ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΒΙΟΦΩΤΟΝΙΚΗ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ:

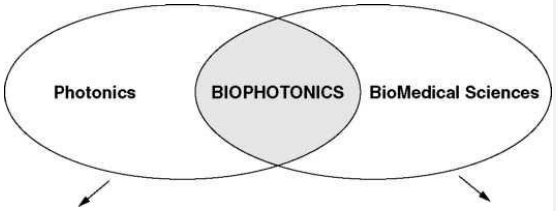
Η βιοφωτονική εξετάζει την αλληλεπίδραση ανάμεσα στο φως και την βιολογική ύλη. Είναι ένας νέος συναρπαστικός τομέας που περιλαμβάνει την "συγχώνευση" της ηλεκτρονικής-τεχνολογικής επιστήμης και την βιολογία και παράλληλα προσφέρει μεγάλη ελπίδα για μελλοντική ικανότητα έγκαιρης διάγνωσης ασθενειών και για νέες εξελίξεις στις "φωτο-καθοδηγούμενες" θεραπείες καθώς και σε θεραπείες που στηρίζονται στο φως(π.χ. φωτόνια-ακτινοβολία Χ, ακτινοθεραπείες για συρρίκνωση όγκων)

Στην ουσία σε αυτή την πτυχιακή εργασία θα προσπαθήσουμε να "κωδικοποιήσουμε" τις θεμελιώδης και βασικές εφαρμογές που περιλαμβάνουν την ενσωμάτωση του φωτός - των φωτονίων και της βιολογίας ,δηλαδή σε εφαρμογές βιοφωτονικής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 ΒΙΟΦΩΤΟΝΙΚΗ - ΕΝΑ ΝΕΟ ΠΕΔΙΟ

Αναμφίβολα ζούμε σε μία εποχή τεχνολογικών επαναστάσεων που επηρεάζουν την ζωή μας -ακόμα και τις κοινωνικές αλληλεπιδράσεις–. Η επιστήμη της βιοφωτονικής αν σχετίζεται με την αλληλεπίδραση φωτονίων και βιολογικής ύλης, χρησιμοποιεί τα φωτόνια αντί του ηλεκτρονίου για την μεταφορά και αποθήκευση πληροφοριών. Αυτό αποτελεί ένα τρομερό πλεονέκτημα σε ότι αφορά τον όγκο της αποθηκευμένης πληροφορίας και την ταχύτητα με την οποία μεταφέρεται η πληροφορία (information technology).



Η εφεύρεση των laser (Ο όρος laser προέρχεται από τα αρχικά των λέξεων Light Amplification by Stimulated Emission Radiation, που σημαίνει ενίσχυση φωτός μέσω εξαναγκασμένης εκπομπής ακτινοβολίας. Ο όρος αυτός αναφέρεται σε μια μοναδική μορφή τεχνητής ακτινοβολίας με συμπυκνωμένη δέσμη φωτός),έχει φέρει μεγάλη επανάσταση στον τομέα της φωτονικής. Από την 1η ημέρα της εφεύρεσης του laser το 1960, η ακτινοβολία των laser έχει "αγγίξει" σε όλες τις διαστάσεις τις ζωές μας, στο σπίτι, στην ψυχαγωγία, στην υψηλής χωρητικότητας αποθήκευσης πληροφοριών, στις τηλεπικοινωνίες -με χρήση οπτικών ινών και κατ αυτόν τον τρόπο οι συσκευές laser μας προσφέρουν πολλές ευκαιρίες για εφαρμογές.

Μια νέα προέκταση της φωτονικής, είναι η βιοφωτονική, η οποία περιλαμβάνει την συνέργεια της φωτονικής και της βιολογίας. Η βιοφωτονική είναι ο τομέας της επιστήμης που ασχολείται με την αλληλεπίδραση του φωτός (φωτονίων) και της βιολογικής ύλης (κύτταρο).

Η χρήση των φωτονίων στις τεχνικές οπτικής διάγνωσης και θεραπείας θα φέρει μεγάλες εξελίξεις στον τομέας της υγείας. Αυτό στην πραγματικότητα δεν προκαλεί έκπληξη αν σκεφτούμε πως στην Φύση αυτή η αλληλεπίδραση φωτονίων και ύλης,παρήγαγε την βασική μορφή ζωής στην αρχή του κόσμου! Η χρήση των φωτονίων ώστε να επιτευχθεί η φωτοσύνθεση και η μετατροπή των φωτονίων (μέσω μιας σειράς πολύπλοκων βημάτων) ώστε να δημιουργηθεί όραση, είναι από τα καλύτερα παραδείγματα ώστε να καταλάβουμε τον ρόλο της βιοφωτονικής στην πράξη.

Τα laser έχουν ήδη παίξει σημαντικό ρόλο στην γενική, πλαστική και αισθητική χειρουργική. Δύο γνωστά παραδείγματα αισθητικής χειρουργικής που συνδέονται άμεσα με τα laser είναι αυτά της α) ανάπλασης δέρματος (γνωστά ως αφαίρεση ρυτίδων) και β) της αποτρίχωσης .Επίσης η τεχνολογία των laser δίνει την δυνατότητα να χειριστούμε την εκπομπή εξαιρετικά στενών παλμών laser, γεγονός που μας δίνει ελπίδες για χρήση στην μηχανική ιστών . Συγκεκριμένα η βιοφωτονική ενδέχεται να μας δώσει την δυνατότητα να δημιουργήσουμε εμφυτεύματα του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του ομφαλού, ώστε να αποκαταστήσουμε την όραση σε κάποιον ασθενή αντιστρέφοντας την μηχανική μεθόδων που "χρησιμοποιεί" η Φύση.

1.2 ΕΥΚΑΙΡΙΕΣ ΤΟΣΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ ΟΣΟ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Η βιοφωτονική προσφέρει τρομερές ελπίδες τόσο για την έρευνα όσο και για την βιοτεχνολογική ανάπτυξη. Η βιοφωτονική στην πραγματικότητα

αποτελείται από τέσσερεις κύριους τεχνολογικούς τομείς: α) τα laser β) φωτονική-οπτική 4) νανοτεχνολογία 5) βιοτεχνολογία

Παρακάτω έχουμε μια λίστα κατηγοριοποιημένη σε αντίστοιχους επιστημονικούς τομείς, στους οποίους η ανάπτυξη της βιοφωτονικής θα προσφέρει πολλές ελπίδες για περεταίρω δυνατότητες.

ΧΗΜΕΙΑ

- ανάπτυξη νέων εφαρμογών φθορισμού
- χημικοί μέθοδοι για επίτευξη ανάλυσης και βιοαίσθησης
- χημικά για υλικά ελέγχου και νανο-συσκευών
- νέες δομές για οπτικές ενεργοποιήσεις(optical activation)

ΦΥΣΙΚΗ

- νέες διαδικασίες - φωτο-διαδικασίες στα βιο-μόρια
- νέες φυσικές αρχές για την απεικόνιση και την βιολογική αίσθηση
- μη-γραμμικές οπτικές διαδικασίες για διάγνωση και θεραπείες
-

ΜΗΧΑΝΙΚΗ

- αποδοτική βελτίωση των laser νέας γενιάς, των συστημάτων παράδοσης και ανιχνευτών
- συσκευές μικρογραφικής, αυτοματοποίησης και ρομποτικού ελέγχου
- νανο-τεχνολογίες για στοχευόμενη ανίχνευση και ενεργοποίηση
- οπτικά BioMEMS (μικρο-ηλεκτρικο-μηχανικά συστήματα) και οι ανάλογες νανοκλίμακες αναλογίας
-

ΕΡΕΥΝΑ ΒΙΟ-ΙΑΤΡΙΚΗΣ

- βιο-απεικόνιση ώστε να ελέγχουμε μοριακές ,κυτταρικές και άλλες λειτουργίες ιστών
- οπτικές λειτουργίες για την έγκαιρη διάγνωση μολυσματικών ασθενειών και καρκίνων
- δυναμικές απεικονίσεις για την φυσιολογική ανταπόκριση σε θεραπείες και φαρμακευτικές αγωγές
- τοξικότητα φωτοδυναμικών υλικών
- βιο-συμβατότητα εμφυτευμάτων

-

ΙΑΤΡΙΚΗ

- συγκόλληση, χάραξη περιγράμματος και αναγέννηση ιστού
- έλεγχος σε πραγματικό χρόνο σε χορήγηση φαρμάκων και της δράσης-επίδρασης αυτών
- μακροπρόθεσμες κλινικές μελέτες για παρενέργειες φαρμάκων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 Η ΦΥΣΗ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣ

Ο ΔΙΠΛΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΑΣ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣ

Σε αυτή την ενότητα θα παρουσιάσουμε τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά του φωτός. Το φως είναι ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα που αποτελείται από ταλαντευόμενες –ηλεκτρικές και μαγνητικές διαταραχές και μπορεί να μεταδοθεί σαν κύμα –στο κενό ή σε ένα άλλο μέσο διάδοσης. Η σύγχρονη θεωρία(κβαντική μηχανική) –προσδίδει άλλη μία περιγραφή στον χαρακτήρα του φωτός–, αυτή των ενεργειακών ή κβαντικών πακέτων που καλούνται φωτόνια. Αυτή η περιγραφή της διπλής φύσης του φωτός προσδιορίζεται από την σχέση $\nu = \frac{c}{n}$ (εξ1) όπου το σύμβολο c συμβολίζει την ταχύτητα ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, κυρίως γνωστή ως η ταχύτητα του φωτός στο κενό, το σύμβολο ν περιγράφει την ταχύτητα του φωτός. Όλα τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα ταξιδεύουν με την ίδια ταχύτητα στο κενό. Σε ένα γυαλί για παράδειγμα ή σε οποιαδήποτε βιολογική ύλη, η ταχύτητα αυτή αλλάζει και περιγράφεται με το σύμβολο ν. Ο λόγος αυτών των δύο σταθερών , ονομάζεται δείκτης διάθλασης ενός μέσου και περιγράφεται από το σύμβολο n.

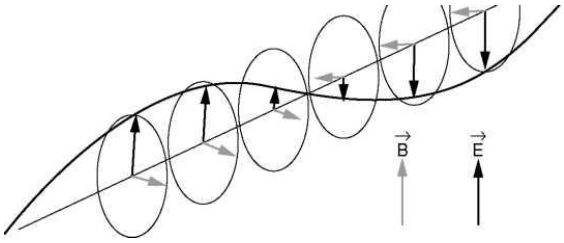
Αλλαγή κωδικού πεδίου

Ως εκ τούτου, το η μπορεί να θεωρηθεί ως η αντίσταση που προκύπτει από το μέσο προς την διάδοση του φωτός. Όσο υψηλότερος είναι ο δείκτης διάθλασης, τόσο χαμηλότερη είναι η ταχύτητα.

Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα ορίζεται από την εξάπλωση (διανομή) μιας σειράς ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων, ως συνάρτηση του μήκους κύματος τους, καθώς και τη συχνότητα, ή τον αριθμό των κυμάτων. Στο φάσμα των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων έχουμε διαφορετικές ομάδες- κατηγορίες ανάλογα με τα μήκη κύματος και χωρίζεται πχ σε ορατό φως ή σε υπεριώδης ακτινοβολία και άλλα. Ανάλογα σε ποια οπτική περιοχή βρισκόμαστε

χρησιμοποιούμε διαφορετικές μονάδες για να χαρακτηρίσουμε το κύμα. Για το ορατό φως σαν παράδειγμα συνήθως μετράμε το μήκος κύματος σε nm ενώ για άλλες περιοχές χρησιμοποιούμε μm ή

Οι περισσότερες από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φωτός και βιολογικών μορίων είναι ηλεκτρικές στη φύση. Ως εκ τούτου, η περιγραφή ενός κύματος φωτός εστιάζεται στη φύση του ταλαντευόμενου ηλεκτρικού πεδίου Ε, η οποία έχει τόσο μία κατεύθυνση όσο και ένα πλάτος (η τιμή που αντιστοιχεί σε μέγιστα και ελάχιστα του κύματος). Η κατεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου, Ε, είναι πάντα κάθετη τόσο προς την κατεύθυνση διάδοσης του κύματος όσο και στο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο Β και δηλώνει την οπτική πόλωση του κύματος. Ωστόσο, μπορεί να είναι γραμμικά πολωμένη, όταν το ηλεκτρικό πεδίο σε κάθε σημείο έχει την ίδια κατεύθυνση ταλάντωσης όπως περιγράφεται στο παρακάτω σχήμα:



Σχήμα 1 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

Μορφοποιήθηκε: Χρώμα γραμματοσειράς: Πράσινο

ενώ όταν το ηλεκτρικό πεδίο κατανέμεται εξίσου, σε ένα επίπεδο κάθετο προς την κατεύθυνση της διάδοσης, καλείται κυκλικά ή ελλειπτικά πολωμένο, όπως απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα

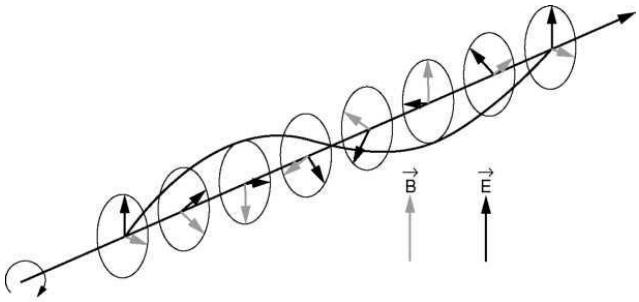


Figure 2.3. Propagation of a circularly polarized light.

Σχήμα 2 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

Η διάδοση του φωτός σε μία κατεύθυνση z , με ταλαντευόμενο ηλεκτρικό πεδίο E(z,t) ,περιγράφεται μαθηματικά από την σχέση

$E(z,t) = Eo\cos(\omega\tau - kz)$ *(εξ 2)*

Αλλαγή κωδικού πεδίου

όπου E_0 περιγράφει το ηλεκτρικό πλάτος του πεδίου, ω η συχνότητα του πεδίου σε rad/sec και όπου κ,

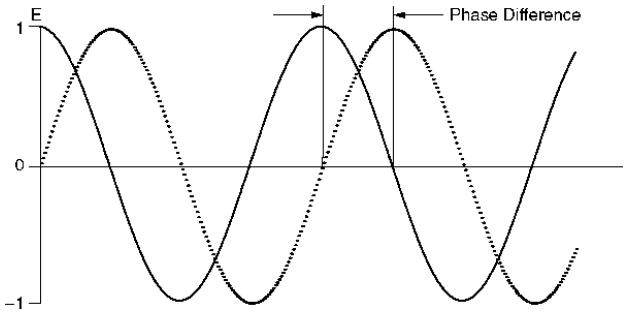
$k^2 = \frac{\varepsilon\omega^2}{c^2}$ (εξ3)

Ο όρος ω είναι η γωνιακή συχνότητα του φωτός και δίνεται από την σχέση 2πf και κ λέγεται ο φορέας διάδοσης και ορίζεται επίσης από την σχέση

$k = \frac{2\pi}{\lambda}$ (εξ4)

Αλλαγή κωδικού πεδίου

όπου χαρακτηρίζει τη φάση του οπτικού κύματος σε σχέση με ένα σημείο αναφοράς (Z = 0). Έτσι ο όρος kz περιγράφει τη σχετική μετατόπιση φάσης σε σχέση με το σημείο αναφοράς. Το παρακάτω σχήμα περιγράφει δύο κύματα με μετατόπιση φάσης



Σχήμα 3 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

Στην σχέση

$$k^2 = \frac{\varepsilon\omega^2}{c^2} \quad (\varepsilon\xi 5)$$

ο όρος ε ονομάζεται διηλεκτρική σταθερά η οποία για οπτικά κύματα ισούται με όπου n ο δείκτης διάθλασης του μέσου. Η ταχύτητα ενός οπτικού κύματος (φως) περιγράφεται από την διάδοση των κυμάτων σε ένα μέσο. Αυτή η διάδοση χαρακτηρίζεται από δύο ταχύτητες:

- την ταχύτητα φάσης, που περιγράφει την μετατόπιση της κορυφής του κύματος.
- την ταχύτητα ομάδας, που περιγράφει την διάδοση πολλών κυμάτων μαζί
-

Για ένα μέσο με δείκτη διάθλασης η, όπως περιγράφηκε ανωτέρω, η ταχύτητα φάσης ενός κύματος μας δίνεται από την σχέση $v = \frac{c}{n}$. Σε γενικές γραμμές, ένα υλικό ως οπτικό μέσο διάδοσης δείχνει μια διασπορά (αλλαγή) του δείκτη διάθλασης ως συνάρτηση του μήκους κύματος. Κανονικά σε μία αύξηση του δείκτη διάθλασης έχουμε μείωση του μήκους κύματος. Επομένως η παραπάνω σχέση προβλέπει ότι η ταχύτητα φάσης θα αυξηθεί με την αύξηση του μήκους κύματος. Με άλλα λόγια, το κόκκινο φως θα ταξιδέψει γρηγορότερα από το μπλε φως. Η ταχύτητα ομάδας ενός πακέτου των

Αλλαγή κωδικού πεδίου

κυμάτων συμπεριφέρεται παρόμοια. Αυτή η διασπορά, στην ταχύτητα ομάδας για διαφορετικά μήκη κύματος είναι γνωστή ως το φαινόμενο της διασποράς της ταχύτητας ομάδας. Έτσι ένας στενός παλμός laser που διαδίδεται σε ένα μέσο όπως για παράδειγμα σε μία οπτική ίνα–, διευρύνεται εξαιτίας του φαινομένου της διασποράς –της ταχύτητας ομάδας–, επειδή το μπλε άκρο–, στο φάσμα φωτός, του παλμού μας υστερεί στο χρόνο σε σχέση με το ερυθρό άκρο.

Η ενέργεια των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων είναι το άθροισμα των ηλεκτρικών και μαγνητικών εισφορών–. Η ένταση I ενός ηλεκτρομαγνητικού κύματος είναι η δύναμη ανά μονάδα επιφάνειας που μεταφέρεται με το κύμα και είναι ανάλογη με το τετράγωνο του πλάτους του ηλεκτρικού πεδίου

$$I(\omega) = (\mathrm{E}o)^2 \frac{cn}{8\pi} \quad \text{(εξ6)}$$

Η Συμφωνία ΤΟΥ ΦΩΤΟΣ

Η συμφωνία του φωτός προσδιορίζει τις συλλογικές κυματικές ιδιότητες των οπτικών κυμάτων που παράγονται από μια πηγή φωτός. Περιγράφει τη σχέση φάσης μεταξύ των διαφόρων κυμάτων. Εάν διατηρείται μία σταθερή σχέση φάσης, τότε η δέσμη φωτός καλείται σύμφωνη. Εάν η σχέση φάσης είναι τελείως τυχαία, τότε η πηγή φωτός ονομάζεται μη σύμφωνη.

Ωστόσο, μια πηγή μπορεί επίσης να είναι μερικώς σύμφωνη. Μια πιο αυστηρή και ποσοτική περιγραφή της συμφωνίας περιλαμβάνει την έννοια της κλίμακας του μήκους συμφωνίας που μετράει το κατά πόσο υπάρχει μια σχετική συμφωνία στην φάση.

Τα δύο χαρακτηριστικά που καθορίζουν πλήρως τις ιδιότητες της συμφωνίας του φωτός είναι η χρονική συμφωνία και η χωρική συμφωνία

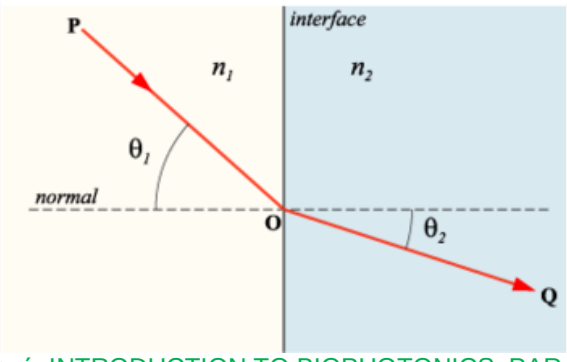
- Χρονική συμφωνία: Αν όλα τα κύματα που παράγονται από μία πηγή έχουν την ίδια συχνότητα ή βρίσκονται σε ένα πολύ στενό φάσμα συχνοτήτων, διαθέτουν χρονική συμφωνία. Το φως στη συνέχεια λέγεται μονοχρωματικό. Εάν υπάρχει μια μεγάλη εξάπλωση των συχνοτήτων (καταλήγοντας σε εξάπλωση χρώματος), το φως είναι πολυχρωματικό και δεν έχει χρονική συμφωνία.

- Χωρική συμφωνία: η συμφωνία ορίζεται από τη χωρική σχέση μεταξύ των φάσεων των διαφορετικών κυμάτων που προέρχονται από μια πηγή φωτός. Αν διατηρείται μια σταθερή σχέση φάσης μεταξύ των κυμάτων κατά την διάρκεια της διάδοσης του φωτός σε ένα μέσο τότε λέμε πως έχουμε χωρική συνοχή.

Τα δύο φαινόμενα που χρησιμοποιούν αυτές τις ιδιότητες συμφωνίας είναι η συμβολή και η διάθλαση:

- Συμβολή, έχουμε όταν δύο κύματα φωτός συμβάλουν. Εάν βρίσκονται ακριβώς στην ίδια φάση (είναι σε πλήρη συμφωνία) τότε συνδυάζονται (γίνονται ένα) και αυτό οδηγεί σε αύξηση του πλάτους και έτσι και στην αύξηση της φωτεινότητας του κύματος. Αντιστρόφως εάν τα δύο κύματα έχουν ακριβώς αντίστροφη φάση τότε τα πλάτη τους αφαιρούνται και αυτό οδηγεί σε σημαντική μείωση της φωτεινότητας
- Διάθλαση, μία σημαντική εκδήλωση της φύσης του φωτός είναι το φαινόμενο της διάθλασης. Διάθλαση μπορεί να περιγραφεί γενικά ως η φυσική τάση που έχει κάθε κύμα το οποίο δεν είναι άπειρο, να διαδίδεται στο κενό. Γενικά **Διάθλαση** ονομάζεται το φυσικό φαινόμενο της εκτροπής της ευθύγραμμης τροχιάς διάδοσης που υφίστανται φωτεινά ή άλλα κύματα όταν διέρχονται από ένα διαπερατό από αυτά μέσον σε έτερο.

Ιδιαίτερα, στην οπτική, η **διάθλαση του φωτός** χαρακτηρίζει κάθε οπτικό φαινόμενο της εκτροπής της διεύθυνσης των φωτεινών ακτίνων κατά τη μετάβασή τους από ένα διαπερατό μέσο διάδοσης με δείκτη διάθλασης n_1 σε άλλο μέσο διάδοσης με δείκτη διάθλασης $n_2 \neq n_1$. Η διαχωριστική επιφάνεια των δύο μέσων καλείται **δίοπτρο**.



Σχήμα4 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

Διάθλαση του φωτός στην επιφάνεια μεταξύ δύο μέσων διαφορετικών δεικτών διάθλασης, με $n_2 > n_1$. Η ταχύτητα είναι μικρότερη στο δεύτερο μέσο ($u_2 < u_1$), οπότε και η γωνία διάθλασης θ_2 είναι μικρότερη από τη γωνία πρόσπτωσης θ_1Σημείωση στο διάγραμμα η διακεκομμένη ευθεία, είναι η κάθετος, στην επιφάνεια πρόσπτωσης.

ΤΟ ΦΩΣ ΩΣ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑ

Η αλληλεπίδραση του φωτός με τα σωματίδια (όπως τα ηλεκτρόνια) της ύλης περιλαμβάνει την ανταλλαγή της ενέργειας, καθώς και ορμή. Αυτές οι διαδικασίες μπορούν να περιγραφούν μόνο με την παραδοχή ότι το φως συμπεριφέρεται επίσης όπως τα σωματίδια που ονομάζονται φωτόνια.

Ένα φωτόνιο για ένα φως μιας συγκεκριμένης συχνότητας f έχει μια διακριτή, σταθερή ενέργεια hf όπου -h είναι μια σταθερά (που ονομάζεται σταθερά του Planck) που έχει ένα μέγεθος από 6,63 χ 10-34 J sec–. Έτσι, η ενέργεια των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων είναι κβαντισμένες (διακριτές) και δεν είναι συνεχώς μεταβαλλόμενες. Επομένως η μικρότερη ενέργεια ενός ηλεκτρομαγνητικού κύματος είναι ίση με την ενέργεια ενός φωτονίου–. Η συνολική ενέργεια E είναι ίση με Nhf, όπου N είναι ο αριθμός των φωτονίων, με αποτέλεσμα την εξίσωση

$E = Nh\nu$ N=αριθμός φωτονίων= $\frac{E}{h\nu}$ (εξ7)

Αλλαγή κωδικού πεδίου

Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά

Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά

Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά

Η κβαντισμένη ενέργεια του φωτονίου χρησιμοποιείται στην περιγραφή της απορρόφησης της εκπομπής και της σκέδασης του φωτός από την ύλη .

Τα φωτόνια ως σωματίδια φέρουν επίσης ορμή (μια φυσική ποσότητα που περιγράφεται από το προϊόν της μάζας και την ταχύτητα του σωματιδίου). Η ορμή, p, ενός φωτονίου δίνεται ως $p = h/\lambda = h\nu/c$

Η ορμή του φωτονίου παίζει ρόλο στην αλληλεπίδραση του με την ύλη, όταν για παράδειγμα ένα φωτόνιο αλλάζει κατεύθυνση καθώς συγκρούεται με κάποιο μόριο ή καθώς διαθλάται στην επιφάνεια κάποιου μέσου. Αυτή η αλλαγή κατεύθυνσης των φωτονίων δημιουργεί μία αλλαγή στην δυναμική και δημιουργεί μια δύναμη που μπορεί να παγιδεύσει ένα μόριο. Η αρχή αυτή χρησιμοποιείται για την οπτική παγίδευση των βιολογικών κυττάρων και αποτελεί τη βάση για τη λειτουργία των οπτικών λαβίδων.

Τα χαρακτηριστικά διάδοσης του φωτός σε ορισμένα μέσα εξαρτώνται από την πόλωση του προσπίπτοντος φωτός. Οι δύο σχετικές επιδράσεις, οι οποίες δεν σχετίζονται μεταξύ τους, είναι οπτική δραστηριότητα και διπλή διάθλαση.

- **Η οπτική δραστηριότητα** συχνά σχετίζεται με ορισμένους τύπους ασύμμετρων μοριακών δομών, όπως ένα που περιέχει ένα άτομο άνθρακα ενωμένο χημικά σε τέσσερα διαφορετικά άτομα (ή ομάδες). Ένα ασύμμετρο άτομο άνθρακα συνδεδεμένο με τέσσερα διαφορετικά άτομα (ή ομάδες) καλείται ένα στροφικό κέντρο. Ένα χειρόμορφο κέντρο εμφανίζει οπτική δραστικότητα, όπως οπτική περιστροφή στην οποία το επίπεδο πόλωσης περιστρέφεται όταν ένα γραμμικά πολωμένο φως περνά μέσα από ένα μέσο που περιέχει χειρομορφικά κέντρα

- ***Η διπλοθλαστικότητα:*** Σε ισοτροπικά μέσα, όπως ένα άμορφο υλικό ή ένα υγρό, όλες οι κατευθύνσεις είναι ισοδύναμες. Με άλλα λόγια, δεν υπάρχει καμία προτιμητέα κατεύθυνση στην οποία τα μόρια ευθυγραμμίζονται. Τέτοια ισοτροπικά μέσα έχουν μόνο ένα δείκτη διάθλασης, το οποίο είναι ανεξάρτητο από την κατεύθυνση της πόλωσης του γραμμικού πολωμένου φωτός. Ως εκ τούτου, η διάδοση του φωτός είναι ανεξάρτητη από την κατεύθυνση στο μέσο. Τα ανισότροπα μέσα είναι τα σώματα στα οποία το φως διαδίδεται με διαφορετική ταχύτητα προς διαφορετικές κατευθύνσεις.

  Τα μη ισοτροπικά υλικά έχουν περισσότερους του ενός δείκτες διάθλασης που εξαρτώνται από τη διεύθυνση διάδοσης του φωτός.

  Τα μη ισοτροπικά είναι τα ορυκτά του τριγωνικού, τετραγωνικού, εξαγωνικού, ρομβικού, μονοκλινούς και τρικλινούσσυστήματος. Τα μη ισοτροπικά ορυκτά με πολωτή και αναλυτή (Nicols X) εμφανίζουν τετράκις κατάσβεση και έγχρωμη πόλωση.

  Η ιδιότητα αυτή οφείλεται στο φαινόμενο της διπλοθλαστικότητας.

  Διπλοθλαστικότητα είναι το φαινόμενο, κατά το οποίο το φως διερχόμενο από ένα μη ισοτροπικό ορυκτό χωρίζεται σε δύο ακτίνες, οι οποίες έχουν ίδια διεύθυνση διάδοσης αλλά διαφορετικές ταχύτητες (επομένως διαφορετικούς δ.δ.). Οι δύο ακτίνες είναι ευθύγραμμα πολωμένες και τα επίπεδα πόλωσης τους είναι κάθετα μεταξύ τους.

2.2 ΚΒΑΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΥΛΗΣ

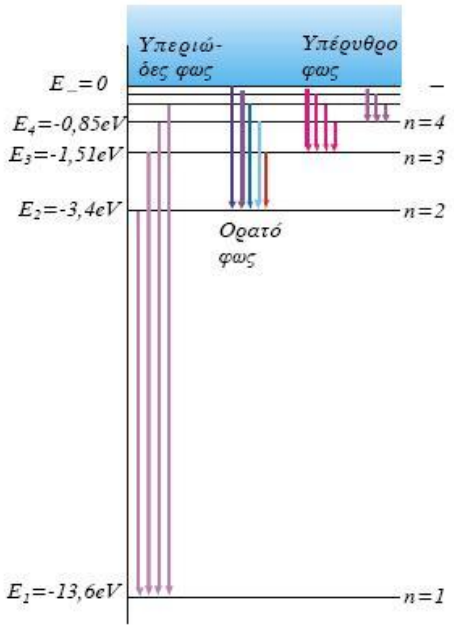
Κατά τον περασμένο αιώνα υπήρξε μια σημαντική εξέλιξη στην κατανόηση της δομής της ύλης. Αυτή η σημαντική ανακάλυψη, η οποία ήταν το αποκορύφωμα των αποτελεσμάτων πολλών πρωτοποριακών πειραμάτων

,ξεκίνησε στις αρχές του 20ου αιώνα και –περιλαμβάνει τις ακόλουθες επαναστατικές ιδέες:

- Ένα άτομο που εθεωρείτο αδιαίρετο–, τελικώς αποδείχτηκε πως έχει περεταίρω δομή που αποτελείται από ηλεκτρόνια που περιβάλλουν τον πυρήνα του-.
- -Η εσωτερική ενέργεια της ύλης βρέθηκε να παίρνει διακριτές τιμές η αλλιώς -κβαντισμένη ποσότητα.
- Το φως έχει διπλή φύση, αυτή του κύματος και του σωματιδίου
- –Ο Heisenberg έδειξε ότι ήταν αδύνατο να μετρηθεί με πλήρη ακρίβεια τόσο η θέση και η ταχύτητα ενός ηλεκτρονίου. Επομένως μια πιθανολογική προσέγγιση της συμπεριφοράς του ηλεκτρονίου ήταν αναγκαία-.

Η πιθανολογική περιγραφή χρησιμοποιεί την έννοια ενός κύματος που σχετίζεται με ένα σωματίδιο, το οποίο οδηγεί σε κβάντωση των διακριτών μόνον επιτρεπόμενων ενεργειακών σταθμών -της ύλης.

Οι επιτρεπόμενες τιμές της ενέργειας του υδρογόνου και κάθε ατόμου ονομάζονται ενεργειακές στάθμες. Οι αντίστοιχες καταστάσεις του ατόμου ονομάζονται ενεργειακές καταστάσεις. Η κατάσταση με τη χαμηλότερη ενέργεια E_1 ονομάζεται θεμελιώδης κατάσταση. Όλες οι άλλες ενεργειακές καταστάσεις E_2, E_3,... ονομάζονται διεγερμένες καταστάσεις**.**



Σχήμα 5 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

Κβαντικές καταστάσεις Μορίων: Διαχωρισμός Μοριακών ενεργειών

Επειδή ένα μόριο περιέχει περισσότερους –από ένα πυρήνα, αυτό αντιπροσωπεύει ένα άλλο επίπεδο πολυπλοκότητας αφού δεν μπορεί κανείς να επιλέξει απλώς την προέλευση των ηλεκτρονικών μετατοπίσεων (λόγω ηλεκτρονική κίνησης) σε σχέση με ένα μόνο πυρήνα. Η εξίσωση του Schrodinger περιλαμβάνει τόσο τις ηλεκτρονικές και πυρηνικές κινήσεις, καθώς και τις πιθανές ενέργειες που προέρχονται από την ηλεκτρονίου-ηλεκτρονίου απώθηση-, ηλεκτρονίου-πυρήνα έλξη, και πυρήνα-πυρήνα απώθηση-.

Ένωση Οργανικών Μορίων

Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον από τη σκοπιά της βιοφωτονικής είναι η συγκόλληση και οι ενεργειακές καταστάσεις που αφορούν άτομα άνθρακα, τα οποία αποτελούν επίσης το αντικείμενο της οργανικής χημείας. Ένα χαρακτηριστικό του άνθρακα είναι η ικανότητα του να

σχηματίζει μονούς ή και πολλαπλούς δεσμούς .– Ίσως φύση έχει επιλέξει τον άνθρακα ως βάση της ζωής στη γη, λόγω αυτής της ποικιλομορφίας στην χημεία του–. Ένα άτομο άνθρακα μπορεί να περιλαμβάνει και τις τέσσερεις τροχιές (μοριακές) -2s, 2px, $2p_Y$, $2p_Z$ στο σχηματισμό δεσμών. Μία ειδική κατηγορία των οργανικών ενώσεων, η οποία περιλαμβάνει εναλλάξ –μονούς και –πολλαπλούς δεσμούς μεταξύ των αλυσίδων των ατόμων άνθρακα, ονομάζονται π συζευγμένα μόρια. Το μήκος της αλυσίδας του άνθρακα καθορίζει το μήκος σύζευξης, παρέχοντας ένα δομικό πλαίσιο πάνω από το οποίο τα ηλεκτρόνια π μπορούν να εξαπλωθούν (μετατοπισμένα).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Ακόμα και σε βασικό κυτταρικό επίπεδο οι οργανισμοί εμφανίζουν μία μεγάλη γκάμα μεγεθών ,ξεκινώντας από τους ιούς που έχουν μέγεθος από 20 έως 200 nm και σε ευκαρυωτικά κύτταρα που έχουν μέγεθος 10 έως 100 μm.

Οι ιοί είναι οργανισμοί που αποτελούνται από νουκλεϊκά οξέα και δεν έχουν την δυνατότητα της αυτόνομης αναπαραγωγής. Αντίθετα τα κύτταρα στους ζωικούς οργανισμούς είναι ευκαρυωτικα κύτταρα. Στην ίδια κατηγορία συμπεριλαμβάνονται και οι μύκητες και τα βακτήρια, τα οποία έχουν την δυνατότητα να αναπαράγονται αυτόνομα. Επίσης υπάρχει μια κατηγορία ευκαρυωτικών κυττάρων, τα οποία τα συναντάμε σε φυτά, στα οποία το κυτταρικό τους τοίχωμα αποτελείται από κυτταρίνη . Αυτό το χαρακτηριστικό δεν εμφανίζεται στα ευκαρυωτικά κύτταρα που αποτελούν όμως έναν ζωικό οργανισμό. Ένα επιπλέον σημαντικό χαρακτηριστικό των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι η δυνατότητα τους να διαφοροποιούνται και να παράγουν μία ποικιλία διαφορετικών κυττάρων . Οι ζωντανοί οργανισμοί έχουν την δυνατότητα να πραγματώνουν μία ποικιλία λειτουργιών όπως

- να παράγουν και να μεταμορφώνουν ενέργεια από το περιβάλλον τους
- να παράγουν μηχανικό έργο (π.χ. μέσω των μυών)
- να αυτό-αναπαράγονται και να αναπαράγονται
- να επικοινωνούν τα κύτταρα μεταξύ τους
- και να δημιουργούν άμυνες εναντίων ασθενειών ή διαδικασίες αυτό-επιδιόρθωσης
-

3.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΟΜΗ

Τα βιολογικά συστήματα αποτελούνται από μόρια και τα κυρίαρχα συστατικά τους είναι το νερό, αμινοξέα, υδατάνθρακες, λιπαρά οξέα και το υπόλοιπο της κυτταρικής μάζας αποτελείται από μακρομόρια ή βιοπολυμερή—. Αυτά τα μακρομόρια οργανώνουν την μορφή των κυττάρων και ρυθμίζουν την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης–. Στα προκαρυωτικά κύτταρα υπάρχει μικρή εσωτερική οργάνωση, χωρίς καθορισμένη μορφή πυρήνα-, ενώ στα

ευκαρυωτικά κύτταρα έχουμε ενδοκυττάρια οργάνωση και ξεχωριστά διαχωρισμένο –πυρήνα. Η μικρότερη οργανωμένη κυτταρική ζωή είναι ο ιός–. Εικάζεται πως οι ζωντανοί οργανισμοί έχουν προκύψει από προβιοτικές συνθήκες και συγκεκριμένα κατα την διάρκεια βίαιων ηλεκτρικών εκκενώσεων σε θερμαινόμενη ατμόσφαιρα που περιείχε μεθάνιο, διοξείδιο του άνθρακα , αμμωνία και υδρογόνο. Έτσι δημιουργήθηκαν τα πρώτα βασικά κυτταρικά συστατικά όπως οι πρωτογενής πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα .Επίσης σύμφωνα με την θεωρία του Δαρβίνου οι οργανισμοί ποικίλουν τυχαία αλλά μόνο οι πιο ισχυροί μπορούν να επιβιώνουν. Οι πρόσφατες εξελίξεις στην επιστήμη έχουν δείξει ότι η αλληλουχία στα νουκλεϊκά οξέα είναι διαφορετική μεταξύ των οργανισμών και η διαφοροποίηση αυτή οφείλεται σε αυτή την διαφορετική αλληλουχία των νουκλεϊκών οξέων-. Τα βασικά κυτταρικά συστατικά είναι

- η κυτταρική μεμβράνη-, όπου αποτελείται από μία στιβάδα φωσφολιπιδίων ,τα οποία διαμορφώνονται στον χώρο τυχαία δημιουργώντας μια μικροστιβάδα που η μία άκρη της είναι υδρόφιλη και η άλλη υδρόφοβη. Σε αυτή την μεμβράνη περιλαμβάνονται και άλλα μόρια όπως πρωτεΐνες, ένζυμα και διάφοροι άλλοι υποδοχείς , τα οποία όλα αυτά μαζί επηρεάζουν και συνθέτουν την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, όσο αφορά σε θρεπτικά συστατικά σε νερό ιόντα και άλλα .
- το κυτταρόπλασμα, το οποίο αποτελεί το εσωτερικό του κυττάρου και περιλαμβάνει μέσα του όλα τα ενδοκυττάρια συστατικά με εξαίρεση τον πυρήνα-. Αποτελείται από διάφορα συστατικά τα οποία κυρίως είναι άλατα, υδατάνθρακες , λιπίδια βιταμίνες και άλλα -Ο ρόλος του κυτταροπλάσματος είναι να παρέχει μία ενδοκυτταρική σταθερότητα και επίσης παίζει ρόλο στην κίνηση του κυττάρου .

- ο κυτταροσκελετός ,ο οποίος στα ζωικά κύτταρα ,κυρίως οργανώνεται γύρω από τον πυρήνα και έχει την δυνατότητα να παρέχει το σχήμα του κυττάρου ,να δίνει μηχανική στήριξη στο κύτταρο και παίζει ρόλο στο μυϊκό "στήσιμο" σε έναν οργανισμό
- ο πυρήνας, ο οποίος είναι το μεγαλύτερο κυτταρικό οργανίδιο και έχει συνήθως διάμετρο 4 με 10 mm και είναι σφαιρικός και περιέχει το DNA το οποίο διανέμεται σε δομές που ονομάζονται χρωμοσώματα τα οποία αποτελούν την ταυτότητα του κάθε οργανισμού .
- τα μιτοχόνδρια, τα οποία είναι μεγάλα κυτταρικά οργανίδια ,συνήθως σφαιρικού σχήματος ,τα οποία είναι πλούσια σε ένζυμα και λειτουργούν ως "μηχανή" του κυττάρου
- ενδοπλασματικό δίκτυο , στο οποίο ένα πολύ σημαντικό συστατικό είναι τα ριβοσώματα ,τα οποία παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην σύνθεση πρωτεϊνών μέσω της ανάγνωσης του αντίστοιχου RNA
- Το σύστημα golgi , το οποίο αποτελείται από κυστίδια ,του οποίου ο ρόλος είναι να τροποποιεί και να "πακετάρει" πρωτεΐνες οι οποίες πρόκειται να εκκριθούν ή να μεταφερθούν σε άλλα κυτταρικά οργανίδια
- τα λυσοσώματα ,τα οποία είναι μικρές σφαίρες ,που περιέχουν υδρολυτικά ένζυμα
- και οι χλωροπλάστες (υπάρχουν μόνο σε φυτικά κύτταρα) , οι οποίοι περιέχουν χρωστικές ,που ονομάζονται χλωροφύλλες και παίζουν σημαντικό ρόλο στην φωτοσύνθεση .

3.3 ΔΙΑΦΟΡΟΙ ΤΥΠΟΙ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Το ανθρώπινο σώμα αποτελείται από πάνω από 200 τύπους διαφορετικών κυττάρων ,μερικά παραδείγματα εκ των οποίων είναι τα επιθηλιακά κύτταρα τα οποία αποτελούν το εσωτερικό των επιφανειών του σώματος και επιτελούν διάφορες λειτουργίες όπως έκκριση ορμονών ή την προστασία των ιστών απο διάφορους μολυσματικούς παράγοντες .Ένα άλλο παράδειγμα κυττάρων είναι τα κύτταρα του αίματος τα οποία χωρίζονται σε τρείς διαφορετικές κατηγορίες τα ερυθροκύτταρα τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια.

Τα ερυθροκύτταρα έχουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην μεταφορά του διοξειδίου του άνθρακα και του οξυγόνου από και προς τους ιστούς μέσω της αιμοσφαιρίνης .

Τα λευκά αιμοσφαίρια παίζουν ρόλο στις αμυντικές λειτουργίες του οργανισμού ενάντια σε μολύνσεις. Τα λευκά αιμοσφαίρια χωρίζονται σε υπό- κατηγορίες κυττάρων ,τα λεμφοκύτταρα ,τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα .

Τα αιμοπετάλια έχουν 2-5 mm διάμετρο και παίζουνε σημαντικό ρόλο στην πήξη του αίματος .

Μια άλλη κατηγορία κυττάρων είναι τα μυϊκά κύτταρα τα οποία αποτελούν τους σκελετικούς μυς και παίζουν ρόλο στις κινήσεις των αρθρώσεων ,στις κινήσεις και τον συντονισμό των καρδιακών μυών που προκαλούν τον παλμό της καρδιάς .

Μια άλλη σημαντική κατηγορία κυττάρων του ανθρώπινου σώματος είναι τα νευρικά κύτταρα τα οποία έχουν πολύ εξειδικευμένη λειτουργία ,κατα την επικοινωνία μεταξύ τους και μεταξύ άλλων κυττάρων και αποτελούν πολύ σημαντικό μέρος του εγκεφάλου και της σπονδυλικής στήλης .

Μια άλλη κατηγορία κυττάρων είναι τα βλαστοκύτταρα τα οποία είναι κύτταρα τα οποία δεν έχουν ακόμα αποκτήσει συγκεκριμένη λειτουργία ,δηλαδή δεν έχουν ακόμα διαφοροποιηθεί και έχουν την δυνατότητα ,αν βρεθούν στο κατάλληλο περιβάλλον να γίνουν οποιοσδήποτε τύπος κυττάρου ,που θα αποτελέσει στην συνέχεια ένα μέλος του ανθρώπινου σώματος .Τελευταίες έρευνες έχουν δείξει ότι μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τα βλαστοκύτταρα για την θεραπεία ασθενειών ή σε περιπτώσεις που θέλουμε να επιδιορθώσουμε ιστούς .

3.4 ΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΜΙΚΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ

Αυτή η ενότητα περιλαμβάνει τα χημικά συστατικά που αποτελούν τα οργανίδια που συνθέτουν ένα κύτταρο .Τα κύρια συστατικά αυτά είναι

1. τα νουκλεϊκα οξέα
2. πρωτεΐνες
3. σάκχαρα

4. λιπίδια

Τα νουκλεϊκα οξέα χωρίζονται σε δύο μορφές κατηγορίες-, τα δεοξυριβονουκλεϊκά οξέα και τα ριβονουκλεϊκά οξέα .Και οι δύο μορφές αποτελούνται από τρία βασικά χαρακτηριστικά i) έναν –δακτύλιο ο οποίος περιλαμβάνει άζωτο ii) σάκχαρο το οποίο είναι δεοξυριβόζη για το DNA η ριβόζη για το RNA και iii) φωσφορική ομάδα .

Οι τέσσερεις βάσεις που αποτελούν το DNA είναι η αδενίνη ,γουανίνη ,θυμίνη και κυτοσίνη . Η αλληλουχία αυτών των τεσσάρων βάσεων κωδικοποιεί κάποια συγκεκριμένη πληροφορία .Ο πολυμερισμός των νουκλεοτιδίων οδηγεί σε δημιουργία νουκλεικων οξέων ,τα οποία έχουν συγκεκριμένη διάταξη στον χώρο .

Η χημική δομή του DNA είναι παρόμοια με αυτή του RNA με την διαφορά οτι τα σάκχαρα στο RNA έχουν ακόμια μία επιπλέον ομάδα υδροξυλίου και επίσης η θυμίνη που υπάρχει στο DNA αντικαθίσταται στο RNA από την ουρακίλη .

Δεύτερη κατηγορία χημικών συστατικών που αποτελούν τα κύτταρα είναι οι πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούνται από αμινοξέα τα οποία έχουν συνδεθεί μεταξύ τους .Υπάρχουν 20 βασικά αμινοξέα τα οποία αναλόγως πως θα ενωθούν μεταξύ τους οδηγούν σε μία τεράστια ποικιλία πρωτεϊνών οι οποίες έχουν πολύ διαφορετικές λειτουργίες .

Τρίτη κατηγορία χημικών συστατικών που αποτελούν το κύτταρο είναι τα σάκχαρα .Η απλούστερη μορφή σακχάρων ονομάζεται μονοσακχαρίτες και ένα παράδειγμα μονοσακχαρίτη είναι η γλυκόζη ,η οποία αποτελεί την ενέργεια για τα κύτταρα και τους ιστούς .Δύο μονοσακχαρίτες μπορούν να ενωθούν και να σχηματίσουν ένα δισακχαρίτη και ούτος καθεξής .Επίσης πολλοί μονοσακχαρίτες μπορούν να ενωθούν μεταξύ τους και να δημιουργήσουν έναν πολυσακχαρίτη ,όπως για παράδειγμα είναι το γλυκογόνο στα ζώα και το άμυλο στα φυτά .

Τέταρτη κατηγορία είναι τα λιπίδια ,τα οποία είναι διαλυτά μόνο σε μη πολικούς διαλύτες .Τα περισσότερα λιπίδια προκύπτουν από λιπαρά οξέα και μπορούν να

αποθηκευτούν στο σώμα ως μορφή ενέργειας και να χρησιμοποιηθούν ανάλογα με τις ανάγκες που θα προκύψουν. Παραδείγματα λιπιδίων είναι τριγλυκερίδια και η χοληστερόλη .

3.5 Αλληλεπιδράσεις που προσδιορίζουν τις τρισδιάστατες δομές βιοπολύμερων

Τα βιοπολυμερή στην πραγματικότητα είναι τρισδιάστατες δομές στον χώρο και για τις συγκεκριμένες δομές παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο μη πολικές αλληλεπιδράσεις οι οποίες δεν περιλαμβάνουν κάποιο χημικό δεσμό. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η διπλή -έλικα του DNA όπου ένα μεγάλο πλήθος τέτοιων αλληλεπιδράσεων σχηματίζουν και δίνουν την τελική μορφή που έχει το DNA στον χώρο .Ένα άλλο παράδειγμα τέτοιων αλληλεπιδράσεων είναι ο δεσμός υδρογόνου , όπου έχουμε ασθενείς αλληλοεπιδράσεις δύο ατόμων υδρογόνου ,εκ των οποίων το ένα άτομο είναι ενωμένο με ένα ηλεκτροαρνητικό άτομο και το άλλο είναι ενωμένο με ένα ηλεκτροθετικό άτομο. Ένα ακόμα παράδειγμα μη πολικών αλληλοεπιδράσεων που καθορίζουν την δομή των μορίων στον χώρο είναι —οι υδροφοβικές επιδράσεις όπου έχουμε δύο μόρια που είναι υδρόφοβα και έχουν την τάση να ενωθούν μεταξύ τους και να έρθουν μακριά από το υδρόφιλο περιβάλλον. Γενικά όλες αυτές οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις είναι λιγότερο ισχυρές από ένα χημικό δεσμό ,αλλά γενικά παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο να διατηρούν την τρισδιάστατη μορφή στον χώρο του DNA.

Υπάρχουν τέσσερις δομές που καθορίζουν τα βιοπολυμερή όπως είναι το DNA και οι πρωτεΐνες . Η πρώτη είναι η πρωτοταγής δομή , η οποία αφορά την αλληλουχία των επιμέρους συστατικών που περιλαμβάνονται στο βιοπολυμερές .Μετά είναι η δευτεροταγής δομή η οποία σχετίζεται με την αλληλουχία των επιμέρους υποδομών που περιλαμβάνονται στο βιοπολυμερές .Μετά έχουμε την τριτοταγή δομή που είναι συνολική διάταξης μίας για παράδειγμα πολυπεπτιδικής αλυσίδας στον χώρο και επομένως η τρισδιάστατη διαμόρφωση που παίρνει στον χώρο .Τέλος έχουμε την τεταρτοταγή δομή όπου αφορά την τρισδιάστατη μορφή που

παίρνουν στον χώρο περισσότερες από μία πολυπεπτιδικές αλυσίδες που είναι ενωμένες μεταξύ τους.

3.6 Άλλα σημαντικά κυτταρικά συστατικά

-Άλλα σημαντικά κυτταρικά συστατικά είναι το AMP (μονοφωσφορική αδενοσίνη), ADP(διφωσφορικη αδενοσίνη) και ATP(τριφωσφορική αδενοσίνη).Και το ATP και το ADP παίζουν σημαντικούς ρόλους σε αντιδράσεις οξείδωσης και φωσφορυλιωσης οι οποίες είναι πολύ σημαντικές σε διάφορες λειτουργίες του κυττάρου .Ένα ακόμα σημαντικό συστατικό που παίζει ρόλο στις χημικές αντιδράσεις ως συνένζυμο είναι και το NADPH

3.7 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ

Σε ένα ζωντανό κύτταρο λαμβάνουν χώρα διάφορες διαδικασίες οι οποίες περιλαμβάνουν από την αντιγραφή μέχρι την επικοινωνία μεταξύ δύο κυττάρων .

Η κυτταρική αντιγραφή είναι μία διαδικασία σύμφωνα με την οποία τα χρωμοσώματα ,αντιγράφονται σε δύο αντίγραφα και το ένα αντίγραφο πηγαίνει στο μητρικό κύτταρο και το δεύτερο αντίγραφο στο αντιγραφόμενο κύτταρο. Αυτή η διαδικασία είναι αυστηρά ελεγχόμενη και αν χαθεί ο έλεγχος αυτής της διαδικασίας μπορεί να οδηγήσει σε καταστάσεις όπως ο καρκίνος .Η αντιγραφή των κυττάρων στους περισσότερους ζωικούς οργανισμούς γίνεται μέσω διαδικασιών η οποία η μία λέγεται μίτωση και η άλλη μείωση και η κάθε μια περιλαμβάνει κάποια στάδια .

Μία πολύ σημαντική διαδικασία και στις δύο αυτές περιπτώσεις είναι η αντιγραφή του γενετικού υλικού , η οποία γίνεται μέσω ενός ενζύμου που λέγεται DNA πολυμεράση .

Δεύτερη σημαντική κυτταρική διαδικασία είναι η κυτταρική βιοσύνθεση η οποία περιλαμβάνει την μεταγραφή και την μετάφραση .Στην βιοσύνθεση των

πρωτεϊνών συνεργάζονται τρία είδη RNA που συνθέτουν τις πρωτεΐνες .Αυτά τα τρία είδη είναι το messenger RNA, transfer RNA και το ribosomal RNA .

Η μεταγραφή είναι μια διαδικασία στην οποία το DNA του πυρήνα "ξεδιπλώνεται" σε μικρότερα τμήματα και κατόπιν τούτου μέσω της RNA πολυμεράση εξελίσσεται η διαδικασία .

Η μετάφραση είναι μια διαδικασία σύμφωνα με την οποία δημιουργημένο πλέον mRNA διασχίζει τον πυρήνα και μεταφράζει στο κυτταρόπλασμα ,όπου διαβάζεται από τα ριβοσώματα και κατ' επέκταση έχουμε την βιοσύνθεση των πρωτεϊνών.

Μία άλλη κυτταρική διαδικασία είναι η παραγωγή ενέργειας μη οποία περιγραμματικά μπορεί να γίνει είτε μέσω διάσπασης χημικών δεσμών και εκμετάλλευσης της ενέργειας που είναι αποθηκευμένη σε αυτούς (για παράδειγμα η παραγωγή ενέργειας μέσω της γλυκόζης ,όπου η γλυκόζη διασπάται και η ενέργεια που είναι συσσωρευμένη μέσα σε αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για άλλους σκοπούς).Επίσης ένας τρόπος που μπορούν τα κύτταρα να παράγουν ενέργεια είναι μέσω των δυναμικών που δημιουργούνται στις κυτταρικές μεμβράνες λόγω της διαφορετικότητας στην συγκέντρωση των επιμέρους συστατικών (ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια). Στα φυτά έχει αναπτυχθεί μία διαδικασία σύμφωνα με την οποία χρησιμοποιώντας το φως μπορεί να παράγεται επιπλέον ενέργεια η οποία είναι απαραίτητη για τις διάφορες λειτουργίες του φυτού .

Μία άλλη σημαντική κυτταρική λειτουργία είναι η κυτταρική σηματοδότηση σύμφωνα με την οποία ένα μόριο προσδένεται σε ένα υποδοχέα ,στο κύτταρο στόχος και στην συνέχεια ο υποδοχέας αυτός ενεργοποιεί διαδικασίες μέσα στο κύτταρο .Αυτή η ενεργοποίηση του υποδοχέα και η κυτταρική σηματοδότηση μπορεί να γίνει από διάφορους παράγοντες όπως παράγοντες ανάπτυξης ή ορμόνες .Οι τρόποι με τους οποίους μπορεί αυτό να γίνει είναι ο αυτοκρινής τρόπος ,ο παρακρινής τρόπος και ο ενδοκρινής τρόπος .

Μία άλλη κυτταρική διαδικασία είναι ο κυτταρικός θάνατος .Ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να χωριστεί σε δύο διαφορετικούς μηχανισμούς ,ο ένας είναι η απόπτωση

και ο άλλος η θανάτωση του κυττάρου από κάποιον τραυματισμό .Η απόπτωση είναι μια διαδικασία που μπορεί να χαρακτηριστεί και ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ,όπου έχουμε κάποια εσωτερικά σήματα μέσα στο κύτταρο τα οποία ενεργοποιούν διαδικασίες θανάτου αυτόματα μέσα στο κύτταρο. Αυτές οι διαδικασίες μπορούν να ενεργοποιηθούν είτε από εσωτερικά είτε από εξωτερικά μόρια τα οποία προσκολλούνται σε υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας .Επίσης κυτταρικός θάνατος μπορεί να προκύψει από τραυματισμό ή μηχανική βλάβη εξ αιτίας σε έκθεση σε τοξικά η χημικά.

Μία άλλη κυτταρική διαδικασία είναι η κυτταρική μεταμόρφωση , όπου έχουμε ενσωμάτωση εξωγενούς γενετικού υλικού σε κάποιο κύτταρο. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η έκθεση ενός κυττάρου σε κάποιον ιό , όπου το DNA του ιού περνάει μέσα στον πυρήνα και αλλάζει την σύσταση του DNA

3.8 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Οι πρωτεΐνες χωρίζονται σε δύο κυρίως τύπους ,τις γραμμικές πρωτεΐνες(οι οποίες αποτελούν μέρη κυρίως του συνδετικού ιστού όπως το δέρμα τα δόντια και τα οστά)και τις σφαιρικές πρωτεΐνες (όπως για παράδειγμα η αιμοσφαιρίνη στο αίμα).

Βάση των λειτουργιών τους οι πρωτεΐνες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής

- ένζυμα
- δομικές πρωτεΐνες
- μεταφορικές πρωτεΐνες
- σε ορμόνες
- σε πρωτεΐνες αποθήκευσης
- συσταλτικές πρωτεΐνες
- προστατευτικές πρωτεΐνες

Οι βασικές λειτουργίες των πρωτεϊνών είναι η ενζυματική κατάλυση (η οποία γίνεται από ένζυμα τα οποία είναι πρωτεΐνες) , η ανοσολογική προστασία (που γίνεται μέσω των αντισωμάτων που είναι επίσης πρωτεΐνες) και η μεταφορά μέσω κυτταρικών μεμβρανών (όπου και σε αυτή την διαδικασία υπάρχουν πρωτεΐνες που παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο)

3.9 Η ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ

3.10 ΤΥΠΟΙ ΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΟΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥΣ

Τα κύτταρα συνεργάζονται μεταξύ τους προκειμένου να συνθέσουν και να δημιουργήσουν έναν συγκεκριμένο ιστό ο οποίος επιτρέπει στον οργανισμό –να κάνει μία μεγάλη γκάμα εργασιών χάρις αυτών των ιστών , όπως ο μεταβολισμός η αναπαραγωγή και άλλα. Οι τύποι και οι λειτουργίες των ιστών είναι διαφορετικές σε έναν ζωντανό οργανισμό όπως είναι το ανθρώπινο σώμα .Μια κατηγορία ιστού είναι ο επιθηλιακός ιστός , όπου είναι ο ιστός που καλύπτει την επιφάνεια του δέρματος και όλων των εσωτερικών και εξωτερικών κοιλοτήτων που υπάρχουν στο σώμα .

Δεύτερη κατηγορία ιστών είναι ο μυϊκός ιστός όπου χωρίζεται στις εξής υποκατηγορίες

- σκελετικούς μυς
- λείους γραμμικούς μυς
- καρδιακούς μυς

Τρίτη κατηγορία ιστών είναι ο συνδετικός ιστός ,ο οποίος αποτελείται από το περιεχόμενο -μεταξύ των κυττάρων και τα επιμέρους συστατικά αυτού .

Τέταρτη κατηγορία είναι ο νευρικός ιστός ο οποίος αποτελείται κυρίως από τους νευρώνες και ειδικεύεται στην παραγωγή νευρικών παλμών και στην επικοινωνία μεταξύ των νευρώνων .

3.11 ΟΓΚΟΙ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΙ

Μία σημαντική ανωμαλία στην λειτουργία των ιστών και στην δομή των κυττάρων είναι ο καρκίνος. Με τον όρο όγκο εννοούμαι γενικότερα μία ανωμαλία στον πολλαπλασιασμό του κυττάρου .Σε έναν όγκο έχουμε διαφορετικότητα στα κύτταρα (σε σχέση με μία υγιή κατάσταση) όσο αναφορά την ανάπτυξη, την μορφολογία και την αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων .Οι όγκοι μπορεί να είναι είτε εντοπισμένοι είτε μεταστατικοί .Σε έναν όγκο έχουμε κάποιες λειτουργίες του κυττάρου που δεν λειτουργούν πλέον όπως είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ,γιατί τα κύτταρα στον καρκίνο πολλαπλασιάζονται σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από ότι σε ένα υγιές κύτταρο .Επίσης σε μια καρκινική κατάσταση λαμβάνει χώρα η διαδικασία της μεταμόρφωσης στην οποία ξένο γενετικό υλικό το οποίο μπορεί να προκαλέσει καρκίνο επηρεάζει και άλλα κύτταρα και κατ επέκταση και άλλα ζωτικά όργανα .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΦΩΤΟΣ-ΥΛΗΣ

4.1 Αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο φως και σε ένα μόριο

Το φως είναι μια ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που αποτελείται από ταλαντευόμενα –ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία. Βιολογικά συστήματα είναι μοριακά μέσα–. Για ένα τέτοιο μέσον η αλληλεπίδραση με το φως μπορεί να

περιγραφεί από την ηλεκτρονική πόλωση ενός μορίου που προκαλείται από το ηλεκτρικό πεδίο. Αυτή η προσέγγιση επίσης αναφέρεται ως το ηλεκτρικό δίπολο (ή απλά δίπολο).

Η γραμμική απόκριση του πεδίου, η οποία ορίζεται με γραμμική εξάρτηση της διπολικής ροπής για το ηλεκτρικό πεδίο, προσδιορίζει το συνολικό μοριακό δίπολο ως

$$\mu_T = -er = \mu + \alpha\varepsilon(v') \quad \text{(εξ8)}$$

Αλλαγή κωδικού πεδίου

Στην ανωτέρω εξίσωση μ_T είναι η συνολική ηλεκτρονική διπολική ροπή η οποία δίνεται από το γινόμενο του ηλεκτρονικού φορτίου e και της θέσης του r .Ο όρος μ είναι ο διπολικός παράγοντας εν απουσία κάθε πεδίου και ο όρος αε(ν΄) είναι το ηλεκτρικό πεδίο που επάγεται διπολική ροπή.. Η διπολική αλληλεπίδραση V μεταξύ του μορίου και ενός πεδίου ακτινοβολίας ε (ν) μπορεί να περιγραφεί ως

$$V = \varepsilon(v)\mu + \varepsilon(\omega)\alpha\varepsilon(v') \quad \text{(εξ9)}$$

Ο πρώτος όρος στην παραπάνω εξίσωση περιγράφει την αλληλεπίδραση με ένα πεδίο φωτονίων με συχνότητα ν που οδηγεί στο φαινόμενο της απορρόφησης και εκπομπής ενός φωτονίου από το μόριο. Ο δεύτερος όρος αντιπροσωπεύει ανελαστική σκέδαση Raman, όπου ένα φωτόνιο με συχνότητα ν σκεδάζεται ελαστικά (με μια αλλαγή στην ενέργεια) από ένα μόριο δημιουργώντας ένα φωτόνιο με διαφορετική συχνότητα ν και την ανταλλαγή της διαφοράς της ενέργειας με το μόριο.

Η αλληλεπίδραση του φωτός με ένα μέγεθος ύλης όπως ένα σύνολο μορίων τάξης μεγέθους συγκρίσιμου ή και μεγαλύτερου με το μήκος κύματος του φωτός οδηγεί σε νέες εκδηλώσεις , όπως είναι η διάθλαση ,η αντανάκλαση και ο σκεδασμός ,πρόσθετα στην διαδικασία απορρόφησης .

4.2 Η "συνθηκη" της διεγερμένης κατάστασης

Αυτή η ενότητα περιγράφει τις διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα μετά από μια διέγερση που προκαλείται από την απορρόφηση του φωτός, η οποία οδηγεί ένα μόριο σε διεγερμένη κατάσταση. Αυτές οι διαδικασίες περιλαμβάνουν την εκπομπή φωτονίου με την ταυτόχρονη επιστροφή του μορίου στην αρχική του ενεργειακή κατάσταση ή ακόμα και να συμβαίνουν απουσία φωτός, όπου η ενέργεια της διεργεμένης κατάστασης να χάνεται ως θερμότητα ή στην παραγωγή μιας χημικής αντίδρασης(φωτοχημεία).

Η επιστροφή στην αρχική ενεργειακή κατάσταση μπορεί επίσης να περιλαμβάνει ένα συνδυασμό και των δύο παραπάνω περιπτώσεων. Στη διαδικασία που δεν παράγεται φως αλλά θερμότητα, περιλαμβάνουν την μεταφορά από ένα ενεργειακό επίπεδο σε ένα άλλο, χαμηλότερο, με την περίσσεια ενέργεια να μετατρέπεται σε παλμική ενέργεια διαμέσου μιας μία αλληλεπίδρασης που ονομάζεται "ηλεκτρονική δονητική κατάσταση σύζευξης" . Στη συνέχεια, η περίσσεια δονητική ενέργεια μετατρέπεται σε θερμότητα (αυτή η διαδικασία ονομάζεται δονητική χαλάρωση).

4.3 Διάφορα είδη της φασματοσκοπίας

Η φασματοσκοπία ασχολείται με τον χαρακτηρισμό και τις εφαρμογές της μετάβασης ανάμεσα σε δύο κβαντικές καταστάσεις ενός ατόμου ή ενός μορίου.

Ένα φάσμα είναι μια γραφική παράσταση της έντασης του φωτός που εξέρχεται από ένα μέσο ως συνάρτηση της συχνότητας του (ή μήκος κύματος). Για την απορρόφηση, χρησιμοποιείται μια πηγή φωτός και η μετάδοση του φωτός (ανάλογα με την απορρόφηση η την εξασθένηση του) λαμβάνεται ως συνάρτηση της συχνότητας ή του μήκους κύματος του. Για μία διέργεση ή μια διαδικασία Raman, το μέσο διεγείρεται σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος (που ονομάζεται μήκος κύματος διέγερσης).

Δύο τύποι φασματόμετρων χρησιμοποιούνται για την απόκτηση των φασματικών πληροφοριών που προκύπτουν με την κατανομή της έντασης του φωτός σε συνάρτηση του μήκους κύματος του-:

Τα συμβατικά φασματόμετρα (spectrometers) ανήκουν σε μια γενική κατηγορία αναλυτικών οργάνων τα οποία συλλέγουν, αναλύουν και επαναπεικονίζουν οπτικά σήματα-. Συνήθως στην έξοδό τους παίρνουμε μια σειρά από μονοχρωματικά είδωλα που αντιστοιχούν στις συνιστώσες της ακτινοβολίας που δέχεται η είσοδος του οργάνου.

Ένα κοινό φασματόμετρο είναι το όργανο με το οποίο μπορούμε να μετρήσουμε τη σχετική φασματική κατανομή ισχύος Το μέγεθος αυτό περιγράφει την ισχύ ανά μονάδα επιφάνειας και ανά μονάδα που δέχεται ο ανιχνευτής του οργάνου και που προέρχεται από την πηγή, μετά την ανάλυση δια μέσου των στοιχείων του. Φαινόμενα απορρόφησης, ανάκλασης, πόλωσης, κ.λ.π., από τα διάφορα εξαρτήματα του οργάνου, που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη φασματική κατανομή της πηγής, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στις τελικές μετρήσεις

Μετασχηματισμός Fourier Φασματόμετρα: Η φασματοσκοπία εγγύς υπερύθρου (Near Infrared Spectroscopy) είναι μια φασματοσκοπική μέθοδος, η οποία αξιοποιεί την εγγύς υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (από τα 800 έως τα 2500 nm). Σε σύγκριση με τη μέση υπέρυθρη ακτινοβολία, η εγγύς υπέρυθρη ακτινοβολία μπορεί τυπικά να διεισδύσει σε μεγαλύτερο βάθος σε ένα δείγμα υλικού και ως εκ τούτου είναι πολύ χρήσιμη για την εξέταση χύδην υλικών απαιτώντας μικρή ή καθόλου προετοιμασία του δείγματος. Τυπικούς τομείς εφαρμογής της αποτελούν η φαρμακοβιομηχανία,

η ιατρική διαγνωστική, ο ποιοτικός έλεγχος τροφίμων και αγρο-χημικών προϊόντων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΟΙ ΘΕΜΕΛΙΩΔΕΙΣ ΑΡΧΕΣ ΤΩΝ LASER ,Η ΕΠΙΚΑΙΡΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ LASER ΚΑΙ Η ΜΗ ΓΡΑΜΜΙΚΗ ΟΠΤΙΚΗ

Τα laser είναι συσκευές που παράγουν μία δέσμη φωτός—, εξαιρετικά κατευθυντική και μονοχρωματική. Είναι η πιο διαδεδομένη πηγή φωτός που χρησιμοποιούμε σε εφαρμογές βιοφωτονικής–. Η χρήση των λέιζερ εμπίπτει σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη χρησιμοποιεί το λέιζερ ως μία εύχρηστη –και εξαιρετικά συμπυκνωμένη πηγή φωτονίων. Η δεύτερη αξιοποιεί την εξαιρετικά συνεκτική φύση της δέσμης φωτός που παράγεται από ένα laser.

Ένα πλεονέκτημα της χρήσης laser στην βιοφωτονική είναι η αξιοποίηση της χρονικής ανάλυσης που παρέχεται από ένα παλμικό laser. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της τεχνικής q-switching που έχουμε την δυνατότητα να παράγουμε "στενούς" —παλμούς της τάξεως Picoseconds (ps) και femtoseconds (fs)-.

Μία σημαντική εφαρμογή της βιοφωτονικής -πραγματεύεται με το επίπεδο και την ποσότητα φωτός έκθεσης που απαιτείται για μία δεδομένη εφαρμογή. Αυτή η διαδικασία -είναι η ουσία της ραδιομετρίας-.

5.1 ΟΙ ΑΡΧΕΣ ΤΩΝ LASER

Ο όρος laser είναι ακρωνύμιο των λέξεων : 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.

Τα laser παράγουν σύμφωνο, μονοχρωματικό φως (δηλαδή φως με συγκεκριμένο μήκος κύματος-χρώμα) το οποίο διαδίδεται σε μια συγκεκριμένη κατεύθυνση, σχηματίζοντας στενές δέσμες. Αντίθετα, οι συνηθισμένες πηγές φωτός, όπως οι λαμπτήρες πυρακτώσεως, παράγουν μη-σύμφωνο φως προς όλες τις διευθύνσεις και, επιπλέον, έχουν μεγάλο φασματικό εύρος.

Η λειτουργία των laser ερμηνεύεται από την θεωρία της κβαντικής μηχανικής και της θερμοδυναμικής. Πολλά υλικά έχουν βρεθεί ότι έχουν τα απαραίτητα χαρακτηριστικά για να αποτελέσουν ενεργό υλικό των λέιζερ, με αποτέλεσμα την δημιουργία πολλών τύπων λέιζερ με διαφορετικά χαρακτηριστικά, που χρησιμοποιούνται σε μεγάλο εύρος εφαρμογών.

Το πρώτο laser κατασκευάστηκε το 1960, από τότε όμως τα laser βρήκαν εφαρμογή στις θετικές επιστήμες, στην βιομηχανία, στην ιατρική, και στην ηλεκτρονική.

Για πολλές εφαρμογές στη Βιοφωτονική, ένα laser είναι μια πηγή φωτός με μεγάλη ένταση που είναι

- μονοχρωματική (δηλαδή παράγει ένα χρώμα που σημαίνει ένα μόνο μήκος κύματος)
- μία εξαιρετικά κατευθυντική δέσμη φωτός με χαμηλή απόκλιση
- ικανή να επικεντρώνεται σε ένα πολύ μικρό σημείο
- ικανή να παράγει πολύ στενούς παλμούς φωτός πολύ υψηλής έντασης

•

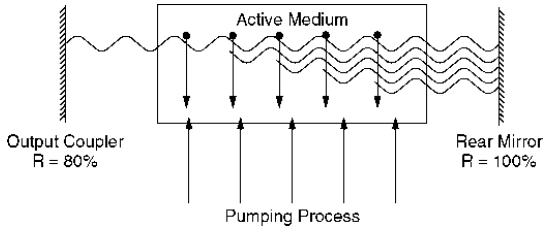
Τα λέιζερ έχουν την μοναδική ικανότητα να παράγουν μια συνεκτική δέσμη φωτός και εξαιρετικά βραχείς παλμούς (σε $10^{-9-10-15}$ sec, δηλαδή, σε νανοδευτερόλεπτα). Πολλές εφαρμογές λαμβάνουν χώρα χάρις τη χρήση αυτών των μοναδικών ιδιοτήτων μιας δέσμης laser

Η βασική αρχή του laser, όπως αναφέρει και το όνομα του βασίζεται στην εξαναγκασμένη εκπομπή από ένα υψηλότερο επίπεδο f σε ένα χαμηλότερο επίπεδο i (όχι απαραίτητα στην αρχική ενεργειακή κατάσταση). Αυτό θα απαιτήσει να δημιουργηθεί μία αναστροφή πληθυσμού ώστε ο αριθμός των ατόμων ή των μορίων στο επίπεδο f να είναι μεγαλύτερος από αυτόν στο επίπεδο i ($N_f > N_i$) .

Τα περισσότερα laser χρησιμοποιούν ηλεκτρονικά επίπεδα ως αρχή λειτουργίας τους. Ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο laser διοξειδίου του άνθρακα χρησιμοποιεί δονητικά επίπεδα (f και i είναι δονητικά επίπεδα με διαφορετικούς κβαντικούς αριθμούς, v). Αυτή η αντιστροφή πληθυσμού έχει δημιουργηθεί είτε με ηλεκτρική διέγερση του επιπέδου f ή με οπτική διέγερση (απορρόφησης) σε ένα υψηλότερο επίπεδο.

Τα θεμελιώδη στοιχεία ενόςlaser είναι:

- Το ενεργό μέσο,στο οποίο ένα άτομο ή ένα μόριο μπορεί να διεγείρεται από ένα κατάλληλο μηχανισμό άντλησης ,ώστε να δημιουργήσει αντιστροφή πληθυσμού. Τα αυθόρμητα φωτόνια που εκπέμπονται σε κάποια θέση στο μέσο αυτό διεγείρουν με την σειρά τους άλλα άτομα ή μόρια καθώς διαδίδονται μέσα στο υλικό
- Μια πηγή άντλησης, η οποία μπορεί να είναι ένας θάλαμος ηλεκτρικής εκκενώσεως, μια ηλεκτρική παροχή ισχύος, μια λάμπα, ή ακόμα και ένα άλλο laser
- Δύο ανακλαστικά κάτοπτρα, τα οποία αντανακλούν το φως σε φάση (προσδιορίζεται από το μήκος της κοιλότητας), έτσι ώστε το φως να ενισχύεται περαιτέρω από το ενεργό μέσο



Σχήμα 6 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

Τόσο η διαδικασία της εξαναγκασμένης εκπομπής όσο και της οπτικής ανατροφοδότησης επιδρούν στην συνεκτικότητα της ακτίνας του laser.

-Μόνο τα κύματα που αντανακλώνται σε φάση συμβάλλουν στην ενίσχυση και συνεπώς στην δημιουργία δέσμης μεγάλης έντασης. Αυτή η διαδικασία παράγει μια δέσμη laser μεγάλης κατευθυντικότητας, μικρού φασματικού εύρους, καθιστώντας το laser μια οπτική υψηλής κατεύθυνσης με χαμηλή απόκλιση και στενού φασματικού εύρους.

Μια προσπίπτουσα και ανακλώμενη ακτίνα για –να είναι σε φάση σε μια κοιλότητα, πρέπει να ικανοποιείται η συνθήκη του στάσιμου κύματος:

$$n\frac{\lambda}{2} = l \quad (εξ10)$$

Αλλαγή κωδικού πεδίου

όπου λ είναι το μήκος κύματος της εκπομπής και l το μήκος της κοιλότητας

ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ LASER

Παλμικά laser: Τα λέιζερ παλμών χαρακτηρίζονται από υψηλό κέρδος που επιτυγχάνεται λόγω της μεγάλης αναστροφής πληθυσμού για ένα σύντομο χρονικό διάστημα. Παλμική λειτουργία μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση ενός παλμού διέγερσης (ηλεκτρικού ή οπτικού). Η προσέγγιση αυτή

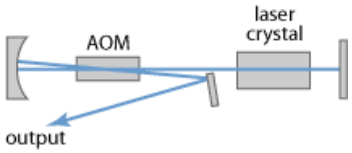
καλείται κέρδος διαμόρφωσης. Υψηλής ισχύος λειτουργίας παλμός επιτυγχάνεται με τον έλεγχο της οπτικής ανατροφοδότησης , όπως π.χ. συμβαίνει στην Q-switching διαδικασία. Ένα κύριο πλεονέκτημα των παλμικών laser είναι η ικανότητά τους να παράγουν μικρής διάρκειας παλμούς με πολύ υψηλή ένταση. Η χρονική διάρκεια παλμού, μπορεί να κυμαίνεται από χιλιοστά του δευτερολέπτου έως αρκετά fs. Ωστόσο, για να επιτύχουμε διαφορετικά φασματικά πλάτη απαιτούνται διαφορετικές τεχνικές. Μερικές από αυτές τις διαδικασίες παραγωγής παλμού περιγράφονται παρακάτω:

κανονική λειτουργία παλμών , σε αυτή την περίπτωση ενός ηλεκτρικού συστήματος άντλησης . ο ηλεκτρονικός οδηγός παράγει διαμορφωμένη "τεμαχισμένη" δέσμη φωτός ,παράγοντας δηλαδή παλμούς laser .Η ίδια τεχνικη εφαρμόζεται και για την παραγωγή laser μεγάλων παλμών .Η ίδια τεχνική εφαρμόζεται και σε laser Nd:YAG ,όπου ελέγχουμε την διάρκεια ακτινοβόλησης (επιτυγχάνεται με συγκεκριμένο ηλεκτρονικό κύκλωμα φόρτισης της πηγής φωτός μας) ώστε να επιτύχουμε παραγωγή παλμών διάρκειας της τάξεως των 100μsec έως αρκετά milliseconds . Σε μια τέτοια περίπτωση, το λέιζερ ονομάζεται ελεύθερης παλμικής λειτουργίας

Q-switched λειτουργία στην οποία ελέγχουμε την ποιότητα (ικανότητα αποθήκευσης ενέργειας), Q, της κοιλότητας λέιζερ χρησιμοποιώντας ένα οπτικό στοιχείο (που ονομάζεται Q-switching στοιχείο). Ο ρόλος του Q-switching στοιχείου είναι να επηρεάζει την οπτική ταλάντωση μέσα στην κοιλότητα ενός laser. Αρχικά, το Q της κοιλότητας διατηρείται σε μια χαμηλή τιμή, όπου η ανάδραση της κοιλότητας δεν λειτουργεί. Με άλλα λόγια, ένα κλείστρο εισάγεται εντός της κοιλότητας. Σε μια τέτοια κατάσταση, η ενέργεια αποθηκεύεται στο εσωτερικό του ενεργού μέσου και η ενέργεια συσσωρεύεται ;_μέσα . Στη συνέχεια, το Q της κοιλότητας αλλάζει ξαφνικά σε υψηλή ποιότητα μετάδοσης με την κατάλληλη χρήση του στοιχείου Q Έτσι, το κλείστρο ανοίγει ξαφνικά. Η κοιλότητα γίνεται τώρα διαπερατή και ένα μεγάλο ποσό της ενέργειας (ένας πολύ υψηλός παλμός από άποψη έντασης) αναδύεται από την κοιλότητα, γρήγορα εξαντλώντας την αποθηκευμένη ενέργεια του μέσου.

Mode-locked λειτουργία, σε αυτή τη λειτουργία, οι διαφορετικοί διαμήκεις ρυθμοί της κοιλότητας, οι οποίες δημιουργούνται τυχαία στον χρόνο μέσα στην κοιλότητα λέιζερ, είναι κλειδωμένοι φασικά με αποτέλεσμα να παράγουν ένα συρμό από εξαιρετικά βραχείς παλμούς (από ps έως fs)

Cavity-dumped λειτουργία, η μέθοδος αυτή είναι παρόμοια με την Q-switching και χρησιμοποιείτε για να επιτύχουμε περιοδικό έλεγχο στην εναλλαγή της κατεύθυνσης της διάδοσης της δέσμης του φωτός σε σχέση με την θέση της κοιλότητας.



Σχηματική εγκατάσταση μιας κοιλότητας ντάμπινγκ λέιζερ. Το ακουστικο-οπτικός διαμορφωτής (AOM) είναι ενεργοποιημένη μόνο για λίγο όταν ένας παλμός εξάγεται. Σε άλλους χρόνους, το φως μπορεί να κυκλοφορεί στο αντηχείο με χαμηλές απώλειες.

Σχήμα7 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

5.2 Τρέχουσες τεχνολογίες laser

Η σημερινή έμφαση στις τεχνολογίες laser έχει μετακινηθεί στα συστήματα στερεάς κατάστασης, τα οποία είναι συμπαγή, υψηλής ενεργειακής απόδοσης, και αξιόπιστα με μακρά περίοδο ζωής. Ο βασικός "αντιπρόσωπος" των laser αυτών είναι τα laser ημιαγωγού ή διοδικά laser. Τα διοδικά laser είναι εξαιρετικά αποδοτικά (μετατροπή > 20% της ηλεκτρικής ενέργειας σε εκπομπή φωτός) και καλύπτουν ένα μεγάλο φασματικό εύρος, αλλά λειτουργούν σε ένα στενό φάσμα μηκών κύματος, επιτρέποντας την επιλογή ενός μόνο κατάλληλου μονοχρωματικού μήκους κύματος κάθε χρονική στιγμή. Μια σημαντική εφαρμογή τους είναι στον τομέα των οπτικών τηλεπικοινωνιών, για τις οποίες χρειαζόμαστε diode lasers με μήκη κύματος 980nm,1300nm,1550 nm.

Τα ημιαγωγικά laser με μήκη κύματος 980nm και 1300 nm μπορούν να έχουν σημαντική εφαρμογή στην βιοφωτονική στον τομέα της βιο-απεικόνισης λόγω της μεγαλύτερης διείσδυσης τους σε βιολογικούς ιστούς. Τα ημιαγωγικά lasers στα 645 nm έχουν αντικαταστήσει τα συστήματα helium-neon σε εφαρμογές στόχευσης με ακτίνα Laser όπως είναι οι χαμηλής έντασης ακτινοθεραπείες-.

5.3 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣ: ραδιομετρία

Στην αλληλεπίδραση του φωτός με την ύλη, χρησιμοποιείται ένας αριθμός διαφορετικών μεγεθών προκειμένου να προσδιοριστεί το επίπεδο και το ποσό της έκθεσης στο φως. Αυτό αποτελεί το θέμα της ραδιομετρίας.

Για μια πηγή παλμών laser η μέση ισχύς, η μέγιστη ισχύς και η ενέργεια ανά παλμό συσχετίζονται . Η μέση ισχύς, ορίζεται ως η ενέργεια ανά δευτερόλεπτο κατά μέσο όρο των παλμών, και συσχετίζεται με την ενέργεια ως

P_{ave} = energy per pulse x number of pulses per second (εξ11)

Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά

Η μέγιστη ισχύς υπολογίζεται από την ενέργεια ανά παλμό υποθέτοντας μια ειδική μορφή του σχήματος παλμού (στο χρόνο)

Ppeak=(energy per pulse)/(pulse duration)

5.4 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα που παρέχεται από μία πηγή laser είναι η ικανότητά του να παράγει παλμούς πολύ μικρής διάρκειας, που επιτρέπει την παρακολούθηση μια βιοχημικής ή βιοφυσικής –διαδικασίας σε πραγματικό χρόνο (Svelto 1996). Οι διάφορες βιολογικές διαδικασίες καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα χρονικών διαστημάτων, από ώρες σε picoseconds –. Για παράδειγμα, οι αντιδράσεις που καταλύονται από ένζυμα μπορεί να διαρκέσουν ms ενώ το ξετύλιγμα της διπλής έλικας του DNA λαμβάνει χώρα σε ένα microsecond

(μs). Ακόμα πιο γρήγορη είναι η πρωταρχική αντίδραση στη διαδικασία της όρασης, όταν η αρχική φωτοδιαδικασία συμβαίνει σε λιγότερο από μερικά ps μετά από την απορρόφηση του φωτός.

Διαδικασίες που χρησιμοποιούν laser, όταν ένα γεγονός παρακολουθείται ως συνάρτηση του χρόνου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τις ακόλουθες έρευνες:

Παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο του φθορισμού ,σε αυτή την διαδικασία επιλέγουμε το μήκος κύματος του παλμού του laser να διεγείρει μόνο ένα μόριο , ώστε να παρακολουθήσουμε μετέπειτα την εκπομπή της ενέργειας από αυτό το μόριο σε πραγματικό χρόνο.

Φασματοσκοπία με χρήση laser: Φασματοσκοπία ήταν αρχικά η μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ ακτινοβολίας και το αντικείμενο μας ως συνάρτηση του μήκους κύματος (" λ").

Αργότερα η έννοια επεκτάθηκε σημαντικά και περιλαμβάνει οποιαδήποτε μέτρηση ποσότητας σε συνάρτηση με μήκος κύματος είτε την συχνότητα.

Laser εφαρμογές στην αλλαγή θερμοκρασίας, στην οποία οι παλμοί laser μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να δημιουργήσουμε μια απότομη αύξηση της θερμοκρασίας ενός βιολογικού μέσου προκειμένου να ξεκινήσει μια θερμικά επαγόμενη μεταβολή, όπως το ξεδίπλωμα μιας πρωτεΐνης.

5.5 ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΣΤΗΝ ΧΡΗΣΗ LASER

Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά

Ένα laser ως πηγή φωτός υψηλής έντασης που παρέχει μια φασματικά συγκεντρωμένη ενέργεια φωτονίων μέσα σε μια κατευθυντική δέσμη θέτει πιθανούς κινδύνους για την ασφάλεια των χρηστών. Ως εκ τούτου, απαιτείται ο χειριστής του laser να γνωρίζει τους κινδύνους αυτούς και να ασκεί τη δέουσα προσοχή κατά τη χρήση των συγκεκριμένων συσκευών.

Πιθανοί Κίνδυνοι: Όταν το μάτι και το δέρμα εκτίθενται στην ακτινοβολία laser πάνω από την μέγιστη επιτρεπτή έκθεση , που καλείται τιμή MPE , μπορεί να

συμβεί βλάβη. Η τιμή MPE εξαρτάται από το μήκος κύματος και τα προσωρινά χαρακτηριστικά (CW έναντι παλμού) μιας δέσμης λέιζερ, καθώς και απότο χρόνο έκθεσης. Εξαρτάται επίσης από τη φύση του ιστού που εκτίθεται. Έτσι , οι MPE τιμές έκθεσης του δέρματος σίγουρα είναι συνήθως υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές για την έκθεση των ματιών, επειδή ο αμφιβληστροειδής είναι πιο ευαίσθητος από το δέρμα.

Κίνδυνοι για τα μάτια: Η ακτίνα του laser μπορεί να προκαλέσει βλάβη σε διάφορες δομές του ματιού, αναλόγως με το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται. Η ακτινοβολία laser με μήκη κύματος από 400nm έως 1.4 μm προκαλεί βλάβη του αμφιβληστροειδούς. UV ακτινοβολία στην περιοχή μήκους κύματος από 180 έως 315 nm απορροφάται από τον κερατοειδή και μπορεί να προκαλέσει βλάβη. Η UV ακτινοβολία, στην κλίμακα 315-400 nm, απορροφάται από τον φακό και μπορεί να προκαλέσει ορισμένες μορφές καταρράκτη.

Κίνδυνοι για το δέρμα: Ο κίνδυνος για το δέρμα γίνεται πιο σοβαρός, χρησιμοποιώντας την υπεριώδη ακτινοβολία, καθώς και υψηλής ισχύος laser. Ακτινοβολία στην φασματική περιοχή από 230 έως 380 nm μπορεί να προκαλέσει εγκαύματα, γήρανση του δέρματος, και καρκίνου του δέρματος. Η πιο σημαντική επίδραση στο υπέρυθρο φως είναι έγκαυμα του δέρματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

6.1 ΦΩΤΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

Με τον όρο φωτοβιολογία εννοούμε την αλληλεπίδραση του φωτός με την βιολογική ύλη. Η φωτοχημεία στα κύτταρα μπορεί να ενεργοποιηθεί από εξωτερικούς παράγοντες είτε από ενδογενής παράγοντες, οι οποίοι καλούνται Φώτο - ευαισθητοποιητές. Στην ουσία η φωτοχημεία είναι μέρος της φωτοβιολογίας. Κάποια παραδείγματα από την αλληλεπίδραση του φωτός με την ύλη την συναντούμε στην διαδικασία της όρασης και της φωτοσύνθεσης.

Η φωτοβιολογία πραγματεύεται πιο συγκεκριμένα αλληλεπιδράσεις του φωτός με βιολογικά και βιοχημικά συστατικά τα οποία έχουν διάφορα μεγέθη, από 100nm (όπως πχ οι ιοί) μέχρι μακροαντικείμενα όπως είναι ολόκληροι οργανισμοί. Δηλαδή το φως αλληλεπιδρά με βιολογικά συστατικά, από πολύ μικρά έως πολύ μεγάλα σε μέγεθος. Πολλές φορές η αλληλεπίδραση του φωτός με βιολογικά υποστρώματα μπορεί να είναι μέσω απλών βιομορίων είτε μέσω ολόκληρων ιστών και σε κάποιες πιο πολύπλοκες περιπτώσεις μπορεί να ενεργοποιηθεί μια ολόκληρη αλυσίδα καταστάσεων.

6.2 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣ ΜΕ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Στη σκέδαση Rayleigh, έχουμε κάποια υποκυτταρικά συστατικά ή οργανίδια τα οποία αποτελούν το κέντρο σκέδασης. Η σκέδαση Rayleigh γενικά σαν φαινόμενο εξαρτάται από τρεις παράγοντες. Αρχικά από το μέγεθος του σκεδαστή , δηλαδή τα κύτταρα ή τα οργανίδια, δεύτερον από την διαφορά που υπάρχει μεταξύ του κέντρου σκέδασης και του υλικού που το περιλαμβάνει και η τρίτη παράμετρος είναι το μήκος κύματος του φωτός ,στο οποίο εκτίθεται το βιολογικό μας συστατικό.

Οι πρωτεΐνες που είναι βάση των βιολογικών οργανισμών, αποτελούνται από αμινοξέα τα οποία μπορεί να είναι είτε αλειφατικά είτε αρωματικά. Στην περίπτωση που είναι αλειφατικά απορροφούν το UV φως σε μήκη κύματος

μικρότερα από 240 nm ενώ τα αρωματικά αμινοξέα απορροφούν σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από 240 nm. Σε μία πρωτεΐνη πέρα από τα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με το φως, μπορεί να περιλαμβάνονται και χρωμοφόρες ομάδες, οι οποίες επίσης αλληλεπιδρούν με το φως, όπως είναι η αιμοσφαιρίνη , η μελανίνη , η ρετινόλη και άλλες.

Επίσης τα συστατικά του DNA και του RNA που περιλαμβάνουν υδατάνθρακες και βασεις πουρίνης και πυριμιδίνης , έχουν την δυνατότητα να απορροφούν το φως σε μήκος κύματος 230 nm.

Τα κύτταρα " επιδεικνύουν " μία μεγάλη ποικιλία από φωτοχυμικά φαινόμενα .Ένας μεγάλος αριθμός κυτταρικών συστατικών φθορίζουν όταν εκτίθενται απευθείας στο φως και απορροφούν ενέργεια από αυτό. Κάποια τέτοια παραδείγματα που φθορίζουν στην απυθείας έκθεση στο φώς είναι το NADH , οι φλαβίνες τα αρωματικά αμινοξέα και άλλα. Επιπλέον μερικά ακόμα σημαντικά μόρια ή ομάδες που φθορίζουν είναι παρόντα και ως εξωκυτταρικά συστατικά στους ιστούς και ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το κολαγόνο και η ελαστίνη τα οποία βρίσκονται στον εξω- κυττάριο χώρο και φθορίζουν ως αποτέλεσμα μίας διασύνδεσης μεταξύ των αμινοξέων τους. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα φθορίζουσας πρωτεΐνης είναι η GFP που βρίσκεται στις μέδουσες η οποία απορροφά στα 395 nm και στα 475 nm και εκπέμπει ένα πράσινο φθορίζων χρώμα στα 508 nm.

Φωτοχημικές διαδικασίες που περιλαμβάνουν χημικές αντιδράσεις στην ενοποιημένη μορφή του κυτταρικού συστατικού, είναι διάφορες και κάποια παραδείγματα αυτών είναι,

η Φώτο -πρόσθεση (είναι μια διαδικασία όπου ένα συστατικό προστίθεται σε ένα άλλο με παρουσία φωτός), και ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η πρόσθεση της κυστεινης στην θυμίνη στην δομή του DNA

ο Φώτο- θρυμματισμός (είναι η διαδικασία που ένα συστατικό "κόβεται" σε επιμέρους μέρη με παρουσία φωτός, δηλαδή ένα συστατικό αποσυντίθεται σε μικρότερα χημικά συστατικά σπάζοντας διάφοροι χημικοί δεσμοί)

η Φώτο- οξείδωση (όπου παρουσία φωτός ένα μόριο οξυγόνου από το περιβάλλον προστίθεται σε ένα συγκεκριμένο μόριο) και ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η φωτο- οξείδωση της χοληστερόλης

η Φώτο- ενυδάτωση (όπου γίνεται παρουσία νερού και φωτός , όπου ένα μόριο νερού προστίθεται σε ένα χημικό μόριο και προκύπτει ένα καινούργιο συστατικό) και ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η φωτο- ενυδάτωση της ουρακίλης

ο Φώτο- ισομερισμός (όπου έχουμε παρουσία φωτός αλλαγή στην γεωμετρία και την διαμόρφωση στον χώρο ενός μορίου). Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η 11-cis ρετινάλη η οποία όταν εκτεθεί σε φως διεγείρεται και περιστρέφεται κατά 180 μοίρες μετατρέποντας την σε all-trans-retinal

η Φώτο -αναδιαμόρφωση (όπου έχουμε ανακατανομή ή αναδιαμόρφωση κάποιων χημικών δεσμών μέσα στο μόριο χωρίς όμως να αλλάξει η χημική του σύσταση) και ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η 7-dehydrocholesterol

Υπάρχουν κάποιες σημαντικές χημικές αντιδράσεις οι οποίες ενεργοποιούνται από το φως μέσω της χρήσης εξωγενών χρωμοφόρων τα οποία μπορούν να επηρεάζουν την βιοχημεία του κυττάρου. Οι πιο συνηθισμένες αντιδράσεις με χρήση χρωμοφόρων είναι η Φώτο- πρόσθεση και η Φώτο- οξείδωση

6.3 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣ ΜΕ ΙΣΤΟΥΣ

Η αλληλεπίδραση του φωτός με ιστούς μπορεί να γίνεται είτε μέσω ενδοκυττάριων συστατικών που περιλαμβάνονται στον ιστό είτε μέσω έξω-κυττάριων συστατικών που περιέχει ο ιστός .Μέσω της αλληλεπίδρασης του φωτός με τον ιστό μπορούν να υπολογιστούν οι οπτικές ιδιότητες ενός ιστού , μέσω της ικανότητας του να απορροφά να αντανακλά και να σκεδάζει το φως ,έτσι μπορούμε να έχουμε γνώση για τις ιδιότητες του ιστού με την χρήση φωτός και το πως αντιδρά ο ιστός σε αυτό. Επίσης σε ένα ιστό μπορούν να ενεργοποιηθούν διάφορες διεργασίες μέσω του φωτός .Υπάρχει ο αυτοφθορισμός όπου είναι η διαδικασία σύμφωνα με την οποία ενεργοποιούνται από το φως φθορίζουσες ομάδες στον ιστό με αποτέλεσμα στην συνέχεια ο ιστός να φθορίζει .Επιπλέον το φως μπορεί να έχει και θερμική επίδραση στον ιστό. Αυτό σημαίνει πως η επίδραση του ιστού από το

φως είναι εξαρτώμενη από την θερμοκρασία που θα αναπτύξει και όχι από την ενέργεια και το μήκος κύματος του φωτός .Δύο σημαντικοί παράμετροι επηρεάζουν τις θερμικές επιδράσεις του φωτός σε ένα ιστό .Η πρώτη είναι η μέγιστη τιμή της θερμοκρασίας που φτάνει ο ιστός υπό την επίδραση του φωτός και η δεύτερη η εξάπλωση της ζώνης θέρμανσης στον ιστό .Η ζώνη θέρμανσης στον ιστό μπορεί να προκαλέσει τα τέσσερα φαινόμενα

- συγκόλληση
- εξάχνωση
- απανθράκωση
- λιώσιμο

ανάλογα δηλαδή με την ένταση της θερμότητας που δίνουμε στον ιστό μπορούμε να έχουμε κάποιες από τις παραπάνω καταστάσεις—. Η απανθράκωση συμβαίνει σε θερμοκρασίες ιστού πάνω από 150 βαθμούς κελσίου-, η εξάχνωση γίνεται σε θερμοκρασίες 100 βαθμούς κελσίου όπου το νερό εξατμίζεται–, η συγκόλληση γίνεται όταν η θερμοκρασία του ιστού είναι γύρω στους 60 βαθμούς-.

Επίσης υπάρχει η δυνατότητα της Φώτο- εκτομής–, σύμφωνα με την οποία τα διάφορα κυτταρικά και έξω - κυττάρια συστατικά αποσυνθέτονται φωτοχημικά με την χρήση έντονης UV ακτινοβολίας που παράγεται από laser.

Επίσης άν η ενέργεια του φωτός είναι ακόμα πιο μεγάλη και δημιουργηθεί και πλάσμα–, τότε έχουμε την περίπτωση plasma-induced ablation (πλάσμα που προκαλείται από την εκτομή)-.

6.4 ΦΩΤΟ- ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΠΟΥ ΣΥΜΒΑΙΝΟΥΝ ΒΙΟ-ΠΟΛΥΜΕΡΗ

Μια σημαντική και χαρακτηριστική διαδικασία σε βιο- πολυμερή είναι η φωτοσύνθεση όπου τα φυτά στην ουσία χρησιμοποιούν την ηλιακή ενέργεια για να παράγουν ενέργεια-. Υπάρχουν 3 τέτοια πολύ σημαντικά παραδείγματα στην φύση ,το πρώτο και σημαντικό παράδειγμα είναι το παράδειγμα της ροδοψίνης που υπάρχει στους Φώτο- υποδοχείς του ματιού το δεύτερο παράδειγμα είναι τα φωτοσυνθετικά συστήματα που υπάρχουν στους χλωροπλάστες των φυτών και τρίτον είναι η βακτηριοροδοψίνη που υπάρχει στην μωβ μεμβράνη του βακτηρίου halobacterium halobium. Σε κάθε περίπτωση τα βιο - πολυμερή και αυτού του είδους οι αλληλεπιδράσεις ,

έχουνε πολύ υψηλή απόδοση, το πρώτο βήμα που ενεργοποιείται από το φως οδηγεί σε μία σειρά πολύπλοκων βημάτων και στην συνέχεια τα ενδιάμεσα που παράγονται παίρνουν μέρος σε μία πληθώρα διαδικασιών, πολλές από τις οποίες συμβαίνουν στο σκοτάδι και όχι στο φως. Ένα χαρακτηριστικό των παραπάνω αλληλεπιδράσεων είναι ότι συνήθως έχουν κυκλική ροή.

Στο μάτι έχουμε τον αμφιβληστροειδή χιτώνα ο οποίος καλύπτεται από κύτταρα τα οποία είναι από μόνα τους υποδοχείς φωτός, υποδοχείς ευαίσθητοι στο φώς. Το ανθρώπινο μάτι μπορεί να ανιχνεύσει το φως που είναι στο φάσμα στην περιοχή όπου ονομάζεται ορατό, από τα 380 έως τα 760 nm. Επίσης το εσωτερικό του ματιού αποτελείται από δύο είδη φωτο-ευαίσθητων κυττάρων τα οποία είναι τα ραβδία (τα οποία είναι από 100.000.000 έως 120.000.000 στο κάθε μάτι) και τα κονία που είναι 7.000.000 έως 8.000.000. Τα ραβδία είναι πολύ ευαίσθητα στο φως αλλά παρέχουν μόνο μονόχρωμη εικόνα, δηλαδή αποχρώσεις του γκρι, ενώ αντίθετα τα κονία είναι πολύ λιγότερο ευαίσθητα αλλά έχουν την δυνατότητα να ξεχωρίσουν το χρώμα. Τα ραβδία περιέχουν την ροδοψίνη που είναι αυτή που αλληλεπιδρά με το φως και δίνει αυτή την χαρακτηριστική ικανότητα στα κύτταρα αυτά.

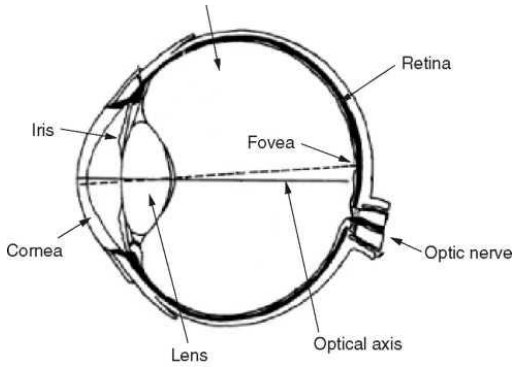
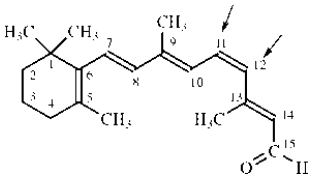


Figure 6.6. Structure of the human eye.

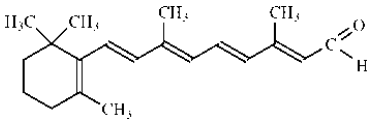
Μορφοποιήθηκε: Αγγλικά (Η.Π.Α.)

Σχήμα 8 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

Τα φωτόνια απορροφούνται από την ροδοψίνη και στην συνέχεια γίνονται μία πληθώρα αντιδράσεων και διεργασιών και αυτή η απορρόφηση της ενέργειας από την ροδοψίνη μεταφέρεται μέσω των νευρώνων που υπάρχουν στον εγκέφαλο και δίνουν την εικόνα. Όταν η ροδοψίνη επιδρά με το φως τότε χημικά έχουμε την μετατροπή που έχουμε ήδη αναφέρει της 11 cis retinal σε all trans retinal.



11-cis-Retinal

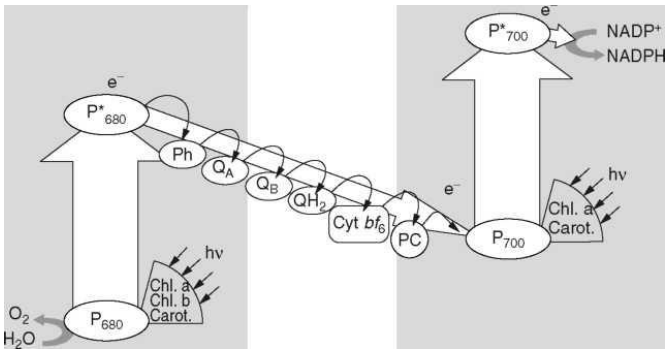


All-trans--Retinal **Figure 6.7. Retinal isomerization under light exposure.**

Επιπλέον όταν η ροδοψίνη αλληλεπιδρά με το φως δημιουργεί και έναν αριθμό ενδιάμεσων μορίων τα οποία απορροφούν το φως σε διαφορετικά μήκη κύματος-.

ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ

Η φωτοσύνθεση συμβαίνει στα φυτά στην άλγη και σε μία ποικιλία βακτηρίων . Κατά την φωτοσύνθεση χρησιμοποιείται ένας μεγάλος αριθμός χρωμοφόρων ομάδων οι οποίες λειτουργούν σαν κεραίες και στην ουσία απορροφούν το φως–. Η ενέργεια διέργεσης από το φως που απορροφάται από τις κεραίες αυτές μεταφέρεται σε κέντρα αντίδρασης σε πολύ μικρό χρόνο–. Υπάρχουν διάφοροι τύποι τέτοιων μορίων-κεραιών που απορροφούν το φως όπως είναι οι χλωροφύλλες τα καροτενοειδή και άλλα τα οποία απορροφούν σε διάφορα μήκη κύματος. Η φωτοσύνθεση είναι μια διαδικασία κυκλική και αυτοκαθοριζόμενη—. Στο παρακάτω σχήμα περιγράφεται η διαδικασία της φωτοσύνθεσης που αποτελείται από δύο ομάδες–, το σύστημα I και το σύστημα II



Σχήμα 9 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

όπου η ακτινοβολία απορροφάται από χλωροφύλλες και καροτενοειδή και μετά στο σύστημα αυτό να μεταφέρεται η ενέργεια μέσω διέργεσης διάφορων άλλων ενδιάμεσων συστατικών στο σύστημα II και κατόπιν στο σύστημα II πάλι έχουμε διέργεση από φως και η ενέργεια αυτή χρησιμοποιώντας ηλεκτρόνια από το νερό που περιλαμβάνεται στον ιστό ανάγει τον NADP+ σε

NADPH το οποίο με την σειρά του χρησιμοποιεί το διοξείδιο του άνθρακα για να το ανάγει σε σάκχαρα-, δηλαδή ενέργεια-.

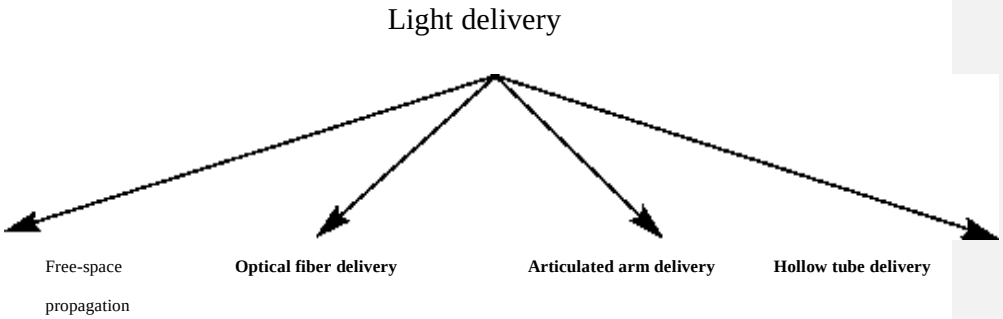
ο χημικός τύπος της παραπάνω περιγραφής της φωτοσύνθεσης είναι :

$$6CO_2 + 6H_2O \text{ ------> } (CH2O)6 + 6O2$$

6.5 ΦΩΤΟΔΙΕΡΓΕΣΗ

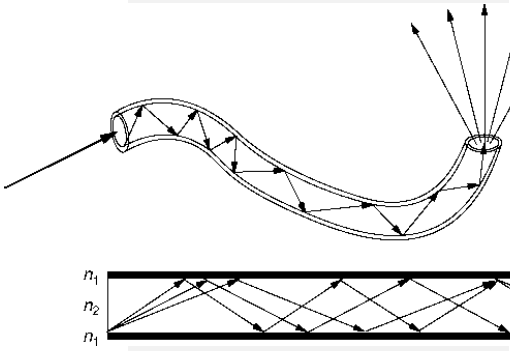
Η Φωτοδιέργεση–, είναι ένας ενεργός τομέας έρευνας–, σε ζωντανούς οργανισμούς χρησιμοποιώντας φασματογραφική ανάλυση , βιο- απεικόνιση , laser–. Στην ενότητα αυτή θα δούμε τρόπους με τους οποίους μπορούμε να μεταφέρουμε το φως που παράγεται από laser σε μία συγκεκριμένη περιοχή του ιστού ή του οργάνου που θέλουμε να επέμβουμε. Υπάρχουν τέσσερεις τρόποι με τους οποίους μπορεί να γίνει αυτή η μεταφορά

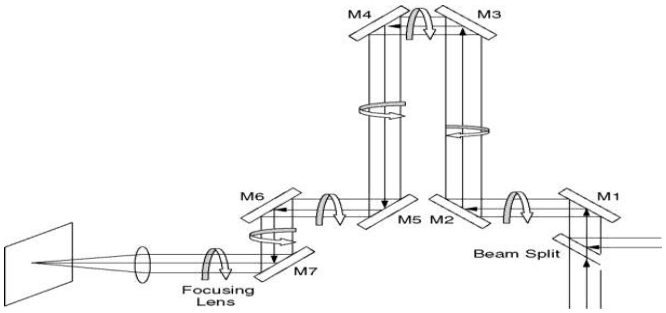
- μετάδοση στο κενό
- μέσω οπτικής ίνας
- μέσω μιας διάταξης (articulated arm delivery)
- κοίλου σωλήνα



Οι **οπτικές ίνες** είναι πολύ λεπτά νήματα από πλαστικό ή γυαλί, με διάμετρο μικρότερη των 8μm όπου από μέσα τους, μεταδίδονται ψηφιακά δεδομένα, υπό μορφή φωτός. Συνήθως τις συναντάμε συγκεντρωμένες σε δέσμες, που

σχηματίζουν τα λεγόμενα οπτικά καλώδια. Ένα καλώδιο οπτικών ινών[1], περιέχει μέσα του δεκάδες ή και εκατοντάδες πολύ λεπτές τέτοιες οπτικές ίνες, με διάμετρο μικρότερη και από μία τρίχα. Με τις ακτίνες λέιζερ, ένα σήμα μπορεί να μεταδοθεί δια μέσου οπτικών ινών σε απόσταση μεγαλύτερη από 50 χλμ.





Σχήμα 10 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

Στην περίπτωση της μεταφοράς του φωτός με– διάταξη βραχίονα που έχει άρθρωση , έχουμε την διάταξη που απεικονίζεται στο παραπάνω σχήμα , όπου περιλαμβάνει κενούς σωλήνες και κάτοπτρα προκειμένου να μεταφερθεί το φως-. Η ακτίνα του φωτός μεταφέρεται μέσω του σωλήνα και αντανακλάται

μέσω ενός καθρέπτη που είναι στην κατάλληλη γωνία. Μολονότι αυτή η συγκεκριμένη διάταξη είναι ογκώδης και ακριβή συγκριτικά με τις οπτικές ίνες , όμως στην παρούσα στιγμή είναι η μοναδική διάταξη που είναι κατάλληλη για να μεταφέρει φως που παράγεται από laser CO_2.

6.6 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ IN VIVO

Η φασματοσκοπία είναι μία ισχυρή τεχνική στις βιοιατρικές επιστήμες και καλύπτει ένα ευρύ φάσμα από μελέτη δομών κυττάρων και ιστών μέχρι και βιολογικές πρακτικές εφαρμογές όπως η πρώιμη διάγνωση του καρκίνου. Κάποιες in vivo φασματοσκοπικές τεχνικές είναι η σκέδαση Raman ο φθορισμός και άλλες.

ΟΠΤΙΚΗ ΒΙΟΨΙΑ

Είναι μία μέθοδος να κάνουμε βιοψία αναίμακτα. Η οπτική βιοψία έχει ως κύρια εφαρμογή την πρώιμη διάγνωση του καρκίνου και έχει τα πλεονέκτημα τα συγκριτικά με την συμβατική βιοψία ότι

- είναι πολύ γρήγορη
- είναι αναίμακτη
- μπορεί να ανιχνεύει ακόμα και μικρούς όγκους
- έχει την δυνατότητα να ανιχνεύει και προ καρκινικές καταστάσεις
-

Με την χρήση ενδοσκοπικών σηματοδοτών μπορούν να ανιχνευτούν καρκίνοι του στομάχου του εντέρου, της κοιλίας, των πνευμόνων και γυναικολογικών(μήτρας ωοθηκών)

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΟΣ ΜΟΝΟ ΜΟΡΙΟΥ

Με την μέθοδο αυτή έχουμε την δυνατότητα με την χρήση του φθορισμού την επισήμανση ενός μόνο βιομορίου ώστε να παρακολουθήσουμε την πορεία του μέσα στον οργανισμό (label)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΒΙΟΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ - ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Η βιοαπεικόνιση χρησιμοποιώντας οπτικές μεθόδους αποτελεί μια σημαντική εφαρμογή της βιοφωτονικής. Οπτική βιοαπεικόνιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη ενός ευρύ φάσματος βιολογικών δειγμάτων, από κύτταρα σε ex vivo δείγματα ιστού, έως την in vivo απεικόνιση ζωντανών αντικειμένων. Η οπτική βιοαπεικόνιση καλύπτει ένα ευρύ φάσμα ως πρός το μέγεθος του υπο εξέταση δείγματος: από μικροκοσμικά μεγέθη όπως ιούς και λογής βακτήρια μέχρι μεγέθη της τάξης ζωντανών βιολογικών ειδών.

Η οπτική βιοαπεικόνιση χρησιμοποιεί μια οπτική αντίθεση όπως είναι η διαφορά στη μετάδοση του φωτός, την αντανάκλαση, και του φθορισμού μεταξύ της περιοχής που πρόκειται να απεικονιστεί και της γύρω περιοχής (φόντο).

Μία μέθοδος βιοαπεικόνισης είναι με την χρήση μικροσκοπικού φθορισμού. Με την χρήση μίας δέσμης laser μπορούμε να διεγείρουμε ένα φωτισμένο σημείο και μετά να σαρώσουμε την συγκεκριμένη περιοχή και να έχουμε την αντίστοιχη απεικόνιση. Επίσης έχουμε και την εστιακή μικροσκοπία, η οποία επιτρέπει σε κάποιον να αποκτήσει τις εικόνες σε διαφορετικά βάθη και έτσι ανακατασκευάσει μια τρισδιάστατη εικόνα ενός βιολογικού δείγματος.

Η οπτική συνεκτική τομογραφία είναι επίσης μία μέθοδος βιοαπεικόνισης, η οποία επιτυγχάνει να έχουμε τρισδιάστατη απεικόνιση ακόμα και για βιολογικά υλικά υψηλής σκέδασης , όπως για παράδειγμα ένα δόντι.

7.1 ΒΙΟΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ,ΕΝΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΟ ΕΡΓΑΛΕΙΟ

Η Βιοϊατρική απεικόνιση έχει γίνει ένα από τα πιο σημαντικά εργαλεία στη φροντίδα υγείας, για τη διάγνωση και τη θεραπεία ασθενειών του ανθρώπου. Η εξέλιξη της ιατρικής απεικόνισης από απλή ακτινογραφία (απεικόνιση ραδιοϊσοτόπου), στην απεικόνιση με ακτίνες X, με τη βοήθεια υπολογιστή (τομογραφία σαρώσεις CAT), την απεικόνιση με υπερήχους, και στην απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (MRI) έχει οδηγήσει σε επαναστατικές

βελτιώσεις στην ποιότητα υγειονομικής περίθαλψης που διατίθενται σήμερα στην κοινωνία μας .

Ωστόσο όλες αυτές οι απεικονίσεις εστιάζονται στην δομή και στην ανατομική απεικόνιση των ιστών και των οργάνων. Για να έχουμε έγκαιρη διάγνωση για ασθένειες όπως ο καρκίνος η ακόμα και για να εφαρμόσουμε θεραπείες που να καθοδηγούνται από την απεικόνιση ,χρειάζεται να αναπτύξουμε μεθόδους απεικόνισης σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο .Τότε μόνο όλα τα παραπάνω θα είναι εφικτά να γίνουν πραγματικότητα .Μόνο αν έχουμε πληροφορίες σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο θα μπορούμε να έχουμε διάγνωση σε έγκαιρο επίπεδο μιας ασθένειας.

Όλες αυτές οι δυνατότητες απεικόνισης που έχουμε, δηλαδή x-ray (ακτινογραφία), ct scan (αξονική τομογραφία), απεικόνιση ultrasound (υπέρηχοι) , MRI (μαγνητικός τομογράφος) έχουν κάποιους περιορισμούς

- βλαβερές συνέπειες της ακτινοβολίας στις περιπτώσεις που έχουμε χρήση x-ray, όπως στην ακτινογραφία και στον αξονικό τομογράφο
- νεαροί ασθενείς δεν μπορούν λόγω του νεαρού της ηλικίας τους να έρθουν σε επαφή με τις ακτίνες Χ και επίσης οι τεχνικές απεικόνισης με αυτή την μέθοδο πολλές φορές δεν έχουν την ικανότητα να κάνουν διάκριση ανάμεσα στους καλοήθης και κακοήθης καρκίνους
- ανικανότητα του μαγνητικού τομογράφου να μας προσφέρει συγκεκριμένες χημικές πληροφορίες ή οποιαδήποτε δυναμική πληροφορία (αλλαγές που συμβαίνουν σε πραγματικό χρόνο ή ανταπόκρισης στη θεραπεία ή σε ένα ερέθισμα)
- αδυναμία των υπερήχων για να παρέχει ανάλυση μικρότερη των χιλιοστών, καθώς και να γίνεται διάκριση μεταξύ καλοήθους και κακοήθους όγκου
-

Η οπτική απεικόνιση ξεπερνά πολλές από αυτές τις ελλείψεις–. Αντίθετα με αυτό που νομίζουν πολλοί–, ότι το φως δεν διαπερνά το δέρμα, ειδικότερα η IR ακτινοβολία διεισδύει μέσα στους ιστούς–. Επιπλέον με την χρήση ενός ελάχιστα επεμβατικού ενδοσκοπικού οπτικού συστήματος με οπτικές ίνες μπορούμε να φτάσουμε σε πολλά όργανα και ιστούς για να έχουμε οπτική απεικόνιση-.

Η οπτική απεικόνιση χρησιμοποιεί την χωρική μεταβολή των οπτικών ιδιοτήτων —ενός βιολογικού είδους ,όπως ένα κύτταρο ένας ιστός ή ακόμα ένας ολόκληρος ζωντανός οργανισμός-. Οι οπτικές ιδιότητες μπορεί να είναι η αντανάκλαση , η σκέδαση–, η απορρόφηση και ο φθορισμός–. Αξιολογώντας τις χωρικές μεταβολές των οπτικών αυτών χαρακτηριστικών μπορούμε να αποκτήσουμε οπτική εικόνα-.

–Η χρήση του λέιζερ ως μια έντονη και εύχρηστη πηγή φωτός για να δημιουργήσει μια οπτική απόκριση, είτε ανάκλασης, μετάδοσης, ή εκπομπής, έχει επεκτείνει σημαντικά τα όρια της οπτικής απεικόνισης, καθιστώντας τη την —πιο ισχυρή τεχνική για βασικές μελέτες, καθώς και για κλινικές διαγνώσεις. Μερικά από τα οφέλη που προσφέρονται από την οπτική απεικόνιση είναι

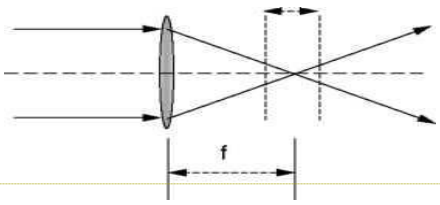
- δεν είναι επιβλαβής
- απεικόνιση τάξης μεγέθους των 100nm έως και μακροσκοπικά αντικείμενα
- πολυδιάστατη απεικόνιση χρησιμοποιώντας την μετάδοση την αντανάκλαση και τον φθορισμό σε συνδυασμό με φασματοσκοπικές πληροφορίες
- απεικόνιση δειγμάτων in vitro , in vivo και ex vivo
- πληροφορίες για τις κυτταρικές διεργασίες και την χημεία των ιστών με φασματική και δυναμική απεικόνιση

- ικανότητα να συνδυάσουμε την οπτική απεικόνιση με άλλες τεχνικές απεικόνισης όπως είναι οι υπέρηχοι
- ευαισθησία και επιλεκτικότητα για την απεικόνιση μοριακών γεγονότων

7.2 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Κοινό μικροσκόπιο

Ένα απλό μικροσκόπιο δεν είναι τίποτα, αλλά από ένας μεγεθυντικός φακός. Ο πρώιμος σχεδιασμός ενός μικροσκοπίου είχε ένα μόνο φακό τοποθετημένο σε μεταλλική πλάκα με βίδες για να κινηθεί το δείγμα σε όλο το πεδίο και να εστιάσει στην εικόνα . Η έννοια του σχηματισμού εικόνας από ένα φακό



Σχήμα 11 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

δείχνεται στο παραπάνω σχήμα. Ένας φακός στηρίζεται στο φαινόμενο της διάθλασης και είναι διαμορφωμένο έτσι ώστε οι ακτίνες του φωτός κοντά στο κέντρο δύσκολα να διαθλώνται και εκείνων στην περιφέρεια να διαθλώνται σημαντικά (Born και Wolf, 1999). Μία παράλληλη δέσμη φωτός που περνάει από ένα κυρτό φακό εστιάζεται σε ένα σημείο.

Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: (Προεπιλεγμένη) Arial, 12 pt

Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά

Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά

Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά

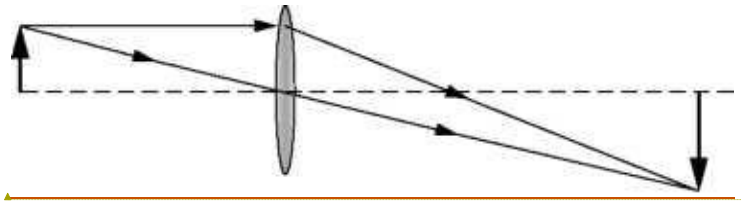
Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά

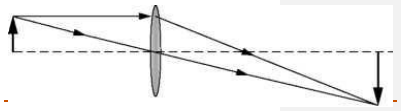
Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά

Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά

Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά

Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά





Σχήμα 12 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

Η απόσταση από το κέντρο του φακού προς το σημείο εστίασης είναι γνωστό ως η εστιακή απόσταση του φακού (f). Όπως απεικονίζεται στο σχήμα, αν ένα αντικείμενο τοποθετείται στη μία πλευρά του φακού σε απόσταση u από αυτό, μια πραγματική εικόνα του αντικειμένου σχηματίζεται στην άλλη πλευρά του φακού σε απόσταση v. Η εικόνα που σχηματίζεται θα είναι μία μεγεθυμένη εικόνα, με συντελεστή μεγέθυνσης M = (ύψος εικόνας) / (ύψος αντικείμενο), η οποία με τη σειρά της είναι ίση με την αναλογία της απόστασης εικόνας προς την απόσταση του αντικειμένου (v / u). Σε ένα μικροσκόπιο, το αντικείμενο τοποθετείται στο εστιακό επίπεδο του και σχηματίζει μία μεγεθυμένη εικόνα, η οποία μπορεί είτε να παρατηρηθεί από τα μάτια ή να καταγραφεί από μια φωτογραφική μηχανή. Το αντικείμενο πρέπει να τοποθετείται κοντά στο εστιακό επίπεδο, εντός μικρής εμβέλειας γνωστή ως το βάθος της εστίασης, για να ληφθεί μια μεγεθυμένη εικόνα.

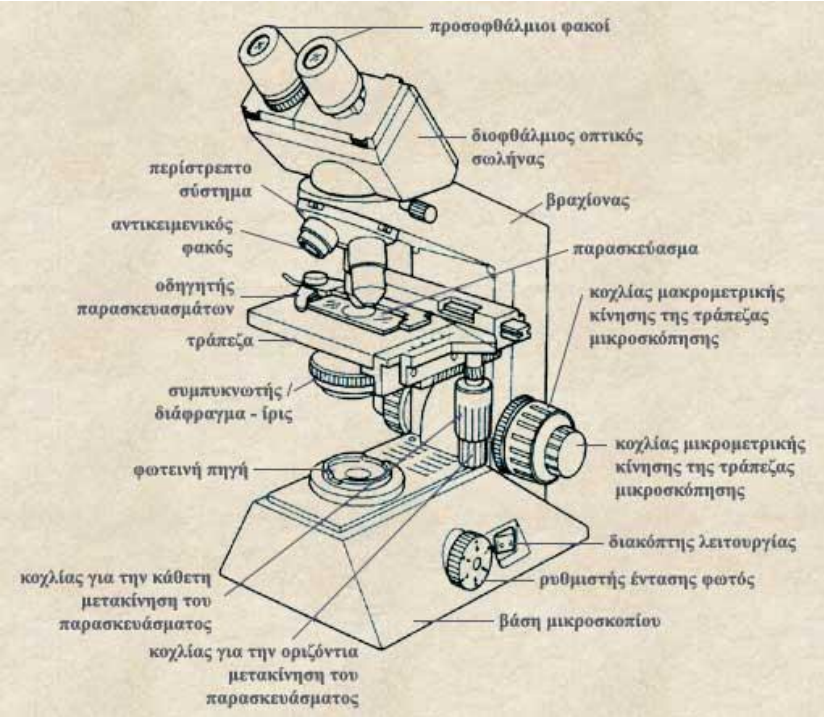
Μορφοποιήθηκε: Γραμματοσειρά: (Προεπιλεγμένη) Arial, 12 pt

Οπτικό ή σύνθετο μικροσκόπιο

Ένα από τα πιο διαδεδομένα μέσα μικροσκοπίας είναι το οπτικό ή σύνθετο μικροσκόπιο. Η πρώτη του μορφή εφευρέθηκε από τους Ολλανδούς αδελφούς Johann και Zaccharias Jansen το 1590 ενώ στη σημαντική βελτίωση και διάδοσή του συνέβαλε σημαντικά ο Άγγλος επιστήμονας Robert Hooke στα τέλη του δέκατου έβδομου αιώνα

Σχήμα 13 (πηγή : http://kpe-kastor.kas.sch.gr/ergastiriakos_odigos/introduction/optical.htm)

Το κύριο τμήμα του σύνθετου μικροσκοπίου είναι το οπτικό σύστημα, η λειτουργία του οποίου υποστηρίζεται από το μηχανικό σύστημα του οργάνου



Σχήμα 14 (πηγή : http://kpe-kastor.kas.sch.gr/ergastiriakos_odigos/introduction/optical.htm)

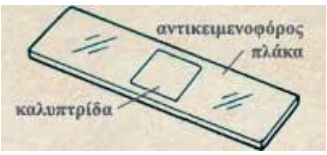
Το οπτικό σύστημα αποτελείται από δύο συγκλίνοντες ομοαξονικούς φακούς, τον αντικειμενικό και τον προσοφθάλμιο. Το μικροσκοπικό παρασκεύασμα τοποθετείται σε μικρή απόσταση από την εστία του αντικειμενικού φακού σχηματίζοντας είδωλο πραγματικό, ανεστραμμένο και με μέγεθος αντιστρόφως ανάλογο με την απόσταση ανάμεσα στο αντικείμενο και την εστία. Ο προσοφθάλμιος φακός, μέσω του οποίου γίνεται η μικροσκοπική παρατήρηση, μεγενθύνει το παραπάνω είδωλο.

Το μηχανικό σύστημα του μικροσκοπίου συγκροτείται από: α) τη βάση στήριξης του οργάνου, β) την τράπεζα, όπου τοποθετείται το αντικείμενο μικροσκόπησης, γ) το βραχίονα με τους κοχλίες μετακίνησης της τράπεζας και δ) τον οπτικό σωλήνα.

Στον οπτικό σωλήνα προσαρμόζεται το σύστημα των φακών, οι προσοφθάλμιοι και οι αντικειμενικοί. Η εναλλαγή των προσοφθάλμιων φακών εξασφαλίζεται με τη μετακίνηση του περίστρεπτου.

Η μεγέθυνση που επιτυγχάνουν οι φακοί κυμαίνεται μεταξύ 6x και 25x για τους προσοφθάλμιους και 2,5x έως 100x για τους αντικειμενικούς. Η συνολική μεγέθυνση που εξασφαλίζει το μικροσκόπιο ισούται εμπειρικά με το γινόμενο των δυνατοτήτων μεγέθυνσης των δύο φακών.

Το αντικείμενο της μικροσκοπικής παρατήρησης, παρασκεύασμα, τοποθετείται σε μια μικρή (επιφάνειας 25_x_75mm και πάχους 1 ή 2 mm συνήθως) γυάλινη πλάκα την αντικειμενοφόρο πλάκα



.-Αντικειμενοφόρος πλάκα - Καλυπτρίδα

Σχήμα 15 (πηγή : http://kpe-kastor.kas.sch.gr/ergastiriakos_odigos/introduction/optical.htm)

Η παρατήρηση των μικροσκοπικών παρασκευασμάτων γίνεται είτε άμεσα (παρατήρηση ζωντανού οργανισμού ή δομών του στη φυσική τους κατάσταση) είτε μετά από στερέωση (νέκρωση) ή και χρώση του υλικού. Στην πρώτη περίπτωση τα παρασκευάσματα χαρακτηρίζονται ως προσωρινά ενώ στη δεύτερη ως μόνιμα.

Μικροσκοπικά παρασκευάσματα που προέρχονται από ζωντανούς οργανισμούς (μικροσκοπικοί πολυκύτταροι οργανισμοί, μονοκύτταροι οργανισμοί, κύτταρα οργανισμών) περιέχουν νερό σε μεγάλο ποσοστό με αποτέλεσμα να είναι σχεδόν αόρατα αν παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο χωρίς καμιά ιδιαίτερη επεξεργασία. Για να γίνουν τα παραπάνω παρασκευάσματα ορατά στο οπτικό μικροσκόπιο εφαρμόζονται κατάλληλες τεχνικές χρώσεις. Μια μεγάλη ποικιλία χρωστικών μπορεί να χρησιμοποιηθεί

για τη χρώση προσωρινών ή μόνιμων παρασκευασμάτων ενώ ταυτόχρονα υπάρχουν δυνατότητες για επιλεκτική χρώση συγκεκριμένων τμημάτων του παρασκευάσματος.

Για τη μεγαλύτερη οπτική ευκρίνεια και την ομοιόμορφη κατανομή του παρασκευάσματος χρησιμοποιούνται μικρά (μήκους 18 ή 22 mm και πάχους 0,15-0,22 mm συνήθως) γυάλινα πλακίδια, καλυπτρίδες, που τοποθετούνται πάνω από το αντικείμενο.

Η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετείται στην τράπεζα μικροσκόπησης και συγκρατείται με το άγκιστρο του οδηγητή. Η μετακίνηση του παρασκευάσματος εξασφαλίζεται με ένα σύστημα κοχλίων προς δύο κατευθύνσεις κάθετες μεταξύ τους. Μετακινώντας κατάλληλα τους παραπάνω κοχλίες το παρασκεύασμα οδηγείται πάνω από το κυκλικό άνοιγμα της τράπεζας.

Για την εστίαση του αντικειμένου στην κατάλληλη απόσταση, μετακινείται κατακόρυφα είτε η τράπεζα είτε ο οπτικός σωλήνας. Προηγείται κίνηση με τον κοχλία μακρομετρικής μετακίνησης της τράπεζας, που εξασφαλίζει μικρή μεγέθυνση και ακολουθεί η χρήση του μικρομετρικού κοχλία για μεγαλύτερη μεγέθυνση.

Ο φωτισμός του αντικειμένου εξασφαλίζεται από ένα λαμπτήρα ενσωματωμένο στη βάση του μικροσκοπίου. Κάτω από το κυκλικό άνοιγμα της τράπεζας, μέσω του οποίου το φως φτάνει στο παρασκεύασμα, βρίσκεται ένα σύνθετο σύστημα (σύστημα Abbe) που συγκροτείται από το συμπυκνωτή και το διάφραγμα - ίριδα και συνοδεύεται συνήθως από έναν φορέα φίλτρων.

Το διάφραγμα - ίρις, διάφραγμα με μεταβαλλόμενη διάμετρο, επιτρέπει την αυξομείωση του φωτισμού ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο αντικειμενικό φακό, το πάχος του υλικού παρατήρησης κ.ά. εξασφαλίζοντας έτσι τον ομοιόμορφο φωτισμό του παρασκευάσματος.

Ο συμπυκνωτής αποτελείται από ένα σύστημα φακών με διαφορετικό δείκτη διάθλασης και σχετική ανεξαρτησία κινήσεων, έτσι ώστε ο κατάλληλος στην

κάθε περίπτωση συνδυασμός τους να εξασφαλίζει τη διέλευση όσο το δυνατόν περισσότερων φωτεινών ακτίνων μέσα από το υλικό μικροσκόπησης. Απουσία συμπυκνωτή ένα μεγάλο μέρος των ακτίνων εκτρέπεται με αποτέλεσμα ο φωτισμός του αντικειμένου να είναι μειωμένος και το είδωλο λιγότερο ευκρινές.

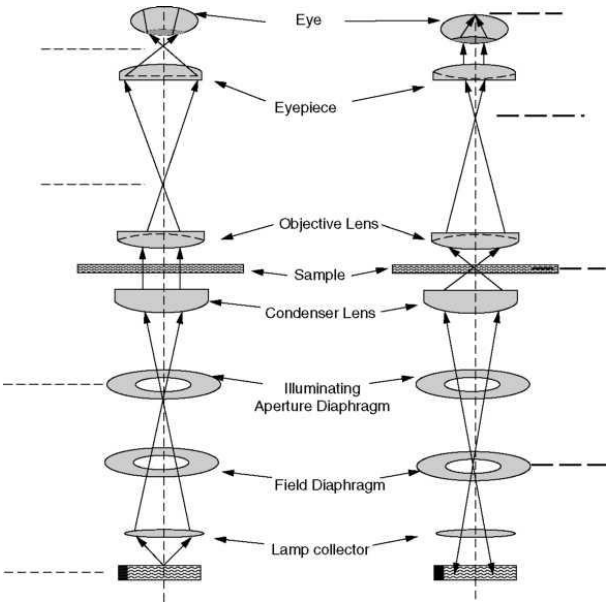
Σε κάθε παρασκεύασμα ανάμεσα στην αντικειμενοφόρο πλάκα και στην καλυπτρίδα παρεμβάλλεται ένα λεπτό στρώμα αέρα που αυξάνει την εκτροπή των φωτεινών ακτίνων δυσχεραίνοντας τη μικροσκοπική παρατήρηση. Προς αποφυγή του παραπάνω προβλήματος τα αντικείμενα μικροσκόπησης παρατηρούνται μέσα σε σταγόνες νερού ή άλλου υγρού. Κατά τη μικροσκόπηση με φακούς μεγάλης ισχύος χρησιμοποιείται υγρό καταδύσεως (έλαιο) με μεγάλο δείκτη διάθλασης, το οποίο παρεμβάλλεται ανάμεσα στο αντικείμενο και τον αντικειμενικό φακό, έτσι ώστε να περιορίζεται η εκτροπή των ακτίνων και να αυξάνεται η διακριτική ικανότητα.

ΦΩΤΙΣΜΟΣ KOHLER

Ένα σωστά ρυθμισμένο σύστημα φωτισμού Köhler εξασφαλίζει καλή αντίθεση επειδή φωτίζεται μόνο η περιοχή του παρασκευάσματος που παρατηρούμε και έτσι δεν υπάρχουν «αδέσποτες» φωτεινές ακτίνες.

Αυτό το σύστημα φωτισμού δίνει καλύτερη εικόνα όσον αφορά στην αντίθεση, δεν υπάρχει όμως διαφορά στη διακριτική ικανότητα συγκρινόμενο με το απλό σύστημα φωτισμού όπου εστιάζεται η σημειακή πηγή.

Η διάταξη για την όλη παραπάνω διαδικασία φαίνεται στο παρακάτω σχήμα



Σχήμα 16 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

ΟΠΤΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΝΟΧΗΣ

Η Οπτική Τομογραφία Συνοχής (Optical Coherence Tomography - OCT) είναι μια τεχνολογία που χρησιμοποιείται ευρέως σαν μια μέθοδος μη επεμβατικής βιοϊατρικής απεικόνισης. Είναι μια τεχνολογία υψηλής ευκρίνειας για απεικόνιση της διατομής της εσωτερικής μικροδομής βιολογικών ιστών. Η OCT είναι σχετικά πρόσφατη, με τις πρώτες αναφορές για χρήση της τεχνολογίας αυτής να γίνονται στις αρχές της δεκαετίας του ’90. Από τότε η τεχνολογία βελτιώνεται και εξελίσσεται, με αποτέλεσμα να βρίσκει συνεχώς

καινούργιες εφαρμογές κυρίως σε ιατρικές διαγνωστικές εφαρμογές. Ο συμβατικός τρόπος που γίνεται μέχρι σήμερα μια ιατρική διάγνωση απαιτεί την αφαίρεση του ιστού και έπειτα μια διαδικασία ανάλυσης του με μικροσκόπιο για να εξαχθούν συμπεράσματα.

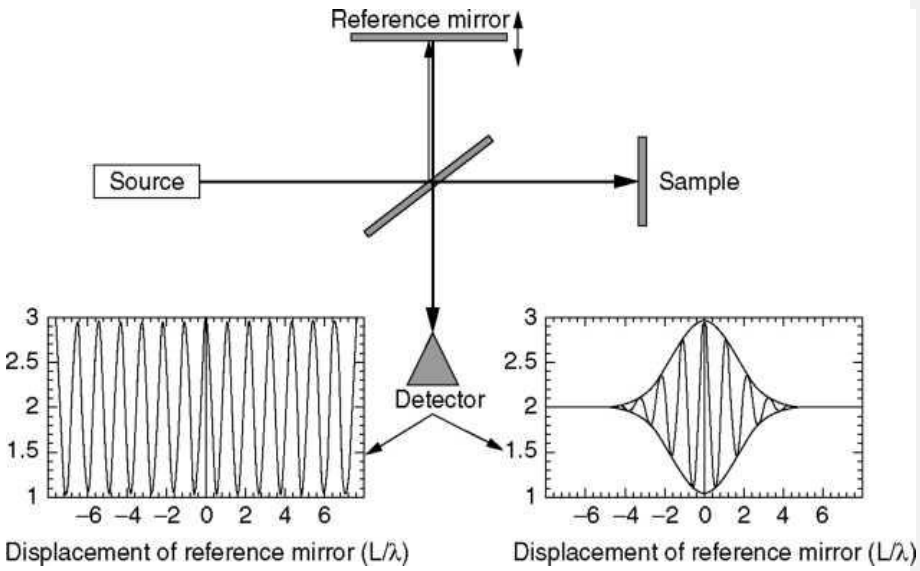
Η OCT δίνει τη δυνατότητα να παρθούν εικόνες του παθολογικού ιστού επιτόπου (in situ) και σε πραγματικό χρόνο – (real time). Ακόμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε περιπτώσεις όπου η υπάρχουσα πρότυπη βιοψία είναι επικίνδυνη ή και αδύνατη .Η τεχνολογία OCT είναι ανάλογη με την τεχνολογία απεικόνισης με υπέρηχους με τη διαφορά ότι η OCT χρησιμοποιεί φώς αντί για ήχο. Γι' αυτό συχνά χρησιμοποιείται η δεύτερη τεχνολογία σαν ένα μέτρο σύγκρισης της πρώτης. Μια σύγκριση της OCT με τη συμβατική τεχνολογία υπέρηχων δείχνει ότι μπορεί να επιτευχθεί μια ή δύο τάξεις μεγέθους ψηλότερη ανάλυση εικόνας από 1 μέχρι 15 μm

.

Γενική αρχή λειτουργίας

Η λειτουργία της OCT είναι βασισμένη στο φαινόμενο της συμβολής λόγω συμφωνίας των κυμάτων και πιο συγκεκριμένα στη συμφωνία μικρού μήκους. Η OCT έχει τη δυνατότητα να πετυχαίνει υψηλή ευκρίνεια βάθους, κάτι το οποίο προσδιορίζεται από το μήκος συμφωνίας της πηγής. Αυτό είναι το μήκος στο οποίο δύο δέσμες φωτός μπορούν να παραμείνουν σε συμφωνία. Φαινόμενο συμβολής μπορεί να παρατηρηθεί μόνο μέσα στο μήκος συμφωνίας της πηγής. Χρησιμοποιώντας πηγές με πάρα πολύ μικρό μήκος συμφωνίας, είναι εφικτή η ευκρίνεια βάθους του ιστού σε μικρομετρικές (μm) τάξεις. Αυτό είναι και ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά της OCT. Στο πάνω μέρος της εικόνας φαίνεται ένας μετρητής συμβολής τύπου Michelson.

Μορφοποιήθηκε: Ελληνικά



Σχήμα 17 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

Δέσμη φωτός από την πηγή φτάνει στον διαχωριστή δέσμης. Το ένα από τα δύο σήματα που συμμετέχουν στη συμβολή είναι εσωτερικό και ονομάζεται δέσμη αναφοράς (reference beam) και κατευθύνεται μέσω του διαχωριστή δέσμης στον καθρέφτη αναφοράς. Το άλλο σήμα είναι αυτό που προσπίπτει στο δείγμα και ονομάζεται δέσμη δείγματος (sample beam). Οι δέσμες θα ανακλαστούν από το καθρέφτη αναφοράς και τον ιστό αντίστοιχα, και θα επιστρέψουν και πάλι στον διαχωριστή δέσμης, εκεί όπου θα επανασυνδυαστούν. Ο συνδυασμός του θα κατευθυνθεί προς τον φωτοανιχνευτή.

Όταν δύο ακτίνες φωτός συνδυαστούν, αυτά που συνιστούν τη συμβολή είναι τα πεδία τους παρά τα μέτρα τους. Ο φωτοανιχνευτής μετρά τις αυτοσυσχετίσεις των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων των δύο ακτινών και όχι τις εντάσεις τους και με αυτό τον τρόπο μπορεί να παρατηρεί συμβολές. Αφού έχει χρησιμοποιηθεί μικρό μήκος συμφωνίας στη πηγή, τότε συμβολή θα συμβεί μόνο εάν το μήκος του

μονοπατιού αναφοράς και το μήκος του μονοπατιού του δείγματος συμπίπτουν εντός αυτού του μήκους συμφωνίας της πηγής. Αν λόγου χάρη ο καθρέφτης μετακινηθεί έτσι ώστε να μεγαλώνει το μήκος του μονοπατιού αναφοράς, τότε συμβολή θα γίνει μεταξύ της δέσμης αναφοράς και της δέσμης του δείγματος που να έχει ανακλαστεί από πιο μεγάλο βάθος του ιστού. Έτσι τα δύο μονοπάτια (αναφοράς και δείγματος) θα ισούνται. Σε κάθε περίπτωση, για να μπορεί να απεικονιστεί το δείγμα πρέπει να μετριέται και η ένταση της ανακλώμενης δέσμης αλλά και η χρονική καθυστέρηση της. Η προσπίπτουσα δέσμη σαρώνεται στην εγκάρσια κατεύθυνση, και για να μπορεί να απεικονιστεί η διατομή του δείγματος σε δύο διαστάσεων εικόνα, πρέπει να σαρωθούν αρκετές δέσμες από διαφορετικές θέσεις στην εγκάρσια κατεύθυνση.

7.3 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Η μικροσκοπία φθορισμού μπορεί να εφαρμοστεί σε ζωντανά ή μονιμοποιημένα κύτταρα.

κλασικές τεχνικές και εφαρμογές

-Μικροσκοπία φθορισμού ευρέως πεδίου

-Συνεστιακή Μικροσκοπία

- Εντοπισμός μακρομορίων (πρωτεΐνες , μεταβολιτές κ.α.) στο κύτταρο

-Παρατήρηση δομών , όπως μεμβράνες , κυτταροσκελετός , χρωματίνη , λυσοσσώματα και άλλα.

-Μελέτη κίνησης μακρομορίων, κυστιδίων και κυττάρων

-Μελέτη κυτταρικών λειτουργιών όπως απόπτωση–, κυτταρική διαίρεση , ενδοκύτωση , εξωκύτωση ,κυτταρική διήθηση ,μετάσταση κ.α.

Εξειδικευμένες εφαρμογές

-FRAP(fluorescence recovery after photobleaching και photoactivation)

- Μελέτη πολύ δυναμικών διαδικασιών (διάχυση και κίνηση μακρομορίων)

-FRET(fluorescence resonance energy transfer)

FLIM(fluorescence lifetime imaging)

- Μελέτη αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών

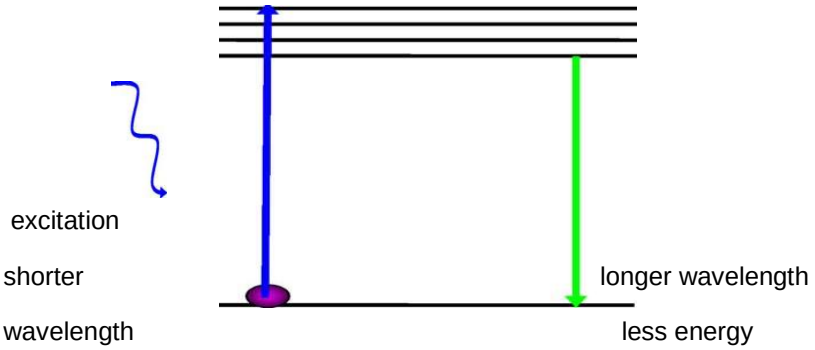
-TIRF(total internal reflection fluorescence)

- Μελέτη δομών του κυτταροσκελετού με μεγάλη ευαισθησία .

Στη μικροσκοπία φθορισμού μακρομόρια του κυττάρου (–πρωτεΐνες, DNA) σημαίνονται με ειδικές φθορίζουσες χρωστικές και παρατηρούνται ως διαφορετικά χρώματα στο μικροσκόπιο φθορισμού-.

Ανάλογα με το είδος του μικροσκόπιου φθορισμού—, μπορούμε να παρατηρήσουμε ταυτόχρονα 1.2 ή 3 φθορίζουσες χρωστικές(χρώματα).

Φθορισμός



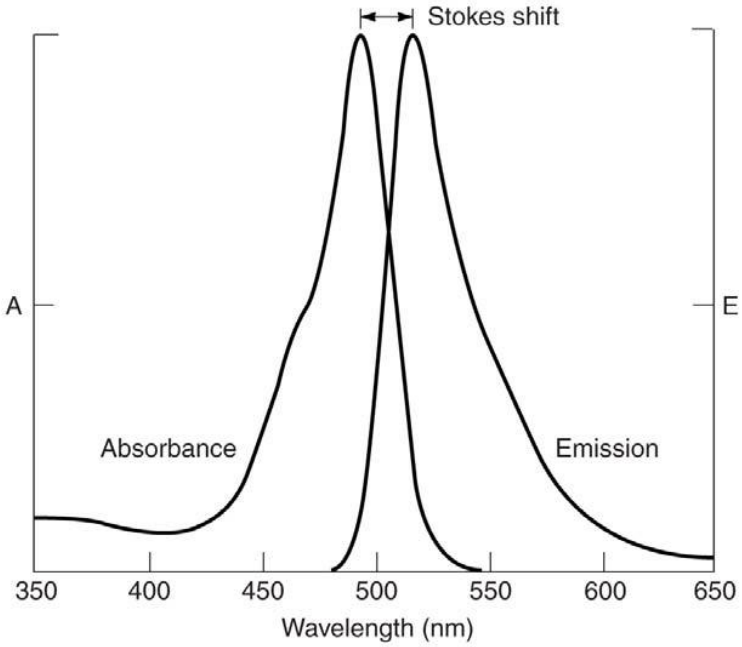
Σχήμα 18 (πηγή: http://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy5.pdf)

Μορφοποιήθηκε: Αγγλικά (Η.Π.Α.)

Μορφοποιήθηκε: Αγγλικά (Η.Π.Α.)

Άτομα ή μόρια διεγείρονται από ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, δηλαδή απορροφούν ενέργεια με αποτέλεσμα ηλεκτρόνια αυτών να μετακινούνται σε υψηλότερη ενεργειακή στοιβάδα. Κατά την επαναφορά των ηλεκτρονίων αυτών στη βασική στοιβάδα εκπέμπεται ακτινοβολία (φθορισμού) μεγαλύτερου μήκους κύματος (μικρότερης ενέργειας $E=hc/\lambda$) .Ο χρόνος μεταξύ απορρόφησης και εκπομπής κατά το φθορισμό είναι 10^{-9} - 10^{-12} seconds .

ΦΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΚΠΟΜΠΗΣ ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ

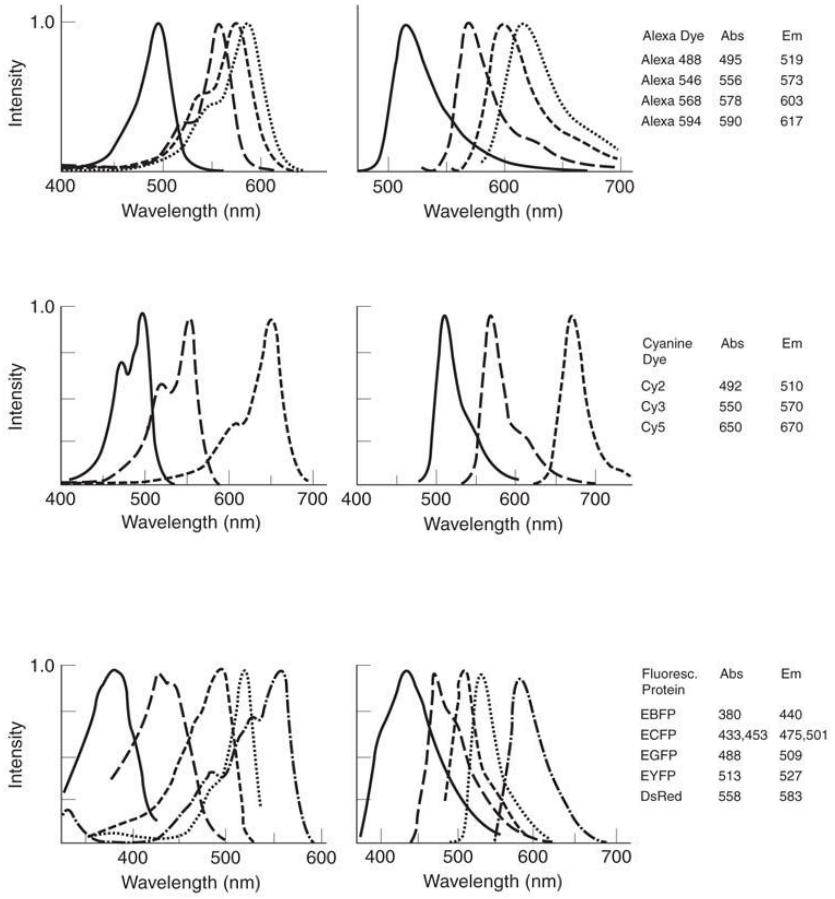


Σχήμα 19 (πηγή: http://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy5.pdf)

- Μόρια τα οποία μπορούν να φθορίζουν ονομάζονται φθορίζοντα μόρια /χρωστικές
- Κάθε φθορίζουσα ουσία έχει χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης / εκπομπής ακτινοβολίας τα οποία εξαρτώνται από την δομή των ατόμων και των ηλεκτρονίων αυτής-.
- Παρατηρείται διαφορά μεταξύ των μέγιστων μηκών κύματος απορρόφησης και εκπομπής (strokes shift)

Επικάλυψη φασμάτων απορρόφησης και εκπομπής φθοριζόντων μορίων

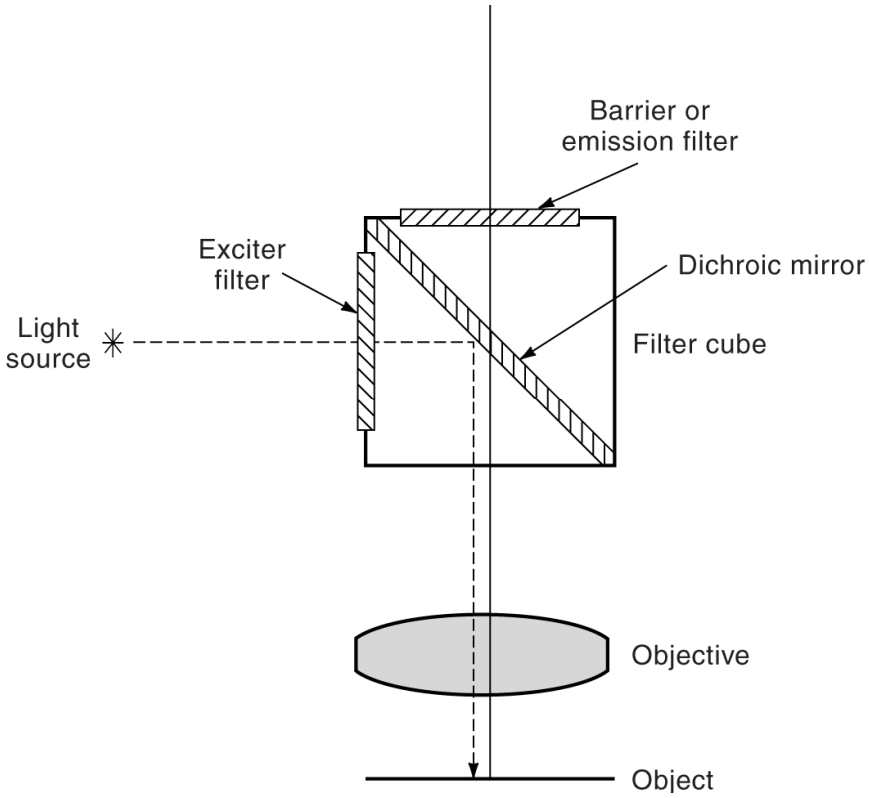
απορρόφηση εκπομπή



Σχήμα 20 (πηγή: http://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy5.pdf)

Ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος δύναται να απορροφηθεί από περισσότερες από μία φθορίζουσες ουσίες και να τις διεγείρει .Συχνά υπάρχει επικάλυψη μεταξύ φασμάτων εκπομπής διαφορετικών φθοριζόντων ουσιών .Όταν χρησιμοποιούμε περισσότερες από μία φθορίζουσες χρωστικές για να σημάνουμε τα μακρομόρια προσπαθούμε να επιλέξουμε συνδυασμούς χρωστικών που έχουν όσο περισσότερο γίνεται διακριτά φάσματα εκπομπής .

Διατάξεις φωτισμού και φίλτρων στο μικροσκόπιο φθορισμού



Σχήμα 21 (πηγή: http://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy5.pdf)

1) φωτεινή πηγή (light source)

2) exciter(excitation) filter

3)dichroic mirror(beamsplitter)

4)emission filter

5)αντικειμενικός φακός υψηλής ποιότητας και NA για μεγιστοποίηση διακριτού ορίου και αντίθεσης

6)Για αποτελεσματική μικροσκόπηση , η φωτεινή πηγή και ο αντικειμενικός φακός ευρίσκονται στην ίδια πλευρά του παρασκευάσματος .Αυτή η διάταξη παροχής φωτός ονομάζεται epilluminator -.

- ο αντικειμενικός φακός λειτουργεί ως πυκνωτής και διοχετεύει φως στο παρασκεύασμα , αλλά και ως φακός συλλέγοντας από το δείγμα τη φθορίζουσα ακτινοβολία

ΦΩΤΕΙΝΕΣ ΠΗΓΕΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

-Στην μικροσκοπία φθορισμού χρησιμοποιούνται φωτεινές πηγές μεγάλης έντασης διότι μόνο ένα στενό φάσμα μηκών κύματος χρησιμοποιούνται για να διεγείρουν το χρωμοφόρο-. Συνήθως χρησιμοποιούνται λάμπες Υδραργύρου (Hg) ή Ξένου (Xe)-.

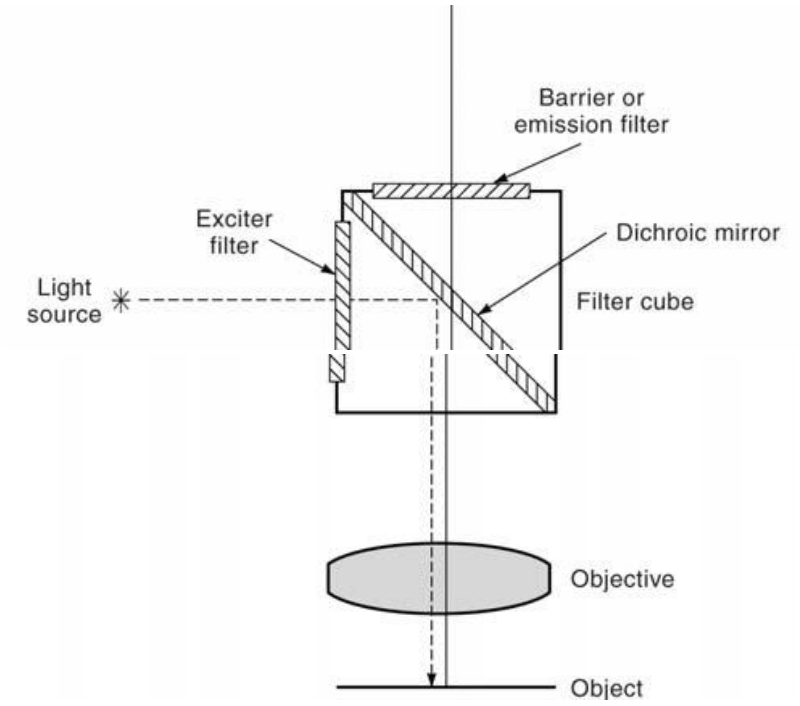
ΦΙΛΤΡΑ

Χρησιμοποιούνται για την απομόνωση ακτινοβολιών συγκεκριμένων μήκων κύματος καθώς επίσης προστατεύουν το δείγμα από ακτινοβολία UV και υπέρυθρη από την πηγή φωτισμού. Όταν χρησιμοποιούμε περισσότερες της μίας—, φθορίζουσες χρωστικές—, μπορεί τα φάσματα απορρόφησης και εκπομπής των χρωστικών να επικαλύπτονται με αποτέλεσμα να πρέπει να τα διαχωρίσουμε.

ΔΙΧΡΟΙΚΟΣ ΚΑΘΡΕΠΤΗΣ

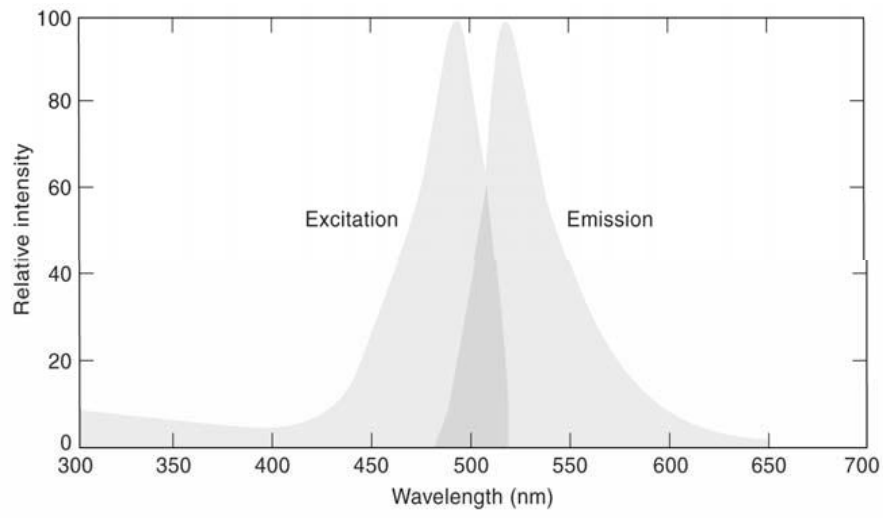
Είναι ένα ειδικό υψηπερατό φίλτρο ειδικά σχεδιασμένο ώστε να επιτρέπει τη διέλευση ακτινοβολιών συγκεκριμένων μηκών κύματος και να αντανακλά τις υπόλοιπες-. Τοποθετείται σε γωνία 45 μοιρών ως προς τον οπτικό άξονα του δείγματος.

-Επίσης αντανακλά το φως διέργεσης (μικρότερου μήκους κύματος) σε γωνία 90 μοιρών ως προς την πρόσπτωση και το κατευθύνει προς το δείγμα ενώ επιτρέπει τη διέλευση της ακτινοβολίας φθορισμού (μεγαλύτερου μήκους κύματος) η οποία δεσμεύεται απο τον αντικειμενικό φακό για τη δημιουργία εικόνας-.

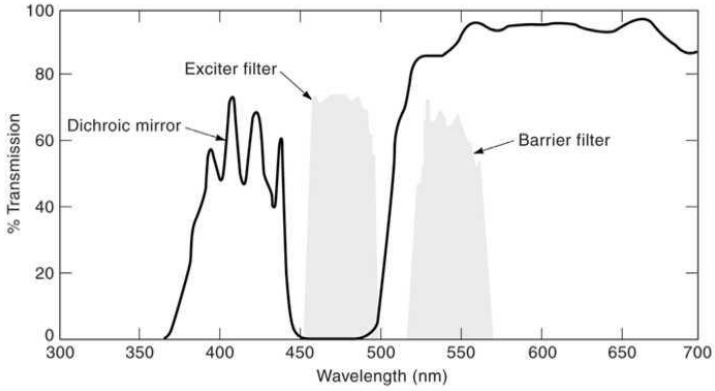


Σχήμα 22 (πηγή: http://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy5.pdf)

ΦΙΛΤΡΑ ΦΩΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΑ ΧΡΩΣΤΙΚΗ fluorescein(FITC)



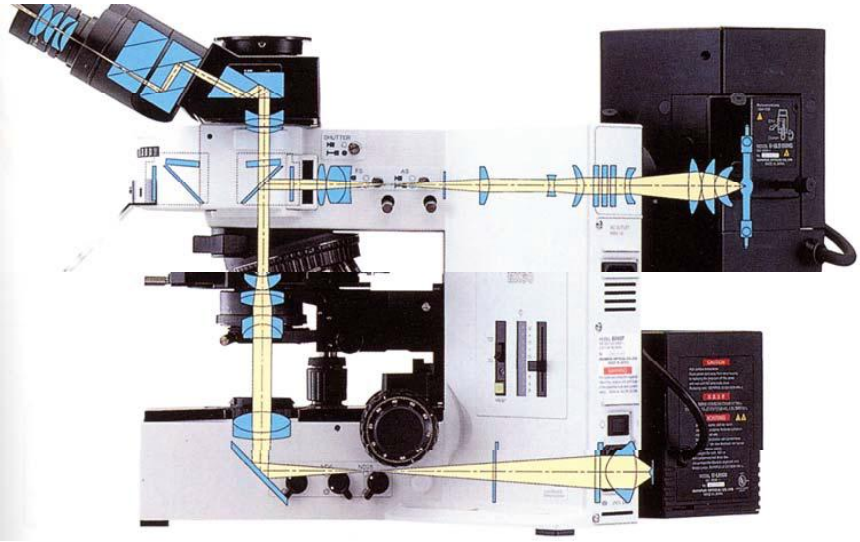
Σχήμα 23 (πηγή: http://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy5.pdf)



Σχήμα 24 (πηγή: http://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy5.pdf)

Τα φίλτρα διέγερσης και εκπομπής δεν αντιστοιχούν υποχρεωτικά επακριβώς στις μέγιστες τιμές διέργεσης και εκπομπής της χρωστικής. Τα όρια της διερχόμενης από τα φίλτρα ακτινοβολίας είναι πολύ απότομα. Ο διχροικός καθρέπτης ανακλά το 100% της ακτινοβολίας η οποία διεγείρει την FITC, διέλευση (T=0%) και επιτρέπει τη διέλευση του 80-90% της ακτινοβολίας εκπομπής της FITC(πράσινη).

Στο παρακάτω σχήμα βλέπουμε το οπτικό "μονοπάτι" σε ένα κλασικό μικροσκόπιο φθορισμού.



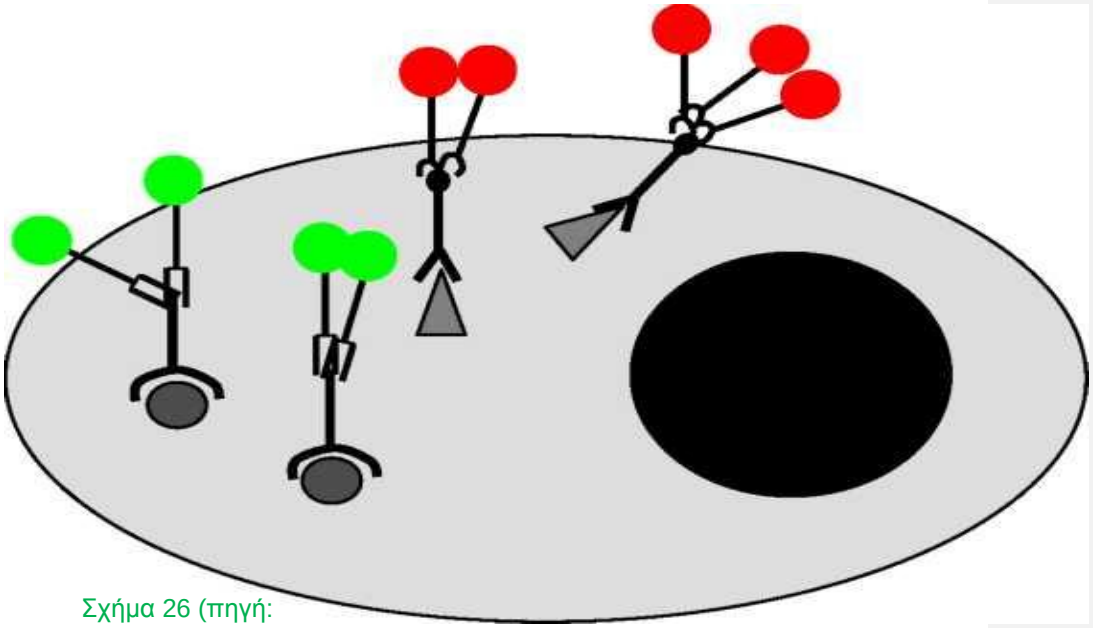
Σχήμα 25 (πηγή: http://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy5.pdf)

Βιοφωτονική -Εφαρμογές των τεχνικών μικροσκοπίας φθορισμού

Με την μικροσκοπία φθορισμού μας δίνονται οι εξής δυνατότητες: Να εντοπίζουμε τις πρωτεΐνες και το DNA στο κύτταρο και να παρατηρούμε τις κυτταρικές δομές όπως μεμβράνες, κυτταροσκελετός—, χρωματίνη, λυσοσσώματα και άλλα. Επίσης η δυνατότητα να μελετήσουμε κυτταρικές λειτουργίες όπως αυτές της απόπτωσης, της κυτταρικής διαίρεσης ,ενδοκύτωσης ,εξωκύτωση και κυτταρική διήθηση-.

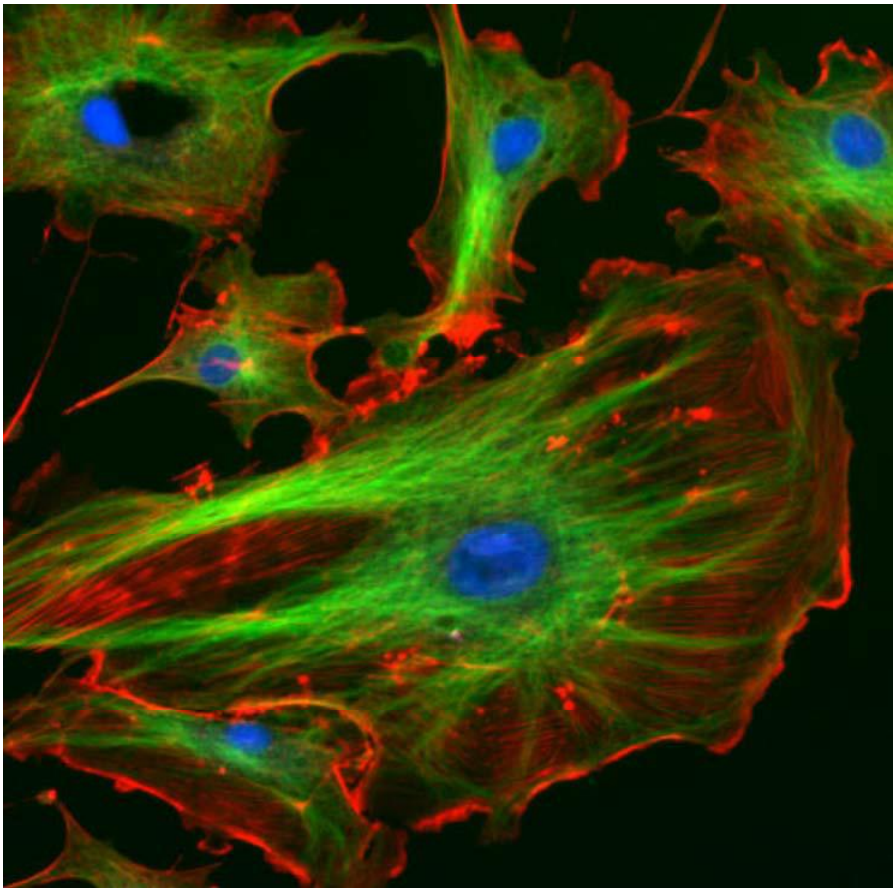
Ανάλογα με τις δυνατότητες του μικροσκοπίου μας (αριθμός φίλτρων, είδος φωτεινής πηγής) μπορούμε να ανιχνεύσουμε ταυτόχρονα πολλαπλά συστατικά του παρασκευάσματος, σημαίνοντας τα με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές οι οποίες έχουν διακριτά φάσματα απορρόφησης και εκπομπής. Για παράδειγμα μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε χρωστικές οι

οποίες εκπέμπουν στο υπεριώδες πράσινο και κόκκινο φάσμα φωτός ή στο πράσινο και κόκκινο υπέρυθρο φάσμα. Για την ανίχνευση των συστατικών του δείγματος που θέλουμε να μελετήσουμε–, μπορούν να χρησιμοποιήσουμε αντισώματα έναντι αυτών συνδεδεμένα ή σημασμένα με φθορίζοντα μόρια όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 26 (πηγή: http://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy5.pdf)

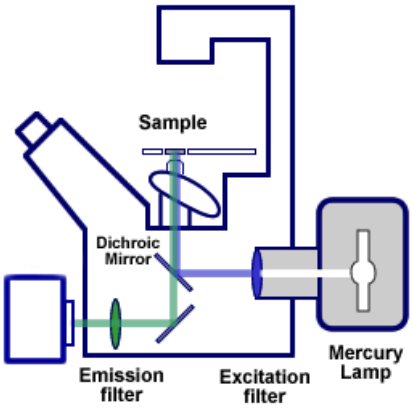
και επίσης μία εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού με τρεις διαφορετικές χρωστικές



Σχήμα 27 (πηγή: http://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy5.pdf)

ΒΙΝΤΕΟΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Σε μια διάταξη μικροσκοπίου φθορισμού μπορούμε να ενσωματώσουμε μία κάμερα στην συνέχεια να προκαλέσουμε φθορισμό σε κάποια στοιχεία του κυττάρου και κατά συνέπεια –να βιντεοσκοπήσουμε κυτταρικές λειτουργίες σε ζωντανά κύτταρα όπως η κυτταρική διαίρεση-, απόπτωση και άλλα-.



Σχήμα28 (πηγή: http://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy5.pdf)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Ένα κυτταρόμετρο ροής είναι μία οπτική διαγνωστική συσκευή που χρησιμοποιείται στην έρευνα και στα κλινικά εργαστήρια για τη σκιαγράφηση μιας νόσου με την μέτρηση των φυσικών ή και των χημικών χαρακτηριστικών των κυττάρων.

-Η κυτταρομετρία ροής είναι επίσης κατάλληλη για ταχεία και ακριβής εξέταση των πιθανών πηγών μόλυνσης, μια εφαρμογή πολύ χρήσιμη και σε πιθανές περιπτώσεις βιοτρομοκρατίας. Είναι, επίσης, μια ισχυρή τεχνική που αφορά τη γεωργία και την έρευνα για την ανάπτυξη της κτηνοτροφίας. Αυτό το κεφάλαιο εισάγει την αρχή της κυτταρομετρίας ροής και –περιγράφει τα διάφορα στάδια που εμπλέκονται στη λειτουργία της. Τα διάφορα συστατικά ενός κυτταρομετρητή ροής περιγράφονται παρακάτω.

Ο φθορισμός γενικά χρησιμοποιείται στην οπτική απόκριση, αλλά μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και στις εφαρμογές κυτταρομετρικής ροής. Τα κριτήρια επιλογής των φθοροφόρων (που συχνά ονομάζονται φθοροχρώματα), που χρησιμοποιούνται –για τη χρώση των κυττάρων για ανάλυση με κυτταρομετρία, συζητούνται παρακάτω. Ένα σημαντικό μέρος της κυτταρομετρίας ροής είναι η χειραγώγηση του μεγάλου όγκου των δεδομένων και την παρουσίασή τους για εργαστηριακή ανάλυση-.

8.1 ΕΝΑ ΚΛΙΝΙΚΟ , ΒΙΟΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΛΕΙΟ

Ο όρος κυτταρομετρία ροής αναφέρεται στην μέτρηση των φυσικών ή και των χημικών χαρακτηριστικών των κυττάρων ή γενικά κάθε βιολογικής ομάδας .Στην κυτταρομετρία ροής οι μετρήσεις των κυττάρων ,μικροσφαιριδίων και κάθε βιολογικής ομάδας γίνονται καθώς αυτά ρέουν σε κάποιο υγρό και περνάνε ένα ένα από ένα σημείο ελέγχου. Η ανίχνευση γίνεται χρησιμοποιώντας οπτική τεχνική, όπου η ακτίνα από μία φωτεινή πηγή

αλληλεπιδρά με το κάθε στοιχείο που περνάει από το σημείο ελέγχου προκαλώντας σκεδασμό ή φθορισμό. Η οπτική αυτή ανταπόκριση χρησιμοποιείται για να προσδιορίζει την κυτταρική λειτουργία προσφέροντας μετρήσεις και την ικανότητα να διακρίνουμε διαφορετικούς τύπους κυττάρων σε ένα ετερογενή πληθυσμό.

Αν και ο φθορισμός ανιχνεύεται μπορεί να έχουμε και –αυτοφθορισμό, γενικά τα κύτταρα ή τα ενδοκυτταρικά προϊόντα σημαίνονται –με ειδικά αντισώματα που φθορίζουν –ή χρωστικές –που δεσμεύονται με κυτταρικά συστατικά και είναι ικανά να παράγουν φθορισμό. Τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής δηλαδή οι πληροφορίες από οπτική διαδικασία, διαθέτουν ένα σύνολο παραμέτρων–, που παρέχουν μοναδικά χαρακτηριστικά ενός συγκεκριμένου τύπου κυττάρων. Η ταυτοποίηση του τύπου των –κυττάρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια και –να συσχετίζεται –με μια συγκεκριμένη παθολογική κατάσταση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσδιορίσει μια συγκεκριμένη ασθένεια ή μικροβιακή εισβολή.

Ένα άλλο όνομα που χρησιμοποιείται για την κυτταρομετρία ροής είναι –η ενεργοποιημένων με φθορισμό κυττάρων ταξινόμηση (FACS), η οποία τονίζει την αξιοποίηση της ανίχνευσης φθορισμού και την ικανότητα του οργάνου να ταξινομεί ε–τα κύτταρα που πληρούν συγκεκριμένα κριτήρια. Κατά μία έννοια, η κυτταρομετρία –ροής και η οπτική μικροσκοπία εκτελούν παρόμοιες λειτουργίες, δηλαδή, την ικανότητα να δούμε μικροσκοπικά αντικείμενα. Όπως σε ένα μικροσκόπιο–, ένας κυτταρομετρητής ροής ενσωματώνει μία φωτεινή πηγή και οπτικά συλλογής φωτός–. Ωστόσο καθώς σε ένα κοινό μικροσκόπιο η ακτίνα φωτός(laser) κινείται ώστε να σαρώσει το δείγμα μας και να ανιχνεύσει την εικόνα των κυττάρων, σε έναν κυτταρομετρητή ροής τα κύτταρα ρέουν μέσα στην συσκευή.

Ωστόσο ενσωματώνοντας την διαδικασία της κυτταρικής ταξινόμησης σε ένα κυτταρομετρητή ροής χρησιμοποιώντας ηλεκτρικούς ή μηχανικούς μεθόδους μας επιτρέπει να επιλέγουμε κύτταρα με ένα ή περισσότερα χαρακτηριστικά (κριτήρια). Έτσι αυτό το χαρακτηριστικό μας επιτρέπει σε από έναν πληθυσμό ετερογενή κυττάρων, να απομονώσουμε μέρος του πληθυσμού π.χ. τα βιώσιμα κύτταρα (δηλαδή βάση κάποιου ή κάποιων χαρακτηριστικών). Εκτός

από την απομόνωση ενός καθαρού πληθυσμού, η δυνατότητα διαλογής κυττάρων μας -επιτρέπει επίσης να πραγματοποιήσουμε περαιτέρω βιοχημική ανάλυση των επιλεγμένων κυττάρων, ή κάποια άλλη επιθυμητή επεξεργασία όπως είναι η κυτταρική καλλιέργεια.

Αν και ένας κυτταρομετρητής ροής μέτρα την οπτική απόκριση από ένα μεμονωμένο κύτταρο την φορά, η πρόοδος στην ρευστών και της ανίχνευσης, σε συνδυασμό με την ταχεία απόκτηση δεδομένων και την βελτίωση του λογισμικού επεξεργασίας, μπορεί τώρα να παρέχει εύκολα τη δυνατότητα να ανιχνεύει και να αναλύει μέχρι 75.000 κύτταρα ανά δευτερόλεπτο. Έτσι, τα δύο σημαντικά πλεονεκτήματα που προσφέρονται από ένα κυτταρόμετρο ροής συγκριτικά με ένα –παραδοσιακό μικροσκόπιο είναι ο ταχύς ρυθμός διεκπεραίωσης του δείγματος και την ικανότητα να ταξινομεί επιλεγμένους πληθυσμούς, διατηρώντας παράλληλα τη βιωσιμότητα τους—. Έτσι, σε πραγματικό χρόνο η παρακολούθηση πολλών βιολογικών γεγονότων μπορεί να επιτευχθεί.

Οι βιολογικοί οργανισμοί ποιοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως επιθετικά όπλα εναντίον πληθυσμιακών κέντρων. Η κυτταρομετρία ροής θα είναι πιθανώς μια μέθοδος επιλογής για την ταχεία και ευκρινής διαλογή πιθανών πηγών σκόπιμης μόλυνσης. Νέας γενιάς κυτταρόμετρων ροής μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά την ικανότητα των ιατρών να καθορίζουν γρήγορα λοιμώξεις από μικροοργανισμούς στον άνθρωπο, στα ζώα, στις προμήθειες τροφίμων, και στις προμήθειες νερού-.

Η κυτταρομετρία ροής-, επίσης, αρχίζει να επηρεάζει -τη γεωργική έρευνα και την ανάπτυξη των αποθεμάτων. Η επιλογή του τύπου του φύλου σε ζώα εκτροφής—, ή η ικανότητα να επιλέγουμε αρσενικά και θηλυκά σπερματοζωάρια, θα έχει τεράστιο οικονομικό αντίκτυπο στα αποθέματα τροφίμων. Η δυνατότητα να επιλέξουμε την επιθυμητή φυλή με τεχνικές κυτταρομετρίας και να χρησιμοποιούμε την τεχνητή γονιμοποίηση εξασφαλίζει την επιθυμητή επιλογή των φύλων των απογόνων –και φυσικά τα αντίστοιχα

χαρακτηριστικά τους. Η δυνατότητα αυτή μειώνει δραματικά το κόστος αναπαραγωγής και συντήρησης.

Επιπλέον η κυτταρομετρία ροής είναι ένα σημαντικό εργαλείο για την ανάπτυξη των τομέων της ιατρικής και βιοδιάγνωσης. Έχει αποδειχθεί ότι είναι μια ισχυρή τεχνική για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου, όπου οι μετρήσεις της περιεκτικότητας του DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να παρέχουν έναν μεγάλο αριθμό πληροφοριών σχετικά με τον κύκλο των κυττάρων. Η κυτταρική διαίρεση, η απόπτωση και νέκρωση μπορούν να μελετηθούν. Επιπλέον, μεταβολικά χαρακτηριστικά, όπως η ροή ασβεστίου, η μιτοχονδριακή δραστικότητα, το κυτταρικό pH και η παραγωγή ελεύθερων ριζών σε ζωντανούς πληθυσμούς κυττάρων μπορούν να ανιχνευθούν και να μετρηθούν σε πραγματικό χρόνο.

Η μοριακή κυτταρομετρία είναι ένα σχετικά νέο πεδίο εφαρμογής της κυτταρομετρίας που προσελκύει μεγάλη προσοχή από την ερευνητική κοινότητα (Nunez, 2001). Χρησιμοποιεί κυτταρομετρία ροής για την απόκτηση πληροφοριών σχετικά με τις κύτταρο-προς-κύτταρο διακυμάνσεις μοριακών παραμέτρων που ερευνώνται.

Μέθοδοι Fluorescence resonance energy transfer (FRET), μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν σε κυτταρομετρία ροής για να προσδιοριστεί αν δύο πρωτεϊνικοί δείκτες συνδέονται στενά στην κυτταρική επιφάνεια ή στο εσωτερικό του κυττάρου. Μια άλλη τεχνική που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με κυτταρομετρία ροής για να ληφθεί μοριακή (ή submolecular) πληροφορία είναι η in situ υβριδοποίηση φθορισμού (επίσης γνωστό ως FISH).

Ένας άλλος σημαντικός τομέας –έρευνας είναι η ανίχνευση ή η αξιολόγηση των δραστηριοτήτων των μικροοργανισμών σε μια ευρεία ποικιλία δειγμάτων, όπως το γάλα, φασόλια, το νερό του ποταμού και άλλα.

Οι διάφορες εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής συνοψίζονται περαιτέρω στους Πίνακες 8.1,8.2, και 8.3

TABLE 8.1 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

- παρακολούθηση του HIV
- Λευχαιμία ή λέμφωμα ανοσοφαινότυπου
- παρακολούθηση μεταμόσχευσης οργάνου
- ανάλυση DNA για πλοειδισμού όγκου και SPF
- Πρωτοβάθμια και δευτεροβάθμια ανοσοανεπάρκεια
- ανασύσταση αιμοποιητικών

TABLE 8.2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

- μέτρηση της ενδοκυτταρικής κυτοκίνης
- οδούς μεταγωγής σήματος
- ανάλυση του κύκλου του κυττάρου
- μέτρηση των κυτταρικών λειτουργιών

TABLE 8.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

- μέτρηση γονιδιακής έκφρασης
- in situ υβριδισμος
- ανακάλυψη φαρμάκων

8.2 ΤΑ ΜΕΡΗ ΕΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΗ ΡΟΗΣ

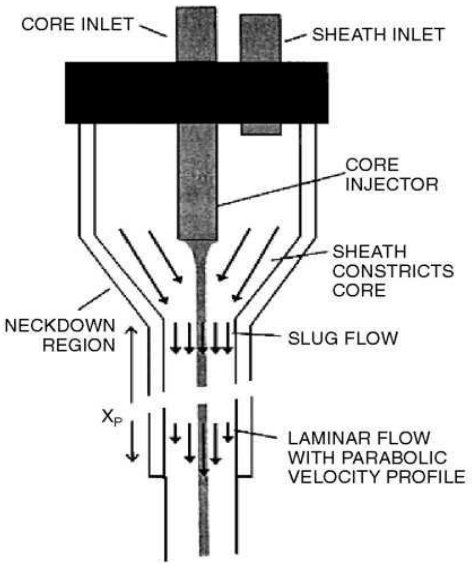
Ένα κυτταρόμετρο ροής αποτελείται από μια πηγή φωτός, η οποία σε όλα τα σύγχρονα κυτταρόμετρα ροής είναι ένα λέιζερ, και την οπτική φωτισμού για την εστίαση της δέσμης λέιζερ επί ενός ρέων βιολογικού κυττάρου ή ενός μικροσφαιριδίου πολυστυρένιου, το οποίο είναι σημασμένο (labeled) με φθορισμό. Η σκέδαση του φωτός λέιζερ και η απόκριση φθορισμού διαχωρίζονται και επικεντρώνονται σε φωτοανιχνευτές. Μια ειδική ηλεκτρονική διαδικασία επεξεργάζεται την οπτική απόκριση και ελέγχει την ταξινόμηση εφόσον παρέχεται. Αυτά τα συστατικά ενός κυτταρομετρητή ροής είναι τα εξής

Πηγή φωτός , Ένα κυτταρόμετρο ροής μπορεί να χρησιμοποιεί ένα μόνο μήκος κύματος διέγερσης ή μια σειρά από μήκη κύματος διέγερσης από διαφορετικές πηγές λέιζερ. Οι ακτίνες λέιζερ μπορούν να είναι ομοαξονικές ή χωρισμένες έτσι ώστε να συμβαίνουν ένα ή περισσότερα σημεία ελέγχου . Τα σημαντικά χαρακτηριστικά για ένα λέιζερ στην κυτταρομετρία ροής είναι η σταθερότητα στη δύναμη, χαρακτηριστικά υψηλής ποιότητας δέσμης, και το χαμηλό επίπεδο θορύβου υψηλής συχνότητας.

Στα πιο παλιά κυτταρόμετρα ροής το εύρος της μπλε-πράσινης περιοχής καλύπτονταν από ένα argon-ion laser το οποίο παρέχει διέργεση σε UV (350-365 nm) καθώς και σε 488 και 514.5 nm. Η κόκκινη περιοχή καλύπτονταν από ένα helium neon laser στα 632 nm. Η τρέχουσα τάση, ωστόσο, είναι η αντικατάσταση αυτών των ογκώδη και αναποτελεσματικών λέιζερ αερίου από τα συμπαγή λέιζερ στερεάς κατάστασης. Τα laser διόδου είναι διαθέσιμα στα 488 nm και 532 nm. Το κόκκινο (635-670 nm), μπλε (~ 405 nm) περιοχές που καλύπτονται από έναν αριθμό λέιζερ διόδου. Μια άλλη νέα προοπτική είναι η χρήση του λέιζερ κοντά στα IR (700-800nm) για να διεγείρει χρωστικές

IR, οπότε το πρόβλημα που –οφείλεται στον αυτοφθορισμό μειώνεται σημαντικά.

Ροή κυττάρων-, στο παρακάτω διάγραμμα βλέπουμε την διάταξη μιας ροής κυττάρων .



Σχήμα 29 (πηγή : http://www.kyttarometria.gr/files/Doc07.pdf)

Στους περισσότερους κυτταρομετρητές ροής έχουμε εισαγωγή του δείγματος στο υγρό περιροής καθώς αυτό διέρχεται από ένα μικρό (50-300 μm) στόμιο.

• Η είσοδος ενός μεγάλου όγκου σε ένα μικρού όγκο υγρού με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτυγχάνεται εστίαση κατά μήκος του άξονα ονομάζεται υδροδυναμική εστίαση.

Το υγρό περιροής

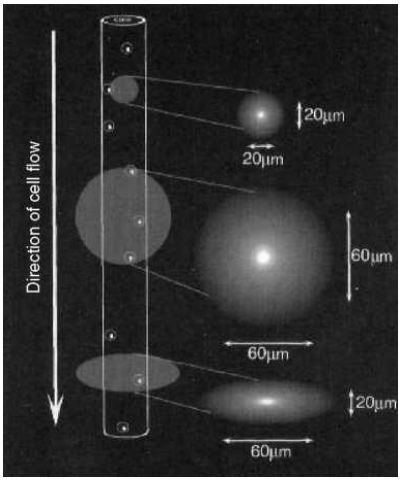
• Υδατικό διάλυμα

• Βασικό συστατικό για την ορθή εστίαση

• Ισότονο διάλυμα το οποίο εξασφαλίζει την διατήρηση του σχήματος των κυττάρων

Οπτικά φωτισμού , Τα οπτικά στοιχεία μεταξύ του λέιζερ και του δείγματος ονομάζονται οπτικά φωτισμού και χρησιμοποιούνται για να διαμορφώσουν την εστίαση της δέσμης λέιζερ. Εκτός ορισμένων λέιζερ διόδου—, οι περισσότερες πηγές λέιζερ παράγουν κυκλικές δέσμες που μπορεί ακόμη και να είναι μια πραγματική Gaussian κατανομή της έντασης. Ωστόσο, η χρήση μιας τέτοιας κυκλικής Gaussian δέσμης παράγει μία κυκλική κηλίδα που δεν είναι επιθυμητή για την κυτταρομετρία ροής.

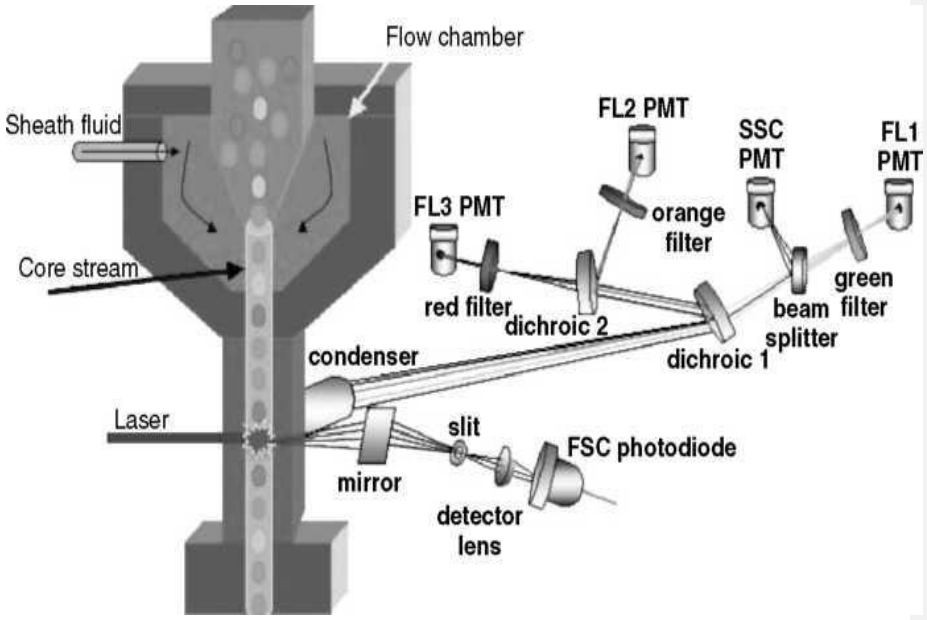
Τα οπτικά διαμορφώσεως της δέσμης που χρησιμοποιούνται πιο συχνά στους τρέχων —κυτταρομετρητές ροής χρησιμοποιούν ένα ζεύγος ανομορφικών πρισμάτων ή δύο σταυρωτούς –κυλινδρικούς φακούς –που παρέχουν ένα ελλειπτικό σημείο 10 -20 mm σε διάταξη παράλληλη προς την κατεύθυνση της ροής των κυττάρων και 60 mm κάθετα προς την κατεύθυνση της ροής. Το πλεονέκτημα όλης αυτής της διαδικασίας φαίνεται στο παρακάτω σχήμα



Σχήμα 30 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

Στην πραγματικότητα δηλαδή επιτυγχάνουμε τα σημεία αυτά να μην είναι πάνω στην ροή των κυττάρων .

Οπτικά συλλογής–, Η οπτική συλλογή αποτελείται από μία σειρά –από οπτικές θύρες για να διαχωρίσει και να συλλέξει -διάφορες οπτικές απαντήσεις που προέρχονται από τον φωτισμό του κάθε κυττάρου ροής. Αυτές οι οπτικές αποκρίσεις, είναι (i) προς τα εμπρός σκέδαση –(FSC), (ii) πλευρά σκέδασης (SSC), και (iii) διάφορα σήματα φθορισμού σε διαφορετικά μήκη κύματος που συλλέγονται σε 90° προς την δέσμη του λέιζερ. Ο αριθμός των οπτικών αποκρίσεων που ανιχνεύονται (ως εκ τούτου ο αριθμός των φωτοανιχνευτών που χρησιμοποιούνται) καθορίζουν αυτό που είναι γνωστό ως ο αριθμός των μετρούμενων παραμέτρων σε ένα κυτταρόμετρο ροής. Το παρακάτω σχήμα δείχνει μια τυπική διάταξη των οπτικών συλλογής, σε ένα πέντε παραμέτρων κυτταρόμετρο: δύο κανάλια σκέδασης και τρία κανάλια φθορισμού (FL 1 PMT, FL2 PMT και FL3 PMT) για να παρακολουθεί την εμπρός σκέδαση, την πλευρική σκέδαση, και τα σήματα φθορισμού σε τρεις διαφορετικές φασματικές περιοχές.



Σχήμα 31 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

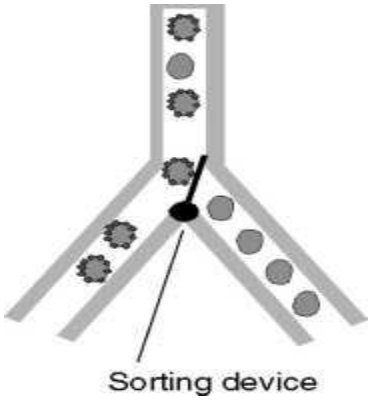
Ανίχνευση και Ηλεκτρονική ,

Σε ένα κυτταρόμετρο χρησιμοποιούμε ένα σύστημα ανίχνευσης και χρησιμοποιούνται ηλεκτρονικές διατάξεις για την απόκτηση και την επεξεργασία της οπτικής απόκρισης—. Στους περισσότερους κυτταρομετρητές ροής, οι φωτοανιχνευτές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του φθορισμού είναι σωλήνες φωτοπολλαπλασιαστών–. Για την προς τα εμπρός - σκέδαση σήματος (FSC), η οποία είναι σημαντικά ισχυρότερη από τον φθορισμό–, μια πολύ φθηνότερη φωτοδίοδο–ς που έχει χαμηλή ευαισθησία μπορεί να χρησιμοποιηθεί.

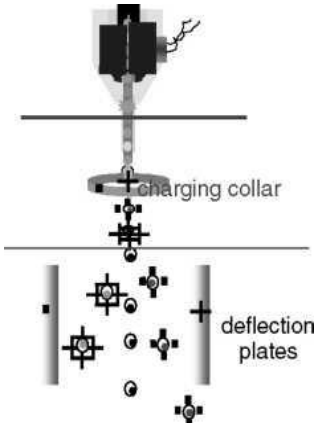
-Ένας ηλεκτρικός προενισχυτής μετά τον φωτοανιχνευτή είναι απαραίτητος επειδή η dc τάση απόκλισης που καθιερώνει μηδενική αρχική τιμή χρησιμοποιείται για να παρέχει σταθερή κατάσταση ροής φθορισμού . Αυτός ο φθορισμός είναι το αποτέλεσμα των φθοριοχρωμάτων που παραμένουν στο διάλυμα–. Επομένως οι ενισχυτές μπορούν να είναι είτε λογαριθμικοί ή γραμμικοί. Ένας λογαριθμικός ενισχυτής επιτρέπει σε κάποιον να επεξεργάζεται τα σήματα σε ένα ευρύ φάσμα των εντάσεων–, ενώ ένας γραμμικός ενισχυτής περιορίζει τις μετρήσεις σε σήματα με ένα μικρό γραμμικό εύρος .

Λογαριθμικοί ενισχυτές χρησιμοποιούνται συνήθως για την ανάλυση των σημάτων φθορισμού από τα κύτταρα που επισημαίνονται με επιφανειακούς δείκτες, επειδή αυτά τα κύτταρα εμφανίζουν συχνά μια μεγάλη γκάμα διακύμανσης των –εντάσεων φθορισμού. Οι γραμμικοί ενισχυτές μπορούν να

είναι χρήσιμοι για την ανάλυση των προς τα εμπρός και πλευρικών σημάτων σκέδασης, καθώς και για χαμηλής έντασης φθορισμού.



Διαλογέας κυττάρων: Τα περισσότερα εμπορικά κυτταρόμετρα ροής δεν διαθέτουν την ικανότητα της κυτταρικής επιλογής. Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζονται οι δύο συσκευές που συνήθως χρησιμοποιούνται για να επιτύχουμε διαλογή κυττάρων.



(a) (b)

Schematics of two types of cell sorting devices for flow cytometry. (a) electrostatic sorting, (b) mechanical sorting

Μορφοποιήθηκε: Αγγλικά (Η.Π.Α.)
Μορφοποιήθηκε: Αγγλικά (Η.Π.Α.)
Μορφοποιήθηκε: Αγγλικά (Η.Π.Α.)
Μορφοποιήθηκε: Αγγλικά (Η.Π.Α.)
Μορφοποιήθηκε: Αγγλικά (Η.Π.Α.)
Μορφοποιήθηκε: Αγγλικά (Η.Π.Α.)
Μορφοποιήθηκε: Αγγλικά (Η.Π.Α.)
Μορφοποιήθηκε: Αγγλικά (Η.Π.Α.)

Σχήμα 32 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

Στην περίπτωση (a) της συσκευής ηλεκτροστατικής διαλογής ,τα κύτταρα ενός συγκεκριμένου είδους αφού περάσουν από το σημείο ελέγχου ,φορτίζονται και ηλεκτροστατικά έλκονται σε ένα σημείο διαλογής .Αυτό περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα

- Υδροδυναμική εστίαση σε ένα ακροφύσιο, αφού διέρχεται από το σημείο του ελέγχου (φωτεινή ζώνη).
- Φθορισμό από μια επιλεκτική ετικέτα φθορισμού των κυττάρων παρέχοντας ένα κατάλληλο έναυσμα να δονείται το ακροφύσιο από έναν μετατροπέα και να σπάσει τη ροή των κυττάρων σε σταγονίδια που εκτοξεύονται στον αέρα. Αυτή η διαδικασία εξασφαλίζει ότι τα σταγονίδια θα περιέχουν τα συγκεκριμένα κύτταρα.
- Απόκριση φθορισμού από ένα επιλεγμένο φθορίζων (labeled) κύτταρο παρέχοντας ηλεκτρονικό έναυσμα το οποίο είναι χρονικά καθυστερημένο ώστε να φορτίσει αυτό το κύτταρο καθώς αυτό φτάνει στο "κολάρο" φόρτισης
- -Φορτισμένα σταγονίδια που περιέχουν επιλεκτικά το συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό εκτρέπονται από ένα ηλεκτροστατικό πεδίο από τις πλάκες που είναι σε υψηλή τάση (3000V).
- Διάφορες συσκευές συλλογής, όπως σωλήνες, πλάκες, και ούτω καθεξής, τοποθετούνται σε κατάλληλη θέση να συλλέξουν ένα συγκεκριμένο τύπο φορτίου (θετικό, αρνητικό ή ουδέτερο) και έτσι επιλέγουν συγκεκριμένο πληθυσμό κυττάρων.
-

Η δεύτερη μέθοδος χρησιμοποιεί μία μηχανική πύλη που ταλαντεύεται μπρος και πίσω για να κατευθύνει έναν συγκεκριμένο τύπο κυττάρου σε μία επιθυμητή οδό. Ενώ αυτή η μέθοδος θεωρείται ότι είναι πιο ήπια ως προς κύτταρα, έχει μόνο ένα μέγιστο ποσοστό 300 ταξινομημένων κυττάρων ανά δευτερόλεπτο.

8.3 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια ταχέως αναπτυσσόμενη μέθοδος σε παγκόσμιο επίπεδο, με μεγάλη δυναμική στα επόμενα έτη. Έχει υπάρξει μεγάλο ενδιαφέρον για την κυτταρομετρία ροής από την άποψη της έρευνας, κυρίως από τους τομείς της γονιδιωματικής και πρωτεομικής.

Οι πρόσφατες βελτιώσεις στον τομέα των laser στερεής κατάστασης, της micro-τεχνλογίας και της micro-οπτικής και των ανιχνευτών σε πολύ μικρά μεγέθη παρέχουν δυνατότητες για βελτίωση των κυτταρόμετρων ροής με αυξημένες δυνατότητες να παρακολουθούν ταυτόχρονα πολλές διαφορετικές μεταβλητές. Η προσδοκία ότι ένα κυτταρόμετρο ροής να μπορεί να βρίσκεται ενσωματωμένο σε ένα chip ίσως να μην είναι τόσο μακρινό όνειρο.

Μερικές από τις μελλοντικές κατευθύνσεις που εκτιμάται ότι θα εμπλακεί το κυτταρόμετρο ροής είναι οι εξής :

έρευνα, ένα νεοεμφανιζόμενο πεδίο είναι η κυτταρομετρία ροής ενός μονάχα μορίου η οποία εκμεταλλεύεται μια ποικιλία από τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια για την ανίχνευση μεμονωμένων μορίων σε διαλύματα φθοριοχρωμίου. Η 'κυτταρομετρία ροής' ενός μεμονωμένου μορίου" προσφέρει τεράστιες προοπτικές για τη μοριακή βιολογία. Η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταξινόμηση κατά μέγεθος της έλικας του DNA και της αλληλουχίας του DNA. Σε αυτή τη μέθοδο, η συγκέντρωση και η ροή ρυθμίζονται έτσι ώστε το κάθε μόριο (ή σημασμένο με φθορισμό μέρος του DNA) ρέει μέσα από τη ζώνη φωτισμού ενός κυτταρόμετρου ροής ,μεμονωμένα, ένα κάθε φορά, με τον ίδιο ρυθμό, και βιώνει την ίδια ένταση φωτός. Η πληροφορία της αλληλουχίας του DNA μπορεί να ληφθεί εύκολα με τη χρήση ίη situ υβριδοποίησης φθορισμού (FISH) εμπλέκοντας μια δεξαμενή σημασμένων ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών φθορισμού.

Μια πολλά υποσχόμενη νέα μέθοδος χρησιμοποιεί ανίχνευση φθορισμού μονού μορίου με την διέργεση δύο-φωτονίων, η οποία παράγεται χρησιμοποιώντας εξαιρετικά στενούς παλμούς laser (femtosecond) , υψηλής έντασης αλλά με χαμηλή μέση ισχύ, διευκολύνει την ανίχνευση ενός μονάχα

μορίου γιατί το μήκος κύματος διέργεσης –κοντά στις IR και το μήκος κύματος εκπομπής (στο ορατό φως) διαχωρίζονται εύκολα. Πρόσφατες αναφορές των φθοριοχρωμίων με σημαντική ενισχυμένη (2,3...- φωτονίων) απορρόφηση–, ώστε –να παράγουν ακόμη και αντιστροφή πληθυσμού και εξαναγκασμένη εκπομπή , παρέχουν μία περεταίρω ελπίδα για την κυτταρομετρία ροής ενός μορίου .

Ένας άλλος τομέας των ερευνητικών δραστηριοτήτων είναι εφαρμογές –που χρησιμοποιούν διάφορους δείκτες ενεργοποίηση για –να προωθήσουμε μια κυτταρική διαδικασία και την παρακολούθηση της μέσω κυτταρόμετρου ροής σε πραγματικό χρόνο. Με μία δέσμη φωτός από παλμικό laser και σαρώνοντας (scanning) κάθετα στο μήκος της ροής του κυτταρόμετρου–, μπορούμε να παρακολουθήσουμε την όλη διαδικασία σε πραγματικό χρόνο-.

Για λεπτομερείς πληροφορίες μπορούμε να έχουμε την χρονική ανάλυση με φασματοσκοπική ανάλυση, όπου το σήμα φθορισμού που λαμβάνεται ως συνάρτηση__—του χρόνου (χρόνος διέλευσης της ροής) μπορεί να διασκορπίζεται σε ένα φασματογράφο και να συλλέγεται χρησιμοποιώντας μια συστοιχία ανιχνευτών-.

Ένας άλλος τομέας μελλοντικής ανάπτυξης περιλαμβάνει την παραγωγή νάνο - σωματιδίων της τάξης μεγέθους των 10-30 nm. Αυτά τα νάνο - σωματίδια, όταν είναι κατάλληλα κατασκευασμένα, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην στόχευση συγκεκριμένων κυττάρων, καθώς μπορούν να διεισδύουν μέσω της κυτταρικής μεμβράνης ,λόγω του μικρού μεγέθους τους, και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να εντοπίσουν ένα ειδικό οργανίδιο . Η ανίχνευση μπορεί να γίνει εφικτή από την εκπομπή (emission) που θα προκύψει με διέργεση που θα είναι αποτέλεσμα της χρήσης ενός laser στα 970 nm–.

Μία σημαντική μελλοντική κατεύθυνση της ανάπτυξης του κυτταρόμετρου ροής είναι η ανάπτυξη στους τομείς της μικροτεχνίας και της ρομποτικής. Έχει υπάρξει σημαντική βελτίωση στον τομέα των micro - lasers, micro –

ανιχνευτών (detectors) και γενικότερα μικρό - ηλεκτρομηχανικών συστημάτων (MEMS) καθώς και της μικρό - οπτικής . Μια καθοριστική ολοκλήρωση αυτών των παραμέτρων μας φέρνουν κοντά στην παραγωγή ενός φωτονικού chip. Σημαντική πρόοδος έχει επίσης σημειωθεί στον τομέα της μικρορευστομηχανικών. Οι δύο αυτές εξελίξεις, σε συνδυασμό μεταξύ τους, μπορούν να προσφέρουν ένα γόνιμο έδαφος για να παραχθεί ένα κυτταρόμετρο ροής on-a-chip.

Η χρήση της ρομποτικής για την υλοποίηση ενός αυτοματοποιημένου συστήματος για την επεξεργασία του δείγματος με αύξηση του αριθμού των ανιχνευτών θα ενισχύσει σε μεγάλο βαθμό τις δυνατότητες ενός κυτταρομετρητή ροής, στην απόκτηση δεδομένων, θα μειώσει σημαντικά το χρόνο επεξεργασίας του δείγματος, και θα επιτρέψει ενέργειες με μικρότερα μεγέθη.

Ένας άλλος τομέας που θα επηρεαστεί από την αναφερόμενη βελτίωση, είναι αυτός του εντοπισμού και της ανίχνευσης των μικροβιακών δραστηριοτήτων. Οι τρέχουσες εξελίξεις στην βιοιατρική οπτική και στα laser προσφέρουν συσκευές laser με παραγόμενη δέσμη φωτός σε διατάσεις αντίστοιχες με ένα βακτήριο

Εφαρμογές (applications). Νέες εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής ανακύπτουν συνεχώς. Στο μέλλον θα δούμε μια σημαντική χρήση των κυτταρομετρητών ροής ως ένα αξιόπιστο για την έρευνα και κλινική πράξη εργαλείο ,για τη διάγνωση και για την παρακολούθηση της προόδου της θεραπείας.

Άλλες νέες εφαρμογές θα είναι στον τομέα του έλεγχου της ποιότητας του νερού και των τροφίμων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΦΩΣ

9.1 ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΦΩΤΟΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ

Η μηχανική ιστών είναι ένας τομέας της βιοτεχνολογίας, που πρόσφατα έχει δει ένα τεράστιο ποσοστό αύξησης. Καλύπτει ένα ευρύ φάσμα συμπεριλαμβανομένων βιοσυμβατών τεχνητών εμφυτευμάτων, την αναγέννηση των ιστών-, την συγκόλληση ιστών, καθώς και την αναδιάρθρωση των ιστών και του περιγράμματος τους. Είναι ένα διεπιστημονικό πεδίο που έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη των υλικών από χημικούς και επιστήμονες υλικών—, την κατασκευή μηχανικών εργαλείων από μηχανικούς, τον προσδιορισμό της βιοσυμβατότητας και την μείωση του κινδύνου δυσλειτουργίας από την βιοϊατρική έρευνα και τις δεξιότητες της εφαρμογής από τους χειρουργούς. Ένας τεράστιος αριθμός προσεγγίσεων και διαδικασιών εφαρμόζονται για την μηχανική των ιστών.

Σε αυτή την πτυχιακή εργασία θα ασχοληθούμε μόνο με τη μηχανική ιστών που χρησιμοποιεί το φως, το οποίο γενικά παράγεται από ένα λέιζερ. Τα Λέιζερ έχουν αναδειχθεί ως πολλά υποσχόμενα εργαλεία για τη μηχανική ιστών. Ο λόγος που για αυτές τις εφαρμογές χρησιμοποιούμε τα laser αναλύθηκε στο κεφάλαιο 6 Φωτοβιολογία (photobiology).

Οι δύο κύριοι τομείς μηχανικής ιστών και της αναδιάρθρωσης του περιγράμματος των ιστών με την χρήση των laser ασχολούνται με (i) δερματολογικές εφαρμογές στην πλαστική και αισθητική χειρουργική και (ii) οφθαλμικές εφαρμογές. Η ανάπτυξη νέων, συμπαγής και αποδοτικής στερεάς

κατάστασης λέιζερ, δίνει ώθηση για νέα πρωτόκολλα και σχήματα προ-και μετά-θεραπείας και θα οδηγήσει σε περαιτέρω ζήτηση αυτών των λέιζερ για πλαστικές-, και οφθαλμικές εφαρμογές τόσο από τους γιατρούς όσο και από τους ασθενείς-.

Μια άλλη ενεργή περιοχή που εμπίπτει στο γενικό πεδίο εφαρμογής της αναδιάρθρωσης ιστού είναι η αγγειοπλαστική με λέιζερ (μια καρδιακή διαδικασία που διαστέλλει και ξεμπλοκάρει την αθηροσκληρωτικής πλάκα από τα τοιχώματα των αρτηριακών αγγείων και συχνά περιλαμβάνει την τοποθέτηση ενός stent για να αποτρέψει τις αρτηρίες από το να κλείσουν και πάλι) (Deckelbaum, 1996). Οπτικές ίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μετάδοση της ακτινοβολίας λέιζερ οπουδήποτε στο καρδιαγγειακό σύστημα.. Το λέιζερ στη συνέχεια χρησιμοποιείται για την εξάτμιση της παρακωλυμένης αθηροσκληρωτικής πλάκας (η πάχυνση των αρτηριακών αγγείων από την συσσώρευση χοληστερόλης).

Μία άλλη προσέγγιση είναι η αγγειοπλαστική με μπαλονάκι και χρήση λέιζερ. Σε αυτή την εφαρμογή η ακτίνα λέιζερ θερμαίνει το τοίχωμα του αγγείου κατά τη διάρκεια της αγγειοπλαστικής με μπαλόνι για να βελτιώσει την αναδιαμόρφωση των αγγείων που προκαλείται από τη διαστολή του μπαλονιού .Η Αγγειοπλαστική με λέιζερ μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την θεραπεία χρόνιων αποφράξεων της –στεφανιαίας αρτηρίας και της atheroscleric νόσου. Τα λέιζερ που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό είναι ένα παλμικό xenon chloride που λειτουργεί στο UV στα 308 nm ή ένα παλμικό holmium που εκπέμπει στο υπέρυθρο εύρος στα 2,0-2,1 μm.

Κάποιες άλλες εφαρμογές των λέιζερ για να αφαιρέσουν κάποιο βιολογικό υλικό είναι:

- ωτολαρυγγολογια: Ένα λέιζερ CO_2 χρησιμοποιείται συχνά για να δημιουργήσει έντονη εντοπισμένη θέρμανση του ιστού-στόχου για την εξάτμιση τόσο του έξω-και ενδοκυτταρικού —νερού, που είναι παράγοντας νέκρωσης των μαλακών ιστών.

- Οδοντιατρική: Τα λέιζερ έχουν χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή τόσο των μαλακών όσο και των σκληρών ιστών. Διαδικασίες μαλακών ιστών έχουν επικεντρωθεί στην τομή και εκτομή υλικών από το βλεννογόνο και του ούλου στη στοματική κοιλότητα χρησιμοποιώντας μια ποικιλία από λέιζερ όπως CO_2, Nd: YAG, Ho: YAG, και τα λέιζερ αργού. Er laser με ένα μήκος κύματος στο εύρος 2.79-2.94 μm έχουν χρησιμοποιηθεί για την κοπή οδοντικών ιστών (τρύπημα και προετοιμασία των κοιλοτήτων), καθώς και για την αφαίρεση οδοντιατρικών υλικών.

Η συγκόλληση ιστού με χρήση laser είναι μια αναπτυσσόμενη εφαρμογή της βιοτεχνολογίας που φαίνεται πολλά υποσχόμενη για εφαρμογές σε σχεδόν σε όλες τις χειρουργικές επεμβάσεις. Η συγκόλληση, με λέιζερ, ιστού χρησιμοποιεί την ενέργεια από την ακτίνα ενός λέιζερ για να ενωθούν οι δεσμοί των ιστών. Η απορροφούμενη ενέργεια λέιζερ μπορεί να παράγει αλλαγές στην μοριακή δομή των ιστών και να επάγουν σύνδεση μεταξύ των γειτονικών δομών του ιστού. Δεδομένου ότι η διαδικασία της συγκόλλησης των ιστών με laser είναι μία μη μηχανική και χωρίς επαφή μέθοδος , είναι ιδανική για τις περιπτώσεις όπου η συρραφή είναι δύσκολη. Οι χειρουργικές απαιτήσεις για συγκόλληση ιστών είναι τα laser να παράγουν ισχυρότερη δύναμη συγκόλλησης, ελαχιστοποιώντας ταυτόχρονα την θερμική βλάβη των ιστών. Για την επίτευξη αυτών των στόχων, οι τρέχουσες προσπάθειες εστιάζονται στην ανάπτυξη νέων τεχνικών που χρησιμοποιούν λέιζερ χαμηλής ενέργειας και με μειωμένη απορρόφηση της ενέργειας για την παραγωγή εντοπισμένης θερμικής μετάδοσης.

Οι ακόλουθες προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται είναι :

- Χρήση ενός σύντομου παλμού λέιζερ και θερμική ανάδραση για να περιορίσουν την παραγωγή ενέργειας
- Επιλογή του μήκους κύματος λέιζερ για να περιορίσει την απορρόφηση στον ιστό

- Εφαρμογή "κόλλας" και χρωμοφόρων που ενεργοποιούνται από λέιζερ για να αυξηθεί η δύναμη συγκόλλησης.
-

Πρόσφατες μελέτες μας δίνουν επίσης κάποια ελπίδα για τη χρήση λέιζερ για την δημιουργία νέων ιστών σε τομές.

Ultra-short παλμικά laser προωθούν μη θερμικές αλληλεπιδράσεις στους ιστού, πρωτίστως από τον μηχανισμό της φωτοδιάσπασης -, μειώνοντας έτσι το ανεπιθύμητο αποτέλεσμα των παράπλευρων απωλειών από ένα θερμικό μηχανισμό. Ενδιαφέρον για τη χρήση αυτών των λέιζερ έχει αναπτυχθεί με τη διαθεσιμότητα των femtosecond παλμικών –λέιζερ, δίνοντας αφορμή για ένα νέο τομέα της χειρουργικής επέμβασης με femtolaser.

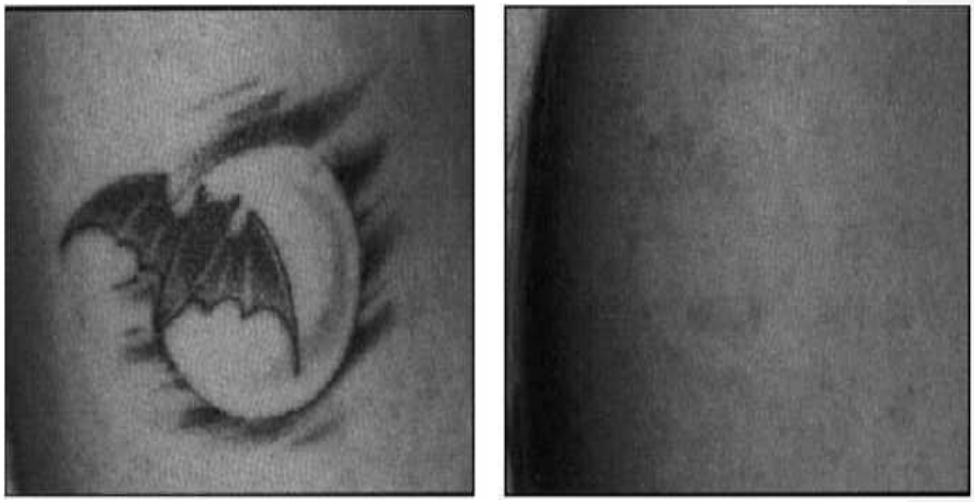
9.2 LASER ΑΝΑΔΙΑΡΘΡΩΣΗΣ ΠΕΡΙΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΙΣΤΩΝ

Οι δύο ειδικές εφαρμογές που θα δούμε -εδώ είναι για τη χρήση των λέιζερ σε δερματολογικές –και οφθαλμολογικές –διαδικασίες–. Η θεωρία της επιλεκτικής Φώτο - θερμόλυσης-, εισήχθη από τον Anderson και Parrish το 1981, είναι η βάση για την πρόοδο –των εφαρμογών laser –στην δερματολογία (Anderson και Parrish, 1983). Επιτρέπει την εξαιρετικά εντοπισμένη απορρόφηση του φωτός και κατά –επέκταση την καταστροφή του "στόχου" στο δέρμα, με ελάχιστη βλάβη -στον περιβάλλοντα ιστό. Για την επίτευξη επιλεκτικής Φώτο - θερμόλυσης, ένα κατάλληλο μήκος κύματος, διάρκεια έκθεσης, και επαρκής ροή είναι απαραίτητα. Διάφοροι στόχοι απορροφούν σε διαφορετικά μήκη κύματος, και το μήκος κύματος του λέιζερ θα πρέπει να απορροφηθεί περισσότερο από τη δομή- στόχο από ό, τι από τις περιβάλλουσες δομές. Το φως που απορροφάται στη δομή- στόχο μετατρέπεται σε θερμότητα, η οποία αρχίζει να διαχέεται –αμέσως. Σε γενικές γραμμές, η διάρκεια της έκθεσης πρέπει να είναι μικρότερη –ή περίπου ίση με το χρόνο θερμικής χαλάρωσης του στόχου. Κλινικά, η εφαρμογή της επιλεκτικής φωτοθερμόλυσης περιλαμβάνει τη διασφάλιση ότι η μέγιστη θερμοκρασία του ιστού που βλάπτει

συμβαίνει μόνο στις επιθυμητούς στόχους ιστού-. Όταν κατά την διάρκεια της θεραπείας μας ο στόχος είναι αγγεία ,τατουάζ ή τρίχες -, η ακτινοβολία πρέπει να περάσει την επιδερμίδα. Επιδερμικοί τραυματισμοί είναι οι πιο συχνές παρενέργειας αυτής της διαδικασίας .

Μερικές από τις δερματολογικές εφαρμογές περιλαμβάνουν:

- Την θεραπεία αγγειακών δυσπλασιών (π.χ., δερματική λεκέδες Sturge-Weber σύνδρομο). Εδώ, το χρωμοφόρο - στόχος είναι ή οξυαιμοσφαιρίνη. Η ακτινοβολία του λέιζερ απορροφάται από την αιμοσφαιρίνη και μετατρέπεται σε θερμότητα, η οποία βλάπτει το ενδοθήλιο και τα γύρω τοίχωμα του αγγείου. Αυτό ακολουθείται από θρόμβωση (φράξιμο ενός αιμοφόρου αγγείου), και αγγειίτιδα (μια φλεγμονώδης νόσος των αγγείων). Καθώς συμβαίνει η αφαίρεση των μη φυσιολογικών φλεβίδιων (οι μικρές φλέβες που χρησιμεύουν ως δίαυλοι για τη συλλογή γειτονικών τριχοειδών), η βλάβη υποχωρεί σε μια πιο συνήθης χρωματισμένη περιοχή του δέρματος.
-
-
- Απομάκρυνση του μελαγχρωματικών βλαβών και Τατουάζ. Σε αυτή την περίπτωση ο χρωμοφόρος-στόχος είναι μελανίνη ή χρωστική των τατουάζ. Η ακτινοβολία του λέιζερ προκαλεί εξαιρετικά ταχεία θέρμανση της μελανίνης ή της χρωστικής ουσίας των τατουάζ. Έτσι τα κύτταρα που περιέχουν την μελανίνη ή την χρωστική των τατουάζ καταστρέφονται .Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζονται τα κλινικά αποτελέσματα της αφαίρεσης τατουάζ με τη χρήση μιας ακτίνας λέιζερ.



Σχήμα 33 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

- Ανάπλαση. Το χρωμοφόρο-στόχος εδώ είναι το νερό. Ένα επιφανειακό στρώμα του δέρματος αποκόπτεται με αποτέλεσμα την δημιουργία ρυτίδων. Το laser εναποθέτει ενέργεια σε 1μm (Er:YAG laser) ή 20μm (CO2 laser) στην επιδερμίδα εξαιτίας της ισχυρής απορρόφησης της ενέργειας από το νερό. Αυτό αφήνει συνήθως 0.05-1 mm της υπολειμματικής θερμικής βλάβη,ς η οποία επιτυγχάνει επίσης αιμόσταση. Λέιζερ έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για την κατάλυση των κονδυλωμάτων και άλλων καλοηθών επιδερμικών βλαβών.
-
-
- Αποτρίχωση. Το χρωμοφόρο στόχος είναι τα ωοθυλάκια της μελανίνης. Επιλεκτική φωτοθερμόλυση των θυλάκων των τριχών επιτυγχάνεται χωρίς να καταστραφεί το δέρμα. Επίσης, επί του

παρόντος είναι συζητήσιμο εάν η αποτρίχωση που επιτυγχάνεται, είναι μόνιμη.

Στον παρακάτω πίνακα έχουμε μία λίστα με τις δερματολογικές εφαρμογές για ανάπλαση του δέρματος (η πιο δημοφιλής είναι η αφαίρεση ρυτίδων, η αποτρίχωση και αφαίρεση τατουάζ) . Τα λέιζερ οι παράμετροι τους που χρησιμοποιούνται για τις διαδικασίες αυτές , αναφέρονται επίσης.

TABLE 13.2. Dermatological Applications of Lasers

Procedure	Skin Resurfacing		Flair removal				Tattoo Removal	
Commonly used lasers	$C0_2$ laser	Er:YAG laser	Alexandrite laser	Diode laser	Nd:YAG laser	Ruby laser	Q-switched frequency-doubled Nd:YAG laser	Q-switched alexandrite laser
Wavelength	10.6 μιη	2.94 μιη	0.755 μιη	0.81 μιη	1.064 μιη	0.694 μιη	0.532μιη	0.752μιη
Pulse duration	800 μββϋ	0.3-10 msec	2-20 msec	0.2-1 sec	10-50 msec	3 msec	10-80 nsec	50 nsec
Fluence (energy)	3.5-6.5 J/cm[1]	5-8J/cm[2] (0.250-0.4 J) (1-1.5 J) 1,4	25^10 J/cm[2]	23-115 J/cm[2]	90-187 J/cm[2]	10-60 J/cm[2]	6-10 J/cm[2]	2.5-6 J/cm[2] -6 4-
General references and websites					2^1			

1. http://www.lasersurgery.com/laser_resurfacing_aging_and_scars.html.
2. Goldberg, D. J., Unwanted Hair: Evaluation and Treatment with Lasers and Light Source Technology, *Adv. Dermatol.* **14,** 223-248 (1999).
3. Goldberg, D. J., ed., *Laser Hair Removal*, Dunitz, London, 2000.
4. Alora, M. B. T., and Anderson, R. R., Recent Developments in Cutaneous Lasers, *Lasers Surg. Med.* **26,**108-118 (2000).
5. http://www.bli.uci.edu/medical/laserskinsurfacing.html.
6. http://www.bmezine.com/tattoo/tr/iqpl.html.
7. 6.

Αλλαγή κωδικού πεδίου

Αλλαγή κωδικού πεδίου

Οι οφθαλμικές εφαρμογές των λέιζερ, είναι μερικές από τις παλαιότερες θεραπευτικές εφαρμογές και πηγαίνει πίσω περισσότερο από τρεις δεκαετίες.

Νέες εφαρμογές λέιζερ και τεχνικές εφαρμόζονται με ένα συναρπαστικό τρόπο και καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα των οφθαλμολογικών προβλημάτων. Οφθαλμικές εφαρμογές —που χρησιμοποιούν έναν αριθμό μηχανισμών αλληλεπίδρασης λέιζερ - ιστού αναπτύχθηκε —στο Κεφάλαιο 6, όπου συζητείται επίσης η δομή και η λειτουργία του ανθρώπινου ματιού. Οι οφθαλμικές εφαρμογές που διορθώνουν ιατρικές καταστάσεις εμπίπτουν σε δύο κατηγορίες:

- χρήση του ορατού ή κοντά στο ορατό , μήκη κύματος υπέρυθρου λέιζερ , για τη θεραπεία νόσων του αμφιβληστροειδούς ή του γλαυκώματος. Παραδείγματα τέτοιων καταστάσεων είναι 1) η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια που σχετίζεται με οίδημα που προκαλείται από μικροανευρύσματα 2) φλεβικών αποφράξεων του αμφιβληστροειδούς που μπλοκάρουν οφθαλμική παροχέτευση του αίματος που προκαλεί αιμορραγία του αμφιβληστροειδούς, οίδημα και ισχαιμία 3) ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας η οποία στην υγρού τύπου νεοαγγειακού ιστού, εισβάλλει στον κανονικό αμφιβληστροειδή, και παράγει οίδημα της ωχράς κηλίδας και αιμορραγία 4) γλαύκωμα, το οποίο μπορεί να θεραπευτεί με την παραγωγή ενός καναλιού στις δομές της ίριδας ή την συρρίκνωση των ιστών αποστράγγισης, προκειμένου να διευκολυνθεί η μείωση της πίεσης του ματιού.

- Χρήση των μη ορατών μηκών κύματος για τη Διαθλαστική Χειρουργική για να αναδιαμορφώσει τον κερατοειδή για την διόρθωση της όρασης. Τα λέιζερ που χρησιμοποιούνται πλέον για τη διόρθωση της μυωπίας γίνεται με δύο τεχνικές: φωτοδιαθλάσεως (PRK) και λέιζερ in situ κερατοειδούς (LASIK). Σε αυτές τις διαδικασίες, μία δέσμη παλμικού λέιζερ εξομαλύνει τις γωνίες του κερατοειδή με την αφαίρεση περισσότερου ιστού από το κέντρο των γωνιών του κερατοειδούς, παρά από την μέση ζώνη. Το αποτέλεσμα της εξομάλυνσης του κερατοειδούς είναι ότι η εστίαση του ματιού κινείται πιο πίσω προς το επιθυμητό σημείο του στον αμφιβληστροειδή και διορθώνει την όραση διορθώνοντας την απόσταση . Όπως συζητείται παρακάτω, οι PRK και

LASIK τεχνικές χρησιμοποιούν το ίδιο σύστημα λέιζερ και τον ίδιο μηχανισμό αλληλεπίδρασης για την επίτευξη του ίδιου στόχου.

Ωστόσο, υπάρχει μια σημαντική διαφορά. Στην τεχνική PRK, το επιθηλιακό (εξωτερική) στιβάδα του κερατοειδούς πρώτα απομακρύνεται από ένα μηχανικό εργαλείο (μαλακή βούρτσα) ή χημικές ουσίες (αλκοόλη) ή ακόμα και μέσα από τη χρήση μίας δέσμης λέιζερ (transepithelial εκτομή). Η δέσμη λέιζερ χρησιμοποιείται για τον καυτηριασμό και την αναδιαμόρφωση του κερατοειδή χιτώνα. Ένας μαλακός φακός επαφής χρησιμοποιείται ως επίδεσμος και τοποθετείται πάνω από το μάτι για να βοηθήσει το στρώμα επιθηλιακών αυξηθεί από πίσω. Αυτό διαρκεί συνήθως 3-5 ημέρες.

Στην LASIK τεχνική, ο οφθαλμίατρος δημιουργεί ένα αρθρωτό πτερύγιο του κερατοειδούς περίπου 125 mm σε πάχος χρησιμοποιώντας μία εξειδικευμένη λεπίδα κοπής τοποθετημένη σε μια συσκευή κενού. Το εργαλείο κοπής, που είναι γνωστό ως, μικροκερατόμος, στη συνέχεια απομακρύνεται, εκθέτοντας έτσι το υποκείμενο του κερατοειδούς ιστού σε υπεριώδες εκτομή του επιθυμητού βαθμού (λείανση). Τέλος, ο κερατοειδής κρημνός επιστρέφει στην αρχική του θέση.

Άλλες οφθαλμικές εφαρμογές του λέιζερ είναι για οπίσθια καψουλοτομή σε μετα-χειρουργική επέμβαση καταρράκτη ή την κοπή της οπίσθιας υαλώδους σκέλης. Σε καψουλοτομή, μία δέσμη λέιζερ χρησιμοποιείται για να ανοίξει μια τρύπα στη μεμβράνη για να διορθώσει την αδιαφάνεια της μεμβράνης, η οποία μπορεί να εμφανιστεί μετά από την χειρουργική επέμβαση καταρράκτη.

9.3 Η ΣΥΓΚΟΛΗΣΗ ΙΣΤΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ LASER

Η συγκόλληση ιστών με laser είναι η διαδικασία με την οποία αξιοποιείται η ενέργεια που παράγεται από ένα laser, ώστε να συγκολλήσουμε δύο ιστούς

.Αυτή την χρονική στιγμή αυτή η δυνατότητα υπάρχει μόνο για τους μαλακούς ιστούς .

Η συγκόλληση ιστού με λέιζερ αποδείχθηκε για πρώτη φορά από τον Jain και Gorisch (1979), οι οποίοι χρησιμοποίησαν Nd: YAG λέιζερ για να σφραγίσουν αρτηρίες αρουραίου. Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση με λέιζερ θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την επαρκώς θέρμανση ενός ιστού για να γίνει μετουσίωση των πρωτεϊνών (κολλαγόνα) στις επιφάνειες του ιστού και να σχηματίσουν νέες συνδετικές δομές. Πιο νέες μελέτες χρησιμοποιούν laser CO_2 για την συγκόλληση ιστών. Η χρήση του laser CO_2, που σχετίζεται με το νερό, που είναι το συστατικό με την μεγαλύτερη συγκέντρωση στους ιστούς, απορροφά έντονα στο μήκος κύματος των (10,6 μm). Αυτή η ισχυρή απορρόφηση οδηγεί σε ένα μικρότερο οπτικό βάθος διείσδυσης (~ 13 mm), που περιορίζει τη χρήση του μονάχα σε εξαιρετικά λεπτούς ιστούς. Επίσης, σύμφωνα με μια έκθεση λέιζερ, η πλευρική εξάπλωση της θέρμανσης παράγει μια μεγάλη ζώνη τραυματισμού.

Άλλα λέιζερ που έχουν χρησιμοποιηθεί για την συγκόλληση ιστών είναι argon-ion και Nd: YAG, τα οποία παράγουν βαθύτερη και πιο ομοιόμορφη θέρμανση του ιστού από εκείνη που επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός λέιζερ CO_2. Στην περίπτωση του λέιζερ Nd:YAG, η έξοδος λέιζερ 1.320 μm έχει χρησιμοποιηθεί, επειδή σε αυτό το μήκος κύματος, τόσο το νερό και όσο και η αιμοσφαιρίνη απορροφούν. Τα παλμικά λέιζερ εμφανίζονται να μπορούν να ελαχιστοποιήσουν την παράπλευρη θερμική βλάβη. Ωστόσο, η επιλογή του μήκους κύματος λέιζερ και οι παράμετροι έκθεσης (ενέργεια, διάρκεια παλμού, κλπ.) εξαρτώνται σαφώς από την απορρόφηση του ιστού, το οπτικό βάθος διείσδυσης, και το χρόνο της θερμικής χαλάρωσης των ιστών που πρόκειται να συγκολληθούν. Το οπτικό βάθος διείσδυσης πρέπει σαφώς να συνδυάζεται με το πάχος των ιστών που πρέπει να συγκολληθούν για να παρέχουμε ομοιόμορφη θέρμανση.

Η τεχνική συγκόλλησης ιστών με λέιζερ χρησιμοποιεί ακτινοβολία λέιζερ για να συγκολλήσει μια πρωτεϊνούχα "κόλλα" στην επιφάνεια του ιστού, παρέχοντας έτσι μεγαλύτερη αντοχή του δεσμού με λιγότερες παράπλευρες απώλειες σε σύγκριση με την άμεση συγκόλληση. Το αίμα ήταν το πρώτο

υλικό που χρησιμοποιήθηκε ως "κόλλα" . Στη συνέχεια,η πρωτεΐνη από τα ασπράδια των αυγών , αλβουμίνη και άλλες πρωτεΐνες όπως αυτές που προέρχονται από ινωδογόνο του αίματος χρησιμοποιούνται σαν υποκατάστατα για τις κολλήσεις.

Χρωστική ως συγκόλληση εισήχθη για να επωφεληθούμε από την ισχυρή απορρόφηση του φωτός από την επιλεγμένη χρωστική και την αποτελεσματική μετατροπή του φωτός σε θερμότητα, από τη χρωστική στις κολλήσεις. Αυτή η μέθοδος έχει επίσης το πλεονέκτημα ότι μία κατάλληλη χρωστική ουσία μπορεί να επιλεγεί ώστε να ταιριάζει με κορυφή (peak) απορρόφησης του με το συγκεκριμένο μήκος κύματος λέιζερ που χρησιμοποιείται. Αυτή η μέθοδος επέτρεψε την ικανότητα να χρησιμοποιούμε το πιο κοινό και σχετικά φθηνό 808-nm diode laser –με τη βοήθεια μίας βιοσυμβατής χρωστικής, πράσινης ινδοκυανίνης .

Η τεχνική συγκόλλησης ιστών με λέιζερ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ενδοσκοπικά και λαπαροσκοπικά και επεκτείνει το εύρος των εφαρμογών της και σε περιπτώσεις που τα ράμματα δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Άλλα πλεονεκτήματα είναι

- μικρο- χειρουργική
- μειωμένη φλεγμονή
- γρηγορότερη ανάρρωση
- αδιάβροχη επικάλυψη
- ευκολία και ταχύτητα της εφαρμογής

οι εφαρμογές της συγκόλλησης με λέιζερ είναι ποικίλες

- **καρδιαγγειακή χειρουργική επέμβαση**, πρωτοβάθμιας αγγειακή αναστόμωση ,σφράγιση για να μειωθεί η απώλεια αίματος στην αγγειοχειρουργική
- **θωρακική επέμβαση**, σφράγιση των διαρροών αέρα μετά από βιοψία πνεύμονα
- **δερματολογική,** συρραφή του δέρματος με βελτιωμένη αισθητική εμφάνιση και ταχύτερη επούλωση
- **γυναικολογική,** επιδιόρθωση των σαλπίγγων

- **νευροχειρουργική**–, συγκόλληση και επισκευή των περιφερειακών νεύρων
- **ουρολογία**-, κλείσιμο του ουρητήρα-, κυστεκτομή

9.3 LASER ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΙΣΤΟΥ

Η αναγέννηση των ιστών που προκαλείται από laser είναι μια συναρπαστική προοπτική για την αποκατάσταση των ζημιών των ιστών μετά από έναν τραυματισμό. Από τις αρχικές αναφορές για την επούλωση των πληγών με χαμηλής έντασης φωτός (Mester et al., 1971), έχουν υπάρξει πολλές αναφορές για τις επιδράσεις του φωτός στην επούλωση των πληγών και στην αναγέννηση των ιστών (Basford, 1996). Πολλοί ερευνητές αναφέρουν την ορατή και IR ακτινοβολία, σε σχετικά χαμηλές πυκνότητες ενέργειας (πυκνότητες ακτινοβόλησης) της –τάξης των 1-4J/cm^2–, πως διεγείρει την ανάπτυξη των τριχοειδών και τον σχηματισμό ιστού (Basford, 1986). Ωστόσο, οι εκθέσεις αυτές πολλές φορές αμφισβητούνται και τα πειραματικά ευρήματα είναι αντιφατικά.

Ωστόσο , μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην προοπτική ότι το λέιζερ μπορεί να προκαλέσει αναγέννηση των ιστών. Οι ακόλουθες υποθέσεις χρησιμοποιήθηκαν προς αυτή την κατεύθυνση-:

• Η μετεγχειρητική επούλωση των πληγών ξεκινά με το σχηματισμό θρόμβων στο αίμα.

•ο θρόμβος του αίματος οδηγεί στον σχηματισμό ουλώδους ιστού.

• Υπάρχει απουσία σχηματισμού θρόμβων αίματος μετά από εκτομή με λέιζερ.

• Απουσία του θρόμβου μπορεί να επιτρέψει την αναγέννηση του φυσικού ιστού.

Η ακόλουθη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί η προσέγγιση της αναγέννησης ιστού:

• Διμερείς χειρουργικά ελαττώματα (3 mm x 3 mm x 3 mm) δημιουργήθηκαν στους γλουτιαίους μυς των χάμστερ

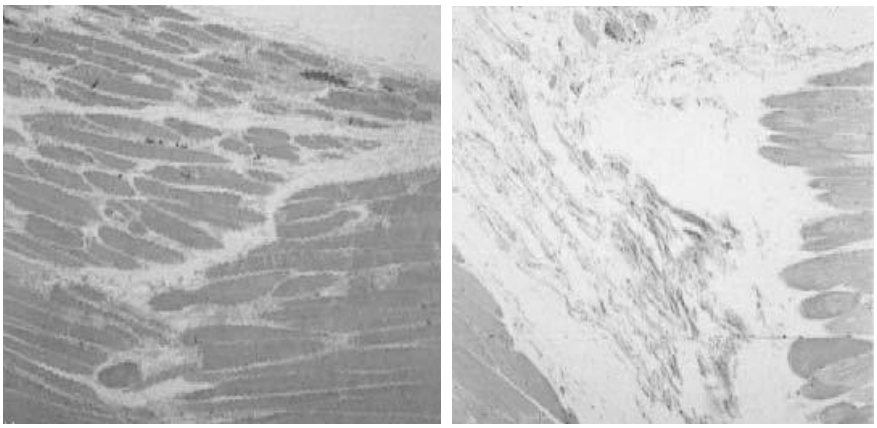
• Κάθε άτομο έλαβε μία πληγή λέιζερ και ετερόπλευρα μια πληγή από νυστέρι

• Στα υποκείμενα εγχύθηκαν με BrDU (800mg/kg) σε όλη την μετεγχειρητική φάση.

• Τα υποκείμενα θανατώθηκαν και τα τραύματα συλλέχθηκαν τόσο για ιστολογική όσο και για ανοσοϊστοχημική ανάλυση.

Από τα αποτελέσματα προκύπτουν οι παρακάτω παρατηρήσεις

Η ενσωμάτωση της BrDU σαφώς υποδεικνύει την ανάπτυξη του νέου ιστού, παρέχοντας έτσι την συναρπαστική προοπτική πως το laser μπορεί να προκαλέσει αναγέννηση ιστού –. Φυσικά χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για να παγιωθεί -η αναγέννηση των ιστών με τη χρήση αυτής της διαδικασίας. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώθηκε ιστολογικά, όπως βλέπουμει στο Σχήμα



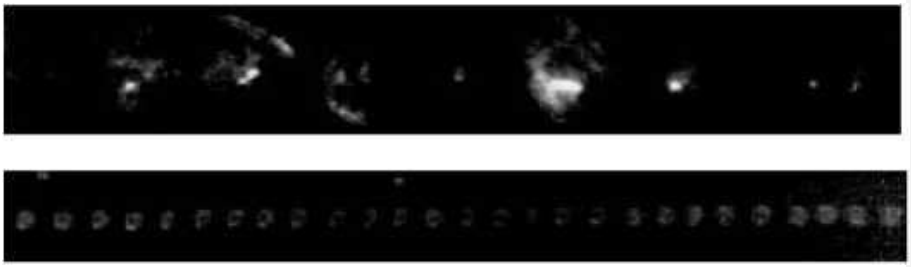
(Αναγέννηση μυών μετά από εκτομή με λέιζερ

Σχήμα 34 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

9.4 FEMTOLASER ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ

Ένας τομέας αυξανόμενου ενδιαφέροντος είναι –η χρήση των εξαιρετικά στενών παλμών (femtoseconds) λέιζερ για τη χειρουργική επέμβαση και την αφαίρεση ιστού (Juhasz et al., 2002). Τα πλεονεκτήματα που προσφέρονται από αυτούς τους στενούς παλμούς (της τάξης των femtoseconds) είναι ότι οι τομές –ή αφαιρέσεις μπορούν να γίνουν με μεγαλύτερη ακρίβεια, με πολύ μικρές παράπλευρες απώλειες. Ο μηχανισμός της αλληλεπίδρασης λέιζερ - ιστού που συμβαίνει χρησιμοποιώντας στενούς παλμούς λέιζερ είναι επίσης διαφορετικός από τους μηχανισμούς φωτοθερμικών και φωτοεκτομής που έχει ήδη συζητηθεί-, επειδή αυτοί αφορούν το περίγραμμα του ιστού και την συγκόλληση του . Η υψηλή μέγιστη ισχύς των παλμών αυτών οδηγούν σε φωτοδιάσπαση όπως είδαμε και στο κεφάλαιο 6. Ο μηχανισμός της φωτοδιάσπασης περιλαμβάνει μια οπτική κατάρρευση που –προέρχεται από το laser (LIOB) ,στην οποία ένας παλμός laser -, ισχυρά εστιασμένος και πολύ μικρής διάρκειας–, παράγει ένα ηλεκτρικό πεδίο , υψηλής έντασης και οδηγεί σε ικανό πολυφωτονικό –ιονισμό όπου μεταγενέστερα παράγει καυτό –micro πλάσμα. Αυτό το microπλάσμα διαστέλλεται με υπερηχητική ταχύτητα κόβοντας ή εξάγοντας τον περιβάλλον ιστό-. Δεδομένου ότι η μετατόπιση είναι

αδιαβατική (δηλαδή, αυτό συμβαίνει σε μια σύντομη χρονική στιγμή σε σύγκριση με την διάρκεια της διάχυσης της τοπικής θέρμανσης), η επίδραση της εκτομής ή κοπής περιορίζεται χωρικά, επομένως περιορίζεται και οποιαδήποτε διάδοση λόγω θερμικής βλάβης. Στο παρακάτω σχήμα βλέπουμε τα αποτελέσματα της εκτομής ιστού που παράγεται από δύο διαφορετικές πηγές: (α) ένα λέιζερ με πλάτος παλμού 200-ps (β) ένα λέιζερ με πλάτος παλμού 80-fs. Τα αποτελέσματα αυτά είναι από το Κέντρο της Ultrafast Optical Science στο Πανεπιστήμιο του Μίσιγκαν.



αφαίρεση ιστού με τη χρήση λέιζερ από δύο διαφορετικά πλάτη παλμού

Σχήμα 35 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

Για τις μελέτες αυτές, οι δέσμες εστιάστηκαν σε ένα κυκλικό σημείο και γίνεται σάρωση σε όλο το δείγμα. Ο διαχωρισμός του κυκλικού σημείου είναι ίδιος σε αμφότερες τις περιπτώσεις, αλλά η διαδικασία εκτομής που έγινε με ένα ανεξέλεγκτο τρόπο, στην περίπτωση των παλμών ps και οι αποκολλημένοι τομείς (ιστοί) είναι μεγάλοι. Οι fs παλμοί λέιζερ, από την άλλη πλευρά, παράγουν αναπαραγώγιμες τομές που είναι χωροταξικά περιορισμένες.

9.5 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ

Μηχανική ιστών με χρήση υπολογιστή –. Με την ανάπτυξη κατάλληλου υλικού και λογισμικού για τον έλεγχο της ακρίβειας της εκτομής του ιστού ή της συγκόλλησης-, η χειρουργική επέμβαση θα οικοδομήσει την εμπιστοσύνη τόσο του γιατρού όσο και του ασθενούς. Τα συστήματα με τη βοήθεια υπολογιστή θα παρέχουν επίσης έναν μηχανισμό παρακολούθησης και ανατροφοδότησης για να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα με ελάχιστες παράπλευρες –απώλειες. Η εισαγωγή της ρομποτικής είναι μια πολλά υποσχόμενη ευκαιρία για αυτόν τον τομέα. Θέματα ασφάλειας λέιζερ μπορούν επίσης να αντιμετωπιστούν με τη χρήση συστημάτων ρομποτικής με τη βοήθεια υπολογιστή, καθιστώντας τα συστήματα αυτά πιο φιλικά προς το χρήστη.

Νέες "κόλες" και χρωστικές για ενίσχυση της συγκόλλησης–. Νέα βιοσυμβατά υλικά για την συγκόλληση ιστών, θα διευρύνουν το πεδίο και την χρηστικότητα –της συγκόλλησης ιστών. Μεγάλη έμφαση επίσης δίνεται η ενεργοποίηση φωτός να γίνεται από laser τα οποία να είναι οικονομικά –. Για παράδειγμα έχει γίνει ήδη αναφορά χρήσης στερεάς πρωτεΐνης που περιέχει ινδοκυανινη (πράσινη χρωστική) η οποία απορροφά σε ακτινοβολίες που παράγονται από κοινά διοδικά –laser με μήκη κύματος 800nm και έχουν χρησιμοποιηθεί για την επισκευή περιφερειακών νεύρων-.

Μηχανισμός κοπής και συγκόλλησης ιστών. Ακόμα κι αν υπάρχει μια γενική συναίνεση σχετικά με τους βασικούς μηχανισμούς των διαδικασιών που παρουσιάστηκαν παραπάνω, πιστεύεται πως συμβαίνουν –και –άλλες μοριακές διεργασίες κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης λέιζερ- ιστού. Βελτιωμένες τεχνικές–, για την παρακολούθηση των -μοριακών -αλλαγών σε πραγματικό χρόνο θα είναι σημαντικής αξίας και επομένως θα βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα μιας δεδομένης θεραπευτικής αγωγής.

Femtolaser Τεχνολογία. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως τα femtolasers έχουν αναδυθεί ως ένα ισχυρό εργαλείο για χειρουργικές επεμβάσεις–. Τα Femtolasers βρίσκονται ακόμη σε επίπεδο έρευνας και απαιτούν μεγάλη

φροντίδα και συντήρηση από εξειδικευμένο τεχνικό. Επιπλέον, είναι ακριβά. Η τεχνολογία είναι, ωστόσο, ταχέως αναπτυσσόμενη με μία σημαντική εξέλιξη που προέρχεται από τις πιθανές εφαρμογές ενός femtosecond λέιζερ ίνας στις τηλεπικοινωνίες. Αυτά τα λέιζερ ινών femtosecond 1.55 μm, μπορούν να βρουν εφαρμογή και στην χειρουργική και ταυτόχρονα να συμβαλλουν και στην επικοινωνία με άλλα ιατρικά μηχανήματα την ίδια ώρα.

ΚΕΦΑΛΕΙΟ 10 ΟΠΤΙΚΗ ΛΑΒΙΔΑ ΚΑΙ ΟΠΤΙΚΟ "ΨΑΛΙΔΙ "

Τα λέιζερ είναι χρήσιμα εργαλεία για να επιτύχουμε μικροχειρισμό των βιολογικών δειγμάτων. Το κεφάλαιο αυτό καλύπτει δύο τύπους μικροχειρισμών λέιζερ: λαβίδα λέιζερ για την οπτική παγίδευση και ψαλίδια λέιζερ για μικροδιατομή.

Η αρχή της οπτικής παγίδευσης χρησιμοποιώντας μια ακτίνα λέιζερ είναι ένας τομέας που περιλαμβάνει πολλούς διαφορετικούς επιστημονικούς τομείς. Γενικά έχουμε την δυνατότητα πολύ μικρά βιολογικά οργανίδια να τα παγιδεύσουμε σε μία εστιασμένη δέσμη φωτός που παράγεται από Laser και να τα μετακινήσουμε στον χώρο . Αυτή είναι μία από τις εφαρμογές που έχει η οπτική λαβίδα. Ωστόσο παρακάτω θα δούμε πως σχεδιάζεται μία οπτική λαβίδα. Επίσης υπάρχουν διάφορες τεχνικές αξιοποίησης μιας λαβίδας λέιζερ, όπως είναι η χρήση τους ως οπτικοί φορείς ή ως εργαλεία για την ταυτόχρονη, πολλαπλή παγίδευση πολλών βιολογικών ειδών.

Το ψαλίδι λέιζερ λειτουργεί με την αρχή της φωτοεκτομής, η οποία συζητήθηκε στο Κεφάλαιο 6. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ανοίξουμε μια τρύπα σε μια κυτταρική μεμβράνη για να επιτραπεί η έγχυση ενός φαρμάκου ή γενετικού υλικού. Μια πιο δημοφιλής εφαρμογή είναι η μικροεκτομή (microdissection), που χρησιμοποιείται για να αποκοπεί ένα μόνο κύτταρο ή ένας πληθυσμός κυττάρων από ένα δείγμα ιστού.

10.1 ΝΕΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΓΙΑ ΜΙΚΡΟ-ΧΕΙΡΙΣΜΟΥΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΩΤΟΣ

Ας φανταστούμε τις παρακάτω εφαρμογές

- να μπορούμε να πιάσουμε ένα βιολογικό κύτταρο, μη επεμβατικά, χρησιμοποιώντας μια εστιασμένη ακτίνα λέιζερ, κρατώντας το στη θέση του, να το κινούμε ή να το τεντώνουμε
- να κρατάμε ένα αυγό με μία ακτίνα λέιζερ και να φέρουμε ένα σπέρμα παγιδευμένο σε μια άλλη δέσμη για την γονιμοποίηση του αυγού.
- Να μπορούμε να κάνουμε μία μικρή τρύπα σε ένα κύτταρο για να κάνουμε ένεση μορίων για το χειρισμό και τον έλεγχο των ενδοκυτταρικών δραστηριοτήτων, χωρίς μόνιμη βλάβη της μεμβράνης πλάσματος, η οποία, στη συνέχεια, θα σφραγίζει σε ένα κλάσμα του δευτερολέπτου.
- Εκτέλεση μικροχειρουργικής, χρησιμοποιώντας ένα λέιζερ ως νυστέρι για να κόψει ένα τμήμα της ενδοκυτταρικής δομής (ένα οργανίδιο ή ένα τμήμα DNA) και να τροποποιήσει τη δομή και τη λειτουργία ενός κυττάρου χωρίς να επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων.
-
-

Μπορεί να φαίνεται σαν επιστημονική φαντασία, αλλά αυτοί οι τύποι μικρο-χειραγώγησης αυτή την στιγμή εφαρμόζονται σε πολλά εργαστήρια στον κόσμο. Τσιμπιδάκια λέιζερ και ψαλίδια λέιζερ είναι δύο διαφορετικά εργαλεία μικροχειρισμού που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανεξάρτητα ή να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό. Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2, το φως, ως σωματίδιο (φωτόνιο) μεταφέρει ορμή, μια ιδιότητα που χρησιμοποιείται για τη λειτουργία της λαβίδας λέιζερ. Το φως είναι επίσης ένας φορέας ενέργειας, πακέτα ενέργειας που ονομάζονται κβάντα . Η

ενεργειακή πτυχή του φωτός χρησιμοποιείται στη δράση ψαλιδιού λέιζερ. Όταν ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα αλληλεπιδρά με ένα μικρό σωματίδιο, τότε το κύμα ανταλλάσσει ενέργεια και ορμή με το σωματίδιο. Η δύναμη που ασκείται στο σωματίδιο είναι ίση με την ορμή που μεταφέρεται ανά μονάδα χρόνου. Η δύναμη που ασκείται από μία οπτική λαβίδα είναι της τάξεως των piconewtons (10^{-12} N). Είναι πάρα πολύ αδύναμη για να χειριστεί αντικείμενα μεγάλου μεγέθους–, αλλά είναι αρκετά μεγάλη για να χειριστεί –μεμονωμένα σωματίδια σε κυτταρικό επίπεδο. Η δύναμη κατανέμεται σε μεγαλύτερο μέρος της περιοχής του σωματιδίου, οπότε εύθραυστα και λεπτά_αντικείμενα μπορούν να αλλοιωθούν χωρίς να προκαλεί βλάβη. Ακτίνες λέιζερ κοντά στις υπέρυθρες —μπορούν να χειριστούν κύτταρα χωρίς να τα καταστρέψουν–, επειδή τα κύτταρα δεν απορροφούν σε αυτά τα μήκη κύματος.

Τα τσιμπιδάκια λέιζερ, επίσης γνωστά ως οπτικές λαβίδες ή οπτικές παγίδες, χρησιμοποιούν την αρχή της παγίδευσης μικρών σωματιδίων / βιολογικών κυττάρων-, στη μέση μιας εστιασμένης δέσμης συνεχούς κύματος (CW) λέιζερ με βάση την κλίση στη δύναμη που προέρχεται από την αλλαγή της ορμής του φωτός–. Το μήκος κύματος της δέσμης λέιζερ (συνήθως 1064 nm) επιλέγεται από την περιοχή της οπτικής διαφάνειας του σωματιδίου, έτσι ώστε να μην λαμβάνει χώρα καμία ανταλλαγή της ενέργειας (απορρόφηση φωτός). Το σωματίδιο/κύτταρο που είναι παγιδευμένο, μπορεί να μετακινηθεί στον χώρο μεταφέροντας το εστιακό σημείο του laser, καθ αυτόν τον τρόπο

ονομάζεται και οπτική λαβίδα ,γιατί μπορούμε χρησιμοποιώντας την να αλλάζουμε θέση του σωματιδίου στον χώρο–. Η ανάπτυξη της οπτικής λαβίδας πρωτοεμφανίζεται με την πρωτοποριακή εργασία του Ashkin 1985. Η πρώτη έκθεση της παγίδευσης και το χειρισμού ενός ζωντανού βιολογικού κύτταρου σε μια ακτίνα λέιζερ χωρίς να αυτό να καταστραφεί ήταν επίσης από τον Ashkin το 1987. Από τότε, οι οπτικές λαβίδες έχουν διανύσει πολύ δρόμο και έχουν αναγνωριστεί ως ένα σημαντικό εργαλείο για βιολογικούς μικροχειρισμούς . Τρέχουσες εφαρμογές κυμαίνονται από βασικές μελέτες της βιοφυσικής και βιοχημείας στο επίπεδο του ενός κυττάρου μέχρι και σε

ιατρικές εφαρμογές, στην ανάλυση των κυττάρων του αίματος και in vitro γονιμοποίησης . Υπάρχει ακόμη και μια πρόταση της χρήσης της οπτικής λαβίδας στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου με βάση τις αλλαγές σε ιξωδοελαστικές ιδιότητες των κυττάρων .

Μια λαβίδα λέιζερ προσφέρει μια σειρά από πλεονεκτήματα σε σχέση με ένα παραδοσιακό μηχανικό μικροχειριστήριο. Μερικά από αυτά είναι:

- Δεν περιλαμβάνει καμία μηχανική επαφή που μπορεί να εισάγει τον κίνδυνο μόλυνσης.
- Πρόκειται για μία μη επεμβατική μέθοδο χειραγώγησης που δεν προκαλεί καμία ζημιά στα ζωντανά κύτταρα. Έτσι, ένα ζωντανό κύτταρο μπορεί οπτικά να παγιδευτεί και να χειραγωγείται, χωρίς να επηρεάζεται η δυνατότητα επιβίωσης του.
- υποκυτταρικά οργανίδια σε ένα ζωντανό κύτταρο μπορούν να αλλοιωθούν (επανατοποθετηθούν) χωρίς το άνοιγμα της μεμβράνης, όπως απαιτείται από άλλες βιολογικές μεθόδους.
- Οπτική παγίδευση παρέχει πρωτοφανής δυνατότητες για τη μέτρηση διαφόρων δυνάμεων στη βιολογία, μέχρι το επίπεδο των piconewtons, επιτρέποντας έτσι να συσχετιστούν αυτές οι δυνάμεις με ειδικές βιολογικές λειτουργίες.
- Δυνατότητα χρήσης τσιμπιδάκια λέιζερ για μηχανική αποσυμπίεση του DNA μπορεί να προσφέρει σημαντικές εφαρμογές στον τομέα της γονιδιωματικής με την επιτάχυνση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων.
-
-

Η ιστορία του ψαλιδιού λέιζερ είναι ακόμη μεγαλύτερη. Οι Berns και Round (1970) έδειξαν –ότι τα λέιζερ μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μικρο - διαμελισμό των κύτταρων–. Το ψαλίδι λέιζερ είναι βολικό για την εκτέλεση μικροσκοπικής –χειρουργικής και για –επέμβαση σε ένα δείγμα ιστού, κυττάρων και μορίων. Σε αντίθεση με τσιμπιδάκια λέιζερ που έχουν

εστιασμένη δέσμη IR συνεχούς κύματος, το ψαλίδι λέιζερ χρησιμοποιεί σύντομους παλμούς υψηλής ακτινοβολίας σε ένα μήκος κύματος στο οποίο ένα δείγμα ιστού ή κυτταρικού συστατικού του να απορροφά. Τυπικά, μπορεί να είναι ένα ns , subnanosecond, ή ακόμα και ένα femtosecond, λέιζερ στερεάς κατάστασης , με την έξοδο σε μια ορατή ή υπεριώδη φασματική περιοχή . Συχνά είναι μια πηγή λέιζερ UV όπως ένα λέιζερ αζώτου (337 nm). Η απορροφούμενη ενέργεια που παράγει το οπτικό ψαλίδι προκαλεί φωτοεκτομή για τη διεξαγωγή μιας λεπτής μικροχειρουργικής τομής σε έναν ιστό, ένα κύτταρο, ή οργανίδιο του. Όπως εξηγείται στο κεφάλαιο 6, η διαδικασία φωτοεκτομής περιλαμβάνει μία φωτοχημική διαδικασία με σπάσιμο των χημικών δεσμών, χωρίς να παράγεται θερμότητα.

Ένα ψαλίδι λέιζερ παρέχει μεγάλη ακρίβεια σε σύγκριση με μια επεμβατική μηχανική συσκευή. Σε σύγκριση με ένα κανονικό νυστέρι, το ψαλίδι λέιζερ παρέχει τη δυνατότητα να ενεργεί σε διαστάσεις τόσο μικρές όσο 0,25 mm σε διάμετρο. Μπορεί, ως εκ τούτου, να χρησιμοποιηθεί για να παράγει αλλαγές σε ένα χρωμόσωμα κόβοντας ένα τμήμα του, ενώ εξακολουθεί αυτό να είναι βαθιά μέσα σε ένα ζωντανό κύτταρο.

Ψαλίδι λέιζερ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να κάνει μια τρύπα micro μεγέθους σε μία μεμβράνη (κυτταρική) που σφραγίζει μέσα σε ένα κλάσμα του δευτερολέπτου. Εξωγενή είδη μπορούν να εισαχθούν σε ένα κύτταρο μέσα από αυτές τις οπές, χωρίς μόνιμη βλάβη των μεμβρανών. Το χαρακτηριστικό αυτό παρέχει μια εύκολη προσέγγιση για τη γενετική τροποποίηση των κυττάρων.

Ο όρος microdissection λέιζερ συχνά χρησιμοποιείται για να δηλώσει την διαδικασία αποκοπής ενός τμήματος ενός δείγματος ιστού για να ληφθεί καθαρό (αμόλυντα) δείγμα ιστού, ή να διαχωρίσει τα καρκινικά κύτταρα από τα προκαρκινικά νεόπλασματα .

Ένας άλλος όρος είναι η οπτική ένεση, η οποία αναφέρεται σε μια διαδικασία κατά την οποία μία δέσμη λέιζερ τρυπά μια τρύπα ένα κύτταρο για να το

"φορτώσει" με εξωγενή μόρια, χωρίς καμία ορατή βλάβη στο κύτταρο και με υψηλά ποσοστά επιβίωσης, αυτού-.

Οι ερευνητικές ομάδες του Gruelich και Berns πρωτοστάτησε σε εφαρμογές που αφορούν τις συνδυασμένες δυνατότητες της λαβίδας λέιζερ και ψαλίδια λέιζερ. Μπορούν χρησιμοποιηθεί ένα Nd:-YAG λέιζερ ως -λαβίδα για να φέρει δύο ανθρώπινα κύτταρα μυελώματος κοντά μεταξύ τους, τότε χρησιμοποιείται ένα παλμικό UV αζώτου λέιζερ ως ψαλίδι για να κόψει τις παρακείμενες μεμβράνες ώστε να γίνει η σύντηξη των δύο κυττάρων (Gruerlich, 1999 Berns, 1998). Τα δύο κύτταρα συγχωνεύθηκαν σε ένα ενιαίο υβριδικό κύτταρο περιέχει τα γονίδια και των δύο .

10.2 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΛΑΒΙΔΑΣ LASER

Παρακάτω θα δούμε το block της κατασκευής των οπτικών λαβίδων. Η διάταξη της –οπτικής αυτής –μονάδας, παγίδας λέιζερ δείχνεται στο Σχήμα παρακάτω

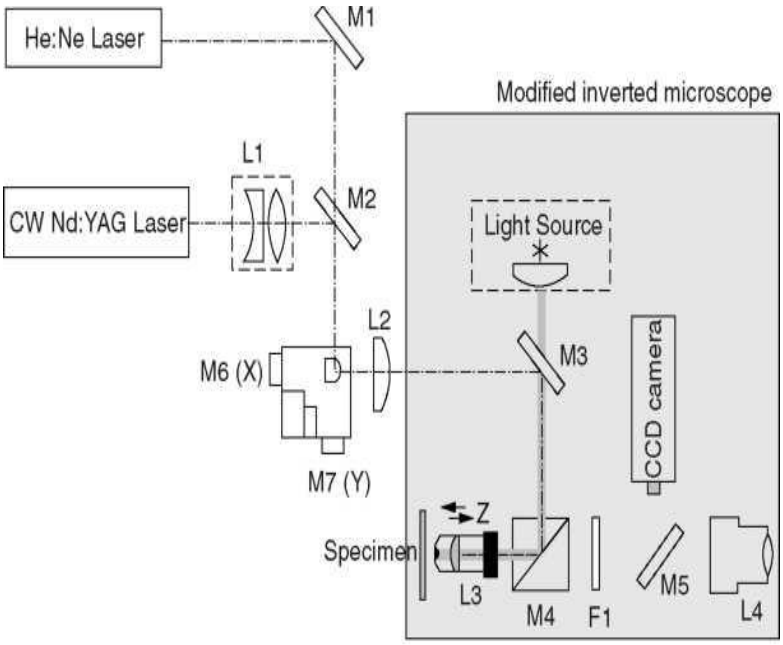


Figure 14.4. Single-beam optical trapping system.

Σχήμα 36 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

Τα κύρια συστατικά ενός οπτικού παγίδα που χρησιμοποιείται σε αυτό το σχεδιασμό είναι ως ακολούθως:

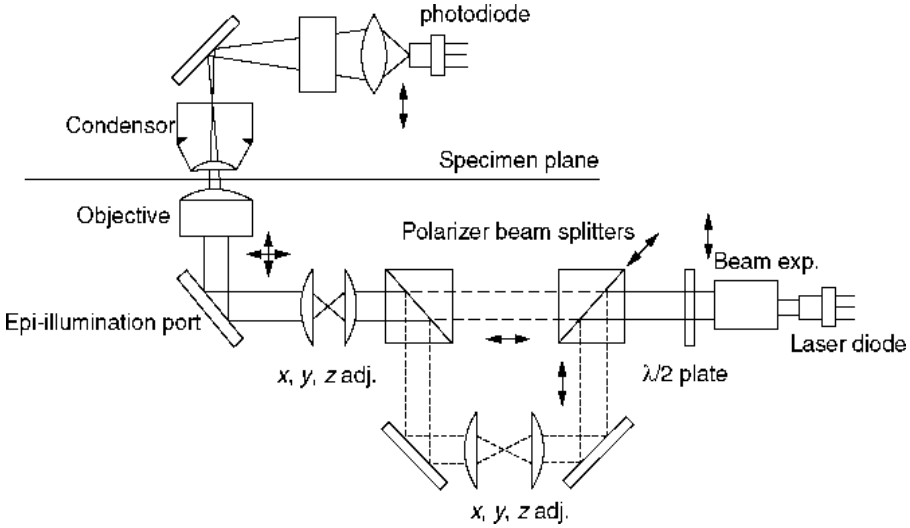
1) Ένα μικροσκόπιο (όρθιο ή ανεστραμμένο) με υψηλής Αριθμητικής οπής φακού παρατήρησης–. Μερικές_–τυπικές προδιαγραφές είναι: NA 1.25-1.40, μεγέθυνση 40-100x. Η διαμόρφωση ου εμφανίζεται χρησιμοποιεί ένα Nikon TE200 ανεστραμμένο μικροσκόπιο με ένα 1.30-NA ελαιοκαταδυτικό–, 100x μεγέθυνση των φακών παρατήρησης-. Η υψηλής αριθμητικής οπή-, επιτρέπει μια στενή –εστίαση της δέσμης λέιζερ για να δημιουργήσει μία βαθμίδα υψηλής έντασης (και, ως εκ τούτου, μια μεγάλη δύναμη)–. Επιπλέον, για τις μελέτες με τη χρήση απεικόνισης φθορισμού, αυτό το μικροσκόπιο μπορεί να είναι είτε ένα επι-φθορισμού ή –ένα συνεστιακό μικροσκόπιο–. Για να συνδυάσει την οπτική παγίδα και τον τρόπο_-επιφθορισμού στην_-περίπτωσή μας, ο σχεδιασμός του μικροσκόπιου Nikon TE200 έχει τροποποιηθεί με την εισαγωγή καθρέφτη M3, η οποία μας επιτρέπει να εισαγάγει ακτίνα λέιζερ παγίδευσης-. Η δέσμη εισάγεται ως παράλληλη δέσμη με τη χρήση του φακού L2, η οποία αντικατοπτρίζεται από τους καθρέφτες M3 και M4 και, στη συνέχεια, επικεντρώνεται στο δείγμα με φακό L3. Οι καθρέπτες M3 και M4 έχουν σχεδιαστεί για να μεταδίδουν και να αντανακλούν αντίστοιχα, το φως από μία λυχνία υδραργύρου (επισημασμένο ως πηγή φωτός στο Σχήμα 14.4. Η πηγή - λάμπα υδραργύρου μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε για τη λειτουργία ανάκλασης ή για τη λειτουργία της φωταύγειας (απεικόνιση). Όλες οι λειτουργίες του μικροσκόπιου ελέγχονται από υπολογιστή Έτσι είναι δυνατή η προβολή βίντεο των εικόνων του μικροσκοπίου και η παρακολούθηση της οπτικής παγίδευσης.

2) **Μία CW Πηγή Laser** που παρέχει μήκη κύματος στα οποία τα βιολογικά δείγματα είναι διαφανή-. Με βάση τα οπτικά χαρακτηριστικά των κυττάρων , η περιοχή κοντά στις IR που καλύπτει μήκη 700-1300 nm–, χρησιμοποιούνται για την οπτική παγίδευση. CW laser με δύναμη στο εύρος αρκετών εκατοντάδων milliwatts –έως αρκετών watts , χρησιμοποιούνται τα οποία μπορούν να παράγουν εντάσεις στο εύρος των 10^6-10^8W/cm^2 · Κατάλληλες επιλογές είναι Nd: YAG σε 1064nm, Nd: YLF στα 1047 nm, Ti: sapphire στο εύρος 695-1100nm, και διάφορα λέιζερ διόδου, γενικά στην περιοχή 800-900 nm (όπου είναι διαθέσιμα με την υψηλότερη ισχύ)-.

Προκειμένου να παραχθεί η πιο απότομη κλίση δύναμης, μία δέσμη λέιζερ με τη λειτουργία TEM_{00} χρησιμοποιείται. Τέτοιες δομές υψηλής ποιότητας λειτουργίας μπορούν να επιτευχθούν εύκολα από λέιζερ diode bar-pumped Nd: YAG lasers and Nd: YAG laser second-harmonic-pumped Ti: sapphire . Ωστόσο, στην περίπτωση των λέιζερ διόδου, τα οποία παράγουν δέσμες ελλειπτικές, απαιτείται δέσμη laser ,διορθωτική, για να κάνει την δέσμη κυκλική. Μια συνεχούς κύματος Nd:YAG TEM_{00} χρησιμοποιήθηκε για την οπτική παγίδευση στη διαμόρφωση και απεικονίζεται στο Σχήμα 14.4. Μία κόκκινη δέσμη από ένα χαμηλής ισχύος He: Ne λέιζερ χρησιμοποιείται ως στόχος της ακτίνας laser-.

3)**κατεύθυνση της ακτίνας ώστε να επιτευχθεί κινητή παγίδευση .**Υπάρχουν αρκετοί μέθοδοι ώστε να γίνει ο χείρισμοςκινητών σωματιδίων και η παγίδευση τους. Ορισμένα πειράματα απαιτούν ταυτόχρονη χρήση περισσοτέρων της μίας οπτικής παγίδας (Fallman και Axner, 1997). Για δύο παγίδες, μια ενιαία δέσμη λέιζερ μπορεί να χωριστεί σε δύο, χρησιμοποιώντας έναν πολωτικό διαμεριστή ακτίνας (Misawa 1992).

Μία πιο ευέλικτη διάταξη για την παραγωγή πολλαπλών οπτικών παγίδων χρησιμοποιεί time-sharing της ίδιας δέσμης ανάμεσα σε μια σειρά από θέσεις στο επίπεδο του δείγματος. Αυτό το χαρακτηριστικό επιτυγχάνεται με την ταχεία σάρωση της θέσης εστίασης της δέσμης και πίσω μεταξύ του επιθυμητού συνόλου θέσεων (Visscher 1993). Όταν το φως έχει σαρωθεί αρκετά γρήγορα, οι οπτικές παγίδες που σχηματίζονται συμπεριφέρονται παρόμοια με αυτό που θα συσταθεί υπό σταθερό φωτισμό. Μία διάταξη διπλή οπτική παγίδας φαίνεται στο παρακάτω σχήμα-.



Σχήμα 37 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

Μορφοποιήθηκε: Αγγλικά (Η.Π.Α.)

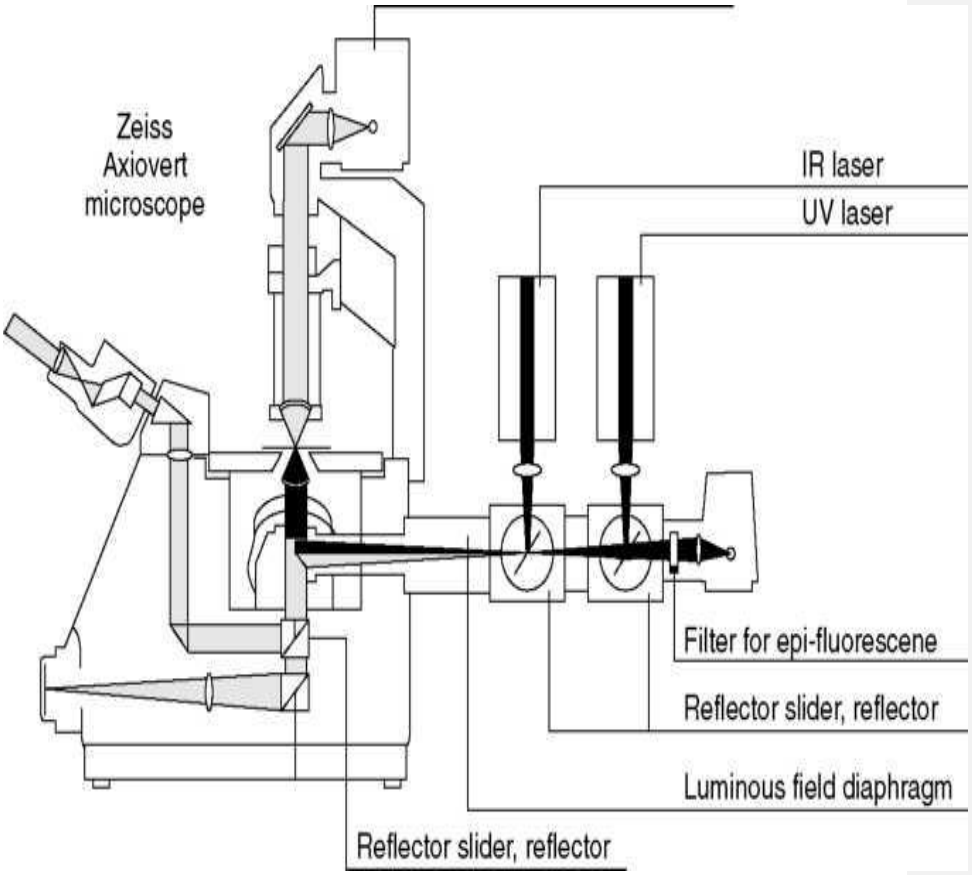
10.3 LASER ΨΑΛΙΔΙΑ

Η δράση ενός ψαλιδιού λέιζερ χρησιμοποιεί την φωτοεκτομή με χρήση παλμικής —ακτινοβολίας λέιζερ. Ένα κατάλληλο UV λέιζερ, που χρησιμοποιείται συχνά, είναι ένα παλμικό λέιζερ αζώτου που παρέχει ένα παλμό εξόδου 3 - ns και ενέργειας 120-300 μJ στα 337 nm. Όταν εστιάζεται μέσω ενός στόχου υψηλής αριθμητικού –ανοίγματος, μπορεί να παράγει μια υψηλή πυκνότητα των φωτονίων σε ένα σημείο, λιγότερο από 1 μm. Αυτή η υψηλή πυκνότητα των φωτονίων της υπεριώδους ακτινοβολίας παράγει φωτοεκτομή εξαιτίας της φωτοχημικής αποσύνθεσης των κυτταρικών δομών (κυρίως μελανίνης).

Η διαδικασία αυτή έχει συζητηθεί στο Κεφάλαιο 6 –. Δεδομένου ότι είναι μια φωτοχημική διαδικασία, παράγεται πολύ λίγη θερμότητα και έτσι συχνά αποκαλείται ως –κρύο - αφαιρετική διαδικασία. Χρησιμοποιώντας αυτή τη

διαδικασία, το ψαλίδι λέιζερ μπορεί να κόψει σε εστιακό μέγεθος μικρότερο από 1 μm, χωρίς να καταστρέφει τις γειτονικές υποκυτταρικές / κυτταρικές δομές.

Η ίδια αρχή της φωτοεκτομής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ανοίξουμε τρύπες στην κυτταρική μεμβράνη, οι οποίες ταχέως θα κλείνουν. Αυτή η διαδικασία επίσης μερικές φορές αναφέρεται ως optoinjection επειδή φάρμακα ή γενετικά υλικά μπορούν να εγχυθούν μέσα στο κύτταρο. Όπως βλέπουμε στο παρακάτω σχήμα συνδυάζοντας ένα ψαλίδι λέιζερ με μια λαβίδα λέιζερ, ανοίγει νέες πόρτες για μια σειρά εφαρμογών. Αυτή η σχεδίαση συνδυάζει μια δέσμη λέιζερ UV, που χρησιμοποιείτε ως οπτικό ψαλίδι, με μία δέσμη IR που χρησιμοποιείται για την οπτική παγίδευση.



Σχήμα 38 (πηγή :INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS, PARAS N. PRASAD)

Βιβλιογραφία

- **introductions to biophotonics (Paraw N. Prasad)**

- **www.help-forward.gr**
- **www.endourology.gr/pageid/laser**
- **www.rp-photonics.com/cavity_dumping**
- **google ---->chatzidimitroglou.pptx**
- **www.news-medical.net/health/spectroscopy**
- **www.routsias-lab.gr**
- **kpe-kastor.kas.sch.gr/ergastiriakos_odigos/introduction/optical**
- **www.eng.ucy.ac.cy**
- **www.kyttarometria.gr/files.doc07.pdf**