανείς να δημιουργήσει τις αντίστοιχες εικόνες.



A



B



Optical Coherence Tomography

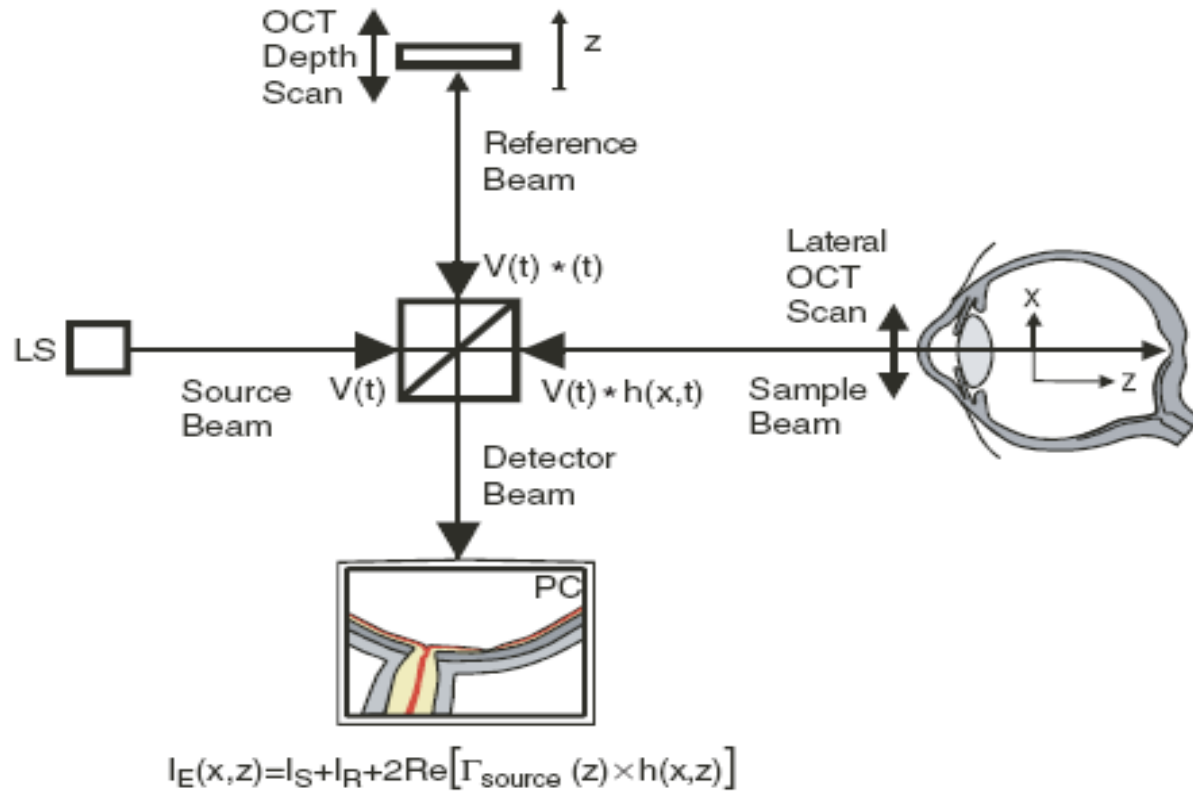


Figure 1. Standard OCT scheme based on a low time-coherence Michelson interferometer. The intensity I_E at the interferometer exit depends on the sample response $h(x, z)$ convolved with the source coherence function $\Gamma_{\text{source}}(z)$. LS = low time-coherence light source; PC = personal computer.

👉 Βασική αρχή της οπτικής τομογραφίας

Η βασική αρχή της οπτικής τομογραφίας μπορεί να αποδοθεί περιληπτικά ως εξής:

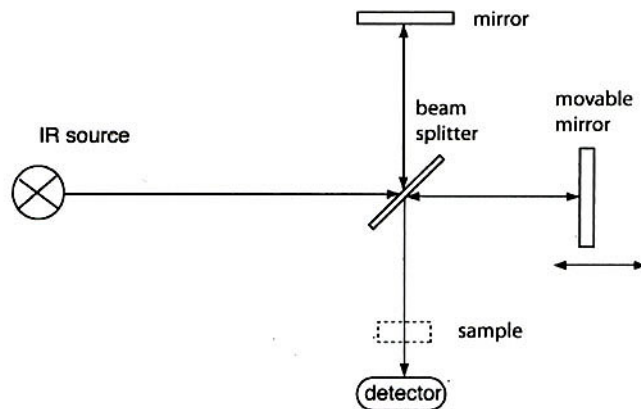
Ένας υπερβραχύς παλμός δέσμης laser κατευθύνεται σε ένα **συμβολόμετρο Michelson** και διαιρείται σε δύο μέρη. Το ένα τμήμα κατευθύνεται προς τον υπό εξέταση ιστό, το άλλο αποτελεί τη δέσμη αναφοράς. Το φως που ανακλάται άμεσα από τις διάφορες δομές του ιστού συνδυάζεται με τη δέσμη αναφοράς και συμβάλλει στον ανιχνευτή.

Η ένταση του φωτός που φθάνει στον ανιχνευτή δίνεται από τη σχέση:

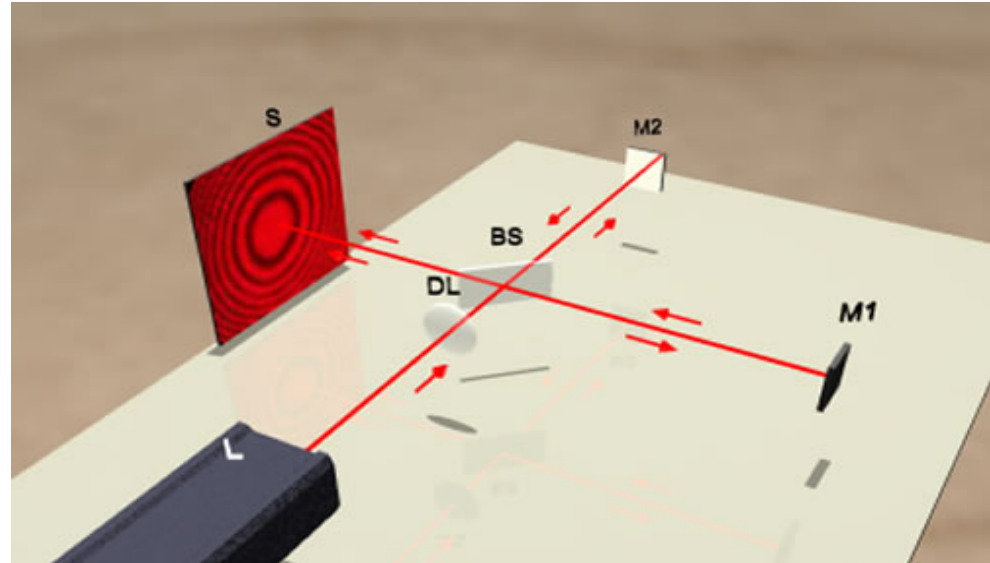
$$I_{\text{ανιχν}} = \frac{1}{4} |E_{\text{αναφ}}|^2 + \frac{1}{4} |E_{\text{ιστο}}|^2 + \frac{1}{2} \Gamma(E_{\text{αναφ}}, E_{\text{ιστο}}) \cos(2k_0 \Delta l)$$

όπου $E_{\text{αναφ}}, E_{\text{ιστο}}$ είναι τα πεδία της δέσμης αναφοράς και αυτής του ιστού-δείγματος αντίστοιχα, $\Gamma(E_{\text{αναφ}}, E_{\text{ιστο}})$ είναι η συσχέτιση (cross correlation) των πεδίων του δείγματος και της αναφοράς, $k_0 = 2\pi/\lambda_0$ είναι το κυματόνισμα και Δl είναι η σχετική διαφορά δρόμου μεταξύ των κλάδων αναφοράς και δείγματος.

Optical Coherence Tomography – Michelson Interferometer



Introduction to Biophotonics, Prasad 103



Interferometer Principles:

$$I \propto \langle E^2 \rangle = \langle (A_1 \cos(kx_1) + A_2 \cos(kx_2)) \rangle$$

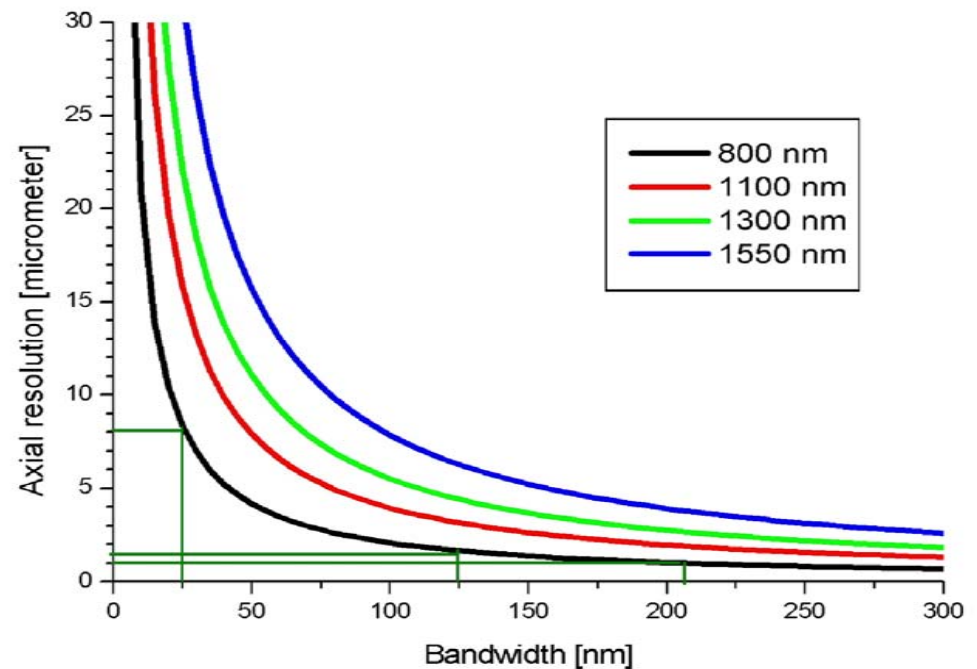
$$I = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos(k\Delta x), \text{ where}$$

$$\Delta x = n_1 x_1 - n_2 x_2$$

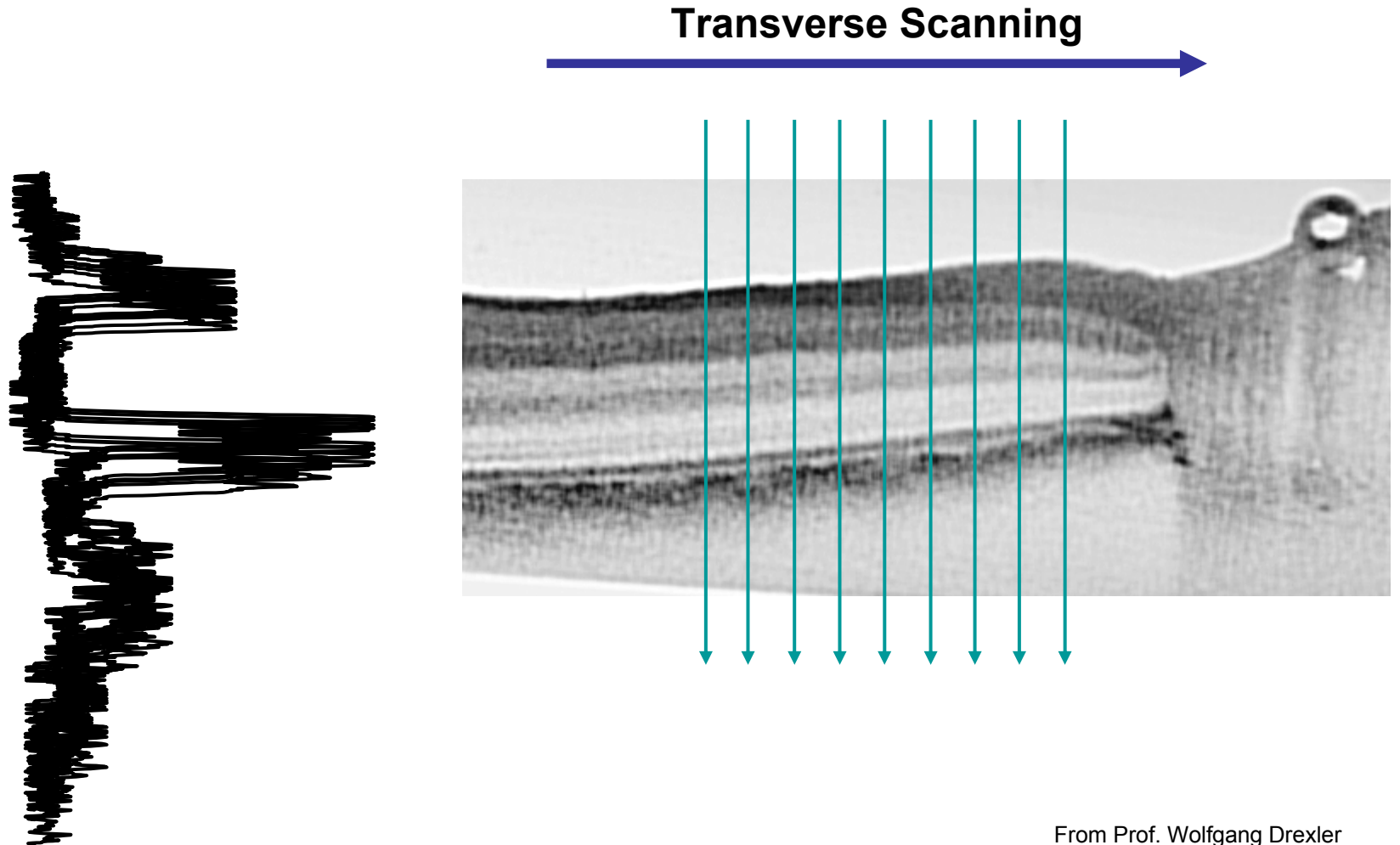
✚ Optical Coherence Tomography – Axial resolution in relation to wavelength & bandwidth

- The axial resolution is
$$l_c = \frac{2c \ln 2}{\pi} \frac{1}{\Delta \nu} = \frac{2 \ln 2}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda} \approx 0.44 \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda}$$

where $\Delta \lambda$ is the 3dB-bandwidth

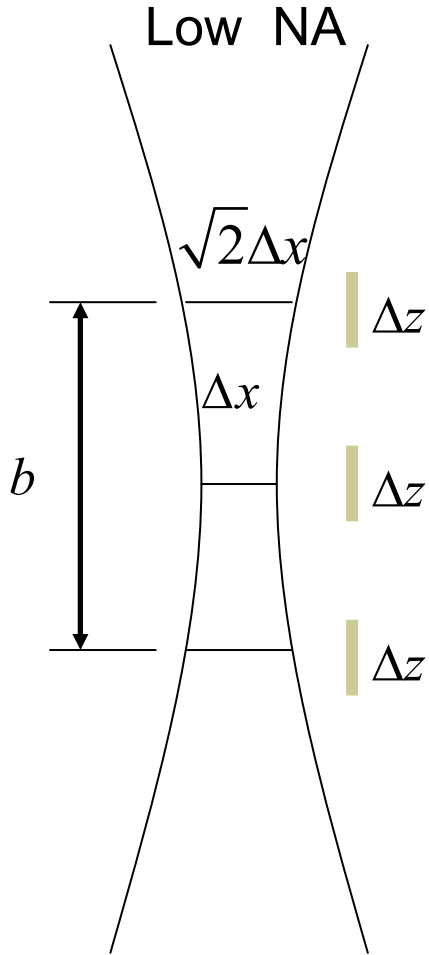


Optical Coherence Tomography – Construction of tomographic image



From Prof. Wolfgang Drexler
Medical University of Vienna, Austria

Optical Coherence Tomography – Lateral resolution

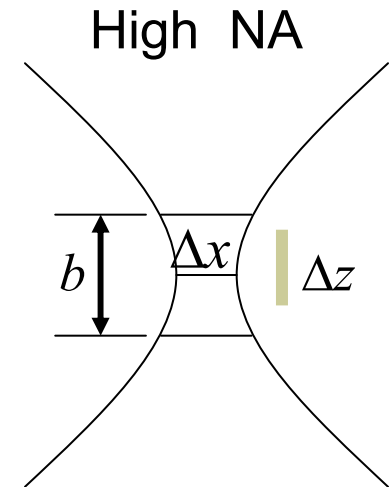


Lateral resolution

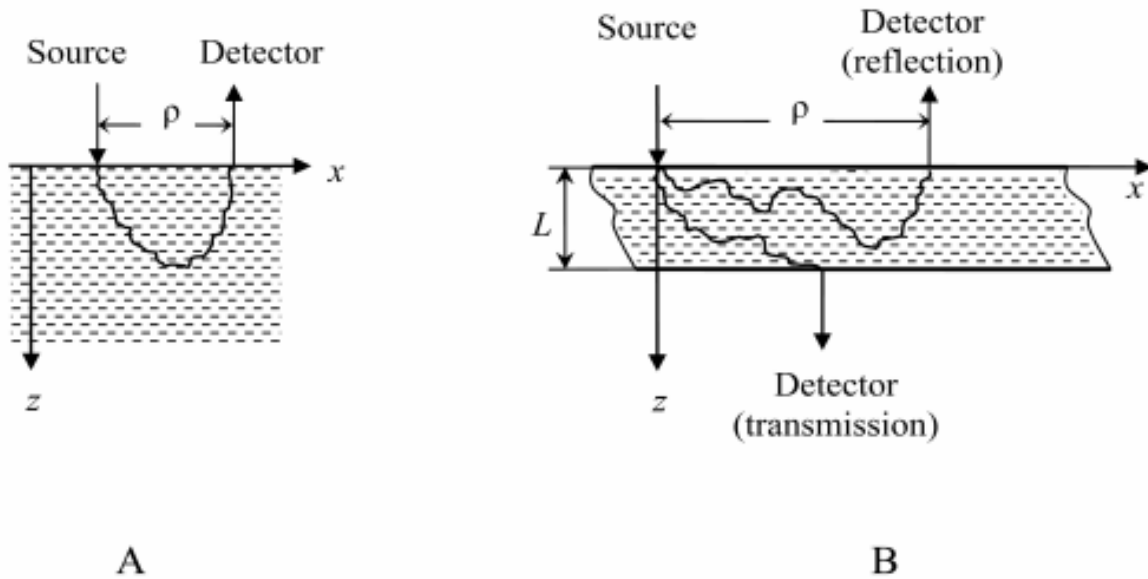
$$\Delta x = \frac{4\lambda}{\pi} \left(\frac{f}{d} \right)$$

Depth of focus

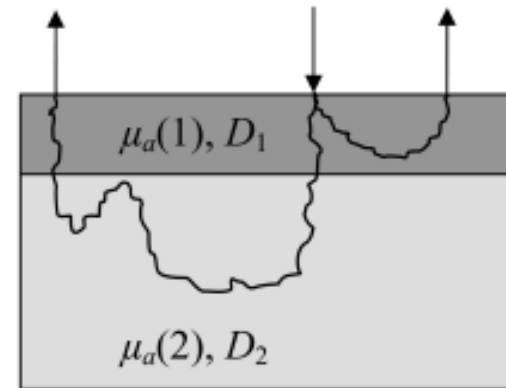
$$b = 2z_R = \pi \frac{\Delta x^2}{2\lambda}$$



Optical Coherence Tomography – Detector types



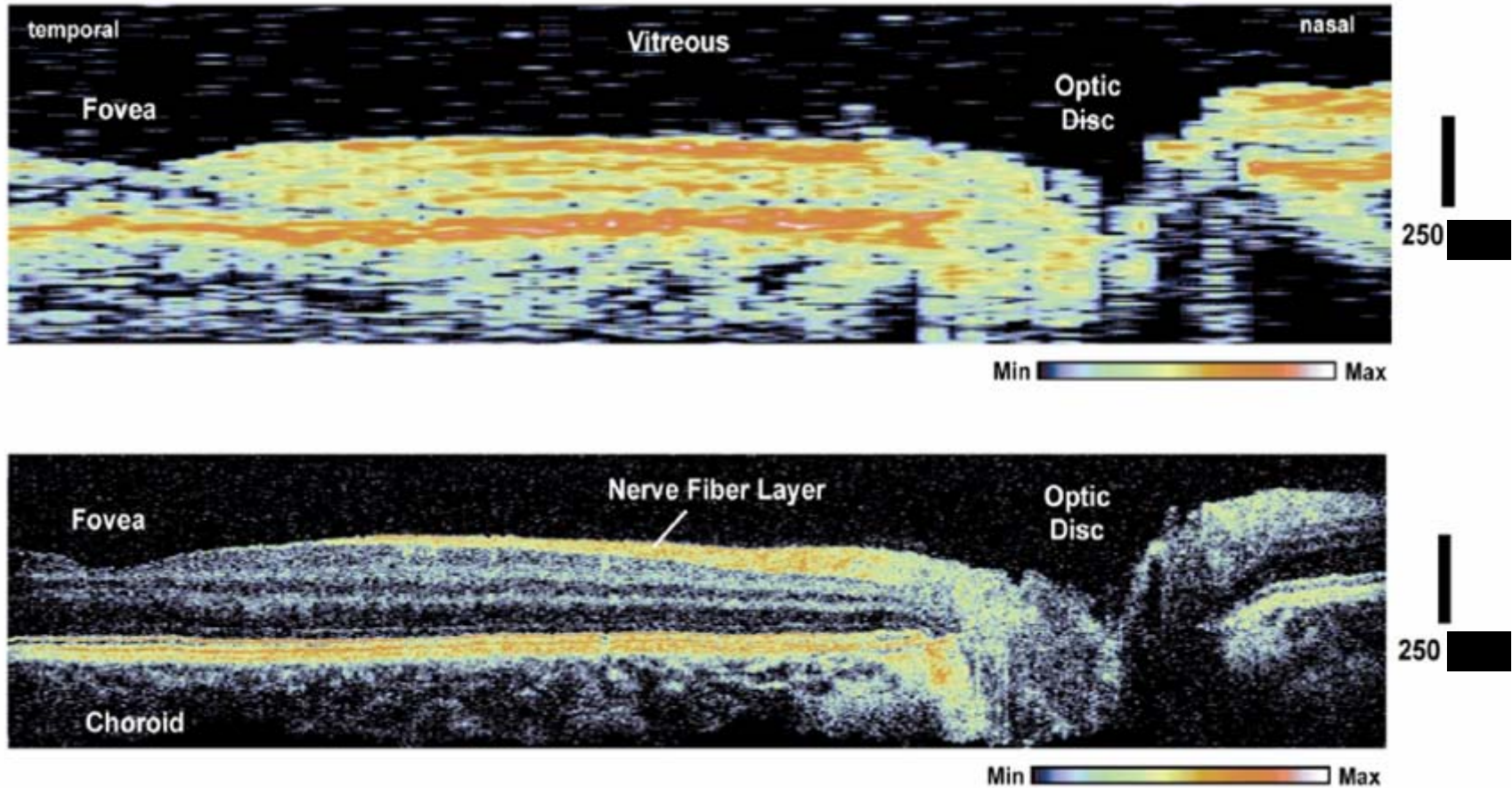
Geometric structures most often used to model the tissue. a) A semi-infinite space bounded by a flat plane. b) A slab of finite thickness and unbounded surfaces. In both cases ρ is the distance between the laser beam and the detector.



A schematic diagram of a two-layered system.



Optical Coherence Tomography – light sources



W. Drexler *et al.*, "Ultrahigh-resolution ophthalmic optical coherence tomography", *Nature Medicine* 7, 502-507 (2001)

✚ Optical Coherence Tomography – Imaging where excisional biopsy is hazardous or impossible

- An application where biopsy is not possible is **the imaging of atherosclerotic plaque morphology** in the coronary arteries.
- OCT could be powerful for diagnostic intravascular imaging as well as for **guidance of interventional procedures** such as atherectomy and stenting.

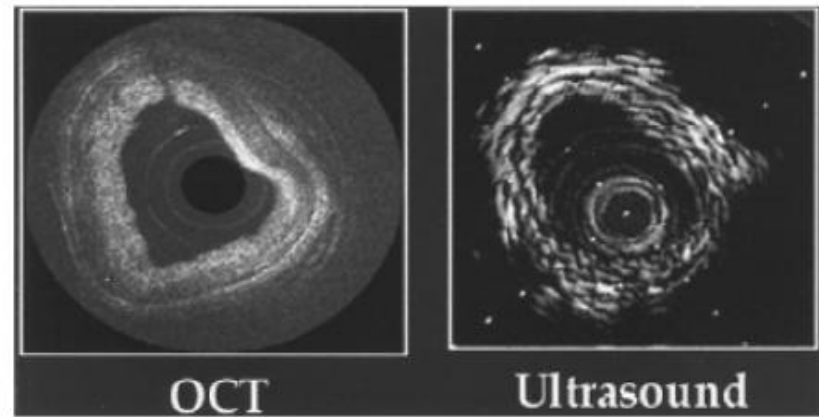
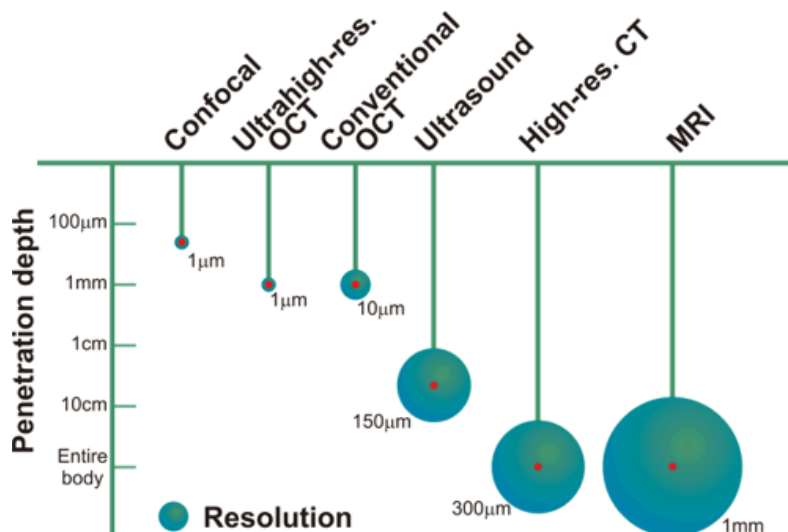


Figure 2- Comparison of OCT and High frequency Ultrasonic(30 MHz). The superior resolution of OCT is evident by the sharp delineation of arterial layer

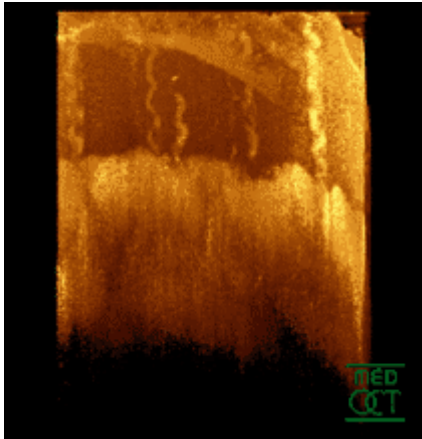


- Conventional **angiography**, **ultrasound**, or **magnetic resonance imaging (MRI)** do not have sufficient resolution to identify atherosclerotic lesions (e.g. lipid, adipose tissue, and calcified plaque) or to guide the removal of plaque by catheter-based atherectomy procedures.
- The optical scattering properties of these lesions are different and provide contrast between different structures and plaque morphologies in OCT imaging.



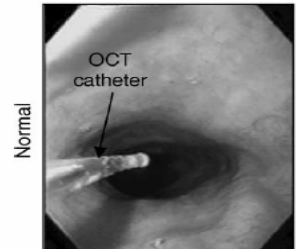
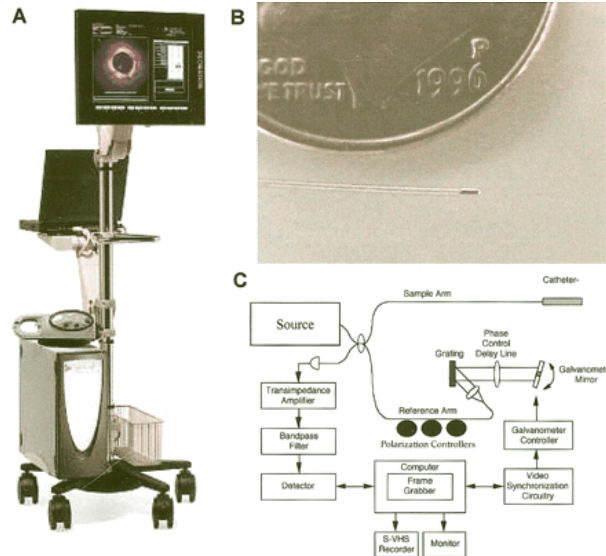
OCT in non-invasive diagnostics

- 👁️ **Ophthalmology**
 - diagnosing retinal diseases.

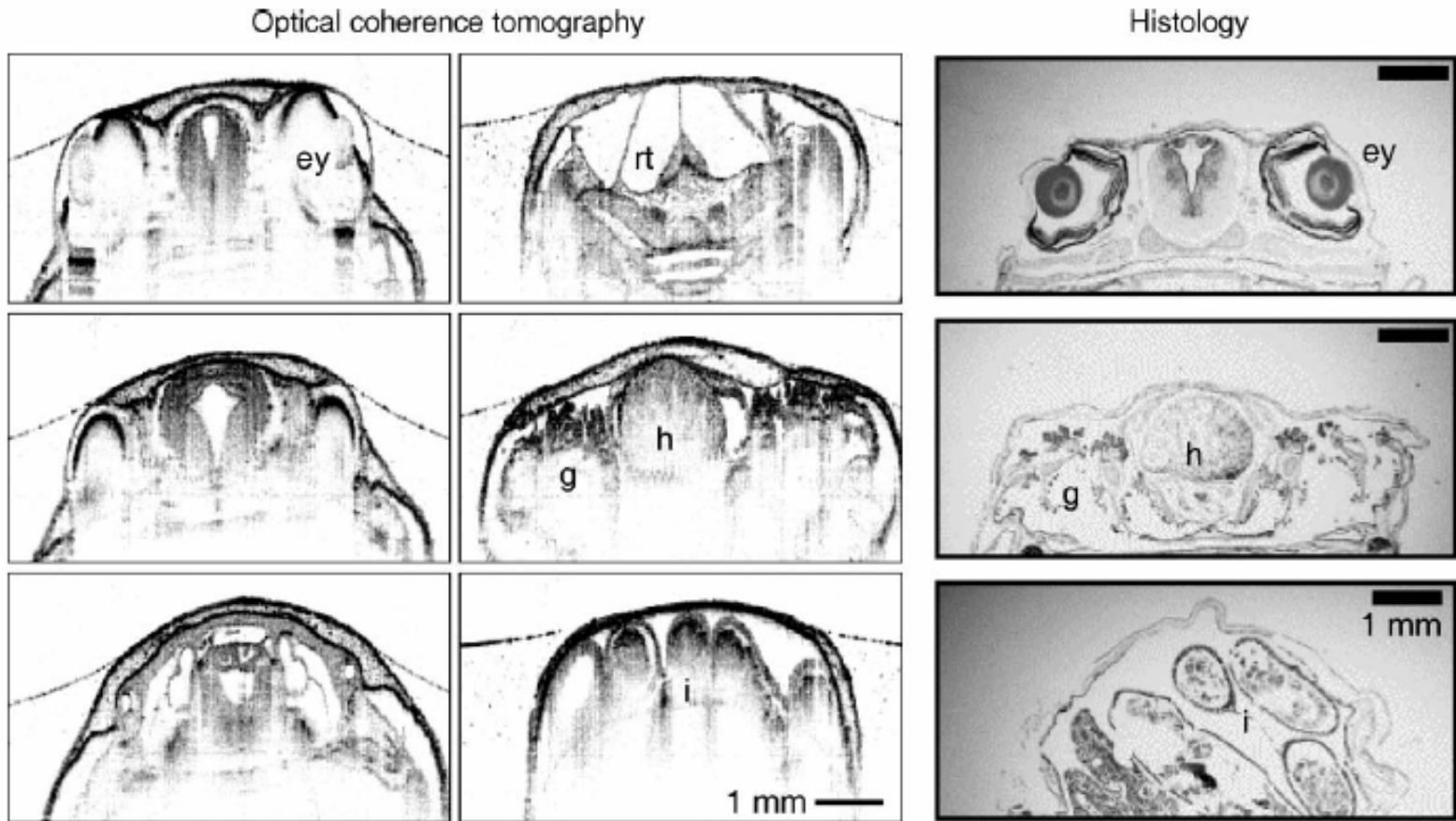


- 👉 **Dermatology**
 - skin diseases,
 - early detection of skin cancers.

- ♥️ **Cardio-vascular diseases**
 - vulnerable plaque detection.
- 🕒 **Endoscopy (fiber-optic devices)**
 - gastroenterology,
 - Guided surgery in delicate procedures



Optical Coherence Tomography – imaging



➤ OCT images and corresponding histology of a Stage 49 (12 day) *Rana pipiens* (Leopard frog) tadpole. OCT images in the left and middle columns were acquired with the OCT beam incident from the dorsal and ventral sides of the specimen, respectively.

➤ The corresponding histology in the right column illustrates strong correlations between OCT images and the actual tissue morphology. Abbreviations: ey, eye; g, gills; h, heart; i, intestines; rt, respiratory tract. (Images from Boppart SA, Brezinski ME, Bouma BE, et al. (1996) Investigation of developing embryonic morphology using optical coherence tomography. *Dev. Biol.* 177: 54–64.)

Ταχυμετρία - ροομετρία laser Doppler

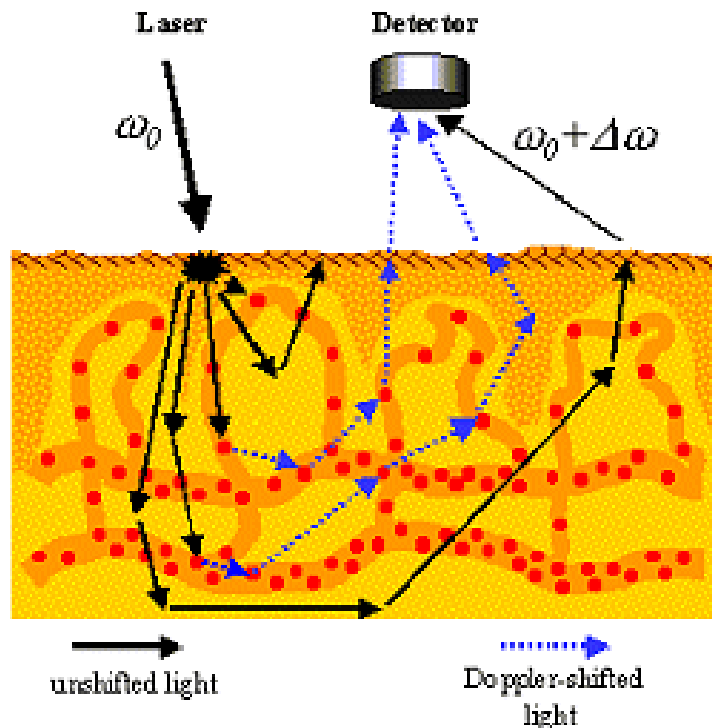
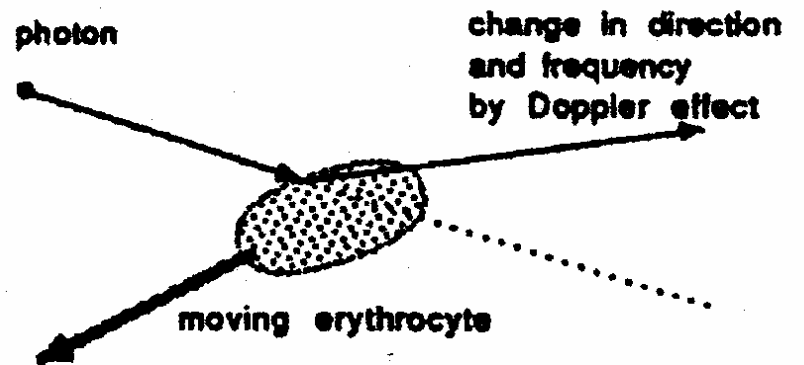
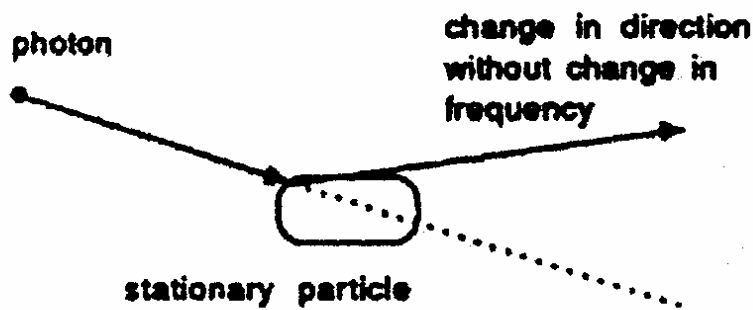
Η μικροκυκλοφορία του δέρματος επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως: ηλικία, φύλλο, φυλή, τοπογραφία δέρματος, φυσική κατάσταση, περιβάλλον, διαφορές από άτομο σε άτομο. Υπάρχουν πολλές παθολογικές καταστάσεις (π.χ. φλεβοπάθειες και έλκη των άκρων, σκληροδερμία, έκζεμα, διαβήτης, σύνδρομο Raynaud, ψωρίαση, ερυθρές κηλίδες, δερματικοί όγκοι) που έχουν επιπτώσεις στη μικροκυκλοφορία που μπορούν να διαγνωσθούν με τη ροομετρία ή ταχυμετρία Laser Doppler.

Η θεωρία της ταχυμετρίας laser Doppler βασίζεται στις παρακάτω παραδοχές:

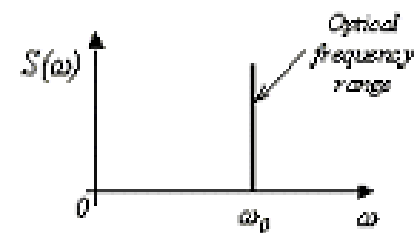
➤ Το φως laser, που προσπίπτει σε κάποιο ιστό, π.χ. σε δέρμα και τα αιμοφόρα αγγεία του, διαπερνά τον ιστό σε ένα βάθος που εξαρτάται από την συχνότητα του φωτός και τις οπτικές ιδιότητες του ιστού σε αυτήν τη συχνότητα.

➤ Το φως ανακλάται όταν προσπίπτει σε ένα κινούμενο κύτταρο αίματος στον ιστό και εμφανίζει μια αλλαγή στη συχνότητα σχετική με την ταχύτητα του κυττάρου. Με τη δειγματοληψία όλου του ανακλώμενου φωτός, μπορεί κανείς να υπολογίσει τη ροή των ερυθροκυττάρων στον όγκο του δέρματος. Το σκεδαζόμενο φως που εισέρχεται στην οπτική ανιχνευτική διάταξη περιλαμβάνει φωτόνια που έχουν υποστεί μετατόπιση Doppler, καθώς και φωτόνια που έχουν διασκορπιστεί από τις στάσιμες δομές και που έχουν μια αμετάβλητη συχνότητα.

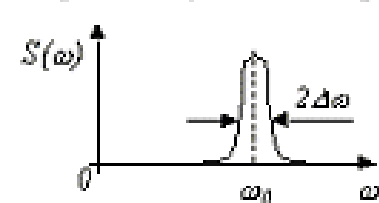
➤ Η ροή υπολογίζεται με πολλαπλασιασμό του ποσοστού του ανακλώμενου φωτός που επιστρέφει από τα κινούμενα κύτταρα του αίματος με την μέση ταχύτητα της μετακίνησης.



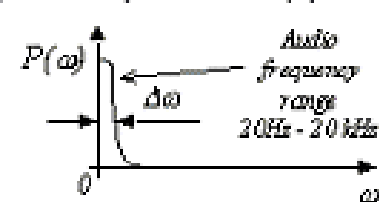
Spectrum of incident light



Spectrum of scattered light

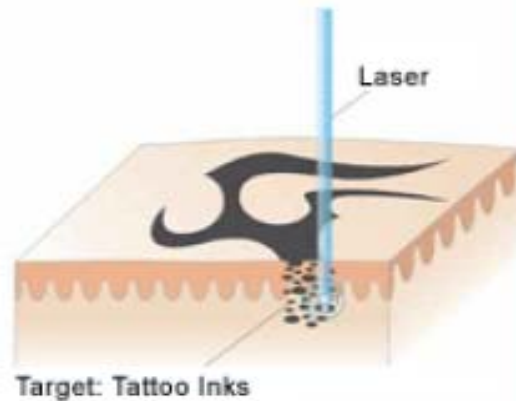


Spectrum of the intensity fluctuations



Άλλες εφαρμογές των laser στη δερματολογία

Removal of tattoos using ruby lasers



*The wavelength of ruby laser (694 nm) is specifically absorbed by the **blue and black color pigments** in the tattoo.*

***Nanosecond pulses** are absorbed only in the pigment particles without causing significant damages in the surrounding tissue.*

Before - afterwards pictures



ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. “Ιατρικά lasers: Επιστήμη και κλινική εφαρμογή”, G. Carruth and A. McKenzie, μετάφραση, σύγχρονη ενημέρωση και επιμέλεια Α.Α. Σεραφετινίδης και Μ.Ι. Μακροπούλου, Εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα, 1994.
2. P.N. Prasad. Introduction to Biophotonics. Wiley Interscience Inc., New Jersey, (2003).
3. Τα πειραματικά αποτελέσματα σε οπτική παγίδευση είναι από έρευνες που έγιναν στον τομέα Φυσικής του ΕΜΠ, στα πλαίσια διδακτορικών διατριβών (Ε-Χ. Παπαγιάκουμου, Ε. Σπυράτου) και διπλωματικών εργασιών (Δ. Περάκης).
4. Πολλά άρθρα ανασκόπησης και ιστοσελίδες.