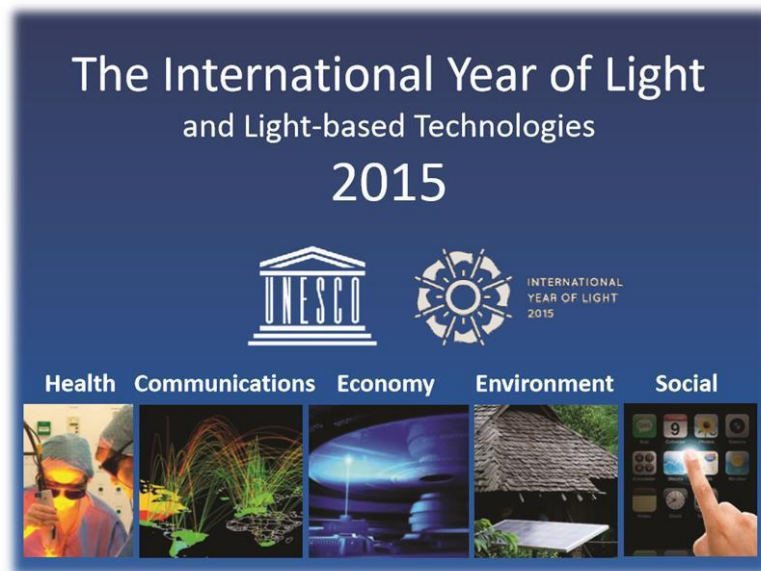




Βιοφωτονικές τεχνικές μικροχειρισμού κυττάρων και νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμάκων



Μυρσίνη Μακροπούλου
Καθηγήτρια Τομέα Φυσικής, Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και
Φυσικών Επιστημών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα.



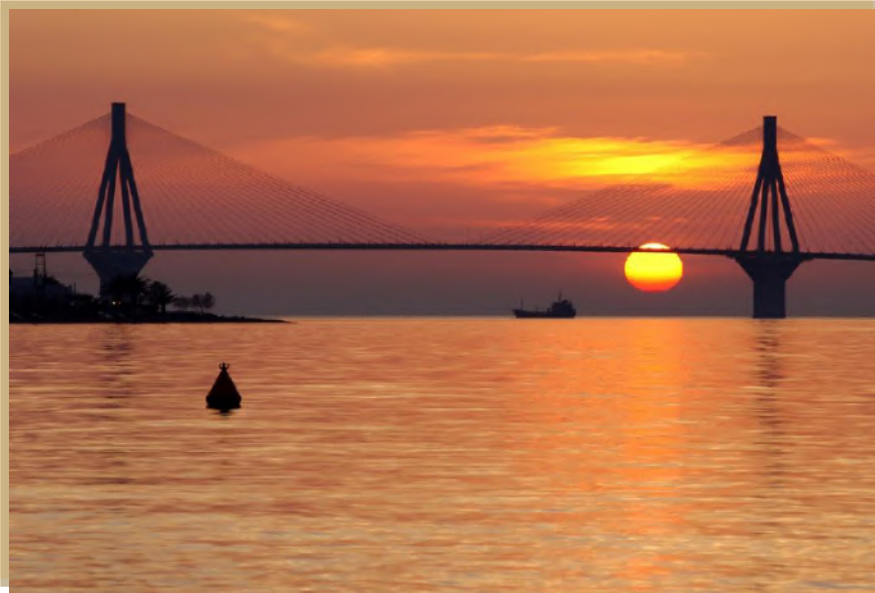
Τα μέλη του εργαστηρίου **“Οπτοηλεκτρονική, Lasers και Εφαρμογές”** που συμμετέχουν ή συμμετείχαν στην έρευνα που περιγράφεται σε αυτήν την παρουσίαση είναι:
Μέλη ΔΕΠ: **Αλέξανδρος Σεραφετινίδης, Μυρσίνη Μακροπούλου,**
Μεταδιδακτορικοί ερευνητές: **Ε.-Χ. Παπαγιάκουμου, Ελλάς Σπυράτου, Δόμνα Κοτσιφάκη,**

1^η Ημερίδα Ιδρυτικών Μελών ΕΛΕΝΕΠΥ
Δευτέρα 13/6/2016



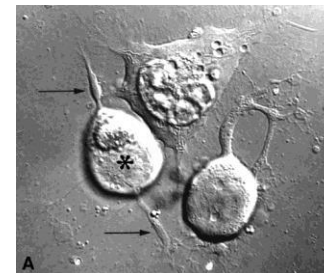
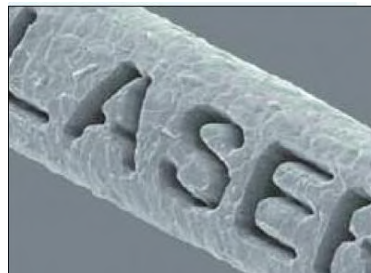
Η ΦΥΣΙΚΗ ΣΤΙΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ: ΓΕΦΥΡΩΝΟΝΤΑΣ ΤΟ ΠΑΡΟΝ
ΜΕ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ – **ΒΙΟΦΩΤΟΝΙΚΗ**

**1895: ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ
ΤΩΝ ΑΚΤΙΝΩΝ X
ΚΑΙ ΤΗΣ
ΡΑΔΙΕΝΕΡΓΕΙΑΣ**



**1960: ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ
ΤΩΝ ΑΚΤΙΝΩΝ
LASER**

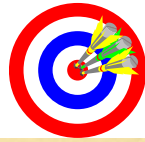
*Μισός αιώνας laser: Μια ανακάλυψη της Φυσικής που άλλαξε
το τοπίο στην επιστήμη και την τεχνολογία και προφανώς στη
Βιολογία και την Ιατρική!!!*





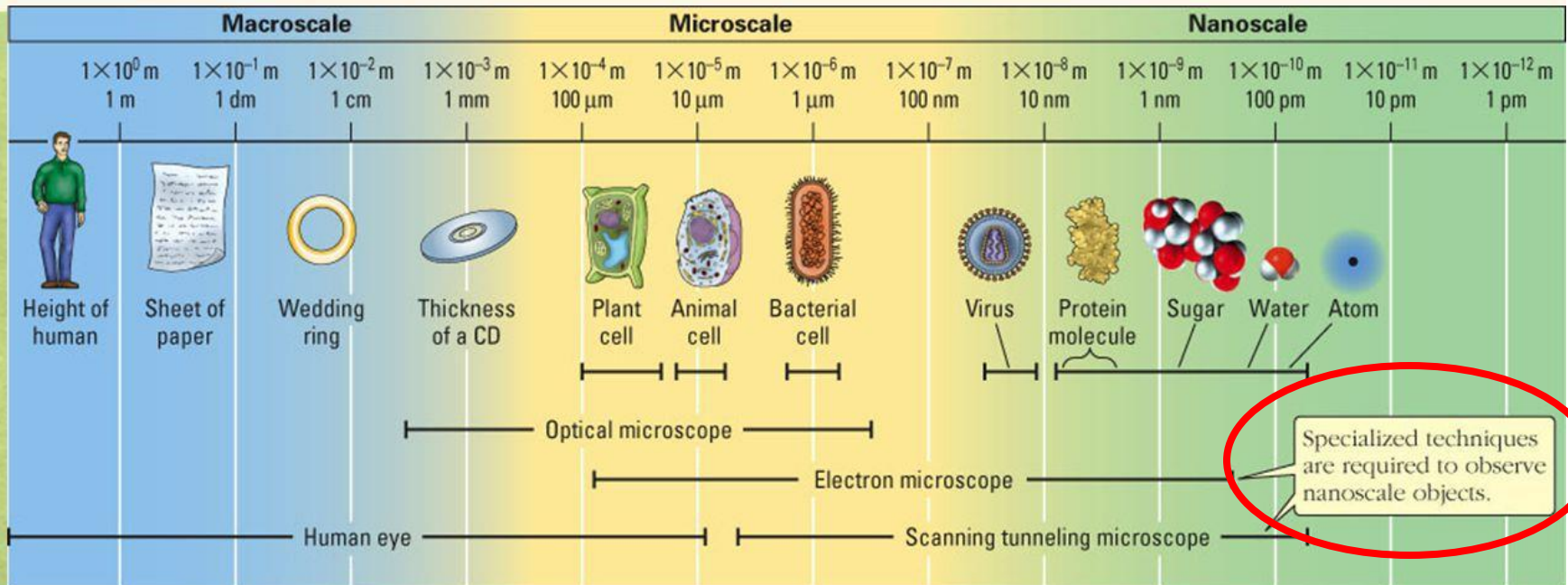
■ Από την Φυσική στη Νανοϊατρική με όχημα τη Βιοφωτονική

Ποιός είναι ο στόχος;



■ Από το μικρό στο μικρότερο

e) Macroscale, Microscale, Nanoscale



© 2007 Thomson Higher Education

Η εισαγωγή της νανοτεχνολογίας στην ιατρική απαιτεί και τα κατάλληλα, προηγμένα, βιοφυσικά εργαλεία τόσο σε μακρο- όσο και σε νανο-κλίμακα.



❖ Από την Ιατρική στη Νανοϊατρική ❖ Ένα παράδειγμα στη νανο-χειρουργική οργανιδίων

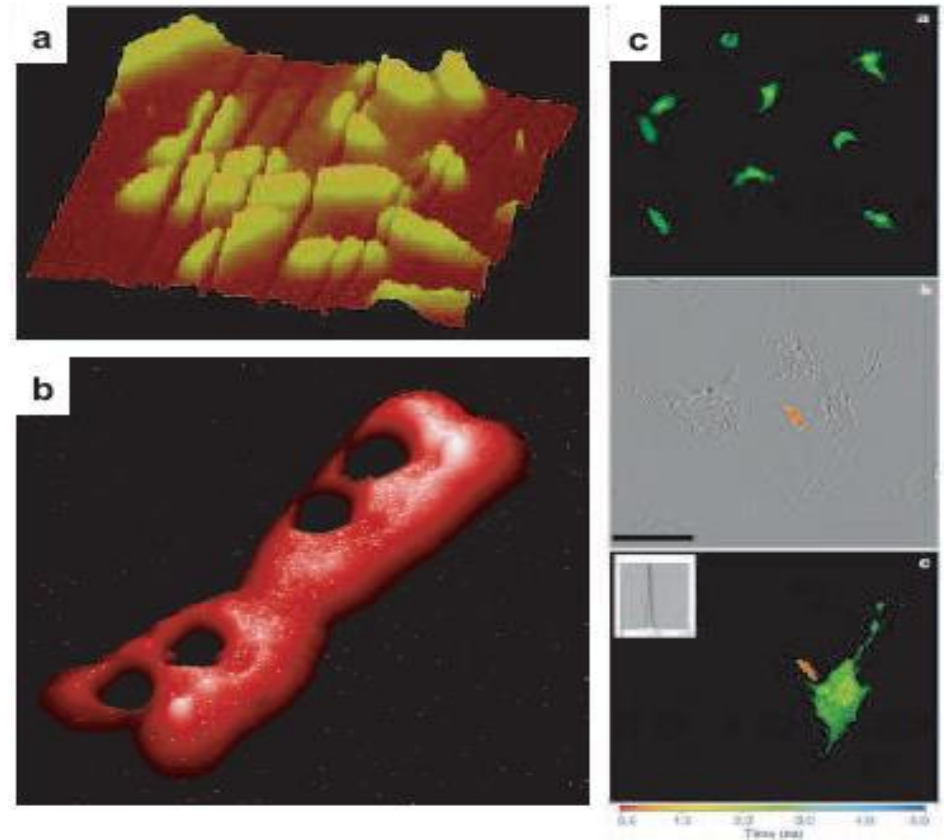
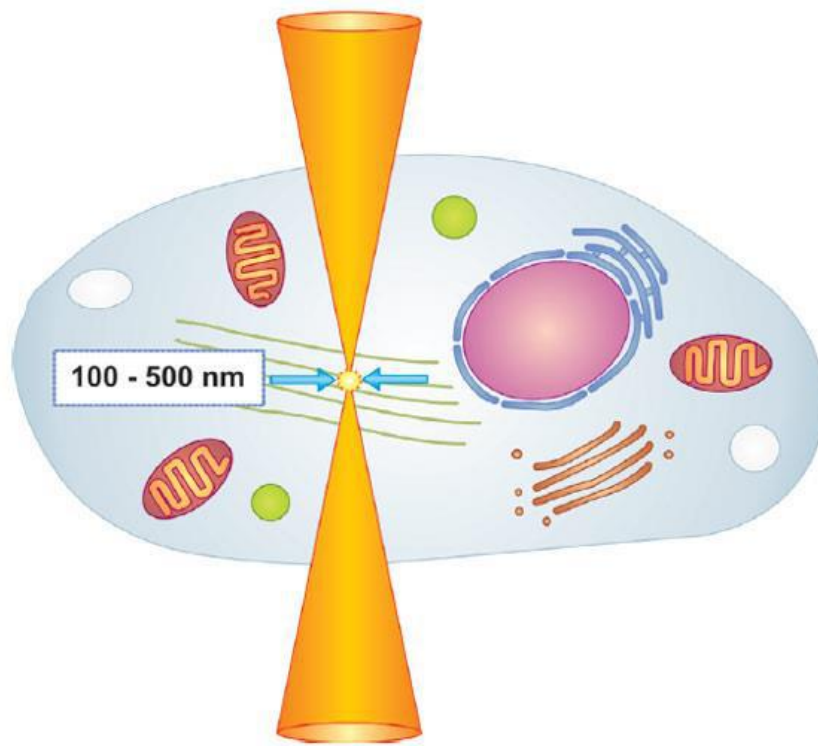


Figure 3.5: Femtosecond laser nanodissection of human chromosomes. a) slices through a chromosome are created by scanning the laser beam in parallel lines across [1] and b) holes are drilled in the chromosome by fixing the laser on a spot [10]; c) Targeted cell transfection through laser irradiation of the cell membrane. eGFP is expressed in the irradiated cells. Scale bar, 25 μm . [11]

Nanodissection with ultrashort pulses

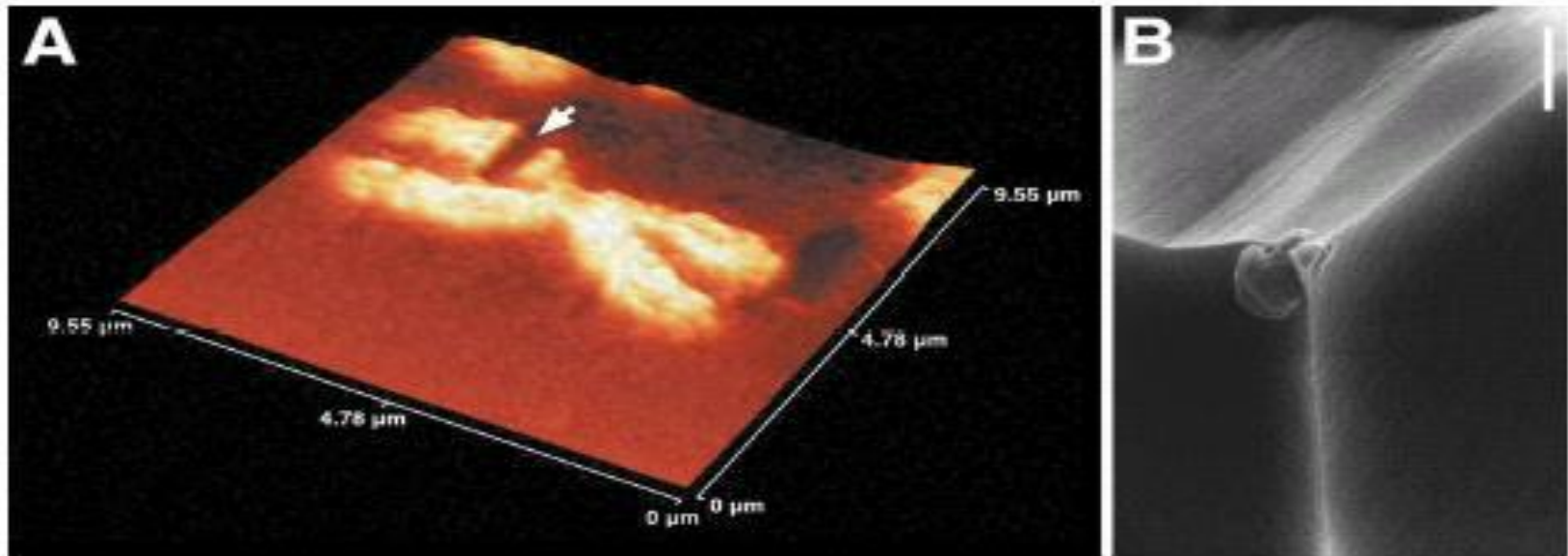
<http://www.americanlaboratory.com/913-Technical-Articles/18718-Nanodissection-With-Femtosecond-Laser-Technology/>

http://mazur.harvard.edu/publications/Pub_596.pdf



❖ Ένα παράδειγμα στη μικρο(νανο;)χειρουργική χρωμοσωμάτων

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



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



United Nations
Educational, Scientific and
Cultural Organization



International
Year of Light
2015



Σύγχρονες βιοφωτονικές τεχνικές στην μελέτη νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμάκων

Μικροχειρισμός πολυμερικών
νανο-σωματιδίων με χρήση
οπτικής λαβίδας laser



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

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

❖ Έτσι έχει κανείς το πλεονέκτημα μιας μεθόδου **ανέπαφης, μη-επεμβατικής και πολύ μεγάλης ακρίβειας**. Η τεχνική αυτή αποδίδεται με τους όρους «**ψαλίδι laser**», ή "**οπτική λαβίδα**" ή "**οπτική παγίδα**" αν μεταφράσουμε ελεύθερα τον διεθνώς καθιερωμένο αγγλικό όρο **optical tweezers** ή **optical trapping**.

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



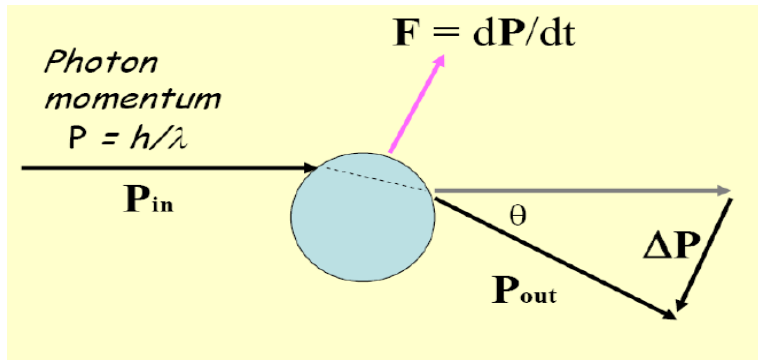


➤ Τι είναι η οπτική παγίδα ή οπτική λαβίδα ή οπτική τσιμπίδα (optical tweezers)

LIGHT IS A
WAVE!

Το φως, φυσικό φως ή φως laser, αποτελείται από φωτόνια που το καθένα έχει **ορμή μέτρου p** , η οποία για **μήκος κύματος λ** δίνεται από τη σχέση $\Rightarrow |\vec{p}| = \frac{h}{\lambda}$ (όπου h είναι η σταθερά του Planck).

Η οπτική δύναμη, που μπορεί **να κινήσει**, **να ανυψώσει** ή **να παραμορφώσει** ένα σωματίδιο, οφείλεται στη **μεταβολή της ορμής των φωτονίων** κατά την πρόσπτωση της δέσμης στον στόχο, όπου συμβαίνει ή **ανάκλαση** ή **σκέδαση** ή **απορρόφηση** ή συνδυασμός τους, με συνέπεια την αλλαγή της κατεύθυνσης των φωτονίων.



Σύμφωνα με το δεύτερο νόμο του Νεύτωνα, η μεταβολή της ορμής είναι ίση με τη δύναμη:

$$\vec{F} = \frac{d\vec{p}}{dt}$$



United Nations
Educational, Scientific and
Cultural Organization

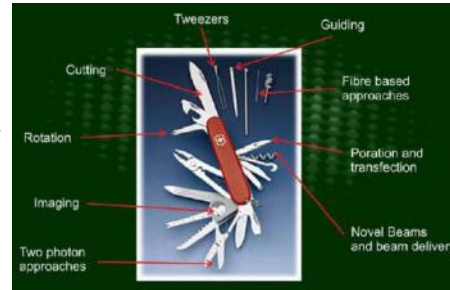


International
Year of Light
2015

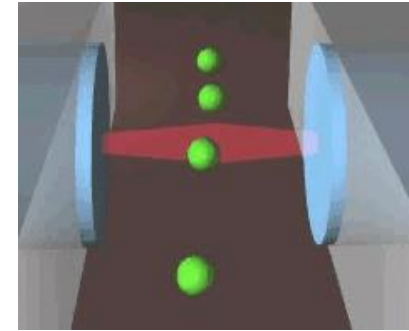


Αφού το φως laser ασκεί δυνάμεις και παραμορφώνει κύτταρα:

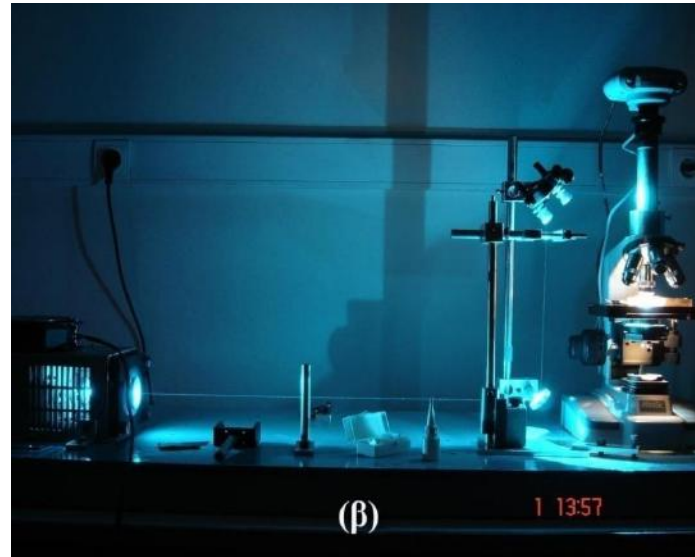
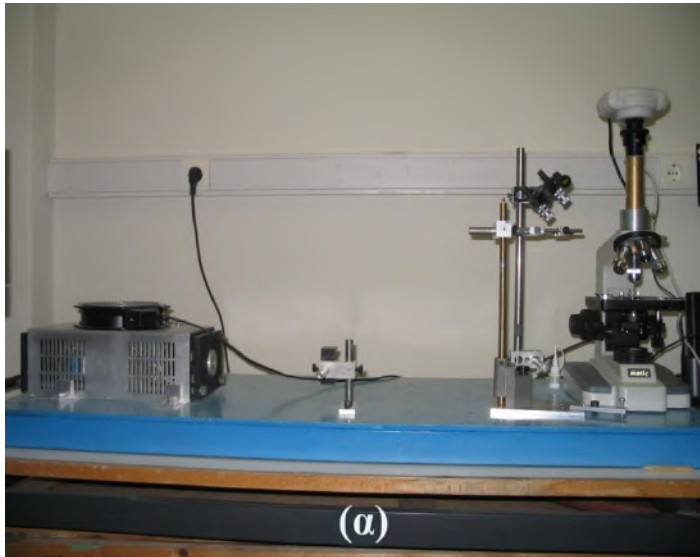
Από τα μηχανικά, μακροσκοπικά εργαλεία



Στο ανέπαφο νανομετρικό εργαλείο, το ά-μαζο φωτόνιο



Σύγχρονες βιοφωτονικές τεχνικές στην μελέτη νανοσυστημάτων



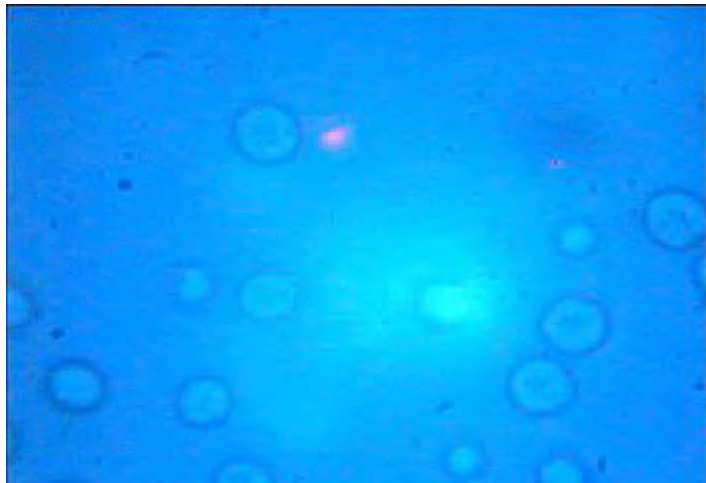
Μια διάταξη οπτικής παγίδευσης μπορεί να βασίζεται σε ένα Ar⁺ laser, με ισχύ στα 35 mW και ένα οπτικό μικροσκόπιο.

E. Papagiakoumou, D. Pietreanu, M.I. Makropoulou, E. Kovacs, A.A. Serafetinides, "Evaluation of trapping efficiency of optical tweezers by dielectrophoresis" J. Biomed. Opt., 11, 1 – 8 (2006).

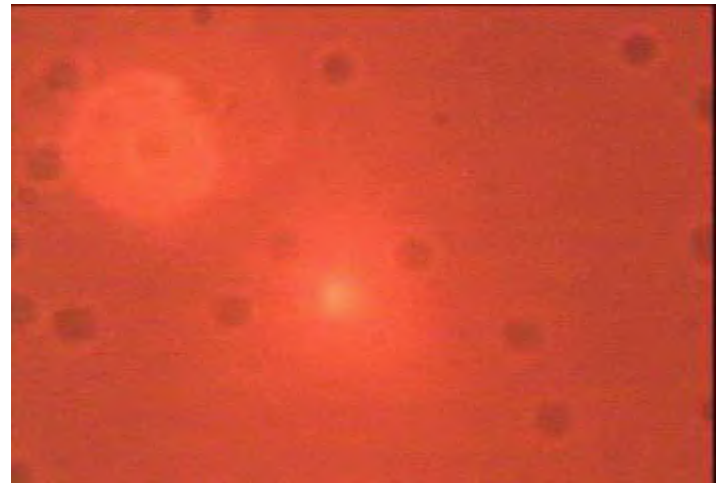


Εφαρμογές της οπτικής παγίδευσης με δέσμη laser στον μικροχειρισμό και την μικροχειρουργική βιοδομών

Οπτική λαβίδα laser He-Ne ($\lambda = 633 \text{ nm}$, 8 mW) που δεν απορροφάται από την πλειοψηφία των βιολογικών ιστών. Παγίδευση κυττάρων μαγιάς.



Οπτική λαβίδα laser αργού ($\lambda = 514 \text{ nm}$) σε μικροσφαιρίδια πολυστυρενίου βαμμένα με κίτρινη χρωστική. Παγίδευση και φθορισμός.



Συνδυασμός οπτικής παγίδας He-Ne και μικροδέσμης laser Er:YAG σε φύκη *Klebsormidium*. Η δέσμη επιφέρει αλλοιώσεις-τομή του φυτικού κυττάρου, όχι μικροτομές μεγάλης ακρίβειας.



Εφαρμογές της οπτικής παγίδευσης με δέσμη laser στην μικροχειρουργική βιοδομών

- Μελετήσαμε τον μηχανισμό της φωτο-αποδόμησης σε ένα είδος φυκιών, στο *Ectocarpus siliculosus*.
- Προσπαθήσαμε να επέμβουμε σε υπο-κυτταρικά οργανίδια χωρίς να καταστραφεί η κυτταρική μεμβράνη.
- Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το μέγεθος των κυττάρων ήταν σχετικά μεγάλο και η οπτική παγίδα δεν μπορούσε να αποδώσει για την ακινητοποίηση του κυττάρου.
- Η βλάβη των κυττάρων παρατηρήθηκε οπτικά κατά την διάρκεια του πειράματος, δεν αξιολογήθηκε επί πλέον με βιοαναλυτικές μεθόδους.

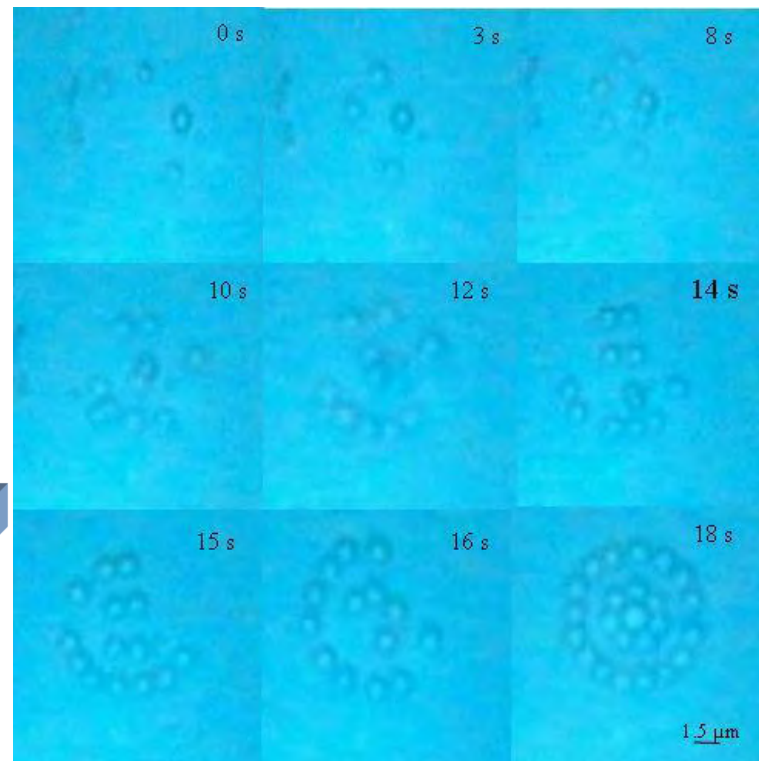
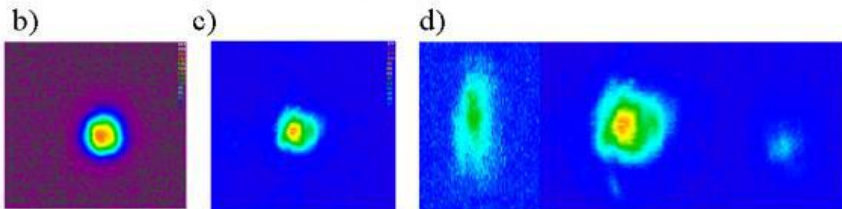
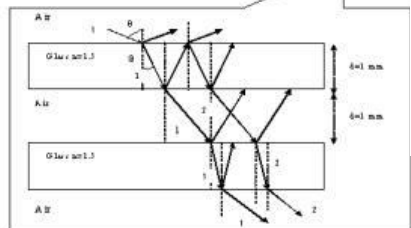
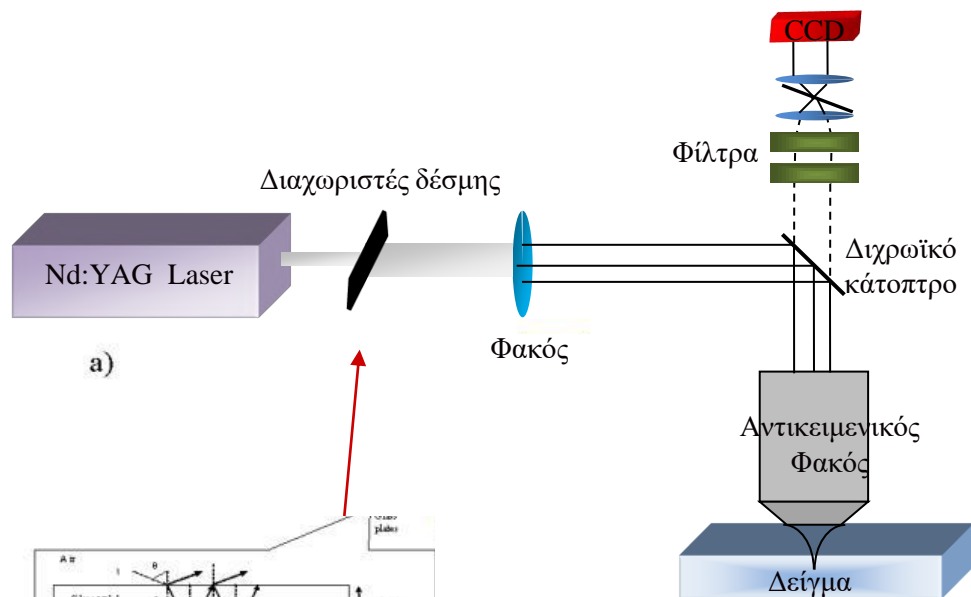


a) The arrow shows the area inside the cell before applying the microbeam, **b)** irradiation with a pulse of N₂ laser at 337 nm and energy 27 μJ. Moving of the area within the cell is observed, **c)** further irradiation led to complete ablation of the sub cellular organelle without damage the cell membrane.

[D. G. Kotsifaki ; M. Makropoulou and A. Serafetinides,](#) " Near infrared optical tweezers and nanosecond ablation on yeast and algae cells ", Proc. SPIE 8770, 17th International School on Quantum Electronics: Laser Physics and Applications, 877019 (March 15, 2013); doi:10.1117/12.2013660; <http://dx.doi.org/10.1117/12.2013660>



Εφαρμογές της οπτικής παγίδευσης με δέσμη laser σε μικροσφαιρίδια – πολλαπλή παγίδα



Σφαίρες πολυστυρενίου διαμέτρου 900 nm.

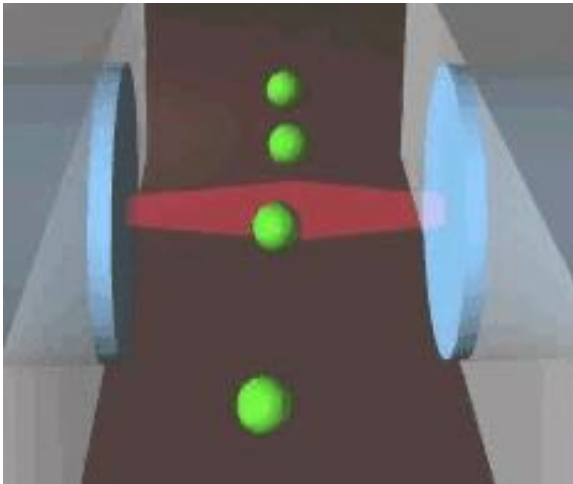
continuous wave vertically polarized
Nd:YAG laser laser operating at $\lambda=1064$ nm,
in TEM₀₀ mode

D.G. Kotsifaki, M. Makropoulou, A.A. Serafetinides, "Efficient and low cost multiple optical trap, based on interference", *Optik - Int. J. Light Electron Opt.* (2012), doi:10.1016/j.ijleo.2011.12.037



❖ Ανάπτυξη διάταξης οπτικής παγίδευσης με χρήση οπτικών ινών

Μια διπλή οπτική παγίδα (**optical stretcher**) είναι ένα σύγχρονο εργαλείο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να παγιδέψει και να παραμορφώσει (τεντώσει) μεμονωμένα βιολογικά κύτταρα, ώστε να μελετηθούν οι μηχανικές τους ιδιότητες. Μπορεί έτσι, π.χ., να μελετηθούν καρκινικά κύτταρα ή να διαχωριστούν αρχέγονα κύτταρα. Μπορεί δηλαδή να χρησιμοποιηθεί μια τέτοια διάταξη ως «**διαλογέας κυττάρων**».



Η νανοτεχνολογία μπορεί να ελαττώσει το μέγεθος των σημερινών διαλογέων κυττάρων από ένα ερμάριο σε γραμματόσημο και, μεμονωμένα, θα τους καταστήσει είδη μιας χρήσης. Ακόμη πιο απαιτητική νανοτεχνολογία προβλέπεται για το εργαστήριο σε τσιπ (*lab-on-a-chip*).

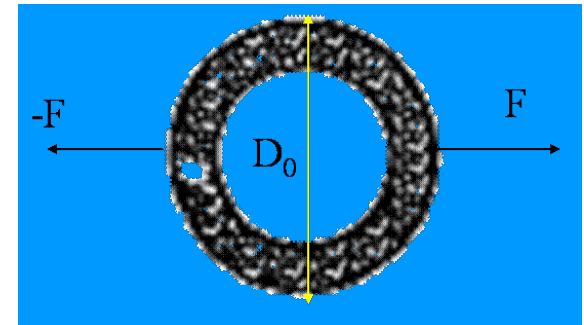
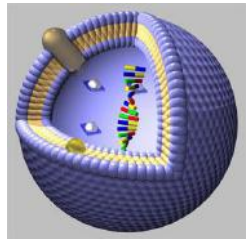
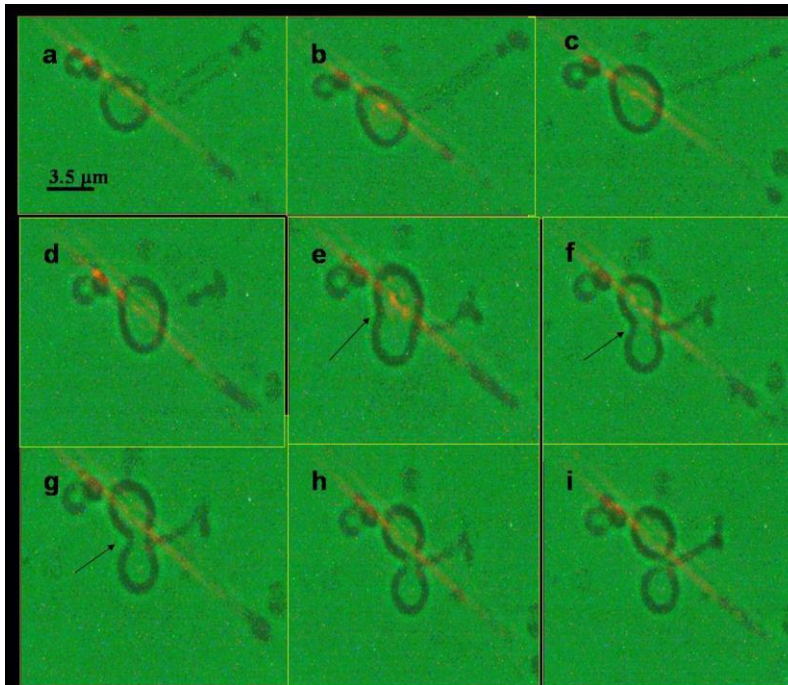
From: J. Guck et al., "Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence", *Biophys. J.* **88**:3689-3698 (2005).

❖ Οι βιοϊατρικές εφαρμογές της οπτικής παγίδευσης με δέσμη(ες) laser δίνουν βάσιμες ελπίδες για **στοχευμένη φωτοδυναμική θεραπεία καρκινικών κυττάρων**, **μικρο- και νανο-χειρουργική**, καθώς και για **διάγνωση παθολογικών καταστάσεων μέσω των εμβιομηχανικών ιδιοτήτων** του κυτταρικού σκελετού,



Εφαρμογές της οπτικής παγίδευσης με δέσμη laser: επαγόμενη τάση σε λιποσώματα

- ❖ Με τη χρήση των **φωτο-επαγόμενων οπτικών δυνάμεων** μελετήσαμε στο εργαστήριο την επίδρασή τους σε **κύτταρα και προσομοιωτές κυττάρων** (λιποσώματα), σε συνδυασμό με τη μεταβολή της θερμοκρασίας και την αλλαγή της ωσμωτικής πίεσης του περιβάλλοντος μέσου.
- ❖ Τα λιποσώματα αποτελούν τα περισσότερο μελετημένα και αποτελεσματικά νανοσωματίδια, που βρίσκουν εφαρμογές τόσο ως **φορείς δραστικών ουσιών-φαρμάκων**, όσο και ως **μοντέλα/προσομοιωτές κυτταρικών μεμβρανών**.



➤ Optical force $F = 5.6 \text{ pN}$

➤ Shear modulus $\mu = 2.3 \pm 0.4 \text{ μN/m}$

Στιγμιότυπα μετασχηματισμού **χρωσμένου με methylene blue λιποσώματος** υπό την επίδραση των αντιδιαμετρικών δυνάμεων της “οπτικής παγίδας γραμμής”. Παρατηρούμε τις μεταβάσεις φάσεως “budding transition” και “fission transition” του λιποσώματος.

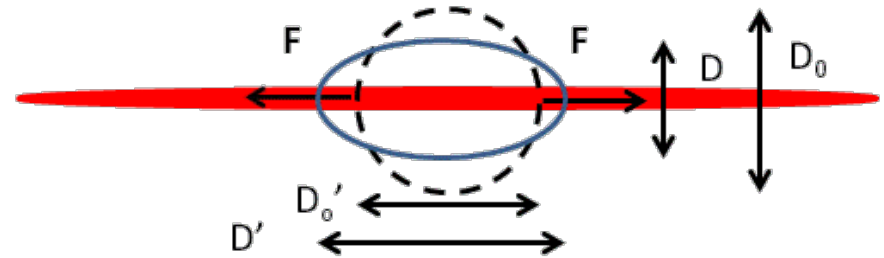
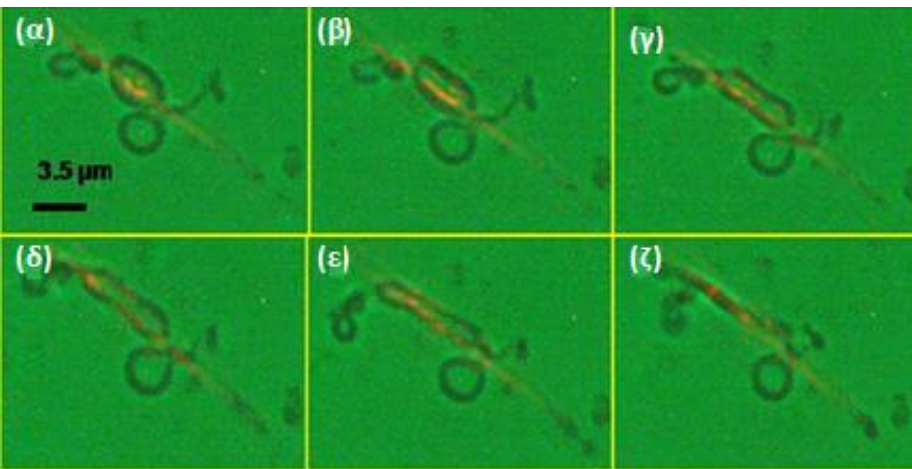
E. Spyratou, E.A. Mourelatou, A. Georgopoulos, C. Demetzos, M. Makropoulou, A.A. Serafetinides, “Line Optical Tweezers: A tool to investigate stained liposomes transformations and to determine shear modulus”, Colloids and Surface A, 349 35-42, (2009).



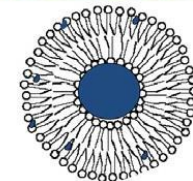
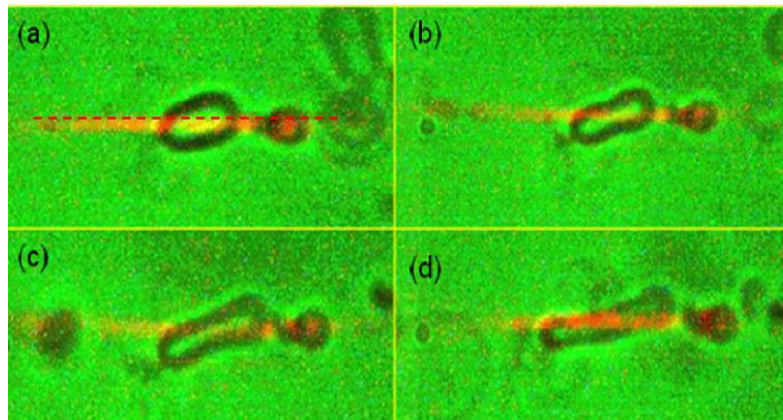
Μεταβάσεις κατάστασης λιποσωμάτων υπό την επίδραση της οπτικής παγίδας γραμμής

Διαδικασία μολιάσματος και διαχωρισμού του λιποσώματος

Λιπόσωμα στην Οπτική Παγίδα Γραμμής



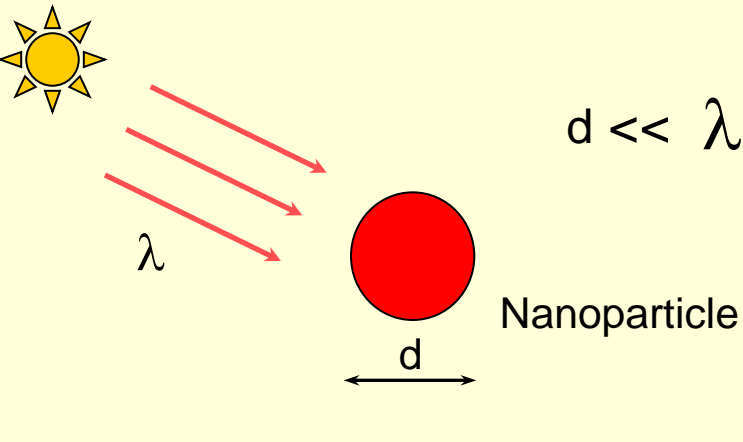
Σχηματική αναπαράσταση της μεταβολής που υφίσταται το λιπόσωμα, $\Delta D = D - D_0$, ενώ βρίσκεται παγιδευμένο, καθώς και των δυνάμεων, F , που ασκούνται σε αυτό λόγω της παγίδας γραμμής.



E. Spyratou, M. Makropoulou, E.A. Mourelatou, C. Demetzos, "Biophotonic techniques for manipulation and characterization of drug delivery nanosystems in cancer therapy", Cancer Letters 327 (2012) 111–122.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.039>

Μικροχειρισμός κυττάρων και νανο-σωματιδίων με χρήση οπτικής παγίδας laser: όρια και περιορισμοί



Τι συμβαίνει όταν το μέγεθος των υπό παγίδευση δομών είναι μικρότερο από το μήκος κύματος του laser;

- Το κύριο μειονέκτημα των συμβατικών συστημάτων οπτικής παγίδευσης είναι **το όριο περίθλασης του προσπίπτοντος φωτός** (ως εκ τούτου η χωρική ανάλυση στην παγίδευση συνήθως περιορίζεται σε περισσότερο από μερικές εκατοντάδες νανόμετρα).
- **Η αύξηση της ισχύος του laser** μπορεί να ενισχύσει τη οπτική δύναμη παγίδευσης, αλλά η ύπαρξη κατωφλίου οπτικής αποδόμησης (**optical breakdown**) οδηγεί σε περιορισμό της μέγιστης ισχύος παγίδευσης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί, ιδιαίτερα στην περίπτωση των ευαίσθητων βιολογικών δειγμάτων.

Μια πιθανή διέξοδος: *Plasmons-assisted nanotrapping (suited for trapping sub-wavelength metallic or dielectric particles).*

Plasmonics:

The use of nanostructured gold substrates is now allowing optical tweezers to exploit plasmonics and confine nanoparticles to ever smaller dimensions.

An interesting evidence of surface plasmon resonance effect

Plasmons of gold nanoparticles in glass reflect green, transmit red.



Illuminated from inside

Illuminated from outside

Lycurgus Cup (British Museum; AD fourth century). This Roman cup is made of ruby glass. When viewed in reflected light, for example in daylight, it appears opaque greenish-yellow. However, when a light is shone into the cup and transmitted through the glass, it appears translucent red-ruby in color.

Chemical Reviews, 2007, Vol. 107, No. 11 4799



Color change in gold nanoparticle aggregates.



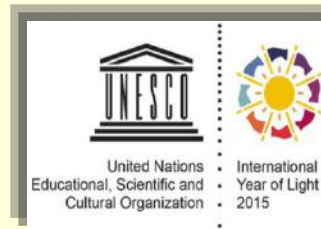
Ενδεικτική βιβλιογραφία.

- [1] Ashkin A., *Acceleration and trapping of particles by radiation pressure*, Phys. Rev. Let., 24(4),156–9 (1970).
- [2] Ashkin A., Dziedzic J.M., Bjorkholm J.E., Chu S., *Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*, Opt. Let.,11(5), 288–90 (1986).
- [3] Block S.M., *Optical tweezers: a new tool for biophysics*, Mod. Rev. Cell Biol. 9, 375-402 (1990).
- [4] Berns M.W., Aist J., Edwards J., Strahs K., Girton J., McNeill P., Rattner J.B., Kitzes M., Hammer-Wilson M., Liaw L.H., Siemens A., Koonce M., Peterson S., Brenner S., Burt J., Walter R., Dyk D., Coulombe J., Cahill T., Berns G.S., *Laser microsurgery in cell and developmental biology*, Scien. 213,505-13 (1981).
- [5] Ε.-Χ. Ι. Παπαγιάκουμου, «Διερεύνηση των φυσικών χαρακτηριστικών και του τρόπου διάδοσης σύμφωνης ακτινοβολίας για την κατανόηση των βασικών μηχανισμών οπτικής παγίδευσης», Διδακτορική διατριβή, ΣΕΜΦΕ – ΕΜΠ, 2005.
- [6] Σπυράτου Ελλάς, «Φωτο-βιοφυσικές εφαρμογές των laser και ανάπτυξη μεθοδολογίας μικροχειρισμού νανο-σωματιδίων με χρήση οπτικής παγίδας laser», Διδακτορική διατριβή, ΣΕΜΦΕ – ΕΜΠ, 2010.
- [7]. Κοτσιφάκη Δόμνα, “Οπτική παγίδα και μικροχειρισμός διηλεκτρικών σωματιδίων και βιολογικών δειγμάτων χρησιμοποιώντας δέσμες laser”, Διδακτορική διατριβή, ΣΕΜΦΕ – ΕΜΠ, 2011.
- [8]. Kotsifaki, D., Makropoulou, M., Serafetinides, A.A., “Ultra-violet laser microbeam and optical trapping for cell micromanipulation,” Proc. SPIE, 6535, 653510 (2007).
- [9] Papagiakoumou, E., Kotsifaki, D., Makropoulou, M. and Serafetinides, A. A., “Mid-Infrared laser microbeam combined with optical trapping for cell micromanipulation,” Opt. Laser Tech. 43, 1448-1452 (2011).
- [10]. E. Spyratou, E.A. Mourelatou, A. Georgopoulos, C. Demetzos, M. Makropoulou, A.A. Serafetinides, Line optical tweezers: A tool to induce transformations in stained liposomes and to estimate shear modulus, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 349 (2009) 35–42.
- [11]. Βαθμονόμηση οπτικής παγίδας μέσω διηλεκτροφόρησης και μέτρηση ελαστικών ιδιοτήτων σε λιποσώματα», Τσούναϊ Ευφροσύνη, Διπλωματική εργασία, ΣΕΜΦΕ – ΕΜΠ, 2012.
- [12]. “Biophotonic techniques for manipulation and characterization of drug delivery nanosystems in cancer therapy”, E. Spyratou, M. Makropoulou, E.A. Mourelatou, C. Demetzos, Cancer Letters 327 (2012) 111–122. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.039>
- [13]. Serafetinides, A.A., Spyratou, E., and Makropoulou, M., “Optical Tweezers and Cell Biomechanics in Macro and Nano-scale”, Proc. SPIE 8770, 17th International School on Quantum Electronics: Laser Physics and Applications, 877014; doi:10.1117/12.2013349, (March 15, 2013).



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

- Τα περισσότερα αποτελέσματα σε οπτική παγίδευση που παρουσιάστηκαν εδώ είναι από έρευνες που έγιναν στον τομέα Φυσικής του ΕΜΠ, στα πλαίσια διδακτορικών διατριβών (Ε-Χ. Παπαγιάκουμου, Ε. Σπυράτου, Δ. Κοτσιφάκη) και διπλωματικών εργασιών (Δ. Περάκης, Σπ. Αγγελόπουλος, Ε. Τσουνάϊ).
- Τα περισσότερα έγιναν με χρηματοδότηση από προγράμματα βασικής έρευνας του ΕΜΠ (ΠΕΒΕ 2007, ΠΕΒΕ 2010, ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ), αλλά κυρίως με το μεράκι και το τάλαντο των νέων ανθρώπων.



Ευχαριστώ για την προσοχή σας