

Università degli studi di Napoli "Federico II"

Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali Tesi di Laurea in Fisica

Studio delle Proprietà Viscoelastiche di Materiale Biologico

Relatori: Prof Antonia

Prof. Antonio Sasso Dott. Luigia Santella Candidata:

Lara Selvaggi Matr. 060/949

a.a. 2005-2006

INTRODUZIONE	5
BIOLOGIA DELLE CELLULE GERMINALI	9
1.1 L'OOGENESI)
1.2 L'UOVO	3
1.3 LO SPERMATOZOO	7
1.4 LA FECONDAZIONE)
1.5 LA REAZIONE CORTICALE DELL'UOVO	2
1.6 IL RILASCIO DI CALCIO	4
1.7 LA STELLA DI MARE	7
REALACIA E MICRORFALACIA 3'	,
2 1 COMPORTAMENTO REOLOGICO DEL MATERIALI 3	3
2.2 RISPOSTA DINAMICA AD UN CARICO SINUSOIDALE	5
2.3 TECNICHE MICROREOLOGICHE)
2 3 1 PINZETTE OTTICHE 4'	2
2.3.2 VIDEOTRACKING 4'	3
2 3 3 DWS (Diffusing Wave Spectroscopy) 4	5
2.3.4 PINZETTE MAGNETICHE	6
2.3.5 MICROSCOPIA A FORZA ATOMICA)
MOTO BROWNIANO	l n
3.1 EQUAZIONE DI LANGEVIN	5
3.2 MOTO BROWNIANO NELLA TRAPPOLA OTTICA	3
3.4 FUNZIONE COMPLESSA DI RISPOSTA E TEOREMA DI	1
FLUITUAZIONE - DISSIPAZIONE	l
TECNICHE SPERIMENTALI UTILIZZATE	1
4.1 TEORIA DELLA PINZETTA OTTICA	4
4.1.1 REGIME DI RAYLEIGH ($a \ll \lambda$)	5

4.1.2	REGIME DELL'OTTICA GEOMETRICA ($a >> \lambda$)	69
4.1.3	REGIME DI LORENTZ – MIE ($a \approx \lambda$)	74
4.2 TEOR	IA DEL VIDEOTRACKING	76
4.2.1	CALCOLO DEL CENTROIDE	77

APPARAT	O SPERIMENTALE	80
5.1 PRE	PARAZIONE DEL MATERIALE BIOLOGICO	80
5.2 APP.	ARATO PER LA MICROINIEZIONE	83
5.2.1	MICROSCOPIO OTTICO	83
5.2.2	SUPPORTO DELL'HOLDER	83
5.2.3	SISTEMA DI INIEZIONE	85
5.2.4	PREPARAZIONE DEL CAPILLARE DI VETRO	85
5.2.5	MICROINIEZIONE	
5.3 APP.	ARATO DELLA PINZETTA OTTICA	
5.3.1	SORGENTE LASER	
5.3.2	MICROSCOPIO	
5.3.3	CELLETTA PORTA-CAMPIONE	
5.3.4	SENSORE DI POSIZIONE	
5.3.5	CALIBRAZIONE DEL SENSORE DI POSIZIONE	100
5.3.6	TELECAMERA CCD	102
5.3.7	ANALISI NEL DOMINIO DELLE FREQUENZE	102
5.4 APP.	ARATO DEL VIDEOTRACKING	106
5.4.1	CALIBRAZIONE DELLA CCD	107
RISULTAT	I SPERIMENTALI	109
6.1 MISU	URE MICROREOLOGICHE PRELIMINARI IN	
GLI	CERINA	109

CONCLUS	IONI	137
6.6 CON	FRONTO CON ALTRI LAVORI	133
0.5 CON	FRONTO TRA LE TECNICHE	131
6.5 CON		150
643	MISURF DI G' e G''	130
	MEDIO	128
6.4.2	ANALISI DELLO SPOSTAMENTO QUADRATICO	
6.4.1	TRAIETTORIE BROWNIANE	127
VIDE	EO-TRACKING	126
6.4 MISU	JRE MICROREOLOGICHE IN OOCITI: TECNICA DEL	
6.3 CRIT	TICA AL METODO DI LASER-TRACKING	125
6.2.4	MISURE DI G' e G''	122
6.2.3	ANALISI DELLO SPETTRO DI POTENZA	120
	MEDIO	118
6.2.2	ANALISI DELLO SPOSTAMENTO QUADRATICO	
6.2.1	TRAIETTORIE BROWNIANE	115

INTRODUZIONE

L'origine della vita, la Fecondazione, è sicuramente uno dei processi fisiologi più belli e interessanti da investigare, anche se sono ancora molti i misteri che circondano tale argomento. Nasce così l'interesse ad effettuare esperimenti di fecondazione in vitro basati su tecniche assai variegate al fine di comprendere sempre più in dettaglio i molteplici e complessi meccanismi che regolano tale processo. Tra le tecniche più avanzate quelle che utilizzano metodi fisici permettono una ricerca di tipo quantitativo e di elevata accuratezza. Il citoplasma delle cellule è costituito dal citosol, un liquido gelatinoso che riempie l'intera cellula, e da vari organelli (compartimenti intracellulari). Il citosol è formato da una complessa rete di filamenti (filamenti di actina, microtubuli, filamenti intermedi) che svolgono un ruolo centrale per le funzioni basilari di una cellula, quali la motilità e la resistenza agli stress. Tale maglia di filamenti è soggetta a riarrangiamenti durante le varie fasi della divisione cellulare e in seguito a fecondazione. Poichè tutti questi processi sono legati alle proprietà bio-meccaniche del citoplasma, negli ultimi anni è molto cresciuto l'interesse a misurare in vivo tali proprietà. In termini fisici, il citoplasma può essere considerato come un mezzo complesso, caratterizzato da un modulo viscoelastico che relaziona la risposta viscosa e quella elastica ad un determinato stress. La scienza che si occupa di questo aspetto della materia soffice va sotto il nome di reologia. Nel caso specifico dei sistemi biologici in vivo le tecniche reologiche tradizionali presentano delle limitazioni dovute alla disomogenee composizione dei compartimenti cellulari. Per ovviare a questo problema, recentemente, si sono sviluppate diverse tecniche non invasive che permettono di effettuare in vivo misure di viscoelasticità. L'insieme di queste nuove tecniche viene indicato come Microreologia.

I metodi microreologici utilizzano sferette micrometriche per sondare localmente sistemi inomogenei, a differenza delle tecniche reologiche le cui misure invece rappresentano una media d'insieme della risposta del materiale. Inoltre, mentre i metodi meccanici tradizionali utilizzano un campione che ha un volume massimo dell'ordine dei millilitri, sono sufficienti volumi dell'ordine dei microlitri per condurre un'analisi microreologica.

Le *tecniche microreologiche* si dividono in due categorie: *attive*, se alla sferetta sonda vengono applicate delle forze dall'esterno; *passive*, se viene monitorato il moto della sferetta sonda per sola fluttuazione termica (moto Browniano). Il moto Browniano costituisce il punto di partenza della nostra analisi per la determinazione della risposta viscoelastica dei campioni investigati.

Utilizzando le fluttuazioni termiche di una microsferetta si può infatti calcolare la *funzione complessa di risposta* del materiale, $\alpha(f)$, che lega la trasformata di Fourier degli spostamenti della sonda alla trasformata di Fourier delle forze impulsive dovute alle collisioni con le molecole del mezzo. La funzione complessa di risposta è data dalla somma di una parte reale e di una parte immaginaria. Utilizzando il teorema di Fluttuazione-Dissipazione si può dimostrare che la componente immaginaria di $\alpha(f)$ (dissipazione) è legata allo spettro di potenza degli spostamenti della sonda (fluttuazioni). Le relazioni di Kramers-Kronig consentono poi di calcolare la componente reale di $\alpha(f)$, mentre la relazione generalizzata di Stokes-Einstein permette di calcolare, a partire da $\alpha(f)$, il modulo viscoelastico G(f), che caratterizza reologicamente il campione in esame. Tale modulo complesso è somma anch'esso di una parte reale, G'(f), legata alla risposta elastica del materiale, e una parte immaginaria, G''(f), legata invece alla risposta viscosa.

In questo lavoro l'attenzione è stata rivolta allo studio delle proprietà viscoelastiche del citoplasma presente all'interno degli oociti (cellule germinali femminili) di stella marina. Per gli esperimenti sono stati utilizzati oociti immaturi (cioè arrestati alla Profase della Meiosi I) e maturati per un'ora con l'ormone 1-metiladenina (1-MA) per studiare i cambiamenti delle

caratteristiche reologiche del citoplasma in risposta allo stimolo fisiologico indotto dall'1-MA. Per portare avanti questo lavoro di indagine si è stabilita una collaborazione scientifica per le competenze biologiche con la Dott. Luigia Santella Responsabile del Laboratorio di Trasduzione dei Segnali della Stazione Zoologica "Anthon Dohrn" di Napoli.

La tecnica della Microiniezione è stata utilizzata per iniettare le particelle-sonda all'interno delle uova per lo studio reologico. A livello fisico è stata preliminarmente usata la tecnica della Pinzetta Ottica che è stata poi sostituita successivamente da quella del Video-Tracking a causa dell'elevata viscoelasticità dell'oocita. Quest'ultima ha permesso di ricavare interessanti informazioni sulle proprietà viscoelastiche dei compartimenti cellulari. La tesi è organizzata in sei capitoli:

- il **primo capitolo** è dedicato ai concetti di base della biologia riguardanti i gameti, uova e spermatozoi, e la fecondazione;
- nel secondo capitolo vengono riportate le nozioni principali della reologia e vengono illustrate le principali tecniche microreologiche;
- nel terzo capitolo viene descritta la teoria del moto Browniano e come da questa è possibile ricavare le informazioni sul comportamento reologico di un materiale;
- nel **quarto capitolo** viene spiegata la teoria che sta alla base delle tecniche sperimentali utilizzate;
- nel **quinto capitolo** vengono descritti gli apparati sperimentali utilizzati;

• nel **sesto capitolo** vengono infine riportati i risultati sperimentali dei moduli viscoelastici del citoplasma degli oociti di stella marina.

CAPITOLO 1

BIOLOGIA DELLE CELLULE GERMINALI

Le cellule germinali sono originariamente cellule diploidi, contenenti cioè una doppia serie di cromosomi. Da queste cellule diploidi discendono i gameti, cellule aploidi contenenti una singola serie di cromosomi e specializzate per la fusione sessuale. Esistono due tipi di gameti: uno grosso e privo di motilità chiamato *uovo*, il gamete femminile, l'altro piccolo e mobile chiamato *spermatozoo*, il gamete maschile. L'uovo e lo spermatozoo sono due cellule in grado di riconoscersi e fondersi in un processo noto come **Fecondazione**.

1.1 L'OOGENESI

L'oogenesi è regolata da modulazioni nella concentrazione degi ormoni in circolo che agiscono a regolare il differenziamento degli oociti. Essa si svolge in cellule specializzate dell'ovario dette *oogoni* ed è articolata in diversi passaggi illustrati in Figura 1.1 e di seguito spiegati.

Le cellule germinali primordiali migrano nella gonade in formazione per diventare oogoni; questi proliferano per mitosi per un certo periodo prima di iniziare la meiosi che produrrà gli *oociti primari*. La Meiosi comincia dopo che la cellula ha percorso le fasi G_1 , S e G_2 del ciclo cellulare. La fase G_1 è caratterizzata da un aumento delle dimensioni della cellula dovuto all'incremento della produzione di organelli, proteine e altre sostanze necessarie alla cellula. Nella fase S si ha la replicazione del materiale genetico: i cromosomi si replicano in modo da produrre ognuno un paio di cromatidi. E infine nella fase G_2 si ha un ulteriore crescita della cellula.

Nella Meiosi il genoma della cellula diploide, composto da strutture elicoidali di DNA chiamate *cromosomi*, viene replicato una volta e separato due volte in modo da produrre quattro cellule aploidi ognuna contenente metà dei cromosomi della cellula originaria. Un nucleo diploide contiene due versioni molto simili di ciascun cromosoma, un membro ereditato dal genitore maschile (cromosoma paterno o omologo paterno) e l'altro ereditato dal genitore femminile (cromosoma materno o omologo materno). Le due versioni, che hanno una sequenza di DNA molto simile ma non identica, si chiamano *cromosomi omologhi*. Dopo che un cromosoma è stato duplicato attraverso la replicazione del DNA, le copie gemelle del cromosoma rimangono inizialmente unite e si chiamano *cromatidi fratelli*.

A questo punto può iniziare la prima fase della Meiosi, la *Profase*, nella quale i cromosomi iniziano a condensarsi e avviene un processo di riconoscimento, la *sinapsi*, durante il quale i cromosomi omologhi si riconoscono e si allineano per tutta la loro lunghezza. In seguito alla sinapsi accade di solito un evento noto come *crossing-over* che comporta uno scambio fisico di segmenti cromosomici tra i cromatidi non fratelli. Il crossing-over avviene in un unico sito tra due dei cromosomi omologhi, tale sito di ricombinazione genetica prende il nome di *chiasma*.

La cellula resta ferma nella Profase della Meiosi; durante questo periodo, gli oociti primari sintetizzano un rivestimento e i granuli corticali. La fase successiva dello sviluppo dell'oocita si chiama *maturazione dell'oocita*; di solito avviene in seguito alla maturità sessuale, quando l'oocita è stimolato da ormoni.

Sotto gli stimoli ormonali, la cellula riprende il suo cammino attraverso la divisione della Meiosi: i cromosomi si ricondensano, l'involucro nucleare viene demolito (tale cambiamento morfologico viene considerato come segno dell'inizio della maturazione) e i cromosomi omologhi replicati si allineano sulla piastra metafasica, segnando la seconda fase della Meiosi detta *Metafase*, e segregano in *Anafase* (terza fase della Meiosi) in due nuclei figli, ciascuno contenente metà del numero originario di cromosomi. Nell'ultima fase della Meiosi, la *Telofase*, i cromatidi fratelli hanno raggiunto i rispettivi poli e ha luogo la decondensazione.

A questo punto, attorno a ogni gruppo di cromosomi si forma una membrana nucleare, per cui si formano due nuclei separati. Ciascun nucleo contiene ancora due coppie di cromatidi fratelli ancora uniti l'uno all'altro.

Per terminare la divisione meiotica, il citoplasma si divide asimmetricamente producendo due cellule che differiscono di molto in dimensioni: una è un piccolo *globulo polare*, l'altra è un grosso *oocita secondario*, il precursore dell'uovo.

A questo stadio ciascun cromosoma è ancora composto da due cromatidi fratelli, i quali non si separano fino all'inizio di una seconda divisione meiotica, quando si ripartiscono in cellule separate. Dopo questa separazione finale in Anafase II, il citoplasma del grande oocita secondario si divide di nuovo asimmetricamente producendo l'uovo maturo e un secondo piccolo globulo polare. Entrambi i globuli polari sono piccoli e alla fine degenerano.



Fig.1.1 - Gli stadi dell'oogenesi

1.2 L'UOVO

Per molti aspetti un uovo è una comune cellula con organelli cellulari tipici. Tuttavia per il suo ruolo unico alla fecondazione l'uovo presenta un'organizzazione spaziale che è determinante nell'indirizzare lo sviluppo delle diverse regioni dell'embrione. Un aspetto importante della disposizone spaziale dei costituenti dell'uovo è la sua polarità. Infatti i costituenti dell'uovo possono essere distribuiti in modo ineguale lungo l'asse dell'uovo che collega il *polo animale* e *vegetativo*. Il nucleo dell'uovo è spostato verso il polo animale ed è da questo polo che vengono espulsi i globuli polari in seguito a maturazione ormonale. Nelle specie in cui le uova possiedono una considerevole quantità di tuorlo, questo si accumula all'estremità opposta dell'uovo (polo vegetativo).

Le uova sono di norma sferiche o ovoidali con diametri variabili a seconda della specie: nell'uomo e nel riccio di mare il diametro è di 100 μ m, nella stella di mare è di 180 μ m, nelle rane e nei pesci è di 1-2 mm e di molti centimetri negli uccelli e nei rettili.

Il citoplasma dell'uovo è suddiviso in compartimenti distinti racchiusi da membrane; ogni compartimento, detto *organello*, contiene una propria serie di enzimi e di altre molecole specializzate. Le proteine conferiscono le proprietà strutturali e funzionali ad ogni organello, catalizzano le reazioni al suo interno e trasportano piccole molecole.

I principali compartimenti intracellulari di una cellula, illustrati in Figura 1.2, sono:

• il **nucleo**: organello, circondato da membrana, dove avviene la sintesi del DNA e dell'RNA;

- il **citosol**, sostanza gelatinosa che riempie l'intera cellula, esclusi gli organelli rivestiti da membrana. E' il sito della sintesi e della degradazione delle proteine;
- il **reticolo endoplasmatico**: compartimento labirintico circondato da membrana che si estende dal nucleo al citosol. Una serie di ribosomi sono attaccati sulla sua superficie e costituiscono la fabbrica delle proteine. In esso sono sintetizzati la maggior parte dei lipidi necessari alla cellula e inoltre costituisce un deposito per gli ioni calcio;
- l'apparato di golgi: organello circondato da membrana, costituito da pile di compartimenti a forma di disco chiamati cisterne del Golgi. In esso le proteine e i lipidi trasferiti dal reticolo endoplasmatico vengono modificati covalentemente e smistati;
- i mitocondri: organelli circondati da membrana delle dimensioni di un batterio (alcuni μm). Svolgono la fosforilazione ossidativa e producono la maggior parte dell'ATP usato dalla cellula per spingere le reazioni;
- i lisosomi: organelli circondati da membrana contenenti enzimi digestivi che digeriscono organelli intracellulari morti, macromolecole e particelle impacchettate in vescicole membranose che si fondono con la membrana plasmatica e rilasciano il loro contenuto all'esterno.



Fig.1.2 – La compartimentazione della cellula

Le cellule devono organizzarsi nello spazio e interagire con il loro ambiente, per fare questo devono essere strutturate internamente in modo appropriato: devono essere quindi in grado di riarrangiare i loro compartimenti interni mentre crescono, si dividono e si adattano a circostanze mutevoli. Alcune di esse devono anche essere capaci di cambiare la loro forma e di muoversi da un punto all'altro. Tutte queste funzioni meccaniche dipendono da un notevole sistema di filamenti proteici chiamato *citoscheletro*.

Il citoscheletro dà alla cellula la forma e la capacità di movimento direzionale. I suoi componenti più abbondanti sono i filamenti di actina, i microtubuli e i filamenti intermedi; illustrati in Figura 1.3.

I *filamenti di actina* sono polimeri elicoidali a due filamenti della proteina actina; appaiono come strutture flessibili con un diametro di 5-9 nm e possono essere organizzati in fasci lineari, reti bidimensionali, gel tridimensionali. I filamenti di actina sono presenti in tutta la cellula, ma sono soprattutto concentrati nella corteccia e sotto la membrana plasmatica. Questi filamenti determinano la forma della superficie della cellula e sono necessari per la sua locomozione.

I *microtuboli* sono lunghi cilindri cavi diritti composti dalla proteina tubulina. Hanno un diametro esterno di 25 nm e sono molto più rigidi dei filamenti di actina. I microtuboli determinano la posizione degli organelli racchiusi da membrana e dirigono il traffico intracellulare.

I *filamenti intermedi* sono fibre simili a delle corde con un diametro di circa 10 nm. Sono composti da proteine dei filamenti intermedi e forniscono forza meccanica e resistenza agli stress.



Fig.1.3 – I componenti del citoscheletro

I filamenti sono collegati tra loro e ad altri compartimenti mediante delle proteine accessorie. Questa serie di proteine accessorie è essenziale per l'assemblaggio dei filamenti del citoscheletro in particolari posizioni, e comprende i motori proteici che muovono gli organelli o i filamenti stessi.

Il rivestimento dell'uovo è uno strato che circonda immediatamente la membrana plasmatica e consiste in gran parte di glicoproteine, alcune secrete dall'uovo e altre depositate su di esso dalle cellule circostanti. Tale strato nelle uova degli echinodermi (stella di mare, ricci di mare) si chiama *strato vitellino* (o membrana di fecondazione), mentre nelle uova dei mammiferi si chiama *zona pellucida*. Questo strato protegge l'uovo dai danni meccanici e in molte uova agisce da barriera specie-specifica per gli spermatozooi, ammettendo soltanto quelli della stessa specie o di specie strettamente affini.

Molte uova contengono vescicole secretorie specializzate, i *granuli corticali*, che sono localizzate nella membrana plasmatica nella regione esterna del citoplasma dell'uovo, al di sotto della *corteccia*. Quando l'uovo è attivato dallo spermatozoo fecondante, questi granuli corticali, che sono distribuiti in modo uniforme su tutta la superficie, rilasciano il loro contenuto per esocitosi (cioè le vescicole si fondono con la membrana plasmatica). Il contenuto dei granuli agisce sollevando il rivestimento vitellino ed impedisce che altri spermatozoi entrino nell'uovo.

1.3 LO SPERMATOZOO

Lo spermatozoo maturo è tra le cellule più piccole di un organismo; ha il compito di trasferire i geni paterni nell'uovo fecondato. E' altamente mobile e specializzato per essere veloce ed efficiente nel processo della fecondazione.

I componenti principali della maggior parte degli spermatozooi sono: la *testa*, un nucleo aploide, un *acrosoma* e un *flagello*. Il nucleo contiene una massa di cromatina altamente concentrata. L'acrosoma invece è situato attorno

al nucleo, all'estremità anteriore della testa, ed è circondato da una membrana. Il contenuto dell'acrosoma comprende vari enzimi idrolitici.

Quando uno spermatozoo giunge a contatto con un uovo, subisce una *reazione acrosomica* che libera degli enzimi dalla vescica acrosomale ed aiuta lo spermatozoo a penetrare la membrana esterna dell'uovo, Fig.1.4.

Le dimensioni degli spermatozoi variano da specie a specie, nel caso della stella di mare hanno una testa di 2-3 μ m e una coda di 30-40 μ m, invece uno spermatozoo umano ha una testa di 6-7 μ m e una coda di 45 μ m.

La produzione degli spermatozoi, la *spermatogenesi*, avviene in modo simile all'oogenesi come illustrato in Figura 1.5.

Le uniche differenze tra la spermatogenesi e l'oogenesi sono due: 1) nella spermatogenesi nuove cellule entrano continuamente in meiosi a partire dalla pubertà, mentre nell'oogenesi gli oogoni proliferano soltanto nel feto, entrano in Meiosi prima della nascita e si arrestano sotto forma di oociti nella prima Profase meiotica; i singoli oociti maturano e sono ovulati ad intervalli, generalmente uno alla volta, a partire dalla pubertà; 2) nella spermatogenesi ciascuna cellula che inizia la Meiosi dà origine a quattro gameti maturi invece cha ad uno.



Fig.1.4 - Reazione acrosomica nello spermatozoo di riccio di mare



Fig.1.5 – Gli stadi della Spermatogenesi

1.4 LA FECONDAZIONE

Le uova e gli spermatozoi sono destinati a morire a meno che non si incontrino e si fondano nel processo della fecondazione. Tramite la fecondazione, l'uovo viene attivato per iniziare il suo programma di sviluppo e i nuclei aploidi dei due gameti si uniscono per formare il genoma di un nuovo organismo diploide.

La fecondazione è stata ampiamente studiata negli invertebrati marini poiché in questi organismi la fecondazione avviene esternamente: un numero enorme di uova e spermatozoi vengono rilasciati nell'acqua di mare. Lo studio della fecondazione esterna è sicuramente più accessibile rispetto allo studio della fecondazione interna dei mammiferi.

Dei numerosissimi spermatozoi rilasciati dal maschio, solo una piccola parte raggiunge il sito di fecondazione. Ci sono prove che segnali chimici rilasciati dalle cellule follicolari che circondano l'uovo ovulato attraggano lo spermatozoo, ma la natura di queste molecole è sconosciuta.

Una volta raggiunto l'uovo, lo spermatozoo deve attraversare lo strato di cellule follicolari ed il rivestimento glicoproteico, lo strato vitellino che circonda l'uovo. Infine lo spermatozoo deve legarsi alla membrana plasmatica dell'uovo e fondersi con essa.

In seguito all'attacco allo strato vitellino (o zona pellucida a secondo della specie), lo spermatozoo subisce la reazione acrosomica, con la quale gli enzimi litici contenuti nell'acrosoma sono rilasciati per esocitosi. La reazione acrosomica è necessaria per la fecondazione perchè libera enzimi, che aiutano lo spermatozoo ad aprirsi un varco attraverso lo strato vitellino, ed altre proteine che lo aiutano a mantenere il suo stretto attacco al rivestimento esterno mentre lo perfora. Inoltre, la reazione acrosomica espone proteine nella membrana plasmatica dello spermatozoo che mediano l'attacco e la fusione di questa membrana con quella dell'uovo.

Dopo che lo spermatozoo ha penetrato il rivestimento extracellulare dell'uovo, si fonde con la membrana plasmatica che riveste le punte dei microvilli sulla superficie (Fig.1.6). I microvilli, sottili proiezioni cilindriche contenenti un fascio centrale di filamenti di actina, si allungano rapidamente intorno allo spermatozoo per assicurare che venga tenuto saldamente, in modo che si possa fondere con l'uovo. Dopo la fusione, quando i microvilli vengono riassorbiti, l'intero spermatozoo è trascinato testa in avanti nell'uovo.



Fig.1.6 - Entrata dello spermatozoo nel riccio di mare

1.5 LA REAZIONE CORTICALE DELL'UOVO

Molti spermatozoi possono legarsi ad un uovo, ma normalmente uno soltanto si fonde con la membrana plasmatica dell'uovo e trasferisce il suo nucleo e altri organelli nel citoplasma dell'uovo.

Se avviene la polispermia, se si fonde cioè più di uno spermatozoo, si formano fusi mitotici extra o multipolari che portano ad una difettosa segregazione dei cromosomi durante la divisione cellulare. Per assicurare che solo uno spermatozoo fecondi l'uovo, intervengono due meccanismi: una rapida depolarizzazione della membrana plasmatica dell'uovo, in seguito a fusione del primo spermatozoo, la quale impedisce la fusione di altri spermatozoi e agisce così da blocco primario della polispermia. Poichè però il potenziale di membrana, che rappresenta una differenza di potenziale attraverso la membrana dovuta ad un leggero eccesso di ioni positivi su un lato e di ioni negativi sull'altro, ritorna normale poco dopo la fecondazione, un secondo meccanismo è necessario per assicurare un blocco secondario della polispermia. Questo è fornito dalla reazione corticale dell'uovo, illustrata in Figura 1.7, 1.8, 1.9.

La fusione dello spermatozoo con la membrana plasmatica dell'uovo provoca l'attivazione della cellula uovo che si manifesta con un aumento del calcio citosolico (Ca2+), che diffonde attraverso la cellula fecondata come un'onda. Il segnale calcio viene decodificato poi da proteine che si attivano quando si legano al calciodando origine per primo alla reazione corticale ed al successivo sviluppo embrionale, [1].



Fig.1.7 - Reazione corticale nell'uovo di riccio di mare



Fig.1.8 – Blocco della polispermia: il sollevamento della membrana di fecondazione nell'oocita maturo impedisce l'entrata di altri spermatozoi



Fig.1.9 - Reazione corticale nell'uovo di riccio di mare

1.6 IL RILASCIO DI CALCIO

Il calcio è un mediatore intracellulare che controlla l'origine e la fine della vita cellulare e inoltre assiste le cellule in molte delle loro attività. Il calcio viene liberato dagli organelli citoplasmatici mediante l'attivazione dei canali sensibili ai secondi messaggeri prodotti in seguito alla stimolazione della cellula. La concentrazione di Ca^{2+} all'interno della cellula è regolata da legami reversibili con una classe specifica di proteine solubili e da proteine sensori di Ca^{2+} , che decodificano il suo contenuto informativo. L'operazione di decodifica viene basata su uno specifico cambiamento conformazionale della proteina sensore. Esistono inoltre altre proteine intrinseche della membrana plasmatica e degli organelli cellulari che regolano la concentrazione di Ca²⁺ senza interpretarne il messaggio, ma accumulandolo negli organelli cellulari.

Normalmente la concentrazione di Ca^{2+} nel citosol è molto bassa, $\approx 10^{-7}$ *M*, mentre nel fluido extracellulare è di $\approx 10^{-3}M$, ed è alta anche all'interno del reticolo endoplasmatico, Fig.1.10. La concentrazione di Ca^{2+} nel citosol è mantenuta bassa attraverso delle Pompe di Ca^{2+} localizzate sulla membrana plasmatica e su quelle del reticolo endoplasmatico, che usano l'energia di idrolisi dell' ATP per pompare Ca^{2+} fuori dalla cellula o dal citosol.

Uno dei meccanismi molecolari attraverso cui si verifica il rilascio di calcio, dopo stimolazione cellulare, è illustrato in Figura 1.11. Una molecola segnale si lega ad un recettore collegato ad una proteina G. Le proteine G, attaccate alla faccia citoplasmatica della membrana plasmatica, servono da molecole di trasmissione cioè quando molecole di segnalazione extracellulari si legano a recettori a serpentina, i recettori subiscono un cambiamento conformazionale che li rende capaci di attivare le proteine G. Queste proteine G accoppiano i recettori attivati all'enzima Fosfolipasi C, alterando così la concentrazione di Ca²⁺ nel citosol. Questo perchè la fosfolipasi C, attaccata alla membrana plasmatica, agisce su un inositolo fosfolipide chiamato fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato (PI(4,5)P₂), che è presente in piccole quantità nel doppio strato lipidico della membrana plasmatica. La Fosfolipasi attivata taglia il PI(4,5)P₂ generando due mediatori intracellulari: il diacilglicerolo, che resta nella membrana plasmatica, e l'inositolo trifosfato IP₃ che invece lascia la membrana plasmatica e diffonde nel citosol. Quando l'IP₃ raggiunge il reticolo endoplasmatico si lega ai canali di rilascio di calcio regolati da IP₃ e li apre. Il Ca²⁺ conservato nel reticolo endoplasmatico viene così rilasciato attraverso i canali aperti comportando un aumento della concentrazione di Ca²⁺ nel citosol, [2].

La regolazione del Ca^{2+} all'interno della cellula è un processo fondamentale, una sbagliata regolaione della concentrazione di calcio può portare la cellula alla morte.



Fig.1.10 – Localizzazione e concentrazione degli ioni calcio Ca^{2+} negli organelli intracellulari



Fig.1.11 – Il meccanismo del rilascio di Ca^{2+} indotto dall'attivazione delle proteine G.

1.7 LA STELLA DI MARE

La stella di mare è un animale invertebrato raggiato con cinque braccia che si dipartono dal disco centrale. Essa fa parte della famiglia degli Echinodermi, animali marini che presentano un rivestimento esterno ruvido e spinoso detto *dermascheletro*. Sono provvisti inoltre di un insieme di canali radiali (un sistema acquifero), nei quali circola un liquido simile all'acqua di mare. Nella stella di mare questi canali presentano diramazioni a forma di tubicini terminanti con delle ventose, *pedicelli ambulacrali*, che si aprono nella porzione ventrale delle braccia. I pedicelli ambulacrali vengono utilizzati per la nutrizione, per la locomozione e per la difesa.

La stella di mare, a seconda della specie, ha dimensioni variabili da pochi centimetri ad un metro.

La riproduzione nella stella di mare è sessuata, a sessi separati, e la fecondazione è esterna. La stella di mare è un animale estremamente prolifico e ogni femmina può emettere anche 2.500.000 uova all'anno. Dalle uova fecondate si forma una piccola larva, che dopo successive trasformazioni, origina una piccolissima stella marina, appena 1 mm di diametro, con braccia molto corte e tozze.

Nella stella marina i gameti femminili sono conservati nelle ovaie sotto forma di oociti immaturi, arrestati alla profase della Meiosi I, come illustrato in Figura 1.12a.

All'interno delle gonadi, ogni oocita è rivestito da uno strato epiteliale di cellule follicolari che, durante la deposizione degli oociti, rilasciano l'ormone 1-metiladenina (1-MA). In risposta all'1-MA, l'oocita diventa maturo, come illustrato in Figura 1.12b.



Fig.1.12 – a) oociti immaturi; b) oociti maturi

Ogni *cellula follicolare* è spessa meno di 0.5 μm , e ad ogni oocita sono associate da 25 a 75 cellule follicolari. Le cellule follicolari sono separate di 10-15 μm dalla superficie dell'oocita da uno strato di gelatina detto "*jelly coat*". Il jelly coat ha uno spessore di circa 40 μm .

La maturazione è caratterizzata dal disasemblaggio del nucleo in un processo noto come *rottura della vescicola germinale*, *GVBD* (Germinal Vesicle Breakdown) e dal completamento della Meiosi I e II, che produce i globuli polari. La GVBD avviene circa 50-55 min dopo l'aggiunta dell'1-MA; la sua evoluzione è illustrata in Figura 1.13, [3, 4].

Durante la maturazione l'oocita è soggetto a cambiamenti meccanici e morfologici che avvengono prevalentemente nella corteccia e nel citoplasma, [5]. L'oocita diventa meno rigido al momento della GVBD, successivamente, la rigidità dell'oocita aumenta transitoriamente durante la formazione del I e del II globulo polare, rispettivamente dopo circa 150 e 210 min dal trattamento con l'1-MA, [6].



Fig.1.13 – Sequenza di immagini della maturazione di un oocita: a) oocita immaturo prelevato dalle gonadi. Nell'immagine sono evidenziati la vescicola germinale (gv), il nucleolo (piccolo cerchietto centrale), lo strato di "jelly coat" (j) e le cellule follicolari (fc); b) nell'acqua di mare le cellule follicolari si dissociano mentre lo strato di jelly coat rimane presente; c) lo strato vitellino (vl) si solleva; d) lo strato vitellino e il jelly coat vengono rimossi in modo che la membrana plasmatica è direttamente immersa nel mezzo; e) dopo 10 min dall'1-MA gli spikes scompaiono; g) dopo 65 min dall'1-MA la vescicola germinale si è disintegrata; h) dopo 165 min dall'1-MA si ha la formazione del I globulo polare (pb)

Sembra che i meccanismi molecolari dall'F-actina (actina filamentosa) siano i responsabili della rigidità dell'oocita e che la rigidità degli oociti immaturi diminuisca, a livelli confrontabili con quelli degli oociti maturi, quando vengono distrutte le fibre dell'F-actina.

L'esistenza di questi cambiamenti morfologici modulati dall'F-actina durante il processo di maturazione degli oociti suggerisce un ruolo importante da parte dell'F-actina nella maturazione, Fig.1.14.

Le variazioni nella consistenza del citoplasma dell'oocita sono indice dei cambiamenti meccanici che si verificano durante la maturazione. Nel citoplasma degli oociti l'ammontare di F-actina aumenta, dopo 30 *min* dall'aggiunta dell'1-MA, del 175% rispetto all'oocita immaturo (non trattato

con l'ormone); successivamente l'F-actina diminuisce a livelli dell'oocita immaturo e rimane costante. Nella corteccia dell'oocita, invece, dopo 15 *min* dall'aggiunta dell'1-MA, il contenuto relativo di F-actina aumenta del 200% rispetto a quello dell'oocita immaturo. Dopo 30 *min* l'ammontare di F-actina diminuisce e decresce ulteriormente durante la rottura della vescicola germinale del 25% rispetto a quello dell'oocita immaturo, [7].



Fig.1.14 – Riarrangiamento dell'actina, evidenziata in verde, durante la maturazione: A) F-actina in un oocita di stella di mare immaturo (non trattato con l'1-MA); B) dopo 1 ora di stimolazione ormonle l'F-actina è completamente riarrangiata

La prima risposta dopo l'aggiunta dell'1-MA è l'aumento del calcio nella corteccia della cellula. Inoltre l'onda di calcio parte dal polo vegetativo dell'oocita (semiemisfero dell'oocita opposto al nucleo) dopo circa 2 *min* dall'aggiunta dell'ormone: è un'onda veloce che dura circa 15-20 secondi. La polimerizzazione dell'actina e i cambiamenti associati iniziano subito dopo la liberazione del calcio. Il fatto che l'onda di calcio sia l'unico evento citoplasmatico conosciuto che precede la polimerizzazione dell'actina, suggerisce che questi due eventi possano essere collegati: la polimerizzazione dell'actina potrebbe essere controllata da un regolatore sensibile al calcio.

CAPITOLO 2

REOLOGIA E MICROREOLOGIA

La reologia studia le relazioni tra le deformazioni dei materiali provocate dall'applicazione di sollecitazioni e le sollecitazioni stesse. Il campo d'applicazione degli studi reologici è vastissimo, in quanto ogni materiale, soggetto a sforzi di varia natura, risponde con un comportamento diverso.

I solidi ideali, sottoposti ad uno sforzo, si deformano elasticamente: l'energia spesa nella deformazione si conserva sotto forma di energia potenziale elastica ed è restituita quando lo stress viene rimosso. I fluidi ideali, liquidi e gas, si deformano invece irreversibilmente; infatti l'energia necessaria per la deformazione viene dissipata sotto forma di calore e non può essere recuperata semplicemente rimuovendo la pressione applicata (comportamento puramente viscoso).

I corpi che incontriamo nella realtà non sono né solidi ideali né liquidi ideali. I solidi reali si possono deformare plasticamente sotto l'azione di forze quando queste superano il valore limite del materiale. I fluidi reali, a parte qualche eccezione, hanno un comportamento reologico intermedio tra i solidi e i liquidi, cioè presentano caratteristiche sia elastiche che viscose e possono perciò essere chiamati "viscoelastici". A livello teorico, tutti i materiali presentano una risposta di tipo viscoelastico alle sollecitazioni imposte. La caratteristica specifica della reologia è quindi lo studio del comportamento delle sostanze che posseggono contemporaneamente elasticità e viscosità.

La viscoelasticità è la proprietà relativa al comportamento sotto sforzo di particolari sostanze, come i polimeri, consistente nella combinazione delle proprietà elastiche dei solidi con le proprietà viscose dei liquidi. Dopo aver applicato una forza di trazione ad un corpo, la manteniamo costante. Se la corrispondente deformazione indotta nel corpo decresce con il tempo si ha il fenomeno chiamato rilassamento (*stress relaxation*); se invece il corpo continua a deformarsi si ha il fenomeno detto strisciamento (*creep*). Una volta tolto il carico si può misurare il ritorno della deformazione nel tempo (*creep recovery*).

La microreologia permette di studiare le caratteristiche viscoelastiche su scala micrometrica, riuscendo così a mettere in evidenza le inomogeneità e le anisotropie locali del materiale investigato. Le tecniche microreologiche si basano essenzialmente sull'osservazione del moto di sferette sonda di dimensioni micrometriche iniettate all'interno del materiale.

I reometri tradizionali, usati per misurare le proprietà viscoelastiche dei materiali, applicano uno sforzo variabile nel tempo e misurano la deformazione subita dal materiale. Con tali tecniche si raggiungono frequenze di alcune decine di H_z e inoltre il volume dei campioni, a causa della geometria di tali apparati, è dell'ordine dei millilitri.

La microreologia invece supera questi limiti raggiungendo frequenze di alcune decine di kHz, usando volumi dell'ordine dei microlitri. Ciò risulta molto vantaggioso soprattutto quando si studiano campioni biologici, come in questo lavoro di tesi, di cui non si dispone di grosse quantità, [8].

2.1 COMPORTAMENTO REOLOGICO DEI MATERIALI

Il comportamento reologico di un materiale può essere matematicamente descritto da un'equazione reologica che correla sforzo e deformazione. Le più semplici equazioni reologiche sono quella di Newton, che descrive il comportamento viscoso ideale, e quella di Hooke, che descrive il comportamento elastico ideale. Uno sforzo di taglio applicato a un liquido ideale comporta uno spostamento di uno strato infinitesimo di fluido su un altro adiacente in modo da ottenere un flusso laminare caratterizzato da due parametri: lo sforzo di taglio τ (*shear stress*) che ha le dimensioni di una pressione ($Pa = N/m^2$) e rappresenta una forza parallela allo scorrimento diviso un'area A, cioè $\tau = F/A$, e il gradiente di velocità $\dot{\varepsilon} = du/dy$ (*shear rate*) che è la derivata della velocità rispetto allo spostamento ed ha le dimensioni dell'inverso del tempo (s^{-1}).

La relazione tra τ e $\dot{\varepsilon}$ è data dalla ben nota legge di Newton:

$$\tau = \eta \cdot \dot{\varepsilon} \tag{2.1}$$

dove η è il *coefficiente di viscosità*.

Nei fluidi puramente viscosi lo sforzo è proporzionale alla velocità di deformazione ed indipendente dall'entità della deformazione stessa. La viscosità η definisce la resistenza di un fluido alla variazione irreversibile di posizione dei suoi elementi di volume. Per un liquido Newtoniano ideale la *curva di flusso* è una retta di pendenza $\eta = \frac{\tau}{\dot{\varepsilon}} = \tan \alpha$ che passa per l'origine degli assi.

La legge di Newton, che definisce i *fluidi newtoniani*, è vera per tutti i gas e per i liquidi omogenei non polimerizzati. Sono fluidi newtoniani l'acqua, l'olio minerale, la glicerina, alcuni solventi, etc.

Un solido ideale sottoposto ad uno sforzo di taglio reagisce deformandosi e la deformazione ε segue la legge di Hooke.

$$\tau = G \cdot \varepsilon \tag{2.2}$$

dove *G* è il *modulo di elasticità* (o modulo di Young).

Nei corpi elastici lo sforzo è direttamente proporzionale alla deformazione subita dal materiale ed indipendente dalla velocità di deformazione.

Si possono riscontrare due tipi di deviazioni dal comportamento puramente Newtoniano o Hookeano: una in cui la velocità di deformazione in un liquido, o la deformazione in un solido, possono non essere direttamente proporzionali allo sforzo applicato ma avere una dipendenza più complessa; l'altra in cui lo sforzo può dipendere sia dalla velocità di deformazione sia dalla deformazione stessa.

Il primo caso riflette il comportamento dei *liquidi non newtoniani*, nei quali la viscosità non è costante, ma dipende dal gradiente della velocità di deformazione secondo la relazione $\tau = \eta(\dot{\varepsilon}) \cdot \dot{\varepsilon}$; per questi liquidi la *curva di flusso* non è una retta, ma una curva il cui andamento dipende dalla relazione che lega la viscosità al gradiente della deformazione.

Appartengono a questa categoria i fluidi dilatanti in cui la viscosità aumenta all'aumentare del gradiente, o i liquidi pseudoplastici in cui si verifica un comportamento opposto. Nei solidi tali anomalie si presentano al superamento del limite elastico (fenomeni di snervamento, frizione, etc.). L'entità della deviazione dal comportamento puramente Newtoniano o Hookeano non è una proprietà intrinseca del materiale, ma dipende dallo stato fisico-chimico in cui esso si trova; in particolare dipende fortemente dalla temperatura.

Il secondo caso riflette un comportamento viscoelastico, cioè elastico e viscoso insieme. Alla categoria di materiali viscoelastici appartengono i fluidi complessi quali i polimeri, i colloidi e i materiali biologici. In questo caso il legame tra sforzo e deformazione è descritto dalla relazione lineare:

$$\tau = \tau_E + \tau_V = G \cdot \varepsilon + \eta \cdot \dot{\varepsilon} \tag{2.3}$$

Quest'equazione definisce i fluidi viscoelastici lineari. La condizione di linearità è verificata per deformazioni o gradienti di deformazioni infinitesimi, nel caso di deformazioni o velocità di deformazione "finite" le relazioni tra lo sforzo e le deformazioni sono molto più complesse, [9].

2.2 RISPOSTA DINAMICA AD UN CARICO SINUSOIDALE

I classici esperimenti di "creep" e "stress relaxation" eseguite con reometri tradizionali si basano sulla seguente procedura: si applica ad un fluido, mediante l'ausilio di un reometro rotazionale, una sollecitazione sinusoidale $\varepsilon(t) = \varepsilon_0 \operatorname{sen}(\omega t)$, dove ω è la frequenza di oscillazione e ε_0 è la sua ampiezza iniziale. La velocità d'applicazione della deformazione (*strain rate*) è definita come $\dot{\varepsilon}(t) = \frac{d\varepsilon}{dt} = \omega \cdot \varepsilon_0 \cdot \cos(\omega \cdot t)$.

Nel regime di viscoelasticità lineare il materiale risponde ad una deformazione tangenziale (*shear strain*) con uno sforzo di taglio (*shear stress*) anch'esso sinusoidale ma sfasato di un angolo δ rispetto alla deformazione, come è mostrato in Figura 2.1:

$$\tau(t) = \tau_0 \cdot sen(\omega \cdot t + \delta) \tag{2.4}$$


Fig.2.1 - Sfasamento tra stress e strain in seguito ad una sollecitazione sinusoidale

Possiamo allora scrivere lo sforzo di taglio come somma di un termine in fase con la deformazione e un termine in fase con la velocità della deformazione:

$$\tau(t) = \tau_0 \cdot \cos(\delta) \cdot sen(\omega \cdot t) + \tau_0 \cdot sen(\delta) \cdot \cos(\omega \cdot t) =$$

= $\varepsilon_0 \cdot G' \cdot sen(\omega \cdot t) + \varepsilon_0 \cdot G'' \cdot \cos(\omega \cdot t)$ (2.5)

dove $G' = \frac{\tau_0}{\varepsilon_0} \cos(\delta)$ è il modulo elastico (*storage modulus*) e $G'' = \frac{\tau_0}{\varepsilon_0} sen(\delta)$

è il modulo dissipativo (loss modulus).

Quindi $\delta=0$ comporta G''=0 e $G'\neq 0$, in questo caso il fluido ha un comportamento puramente elastico; invece $\delta=\pi/2$ implica $G''\neq 0$ e G'=0 che descrivono un comportamento esclusivamente viscoso.

Estendendo queste formule nel campo complesso otteniamo che la deformazione e la sollecitazione saranno rispettivamente:

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_0 \cdot e^{i\omega t} \tag{2.6}$$

$$\tau^*(\omega) = \tau_0 \cdot e^{i(\omega \cdot t + \delta)} \tag{2.7}$$

Otteniamo in questo modo la relazione

$$\frac{\tau^*}{\varepsilon^*} = \frac{\tau_0}{\varepsilon_0} e^{i\delta} = G^* = G' + i \cdot G''$$
(2.8)

che ci fornisce il valore del *modulo complesso di viscoelasticità* $G^*(f) = G'(f) + iG''(f)$, dato dal rapporto tra lo stress e la deformazione totali subite dal materiale ad una determinata frequenza:

$$\frac{\tau(\omega)}{\varepsilon(\omega)} = G^*(\omega) = G'(\omega) + i \cdot G''(\omega)$$
(2.9)

Il termine $G'(\omega)$ indica la capacità del materiale ad accumulare energia elastica, mentre il termine $G''(\omega)$ descrive la capacità di dissiparla.

Analogamente si può definire un'altra grandezza, sempre utile alla descrizione delle proprietà viscoelastiche di un fluido, detta funzione complessa di risposta, *complex compliance* $\alpha *(\omega)$, data dal rapporto tra la deformazione e lo stress totali subite dal materiale ad una data frequenza:

$$\frac{\varepsilon(\omega)}{\tau(\omega)} = \alpha^*(\omega) = \alpha'(\omega) - i \cdot \alpha''(\omega)$$
(2.10)

I termini α' (storage compliance) e α'' (loss compliance) hanno lo stesso significato di G' e G''. In pratica $\alpha^*(\omega)$ e G* sono uno il reciproco dell'altro, ma non vale lo stesso per i termini reali e immaginari delle due funzioni.

Viene definita *frequenza di crossover* (ω_c) il valore per il quale G'=G''; questo valore rappresenta il punto di transizione tra il comportamento dissipativo e quello elastico, o viceversa, Fig.2.2.



Fig.2.2 - Frequenza di crossover

Anche la *viscosità complessa*, $\eta *(\omega)$, data dal rapporto tra lo stress applicato e lo strain rate, è una funzione utile per descrivere il comportamento di un materiale, [10]:

$$\eta^{*}(\omega) = \frac{\tau(\omega)}{\dot{\varepsilon}(\omega)} = \frac{G^{*}(\omega)}{i\omega} = \eta'(\omega) - i \cdot \eta''(\omega)$$
(2.11)

La componente reale $\eta' = \frac{G''(\omega)}{\omega}$, detta *viscosità dinamica*, descrive gli effetti dissipativi e a basse frequenze tende all'ordinaria viscosità di flusso stazionario, η . La componente immaginaria è invece $\eta'' = \frac{G'(\omega)}{\omega}$.

2.3 TECNICHE MICROREOLOGICHE

I metodi microreologici utilizzano sferette micrometriche per sondare localmente sistemi inomogenei, a differenza delle tecniche reologiche le cui misure invece rappresentano una media d'insieme della risposta del materiale.

Le *tecniche microreologiche* si dividono in due classi. Si parla di *tecniche attive*, se alla sferetta sonda vengono applicate delle forze dall'esterno generate da un campo magnetico o elettrico, oppure attraverso delle forze meccaniche; e di *tecniche passive*, se viene monitorato il moto della sferetta sonda dovuto alla sola fluttuazione termica.

E' chiaro che la sferetta sonda si potrà muovere apprezzabilmente con la sola energia termica nel caso in cui il materiale non è troppo viscoso. Verificata questa condizione, tale tecnica è molto vantaggiosa per i calcoli matematici perché, non essendoci sollecitazioni esterne, si può applicare la teoria viscoelastica lineare. In Figura 2.3 sono illustrati gli intervalli delle frequenze e dei moduli viscoelastici per le diverse tecniche microreologiche, durante misure di viscoelasticità lineare per fluidi complessi.



Fig.2.3 – a) intervalli di frequenze; b) modulo viscoelastico delle varie tecniche microreologiche

TECNICHE MICROREOLOGICHE PASSIVE

2.3.1 PINZETTE OTTICHE

All'inizio degli anni '70 Arthur Ashkin indagava la possibilità di intrappolamento di particelle micrometriche sfruttando la pressione di radiazione della luce laser. Nacque così la prima Pinzetta Ottica: un fascio laser fortemente focalizzato attraverso un obiettivo di grande apertura numerica che è in grado di confinare microparticelle in un volume di spazio definito dalla lunghezza d'onda del laser. Su una tale particella agiscono due tipi di forze: una forza di scattering, che spinge la particella lungo la direzione di propagazione del fascio e una forza di gradiente ottico, che richiama la particella nel punto di maggiore intensità del campo. Sotto opportune condizioni sperimentali si riesce a far si che la forza di gradiente superi quella di scattering, ovvero si realizza un a trappola stabile in grado di confinare particelle le cui dimensioni possono variare da circa 50nm fino a $100\mu m$.

L'apparato sperimentale della Pinzetta Ottica è costituito fondamentalmente da un microscopio ottico invertito, con un obiettivo ad immersione ad olio in modo da ottenere un maggiore apertura numerica, e da un fotodiodo a quadranti che misura i voltaggi differenziali indotti dai fotoni tra le coppie dei quattro diodi, permettendo un accurato posizionamento nel piano x-y della particella.

Realizzando una trappola ottica è possibile studiare le proprietà microreologiche del fluido in cui la particella sonda è immersa. Lo spettro delle fluttuazioni della particella immersa in un fluido complesso può essere infatti misurato attraverso la luce scatterata in avanti dalla particella e rivelata dal fotodiodo a quadranti. Tali fotodiodi forniscono con buona precisione (pochi *nm*) la posizione della particella e sono in grado di analizzare tali posizioni con una banda passante fino a decine o centinaia di kHz. L'analisi

delle fluttuazioni della particella intrappolata si ottiene utilizzando l'equazione di Langevin, come spiegato nel Capitolo 3.

2.3.2 VIDEOTRACKING

La tecnica del rilevamento video della posizione della particella, nota come PTM (Particle Tracking Microrheology), è la continuazione, nel corso dello sviluppo, delle vecchie tecniche di microscopia. La PTM colleziona e analizza la distribuzione degli spostamenti Browniani di una microsfera immersa nel campione in esame, per studiare spazialmente le sue proprietà viscoelastiche locali. L'energia termica k_BT crea una piccolissima forza k_BT/a , inferiore ad un pN, su ogni microsfera (a=raggio microsfera).

Questa forza provoca, in prossimità della sferetta, un deformazione locale del mezzo viscoelastico che comporta lo spostamento della sferetta stessa.

La registrazione e l'elaborazione software del moto di queste particelle, mediante microscopia digitale, consente poi di ricavare informazioni sul comportamento reologico del mezzo in cui si muovono.

Gli studi più recenti tendono a considerare medie su un gran numero di particelle immerse nel materiale, che fluttuano contemporaneamente, in modo da ottenere una statistica migliore per la stime delle proprietà reologiche e per l'analisi dell'eterogeneità del materiale, [11]. La dimensione della microsferetta sonda è limitata a $0.5\mu m$ dal limite diffrattivo di risoluzione di un microscopio ottico; per migliorare la risoluzione spaziale negli studi dell'eterogeneità bisogna diminuire le dimensioni della sonda usando particelle fluorescenti $(0.1\mu m)$.

Per prima cosa viene registrata la traiettoria della particella sonda, successivamente, mediante l'equazione generalizzata di Langevin del moto per una microsfera in un mezzo viscoelastico, si calcola lo spostamento quadratico medio della particella in funzione del tempo. Poiché lo spostamento quadratico medio $\langle \Delta r^2(t) \rangle$ è proporzionale alla creep compliance $\alpha(t)$ secondo la relazione:

$$\left\langle \Delta r^2(t) \right\rangle = \frac{k_B T}{\pi a} \alpha(t)$$
 (2.12)

i dati ottenuti vengono trasformati nei moduli complessi di taglio, in funzione della frequenza.

Una questione importante in tale tecnica è l'accuratezza con cui il centroide (centro di massa della particella) viene determinato, [12]. Le particelle grandi sottendono molti pixel sulla videocamera e quindi il centro può essere ricavato con una maggiore precisione rispetto al caso in cui si considerano piccole sonde. L'immagine ottica di piccole particelle è infatti limitata dagli effetti diffrativi.

La risoluzione della tecnica PTM è nanometrica ed è maggiore di uno o due ordini di grandezza rispetto alla convenzionale microscopia ottica o a fluorescenza. Un apparato sperimentale composto da un obiettivo 100X ad immersione ad olio, una telecamera CCD e un microscopio ottico invertito della Olympus fornisce una risoluzione di 10*nm* nel piano focale dell'obiettivo del microscopio.

L'alta precisione di questa tecnica ne comporta la sua applicazione in numerosi studi biofisici. L'analisi delle immagini video permette infatti di studiare, a livello sub-micrometrico, i moti molecolari sulla superficie di cellule vive, nonché il moto di singoli organelli nelle cellule e di singole proteine in soluzione.

2.3.3 DWS (Diffusing Wave Spectroscopy)

La DWS è una tecnica basata sullo studio della dispersione multipla della luce da parte del campione in esame. Essa consente di sondare in maniera non invasiva le proprietà reologiche lineari di fluidi complessi.

Questa tecnica ricava informazioni dall'analisi della funzione di autocorrelazione della luce scatterata in modo multiplo dalle sferette immerse nel campione. La DWS è simile alla tecnica SPTM (Single Particle Tracking Microrheology) che monitora la traccia di una singola particella nel tempo; però mentre la SPTM permette di registrare lo spostamento nel tempo di una singola particella, la DWS consente di monitorare simultaneamente diverse centinaia di microsfere, fornendo così una statistica migliore.

Con questo tipo di reometri ottici è stato possibile misurare i moduli viscoelastici dei network di F-actina, ottenendo risultati meno ambigui rispetto a quelli ricavati con i reometri tradizionali, [13].

L'approssimazione di cui bisogna tener conto, affinché la teoria sia valida, è che ogni fotone sia scatterato un gran numero di volte.

In Figura 2.4 è mostrato l'apparato sperimentale utilizzato nella DWS: il fascio laser viene focalizzato sul campione contenente delle microsferette, la luce scatterata da queste viene raccolta da due tubi fotomoltiplicatori attraverso una fibra ottica. Le uscite dei fotomoltiplicatori sono collegate ad uno strumento che ne calcola la funzione di autocorrelazione.

Dalla misura della funzione di autocorrelazione e usando l'equazione generalizzata di Stokes-Einstein è possibile ricavare lo spostamento quadratico medio della posizione della sferetta sonda. Da questo, infine, si calcolano i moduli viscoelastici del materiale campione.



Fig.2.4 - Apparato sperimentale DWS

TECNICHE MICROREOLOGICHE ATTIVE

2.3.4 PINZETTE MAGNETICHE

La Pinzetta Magnetica rappresenta una tecnica attiva utilizzata per investigare la dinamica microscopica di diversi materiali. Essa utilizza un campo magnetico per intrappolare e manipolare particelle paramagnetiche immerse nel materiale in esame; ed è combinata con la microscopia video che permette di misurare lo spostamento della particella soggetta ad una forza, costante o dipendente dal tempo, generata dal gradiente del campo. Il moto della particella fornisce una stima qualitativa della risposta reologica del materiale. Con gli anni, gli sviluppi ingegneristici delle sonde, che hanno assunto forme sempre più regolari, e i miglioramenti nella video-microscopia e nei sistemi di rivelazione hanno permesso misure più precisa delle proprietà viscoelastiche.

Nell'apparato sperimentale il campo magnetico è generato da due coppie di poli ferromagnetici disposti ad angolo retto, il cui centro geometrico è nel fuoco dell'obiettivo del microscopio, come illustrato in Figura 2.5. Questa configurazione crea un campo magnetico uniforme parallelo al piano focale, che permette sia la rotazione che la traslazione delle particelle magnetiche.

La forza che agisce sulla sferetta sonda, dell'ordine dei pN, è del tipo:

$$f_x(t) = \vec{M}(t) \cdot \frac{\partial \vec{B}(t)}{\partial x}$$
(2.13)

dove $\vec{M}(t)$ è il momento magnetico indotto della particella e $\vec{B}(t)$ è il campo magnetico applicato.

Applicando una forza costante alla particella si hanno informazioni sulla viscosità del campione, con una forza pulsata si studia invece il rilassamento del campione.



Fig.2.5 - Apparato sperimentale di una Pinzetta Magnetica

In Figura 2.6 è mostrata la risposta di una sferetta ad una sollecitazione pulsata, generata dall'accensione (on) e dallo spegnimento (off) del campo magnetico, [14]. Alternativamente si può applicare una sollecitazione oscillante, $f(t) = f_0 e^{i\omega t}$, che permette di misurare il modulo complesso di viscoelasticità $G^*(\omega)$ in funzione della frequenza di sollecitazione.

Indicando con $x(t) = x_0 e^{i(\omega t - \varphi)}$ lo spostamento della particella, otteniamo:

$$G'(\omega) = \frac{f_0}{6\pi a |x_0\omega|} \cdot \cos\varphi(\omega)$$
(2.15)

$$G''(\omega) = \frac{f_0}{6\pi a |x_0\omega|} \cdot sen\varphi(\omega)$$
(2.16)

Le Pinzette Magnetiche offrono diversi vantaggi rispetto alla Pinzetta Ottica: non riscaldano il campione in esame, possono orientare oggetti indipendentemente dalla loro forma geometrica, possono avere un campo di forza uniforme, e riescono ad esercitare forze maggiori. D'altro canto però le Pinzette Magnetiche sono vincolate alla manipolazione su materiale paramagnetico e non sono in grado di generare trappole multiple.



Fig.2.6 - Andamento temporale della posizione di una particella soggetta all'accensione (on) e allo spegnimento (off) del campo magnetico

2.3.5 MICROSCOPIA A FORZA ATOMICA

La microscopia a forza atomica (AFM:Atomic Force Microscopy) è una tecnica estremamente accurata e versatile per misurare strutture o forze superficiali. Appartiene alla classe delle tecniche attive in quanto fa uso delle forze micromeccaniche generate da un microscopio a forza atomica per sondare la risposta meccanica locale del campione in esame. Il microscopio a forza atomica fa parte della categoria degli strumenti detti SPM (Scanning Probe Microscopes), basati sull'interazione a corto raggio, che realizzano una microscopia di superficie.

Il principio di funzionamento di un microscopio a forza atomica è il seguente: un sensore a punta molto fine (qualche decina di *nm*), montato alla fine di una sottile asta elastica (cantilever), viene posto in contatto con la superficie del campione da investigare. La punta sensibile viene mossa lungo tutto il campione. Tutti i movimenti della punta sono realizzati da un attuatore piezoelettrico che assicura un'alta precisione negli spostamenti lungo i tre assi.

A causa della rugosità della superficie del campione, si generano delle forze d'interazione tra la punta e gli atomi della superficie, dell'ordine dei *nN*, che provocano una deflessione dell'asta elastica. Ad un cambiamento di topografia della superficie in esame corrisponde un cambiamento nella deflessione della leva che viene rivelato, con elevata risoluzione, da un fascio laser riflesso da un piccolo specchio posto sulla punta e raccolto da un fotodiodo, come illustrato in Figura 2.7.

Da una scansione della superficie del campione, si può ottenere un'immagine tridimensionale con un'accuratezza inferiore al nm (0.1nm). Questa tecnica ha quindi il grande vantaggio di consentire analisi non distruttive su scala nanometrica.



Fig.2.7 - Apparato sperimentale di un microscopio a forza atomica

L'uso di un AFM per misure di microreologia consiste nell'applicare delle vibrazioni al cantilever immerso nel fluido. Lo studio dell'ampiezza dell'oscillazione e del suo spostamento fornisce informazioni sulla parte elastica e viscosa del mezzo.

CAPITOLO 3

MOTO BROWNIANO

Quando un fluido si trova all'equilibrio termodinamico si è portati a pensare che le molecole che lo compongono siano essenzialmente ferme o che comunque vibrino attorno alla loro posizione di equilibrio per effetto della temperatura. Se però si osserva il moto di un tale fluido, ad esempio mettendo in sospensione delle particelle colorate molto leggere ed osservandone il movimento, si nota che queste sono tutt'altro che a riposo. Quello che si osserva è che ciascuna particella segue un moto assolutamente disordinato, incessante ed irregolare, la cui natura appare essere indipendente dalla natura della particella stessa. Questo è dovuto al fatto che la particella subisce un gran numero di collisioni da parte delle molecole del fluido in cui è immersa, [15]. In Figura 3.1 è illustrato un esempio della traiettoria seguita da una particella in moto Browniano.



Fig.3.1 - Traccia Browniana di una particella

Il movimento caotico (o stato di agitazione) delle molecole di un fluido per effetto della loro temperatura, fu osservato in natura nel 1827 dal botanico scozzese R. Brown, il quale rilevò al microscopio le traiettorie a zigzag di particelle di polline in sospensione nell'acqua. Centinaia di casi furono esaminati successivamente, e in ognuno di essi il moto presentava le stesse caratteristiche generali, che chiamiamo Browniane, [16]:

- la rapidità del moto è tanto maggiore quanto minore è la dimensione della particella sospesa;
- il moto Browniano è stabile nel tempo;
- il moto persiste per tutto il tempo in cui la particella rimane sospesa nel fluido;
- il moto è indipendente dalla maggior parte dei fattori esterni, quali campi elettrici, luce e gravità.

Il meccanismo alla base del moto Browniano è rappresentato dalle collisioni molecolari. La teoria cinetica asserisce che le molecole di un fluido sono costantemente in moto con un'energia cinetica media proporzionale alla temperatura secondo la relazione:

$$\frac{3}{2}k_BT \tag{3.1}$$

che corrisponde ad una velocità di circa 1*mm/s* per una particella di 1 μm di diametro e di densità $\rho = 1g/cm^3$.

Per sistemi in equilibrio, il moto è stabile nel tempo e indipendente dalle influenze esterne. Quindi i moti casuali, osservati per una particella sospesa, dipendono dai trasferimenti irregolari di energia e di momento dalle molecole del fluido alle particelle, dovuti alle collisioni molecolari irregolari tra le particelle sospese e le particelle nel mezzo. Le particelle sospese sono molto più pesanti rispetto a quelle del mezzo, per questo la loro velocità, in seguito ad una collisione, cambia di poco. Solo nel 1905 il fenomeno fu spiegato da Einstein, il quale mise i relazione, in modo quantitativo, il moto browniano e le quantità che appaiono nella teoria cinetica, come i coefficienti di mobilità e la viscosità. Einstein dimostrò inoltre che nel moto Browniano l'allontanamento medio di una particella dalla posizione iniziale è proporzionale alla radice quadrata del numero di urti che subisce.

3.1 EQUAZIONE DI LANGEVIN

Il comportamento Browniano, cioè le fluttuazioni indotte nel moto di un sistema come risultato dell'agitazione termica dell'ambiente circostante con il quale il sistema è in equilibrio, si ritrova in differenti contesti. Trattiamo il caso di moto Browniano libero (o moto termico), che è descritto dall'equazione di Langevin:

$$m\frac{d^2\vec{r}}{dt^2} = -\gamma\frac{d\vec{r}}{dt} + \vec{F}_e(t)$$
(3.2)

dove *m* è la massa della particella (sfera di raggio *a*), \vec{r} lo spostamento del suo centro di massa e $\gamma \frac{d\vec{r}}{dt}$ la forza di Stokes, con $\gamma = 6\pi\eta a$ detto *coefficiente idrodinamico*. $\vec{F}_e(t)$ rappresenta la forza termica casuale (random), a media nulla, dovuta all'interazione tra particelle e molecole del liquido circostante.

La causalità della forza $\vec{F}_e(t)$ è espressa dal fatto che, se mediamo su molte particelle (ensemble) o su intervalli di tempo differenti, otteniamo:

$$\left\langle \vec{F}_{e}\right\rangle = 0 \tag{3.3}$$

Proviamo a dedurre, dall'equazione di Langevin, la variazione temporale dello spostamento quadratico medio della particella $\langle r^2(t) \rangle$. Moltiplichiamo scalarmene per \vec{r} ambo i membri dell'equazione (3.2):

$$m\vec{r} \cdot \frac{d^2\vec{r}}{dt^2} = -\gamma\vec{r} \cdot \frac{d\vec{r}}{dt} + \vec{r} \cdot \vec{F}_e(t)$$
(3.4)

Utilizzando le seguenti identità:

$$\frac{dr^2}{dt} = 2\vec{r} \cdot \frac{d\vec{r}}{dt}$$
(3.5)

$$\frac{d^2 r^2}{dt^2} = 2\vec{r} \cdot \frac{d^2 \vec{r}}{dt^2} + 2\dot{r}^2$$
(3.6)

e mediando nel tempo si ottiene:

$$m\ddot{s} + \gamma \dot{s} = 2nk_B T \tag{3.7}$$

dove si è posto $\langle r^2 \rangle = s$; inoltre *n* rappresenta il numero di dimensioni spaziali. Quest'equazione può essere risolta semplicemente fissando le condizioni iniziali s(t)=0 e ds/dt=0:

$$s(t) = \left\langle r^{2}(t) \right\rangle = \frac{2nk_{B}T}{\gamma} \left[t + \frac{m}{\gamma} \left(e^{-t\gamma/2} - 1 \right) \right]$$
(3.8)

Diventa così possibile analizzare il moto Browniano della particella su differenti scale di tempi rispetto al tempo caratteristico del problema, che in questo caso è dato dal rapporto m/γ . In Figura 3.2 è illustrato lo scarto

quadratico medio della posizione di una particella che si muove di moto browniano all'interno di un fluido.



Fig.3.2 – Scarto quadratico medio di una particella in un fluido, che si muove di moto browniano

Per tempi brevi, $t << m/\gamma$, è possibile espandere in serie di Taylor l'esponenziale nell'equazione (3.8), ottenendo:

$$s(t) = \left\langle r^2(t) \right\rangle \approx \frac{nk_B T}{m} t^2$$
(3.9)

Ovvero per tempi brevi la particella si comporta come una particella libera che si muove con velocità termica costante (regime balistico).

Per tempi lunghi, $t >> m/\gamma$, l'esponenziale tende a zero e si ottiene uno scarto quadratico medio della particella che dipende linearmente dal tempo:

$$s(t) = \left\langle r^2(t) \right\rangle \approx \frac{2nk_BT}{\gamma}t = 2nDt$$
(3.10)

dove $D = k_B T / \gamma$ rappresenta il *coefficiente di diffusione*. Questo risultato rappresenta la ben nota relazione di Einstein.

Per avere un'idea dell'ordine di grandezza dei tempi per cui le due approssimazioni sono valide, consideriamo una sferetta di polistirene di diametro d=1 µm e massa $m = 5 \cdot 10^{-15} Kg$, posta in acqua distillata; otteniamo:

$$\frac{m}{\gamma} = 2 \cdot 10^{-7} s \tag{3.11}$$

Quindi basta campionare il raggio quadratico medio su scale dell'ordine dei nanosecondi per osservare il moto balistico.

Questi risultati sono validi per una particella libera di muoversi nel liquido e soggetta soltanto alle collisioni con le molecole del fluido circostante.

3.2 MOTO BROWNIANO NELLA TRAPPOLA OTTICA

Un caso particolarmente interessante da studiare è quello di una particella, animata di moto Browniano, che si trova in un potenziale armonico. Questa situazione, che si verifica per una particella intrappolata otticamente in un fluido, può essere rappresentata schematicamente da un corpo fluttuante attaccato ad una molla, di costante elastica K, che ha l'altra estremità fissa nell'origine del sistema di riferimento.

Quando la particella è soggetta alle forze ottiche della trappola, l'equazione di Langevin, in una sola dimensione, diventa:

$$m \cdot \frac{d^2 x}{dt^2} + \gamma \cdot \frac{dx}{dt} + K \cdot x = \vec{F}_e(t)$$
(3.12)

dove il termine $K \cdot x$, rappresenta il termine di richiamo elastico della trappola ottica (*K* è detta *stiffness*).

La soluzione dell'equazione (3.12) si ottiene in modo analogo a quella dell'equazione (3.2), ponendo come condizioni iniziali s(t=0)=0=ds/dt:

$$\langle x^{2}(t) \rangle = s_{x}(t) = \frac{nk_{B}T}{K} \left(1 - \frac{\mu_{2}e^{-\mu_{1}t} - \mu_{1}e^{-\mu_{2}t}}{\mu_{2} - \mu_{1}} \right)$$
 (3.13)

dove

$$\mu_{2} - \mu_{1} = \frac{\gamma}{2m} \left(1 \pm \sqrt{1 - \frac{8Km}{\gamma^{2}}} \right)$$
(3.14)

Il sistema in esame ha due tempi caratteristici: $1/\mu_1 e 1/\mu_2$. Quando investighiamo il comportamento a tempi brevi intendiamo tempi minori di $1/\mu_2$. Facendo un'espansione in serie dei due esponenziali nell'equazione (3.13) otteniamo un comportamento quadratico:

$$s_x(t) \approx \frac{nk_B T \mu_1 \mu_2}{2K} t^2 = \frac{nk_B T}{m} t^2$$
 (3.15)

Questo risultato coincide con l'equazione (3.9) essendo $\mu_1\mu_2=2K/m$; quindi per tempi brevi la diffusione segue lo stesso comportamento di quello della diffusione libera.

Per tempi lunghi, invece, i due esponenziali nell'equazione (3.13) sono trascurabili e $\langle x^2 \rangle$ tende al suo valore di equilibrio:

$$S_{\infty} \approx \frac{nk_BT}{K} \tag{3.16}$$

come illustrato in Figura 3.3.

In conclusione per tempi brevi il moto è diffusivo, tipico di una particella libera, mentre per tempi lunghi la particella risente del confinamento ottico della trappola.



Fig.3.3 – Andamento temporale dello scarto quadratico medio della posizione di una particella intrappolata otticamente

3.3 DENSITA' DI POTENZA SPETTRALE (PSD)

L'analisi del moto Browniano di una particella intrappolata in un fluido ci consente di studiare l'evoluzione temporale dello scarto quadratico medio della sua posizione. Il passaggio dal dominio dei tempi a quello delle frequenze è possibile mediante l'utilizzo della trasformata di Fourier

Consideriamo nuovamente l'equazione di Langevin in una dimensione. Trascurando il termine inerziale (essendo la massa della particella molto piccola , $m << 10^{-12} Kg$), si ottiene:

$$\gamma \cdot \frac{dx}{dt} + K \cdot x = \vec{F}(t) \tag{3.17}$$

Eseguendo la trasformata di Fourier per ambo i membri della (3.17), si ottiene:

$$2\pi\gamma(f_c - if)\widetilde{x}(f) = \widetilde{F}(f)$$
(3.18)

dove $\tilde{x}(f) \in \tilde{F}(f)$ sono rispettivamente la trasformata di Fourier nello spazio delle frequenze di $x(t) \in F(t)$, e la quantità $f_c = K/2\pi\gamma$ è la *frequenza di taglio caratteristica* della trappola ottica.

Facendo il modulo quadro della (3.18) otteniamo la Densità di Potenza Spettrale $S_x(f)$:

$$S_{x}(f) = \left| \widetilde{x}(f) \right|^{2} = \frac{k_{B}T}{\gamma \pi^{2} (f_{c}^{2} + f^{2})}$$
(3.19)

L'equazione (3.19) mostra che la PSD, di una particella intrappolata otticamente in un fluido viscoso e che si muove di moto Browniano, è una curva Lorentziana caratterizzata da una semilarghezza a metà altezza f_c e da

un'ampiezza a frequenza nulla $S_x(0) = \frac{k_B T}{\gamma \pi^2 f_c^2}$.

In Figura 3.4 si osserva che la frequenza di taglio f_c divide lo spettro in due regioni: nella zona a basse frequenze (tempi lunghi) c'è un plateau di ampiezza costante il quale indica che la particella risente il confinamento dovuto alla trappola; oltre la f_c , invece, l'ampiezza decresce con f^2 (tempi brevi) rispecchiando il tipico comportamento della diffusione libera. In pratica

alle alte frequenze la particella non risente del confinamento della trappola ottica.



Fig.3.4 – Densità di Potenza Spettrale di una particella immersa in acqua distillata

Le Densità di Potenza Spettrale, come verrà spiegato nel paragrafo seguente, è poi utilizzata per calcolare i moduli viscoelastici di taglio G'(f) e G''(f) nell'ambito di una tecnica più generale riguardante i fluidi complessi.

3.4 FUNZIONE COMPLESSA DI RISPOSTA E TEOREMA DI FLUTTUAZIONE - DISSIPAZIONE

La teoria esposta al precedente paragrafo si applica al caso di fluidi Newtoniani. Se il fluido in cui la particella è immersa presenta anche un comportamento elastico è possibile stimare i moduli viscoelastici G' e G''analizzando sempre il moto Browniano ma facendo ulteriori considerazioni.

Dalle fluttuazioni termiche di una microsferetta si può infatti calcolare la funzione complessa di risposta $\alpha(f)$ della sferetta mediante il Teorema di Fluttuazione-Dissipazione.

Ricordiamo che la funzione complessa di risposta:

$$\alpha(f) = \alpha'(f) + i\alpha''(f) \tag{3.20}$$

relaziona la trasformata di Fourier $\tilde{x}(f)$ dello spostamento della sferetta x(t) con la trasformata di Fourier $\tilde{F}(f)$ della forza F(t) che agisce sulla sferetta, secondo la seguente espressione:

$$\widetilde{x}(f) = \alpha(f) \cdot \widetilde{F}(f)$$
 (3.21)

Il Teorema di Fluttuazione-Dissipazione fornisce poi il legame tra la densità di potenza spettrale, $S_x(f)$ (fluttuazioni), e la parte immaginaria della funzione risposta (dissipazioni):

$$\alpha^{\prime\prime}(f) = \frac{\pi}{2k_B T} f \cdot S_x(f) \tag{3.22}$$

Nota $\alpha''(f)$, possiamo calcolare la parte reale $\alpha'(f)$ della funzione complessa di risposta mediante la relazione di Kramers-Kronig:

$$\alpha'(f) = \frac{2}{\pi} P \int_{0}^{\infty} d\xi \frac{\xi \alpha''(f)}{\xi^2 - f^2}$$
(3.23)

dove *P* rappresenta il valor principale di Cauchy. Sebbene tale integrale si risolve analiticamente, nel nostro caso serviva una sua soluzione numerica che si è presentata piuttosto laboriosa a causa della presenza di poli che rendono la funzione integranda non analitica nel piano complesso. Per risolvere tale problema l'equazione 3.24, attraverso alcuni passaggi, si può scrivere in altra forma:

$$\alpha'(\omega) = \frac{2}{\pi} \int_0^\infty dt \cos(ft) \int_0^\infty d\xi \alpha''(\xi) \operatorname{sen}(\xi t)$$
(3.24)

La relazione tra la risposta della sferetta $\alpha(f)$ e il modulo complesso di viscoelasticità del mezzo, G(f) = G'(f) + iG''(f), in cui è immersa la sferetta (di raggio *a*), può essere infine ricavata attraverso la relazione generalizzata di Stokes-Einstein (GSER):

$$G(f) = \frac{1}{6\pi a \alpha(f)} \tag{3.25}$$

Da tale relazione si ricavano i moduli viscoelastici nel modo seguente:

$$G'(f) = \frac{1}{6\pi a} \frac{\alpha'(f)}{\alpha'(f)^2 + \alpha''(f)^2}$$
(3.26)

$$G''(f) = \frac{1}{6\pi a} \frac{-\alpha''(f)}{\alpha'(f)^2 + \alpha''(f)^2}$$
(3.27)

CAPITOLO 4

TECNICHE SPERIMENTALI UTILIZZATE

Le tecniche sperimentali di cui si è fatto uso in questo lavoro di tesi sono state due: la tecnica della Pinzetta Ottica e la tecnica del Videotracking.

Inizialmente si è utilizzata una Pinzetta Ottica per intrappolare delle microsferette sonda all'interno dell'oocita in esame al fine di determinare le sue proprietà viscoelastiche, come spiegato nel Capitolo 3. Però a causa dell'elevata viscoelasticità del citoplasma dell'oocita la sonda iniettata al suo interno non veniva intrappolata ma seguiva i movimenti naturali del citoplasma. Per questo motivo si è deciso di abbandonare tale tecnica e di utilizzare la tecnica del Videotracking, cioè di monitorare la traccia del moto browniano della sonda iniettata all'interno dell'oocita.

4.1 TEORIA DELLA PINZETTA OTTICA

Le tecniche di intrappolamento e manipolazione ottica di microsonde, mediante l'uso di laser, consentono di studiare la dinamica di tali particelle.

La Pinzetta Ottica, come già detto, consiste in un fascio laser fortemente focalizzato che è in grado di confinare microparticelle in un volume di spazio definito dalla lunghezza d'onda del laser.

Questa tecnica consente di manipolare particelle le cui dimensioni variano da alcune decine di nm ad alcune centinaia di μm , sulle quali agiscono forze che variano rispettivamente da frazioni di pN fino a centinaia di pN. Queste caratteristiche hanno trovato un'ampia applicazione soprattutto nel campo biologico. E' stato infatti possibile intrappolare singole cellule, virus e batteri.

Utilizzando radiazione infrarossa si è verificato che il danneggiamento termico e fotochimico sul materiale biologico è estremamente ridotto al punto di poter osservare la riproduzione sia di cellule di lievito che di cellule di batteri *Escherichia coli* intrappolati. E' inoltre possibile manipolare organelli sub-cellulari come cromosomi o mitocondri e recentemente le Pinzette Ottiche sono utilizzate anche nello studio dei motori molecolari.

In questa sezione tratteremo in modo sintetico la teoria che sta alla base delle Pinzette Ottiche. Ci proponiamo di esporre i principi principali che sono alla base di tali dispositivi. In particolare mostreremo il calcolo delle forze che agiscono su una sfera dielettrica non assorbente di raggio a e indice di rifrazione n_1 , immersa in un liquido con indice di rifrazione n_2 , generate dalla sua interazione con un fascio laser gaussiano nel modo fondamentale TEM₀₀ di lunghezza d'onda λ . La teoria descrive particelle sferiche perchè è questa la geometria più semplice da trattare ed è quella che in prima approssimazione fa da modello per cellule viventi negli esperimenti di intrappolamento biologico. Inoltre, sono proprio microsfere quelle che si utilizzano in numerosi esperimenti che riguardano l'oggetto di questa tesi.

A causa dell'ampio range d'applicazione della Pinzetta Ottica (compreso tra 20 *nm* e 200 μ *m*) non è possibile elaborare una teoria generale, bensì bisogna distinguere teorie diverse a seconda che *a*<< λ (Regime di Rayleigh), *a*>> λ (Regime dell'Ottica Geometrica) e *a* $\approx\lambda$ (Regime di Lorentz-Mie).

Tutti e tre i regimi presentano però alcune caratteristiche comuni: 1) le forze possono ricondursi a due categorie: di *scattering* e di *gradiente*; 2) la forza è direttamente proporzionale alla potenza del laser; 3) per piccoli spostamenti della sferetta dalla posizione di equilibrio il potenziale è armonico. Per quanto concerne la *forza di scattering* \vec{F}_s e quella *di gradiente* \vec{F}_g occorre dire che la prima spinge la particella lungo l'asse di propagazione del fascio mentre la seconda richiama la particella verso il punto di massima intensità (il fuoco, per un fascio gaussiano). Quindi affinché si realizzi una trappola tridimensionale è necessario avere un gradiente d'intensità assiale sufficientemente elevato da superare la *forza di scattering*.

4.1.1 REGIME DI RAYLEIGH ($a \ll \lambda$)

Nell'approssimazione di Rayleigh (detta approssimazione di dipolo) le dimensioni della particella sono molto minori della lunghezza d'onda della radiazione che la investe. La sferetta dielettrica può essere allora trattata come un semplice dipolo localizzato nel suo centro, [17].

In Figura 4.1 è illustrata la geometria di una sfera dielettrica di indice di rifrazione n_1 immersa in un mezzo con indice di rifrazione n_2 , investita da un fascio laser gaussiano polarizzato linearmente lungo l'asse x e che si propaga lungo la direzione z.

Scegliendo questa geometria troviamo il momento di dipolo della particella nel campo elettrico istantaneo $\vec{E}(\vec{r},t)$:

$$\vec{p}(\vec{r},t) = 4\pi n_2^2 \varepsilon_0 a^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2}\right) \vec{E}(\vec{r},t)$$
(4.1)

dove $m = n_1 / n_2$ è l'indice di rifrazione della particella relativa al fluido in cui è immersa e ε_0 è la costante dielettrica del vuoto.



Fig.4.1 – Geometria della sfera e del fascio laser nel regime di Rayleigh

Un dipolo puntiforme indotto, immerso in un campo elettrico, oscilla in modo sincrono con il campo stesso, comportandosi come un dipolo elettrico oscillante che irraggia onde diffuse in tutte le direzioni.

La *forza di scattering* derivante dal corrispondente trasferimento di momento risulta:

$$\vec{F}_{scat}(\vec{r}) = \hat{z} \left(\frac{n_2}{c}\right) C_{scat} I(\vec{r})$$
(4.2)

dove *c* è la velocità della luce, \hat{z} è il versore nella direzione di propagazione del fascio e $\vec{I}(r)$ l'intensità del fascio gaussiano. Inoltre C_{scat} rappresenta la sezione d'urto della pressione di radiazione della particella che vale:

$$C_{scat} = \frac{128\pi^5 a^6}{3\lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 1}\right)^2$$
(4.3)

Sostituendo quindi la relazione (4.3) nell'equazione (4.2) otteniamo la seguente espressione per la *forza di scattering*:

$$\vec{F}_{scat}(\vec{r}) = \hat{z}\left(\frac{n_2}{c}\right) \frac{128\pi^5 a^6}{3\lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2}\right)^2 I(\vec{r})$$
(4.4)

Quindi la *forza di scattering* è direttamente proporzionale all'intensità, cresce con la sesta potenza del raggio della sferetta ed è diretta lungo la direzione di propagazione del fascio, indipendentemente dal valore di *m*.

Oltre alla forza di scattering abbiamo detto che sulla particella agisce un secondo tipo di forza, detta *forza di gradiente*, la cui espressione è:

$$\vec{F}_{grad}(\vec{r},t) = \left(\vec{p}(\vec{r},t)\cdot\vec{\nabla}\right)\vec{E}(\vec{r},t) = 2\pi n_2^2 a^3 \left(\frac{m^2-1}{m^2+2}\right)\cdot\vec{\nabla}\vec{E}^2(\vec{r},t)$$
(4.5)

La *forza di gradiente* risulta quindi direttamente proporzionale al gradiente del campo e cresce con la terza potenza del raggio della sferetta. Si nota inoltre che la condizione m>1 rende le tre componenti della *forza di gradiente* attrattive verso il centro del beam waist, cioè la *forza di gradiente* agisce come forza di richiamo per una particella sferica dielettrica; invece per m<1 le forze diventano repulsive, nel senso che la particella risulterà respinta lontana dal fuoco.

Vediamo adesso un criterio di stabilità per la trappola nel regime di Rayleigh. Affinché un singolo fascio laser realizzi una trappola devono essere verificate due condizioni. La prima è che il rapporto, *S*, tra la componente assiale della forza di gradiente e la forza di scattering sia maggiore di uno nel punto di massimo gradiente d'intensità assiale; per il fascio gaussiano considerato si avrà:

$$S = \frac{\left|F_{grad_{z}}(0,0,kw_{0}^{2}/2\sqrt{3})\right|}{F_{scat}(0,0,kw_{0}^{2}/2\sqrt{3})} = \frac{3\sqrt{3}}{128\pi^{5}} \left(\frac{m^{2}-1}{m^{2}+2}\right) \frac{\lambda^{5}}{a^{3}w_{0}^{2}} \ge 1$$
(4.6)

La seconda condizione necessaria che deve essere soddisfatta affinchè una trappola ottica sia stabile è che la barriera di potenziale della *forza di gradiente* sia maggiore dell'energia cinetica k_BT della particella, ovvero:

$$e^{-\frac{U}{k_B T}} \ll 1 \tag{4.7}$$

dove *U* è l'energia potenziale della *forza di gradiente* nel punto $\vec{r} = 0$, k_B è la costante di Boltzmann e T è la temperatura del mezzo circostante.

Quest'ultima condizione equivale a richiedere che il tempo necessario a spingere una particella nella trappola deve essere minore del tempo che essa impiega a diffondere lontano dalla trappola con il suo moto Browniano.

4.1.2 REGIME DELL'OTTICA GEOMETRICA ($a >> \lambda$)

Per descrivere l'interazione tra la radiazione incidente e la sferetta, nel limite in cui la dimensione della particella sia molto maggiore della lunghezza d'onda della radiazione, a>> λ , si può usare l'ottica geometrica.

Nel regime dell'ottica geometrica il fascio viene decomposto in un insieme di raggi, ognuno con una propria intensità, direzione e stato di polarizzazione, che si propagano in linea retta in un mezzo di indice di rifrazione uniforme. Ogni raggio ha le caratteristiche di un'onda piana di lunghezza d'onda zero che può cambiare direzione quando viene riflessa e rifratta all'interfaccia tra due mezzi differenti. Tali onde verificheranno le leggi di Fresnel per la rifrazione e la riflessione. In questo regime gli effetti di diffrazione possono essere trascurati. Un raggio luminoso che incontra sul proprio cammino una particella dielettrica, con indice di rifrazione maggiore di quello dell'ambiente circostante, viene rifratto, modificando quindi la propria direzione di propagazione. Poiché ad ogni raggio è associata una quantità di moto, per la conservazione della stessa, la sferetta subirà una variazione uguale e opposta alla variazione della quantità di moto del raggio nell'unità di tempo; pertanto risentirà di una forza che la spingerà in una certa direzione. Ripetendo il discorso per tutti i raggi del fascio e sommando tutte le forze, si ottiene una forza risultante che attira la particella verso il fuoco del fascio, [18].

In Figura 4.2 sono riportati tre casi che mostrano la forza di richiamo esercitata sulla sferetta per mezzo di due raggi incidenti a e b, al variare della posizione del fuoco del fascio rispetto al centro della sfera. Le forze $F_a e F_b$ sono dirette, in tutti e tre i casi, nella direzione di variazione della quantità di moto e la loro somma punta sempre verso il fuoco del fascio.

Utilizzando il modello illustrato in Figura 4.3, ci proponiamo di calcolare le forze della trappola agenti sulla sfera nel regime dell'ottica geometrica. La trappola consiste di un fascio di raggi paralleli i quali entrano in un obiettivo di grande apertura numerica e vengono focalizzati nel fuoco f posto sull'asse z.

La forza totale che la luce esercita sulla sferetta sarà data dalla somma dei contributi provenienti da tutti i raggi del fascio che entrano nell'apertura dell'obiettivo, ciascuno a distanza r dall'asse z e con un angolo β rispetto all'asse y. Per determinare tale forza risultante occorre quindi stimare prima la forza esercitata da un singolo raggio.



Fig.4.2 – Descrizione della forza ottica di intrappolamento dovuta alla rifrazione di due raggi per tre diverse posizioni della sferetta rispetto al fuoco del fascio



Fig.4.3 – A) Modello geometrico per un fascio focalizzato da un obiettivo e incidente su una sfera nel caso in cui f è posizionato lungo l'asse Z della sfera; B) Geometria di un singolo raggio incidente

In Figura 4.4 è illustrato un singolo raggio di potenza P che incide sulla sfera ad un angolo θ e viene riflesso e rifratto infinite volte; questo trasporta una quantità di moto pari a n_2P/c . La forza totale agente sulla sfera sarà data dalla somma dei contributi dovuti al raggio riflesso di potenza PR e agli infiniti raggi rifratti emergenti di potenza via via decrescente PT^2 , PT^2R ,... PT^2R^n ..; dove le quantità T e R sono, rispettivamente, i coefficienti di Fresnel di trasmissione e riflessione.

La somma data dalla variazione di momento, lungo la direzione z e y, di tutti i contributi trasmessi e riflessi ci fornisce la forza totale lungo gli assi z e y:

$$F_{z} = \frac{n_{2}P}{c} \cdot \left[1 + R\cos(2\theta) - \frac{T^{2}[\cos(2\theta - r) + R\cos(2\theta)]}{1 + R^{2} + 2R\cos(2r)} \right]$$
(4.8)

$$F_{y} = \frac{n_{2}P}{c} \cdot \left[R\cos(2\theta) - \frac{T^{2}[sen(2\theta - r) + R\cos(2\theta)]}{1 + R^{2} + 2R\cos(2r)} \right]$$
(4.9)

dove θ e *r* sono rispettivamente gli angoli di incidenza e rifrazione.

In analogia al caso di Rayleigh identifichiamo la *forza di scattering* con la componente F_z e la *forza di gradiente* con la componente F_y . Dalle equazioni (4.8) e (4.9) si evince però che nel regime dell'ottica geometrica scompare la dipendenza dal raggio della sferetta intrappolata, a differenza del regime di Rayleigh in cui le forze dipendono dalle dimensioni della particella. Rimane invece la dipendenza di proporzionalità con l'intensità del fascio.

Per ottenere le forze totali occorre integrare numericamente i contributi dei vari raggi. Questi calcoli sono riportati nel lavoro di Askin, [19], ed il risultato finale della forza F_z in funzione dello spostamento dal fuoco è mostrato in Figura 4.5.


Fig.4.4 – Geometria del singolo raggio di potenza P che investe la sferetta e viene riflesso con potenza PR e rifratto infinite volte con potenza PT^2R^n



Fig.4.5 – L'andamento della forza F_z mostra il tipico carattere di forza di richiamo analogo al regime di Rayleigh.

4.1.3 REGIME DI LORENTZ – MIE ($a \approx \lambda$)

Nel caso in cui le dimensioni della sferetta intrappolata sono confrontabili con la lunghezza d'onda del laser siamo nel regime di Lorentz-Mie, detto anche regime intermedio.

Il problema può essere ricondotto al calcolo del coefficiente C_{scat} . In letteratura si trova una forma esplicita di C_{scat} espresso come funzione dei coefficienti di Mie, $a_n e b_n$, che dipendono dalle dimensioni e dall'indice di rifrazione della particella, e dei coefficienti di forma del fascio, g_n , che dipendono dalla lunghezza, dal waist e dalla posizione del fascio laser. Il calcolo di questi coefficienti è molto laborioso, [20]. Ci accontentiamo allora degli andamenti riportati in Figura 4.6 e 4.7 per avere un'idea di come varia la forza esercitata dalla Pinzetta Ottica, espressa attraverso l'*efficienza di intrappolamento assiale Q*, al variare di alcuni parametri, quali l'indice di rifrazione della biglia e lo spot del laser.

L'efficienza di intrappolamento assiale Q può essere definita, allo stesso modo in tutto l'intervallo d'applicabilità delle pinzette ottiche, come:

$$Q = \frac{cF}{n_2 P} \tag{4.10}$$

dove c è la velocità della luce, F è la forza ottica, n_2 è l'indice di rifrazione del mezzo in cui è immersa la sferetta e P è la potenza del fascio.

Dalle figure 4.6 e 4.7 si vede che Q aumenta all'aumentare dell'indice di rifrazione relativo sferetta-mezzo ($m = n_1/n_2$) e aumenta al diminuire delle dimensioni dello spot del fascio.



Fig.4.6 – Efficienza di intrappolamento assiale in funzione della posizione assiale della sferetta, per differenti valori dell'indice di rifrazione relativo.



Fig.4.7 – Efficienza di intrappolamento assiale in funzione della posizione assiale della sferetta, per differenti dimensioni dello spot del fascio

4.2 TEORIA DEL VIDEOTRACKING

Nella tecnica del Rilevamento-Video della traccia della particella (Particle-Videotracking), le particelle sonda sono immerse in un campione viscoelastico e le caratteristiche reologiche sono ricavate dallo spettro delle fluttuazioni termiche, ottenuto usando la video-microscopia digitale. Tale tecnica ha sviluppato una serie di algoritmi informatici che permettono di monitorare, attraverso la successione delle immagini video (frame), spostamenti nanometrici delle particelle-sonda immerse nel campione.

L'intervallo dinamico misurabile dipende dalla velocità di acquisizione dei frame della videocamera e dalla velocità di accumulo dei dati stessi; nel nostro caso sono stati acquisiti 30 frame al secondo.

Il Particle-Videotracking, grazie alla sua elevata precisione, ha numerose applicazioni in biofisica. Ha trovato largo impiego in numerosi studi quali quello della diffusione delle proteine nelle cellule; del movimento guidato dalle chinasi delle sferette lungo i microtuboli; del movimento guidato dalla miosina dei filamenti di actina, in vitro; del movimento dei motori molecolari e nello studio dell'interazione di un repressore Lac con una singola molecola di DNA. L'analisi al computer della successione delle immagini video consente di seguire, mediante microscopio, anche gli spostamenti di singoli organelli e molecole. Usando tale tecnica è stato stimato il coefficiente di diffusione delle proteine in soluzione e nelle membrane cellulari e l'entità dello spostamento generato dai motori molecolari (Saxton e Jacobson, 1997).

Gli studi recenti tendono a considerare medie su un gran numero di particelle immerse nel campione, contemporaneamente fluttuanti, perchè in questo modo si ottiene una statistica migliore per la stima delle funzioni reologiche e si facilita l'analisi dell'eterogeneità del campione. Nella tecnica del Particle-Videotracking sono comunemente usati quattro diversi algoritmi di traccia, [21]: il calcolo del centro di massa (centroide) dell'oggetto in esame, la cross-correlation della sequenza di immagini, il fit gaussiano del profilo di intensità e la sommatoria delle differenze assolute SAD (Sum-Absolute Difference). Questi algoritmi hanno la particolarità di incrementare la risoluzione a livelli *sub-pixel*.

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato l'algoritmo del centroide in quanto risulta essere il più semplice e più veloce per registrare la traccia di una sferetta-sonda di polistirene (delle dimensioni di $1\mu m$) immersa nel citoplasma di un oocita di stella marina, al fine di determinare le proprietà viscoelastiche dell'oocita stesso.

4.2.1 CALCOLO DEL CENTROIDE

Calcolare il centro di massa (centroide) di una sequenza di immagini è un metodo semplice ed efficace che permette di stimare l'entità del movimento di un oggetto.

Dal file contenente la registrazione della traccia della sferetta è possibile estrapolare, mediante l'ausilio di un software, ogni singolo frame e trasformarlo in un'immagine avente una risoluzione di 768×494 *pixel*, come illustrato in Figura 4.8. Successivamente è possibile selezionare da questa una regione quadrata, digitalizzata a 8 bit (scala di grigio), che contiene l'immagine della sferetta di circa 190 *pixel* di diametro, Fig.4.9. L'immagine di questa regione è una matrice quadrata i cui valori variano da zero (nero) a 255 (bianco). Quando la sferetta si trova nel piano focale dell'obiettivo la sua immagine appare come un cerchio scuro rispetto allo sfondo.

L'immagine viene prima ripulita mediante un filtro a soglia per eliminare i disturbi dovuti al rumore di fondo; successivamente si calcola il centroide facendo una media dei *pixel* lungo l'asse *x* e l'asse *y* e pesando ogni *pixel* con il corrispettivo valore nella scala di grigio.

Nel nostro caso un tipico valore della soglia è stato 180. Questo viene scelto in modo tale da ottenere il massimo contrasto tra lo sfondo circostante la sferetta (in modo che risulti completamente nero) e la sferetta stessa (in modo che risulti chiaramente distinguibile), come illustrato in Figura 4.10.

Per ottenere dalla posizione della sferetta $X \in Y$ il reale spostamento in nanometri è necessario calibrare il sistema di risposta, come spiegato nel Capitolo 5.



Fig.4.8 – Immagine di un singolo frame



Fig.4.9 – Immagine della sferetta avente un diametro di circa 190 *pixel*



Fig.4.10 – A) Immagine di un frame della traccia della sferetta di polistirene di $1\mu m$; B) La stessa immagine dopo l'applicazione del filtro a soglia

CAPITOLO 5

APPARATO SPERIMENTALE

In questo lavoro di tesi sono state messe insieme competenze specifiche nel campo fisico e in quello biologico. Le tecniche sperimentali utilizzate hanno compreso 1) la Microiniezione, che permette di iniettare all'interno della cellula campione (oocita) una sferetta-sonda micrometrica, e 2) il Videotracking che permette, mediante la registrazione del moto browniano della sonda immersa nel citoplasma dell'oocita, di ricavare informazioni sulle proprietà viscoelastiche.

In questo Capitolo verrà descritto anche l'apparato sperimentale della Pinzetta Ottica, utilizzata nelle misure preliminari.

5.1 PREPARAZIONE DEL MATERIALE BIOLOGICO

In questo lavoro di tesi sono state utilizzate le stelle di mare della specie *Astropecten auranciacus*, Fig.5.1, pescate nel mare di Gaeta e conservate in acqua di mare, a circa $15^{\circ}C$, nelle vasche dell'Acquario "Anthon Dohrn" di Napoli. La dimensione della stella, da un braccio all'altro, è di circa 20cm.

Un taglio di circa 1*cm* viene fatto su un braccio della stella e facendo una leggera pressione sui bordi del taglio fuoriescono le gonadi, contenenti gli oociti. Le gonadi vengono prelevate con una pinzetta e poste in un beaker di vetro contenente acqua di mare.

Successivamente gli oociti vengono separati dalle gonadi per filtrazione e lasciati sedimentare per qualche minuto. Tutte le operazioni sono state condotte alla temperatura di circa $18^{\circ}C$.



Fig.5.1 – Stella di mare della specie Astropecten auranciacus

A questo punto, mediante uno stereoscopio, Fig.5.2, vengono scelti gli oociti immaturi in condizioni ottimali, con forma più tondeggiante e con una membrana nucleare ben definita, e vengono disposti in una *cameretta*.

La cameretta è un alloggio di vetro, costruito a mano, formato da due vetrini copri oggetto uniti con della cera a formare un angolo, Fig.5.3, che ha lo scopo di impedire il movimento delle cellule durante la microiniezione.



Fig.5.2 – Lo stereoscopio



Fig.5.3 – La cameretta

5.2 APPARATO PER LA MICROINIEZIONE

Il sistema per la Microiniezione, illustrato in Figura 5.4, è costituito da:

- un microscopio ottico
- un supporto laterale che permette di poggiare e direzionare l'holder
- un sistema di iniezione elettronico pneumatico o in alternativa manuale ad acqua

5.2.1 MICROSCOPIO OTTICO

Il microscopio ottico utilizzato è un Zeiss Axioskop. Il sistema di illuminazione è costituito da una lampada alogena la cui luce investe il campione e ne permette l'osservazione diretta, attraverso gli oculari. Il microscopio possiede più di un'uscita che permette, oltre all'osservazione diretta, anche il collegamento ad una telecamera CCD.

L'obiettivo utilizzato è uno Zeiss 10X che offre un buon compromesso tra l'ingrandimento dell'oocita da iniettare (il cui diametro è di circa $180\mu m$) e quello del capillare di vetro usato per l'iniezione (il cui diametro varia con la lunghezza da un max di 1mm a un min di centinaia di nm).

5.2.2 SUPPORTO DELL'HOLDER

Il supporto laterale è prodotto dalla Narishige, modello MO-155, mostrato in Figura 5.5. Tale sistema, posto a circa 10*cm* dal microscopio, è dotato di un alloggio specifico che permette di reggere l'holder che contiene il capillare di vetro per la Microiniezione. Inoltre è munito di tre manopole che permettono spostamenti micrometrici dell'holder lungo le tre direzioni: *x*, *y*, *z*.



Fig.5.4 – Sistema per la microiniezione



Fig.5.5 – Il supporto laterale

5.2.3 SISTEMA DI INIEZIONE

Esistono due tipi di sistema di iniezione: uno manuale ed uno elettronico pneumatico. Il primo, illustrato in Figura 5.6, è costituito da una siringa collegata, ad un'estremità, all'holder mediante un tubicino di gomma riempito con acqua distillata. All'altra estremità della siringa vi è invece un pomello che, a seconda del verso in cui si ruota, permette di aumentare o diminuire la pressione nel condotto di gomma e di regolare la forza con cui la sostanza contenuta nel capillare di vetro viene iniettata nell'oocita. Dopo aver effettuato molteplici prove, nel caso specifico dell'iniezione delle sferette, si è deciso di utilizzare il sistema di iniezione manuale ad acqua poiché si verifica un danneggiamento minore dell'oocita rispetto al sistema elettronico ad aria.

Con il sistema manuale infatti è possibile risucchiare leggermente la soluzione nel capillare, qualora essa dovesse ostruire la punta. Regolando la pressione si riesce a liberare il capillare ostruito. Di contro lo svantaggio del sistema manuale è di doversi esercitare abbastanza affinché la pressione applicata sia quella ottimale; infatti un movimento brusco nell'aumentare o nel diminuire la pressione può comportare la distruzione dell'oocita.

Il sistema elettronico pneumatico, invece, non consente l'eventuale risucchio, ma permette solo di iniettare, avendo precedentemente selezionato i parametri di pressione e tempo di emissione.

5.2.4 PREPARAZIONE DEL CAPILLARE DI VETRO

I capillari di vetro, del tipo senza filamento interno, sono prodotti dalla WPI (World Precision Instruments), Fig.5.7. Hanno un diametro interno di 0.87mm ed uno esterno di 1mm.



Fig.5.6 – L'iniettore manuale



Fig.5.7 – Il capillare di vetro

Questi capillari, per poter essere utilizzati per la Microiniezione vengono stirati meccanicamente mediante un Puller. Il Puller, modello PN-30 della Narishige, illustrato in Figura 5.8, è uno strumento costituito da un filamento metallico situato tra due supporti, di cui uno mobile, che alloggiano il capillare.

Il capillare viene fatto passare attraverso il filamento e bloccato sui supporti da due viti, Fig.5.9a. Successivamente il filamento viene riscaldato, facendolo attraversare da una corrente elettrica, fino a renderlo incandescente, Fig.5.9b, e contemporaneamente viene applicata una forza di trazione al supporto mobile che tira il capillare fino alla rottura e alla formazione di due capillari chiusi all'estremità, Fig.5.9c. Tali estremità sono molto sottili, dell'ordine di qualche centinaia di *nm*.

I parametri da applicare al Puller, forza di trazione e temperatura, vengono impostati in funzione delle dimensioni del capillare desiderato.

Diverse prove sono state necessarie per ottenere le giuste dimensioni, adatte allo scopo.



Fig.5.8 – Il Puller



Fig.5.9 – Sequenza di immagini che mostrano come viene prodotto il capillare

Per mezzo di un "filler", un tubicino flessibile, il capillare viene caricato dalla parte posteriore inserendo prima le sferette di polistirene del diametro di $1\mu m$ e successivamente l'olio minerale che funge da sigillante alle impurità esterne.

Le sferette di polistirene (diametro $1\mu m$), prodotte dalla Postnova, per poter essere iniettate devono essere diluite in quanto presentano il problema della carica elettrostatica, cioè tendono ad agglomerarsi. Per contrastare tale fenomeno è necessario diluirle con una sostanza antistatica che non danneggi la cellula.

Il primo tentativo è stato fatto usando come diluente l'acqua distillata, che presenta un buon risultato antistatico, ma danneggia la cellula.

Il secondo tentativo è stato quello di utilizzare come diluente il tampone di iniezione, l'"Injection Buffer" (IB), una sostanza a base di potassio, che non danneggia la cellula ma non ha buone proprietà antistatiche.

Poiché era indispensabile preservare la cellula è stato usato come diluente l'IB e per migliorare il deflusso delle sferette si è dovuta ottimizzare la sezione della punta del capillare. Una sezione maggiore del capillare consente ovviamente un miglior deflusso ma il rischio di danneggiamento della cellula è molto elevato, quindi anche in questo caso si è dovuto trovare il giusto compromesso.

Per poter iniettare le sferette è necessario rompere leggermente la punta del capillare.

Un modo molto empirico e poco riproducibile per aprire la punta del capillare è quello di far collidere meccanicamente il capillare stesso contro il vetrino superiore della cameretta. Viceversa un metodo più efficiente, impiegato in questo esperimento, è quello di utilizzare una Forgia, Fig.5.10.



Fig.5.10 – La Forgia

La Forgia è uno strumento costituito da un ingranditore 10X, che permette di vedere la punta del capillare, e da due supporti mobili. In un supporto viene inserito il capillare, nell'altro è ancorato un gancio metallico che permette la rottura della punta, Fig.5.11. La rottura avviene mediante trazione del supporto che regge il capillare.



Fig.5.11 – Dettaglio della Forgia

5.2.5 MICROINIEZIONE

Affinché avvenga la microiniezione è necessario l'allineamento tra l'oocita da iniettare, il micromanipolatore ed il capillare. L'oocita viene messo a fuoco mediante l'obiettivo del microscopio mentre il capillare viene messo alla stessa distanza focale variando l'altezza del suo supporto. Si può verificare spesso un errore di allineamento dovuto alla profondità di campo che è direttamente proporzionale all'intensità di luce. Non si dispone, purtroppo, di un altro angolo di visuale a 90° che permetterebbe la visione diretta dell'allineamento sullo stesso piano.

Due metodologie aiutano a ridurre l'errore dovuto alla profondità di campo: una è quella di diminuire l'illuminazione per contenere la profondità di campo stessa; l'altra è quella di agire, per successive approssimazioni, sul supporto del capillare.

A questo punto viene spostato il supporto del capillare in modo che la punta del capillare penetri la membrana esterna dell'oocita, come illustrato in Figura 5.12. Fornendo una leggera pressione all'iniettore, con le modalità precedentemente descritte le sferette vengono inettate nell'oocita.

In Figura 5.13 è illustrata un'immagine con l'ingrandimento della zona in cui sono state iniettate le sferette, vista con un obiettivo 60X.

La cameretta con gli oociti iniettati viene immersa in una Petri contenete acqua di mare e il vetrino superiore della cameretta viene rimosso con una pinzetta.

Gli oociti iniettati vengono raccolti mediante una Pipetta Gilson e messi all'interno di una capsula Heppendorf per il trasporto all'Università, dove si procede all' acquisizione e all'analisi dei dati ottenuti.



Fig.5.12 – Oocita di stella marina durante la microiniezione mediante un capillare di vetro

5.3 APPARATO DELLA PINZETTA OTTICA

L'apparato sperimentale finalizzato alla realizzazione di una Pinzetta Ottica, mostrato in Figura 5.14, è costituito da:

- una sorgente laser
- un microscopio composto
- una celletta porta-campione
- un sensore di posizione (fotodiodo a quadranti)
- una telecamera CCD per l'osservazione delle immagini
- un oscilloscopio
- un analizzatore di spettro
- un computer per l'analisi dei dati

Il fascio laser viene convogliato attraverso un sistema di specchi e lenti nell'obiettivo del microscopio. Mediante l'obiettivo il fascio viene focalizzato all'interno del campione generando la trappola ottica in cui viene posizionata la sferetta-sonda. La luce laser diffusa dalla sferetta e quella non diffusa danno luogo ad una Figura d'interferenza che viene raccolta su un fotodiodo a quadranti. Uno spostamento della sferetta all'interno del campione si traduce in un cambiamento del segnale fornito dal rivelatore. Il segnale viene registrato dall'oscilloscopio e trasferito al computer per l'analisi dei dati.



Fig.5.14 – Schematizzazione dell'apparato sperimentale di una Pinzetta Ottica

5.3.1 SORGENTE LASER

La sorgente laser deve essere scelta in modo da non danneggiare termicamente il campione; quindi la lunghezza d'onda deve cadere in una regione in cui questo presenta un minimo d'assorbimento. In Figura 5.15 è illustrato lo spettro d'assorbimento dell'acqua, maggiore costituente di una cellula. Si vede che l'attenuazione maggiore si ha per le lunghezze d'onda pari a 830*nm* e 970*nm*, [22].

Il laser utilizzato è stato un laser a diodo semiconduttore che emette nel vicino infrarosso a 784nm e presenta una potenza massima di uscita di 120mW. Il fascio è ellittico e viene reso quasi circolare attraverso una coppia di prismi anamorfici; la polarizzazione del fascio è nella direzione parallela al banco ottico.



Fig.5.15 – Spettro d'assorbimento dell'acqua

Il fascio, prima di essere mandato nell'obiettivo, attraversa due lenti L_1 e L_2 , che sono rispettivamente l'obiettivo e l'oculare di un sistema telescopico, illustrato in Figura 5.16. La distanza *d* tra le due lenti è pari alla somma delle distanze focali: $d = f_{ob}(f_1) + f_{oc}(f_2)$.



Fig.5.16 - Sistema telescopico

Questa configurazione permette di ingrandire il diametro del fascio in ingresso all'obiettivo. L'ingrandimento G, cioè il rapporto tra le dimensioni del diametro in uscita e le dimensioni del diametro in ingresso, è dato dal rapporto tra le distanze focali:

$$G = \frac{f_{oc}}{f_{ob}} \tag{5.1}$$

Le lenti da noi utilizzate hanno $f_{ob} = 100mm$ e $f_{oc} = 250mm$, permettono quindi di avere un fascio in uscita di diametro pari a 15mm.

L'ingrandimento è finalizzato alla realizzazione della condizione di *overfilling*, [23]. Abbiamo detto che il maggior contributo alla forza gradiente,

responsabile dell'intrappolamento, viene dai raggi che sono più fortemente focalizzati, cioè quelli che presentano un angolo di incidenza maggiore sulla sferetta. Nasce quindi l'esigenza di illuminare completamente e uniformemente la pupilla d'ingresso dell'obiettivo, responsabile della focalizzazione del fascio. L'apertura dell'obiettivo ha un diametro di 8*mm* e nel nostro caso il fascio ha dimensioni leggermente maggiori in modo che anche i raggi che la illuminano perifericamente abbiano un'adeguata intensità tale da permettere l'intrappolamento.

5.3.2 MICROSCOPIO

Il microscopio che è stato utilizzato per realizzare la Pinzetta Ottica è un Olympus IX70, illustrato in Figura 5.17, che lavora in configurazione invertita, cioè con l'obiettivo posto al di sotto del campione. Questa configurazione risulta conveniente per due motivi: il primo è che il fascio si propaga dal basso verso l'alto e la *forza di scattering* che spinge la particella verso l'alto risulta quindi opposta alla forza di gravità, garantendo in questo modo una buona stabilità assiale della trappola; in secondo luogo tale spinta verso l'alto sfavorisce l'adesione della particella al vetrino porta-campione.

Il microscopio è dotato di due tipi di illuminazione: una lampada a mercurio e una lampada alogena. Per evitare però il riscaldamento all'interno della gabbia di plexiglas, che racchiude l'intero apparato, è stata utilizzata una lampada posta all'esterno della gabbia la cui luce, portata all'interno con un sistema di fibre, viene convogliata sul campione per mezzo di una lente chiamata *condensatore*.

A partire dal basso verso l'alto incontriamo nel microscopio un cubo polarizzatore (*beam-splitter*), un obiettivo e una lente condensatore.

Il beam-splitter ha la duplice funzione di deviare il fascio laser verso l'apertura d'ingresso dell'obiettivo e di far passare la luce della lampada di illuminazione del campione fino a giungere agli oculari, attraverso i quali guardiamo l'immagine.



Fig.5.17 – Microscopio invertito Olympus IX70

L'obiettivo viene utilizzato sia per focalizzare il fascio laser, sia per fornire l'immagine della sferetta intrappolata. Vengono usati obiettivi ad immersione in un liquido (olio (n=1.5) o acqua (n=1.3), che hanno un indice di rifrazione maggiore dell'aria (n=1)) in modo da garantire una maggiore apertura numerica $NA = nsen\theta$ (dove n indica l'indice di rifrazione in cui è immerso l'obiettivo e θ è il semiangolo del cono di luce, emesso da un oggetto puntiforme, che esso raccoglie). In questo modo si realizza un fascio laser con un elevato gradiente ottico che consente di ottenere una trappola ottica stabile. Nel nostro caso è stato utilizzato un obiettivo Olympus PlanApo 60X ad immersione ad acqua, che presenta un'apertura numerica NA=1.2.

La lente condensatore, posta in modo che il suo fuoco anteriore coincida con il fuoco dell'obiettivo, serve a convogliare sul campione la luce proveniente dalla lampada di illuminazione e a raccogliere la radiazione del laser diffusa e non dal campione per inviarla al sensore di posizione.

5.3.3 CELLETTA PORTA-CAMPIONE

La celletta porta-campione, illustrata in Figura 5.18, viene preparata nel modo seguente: le superfici di due vetrini di spessore $150\mu m$ e 1mm, rispettivamente, vengono accuratamente pulite in modo da evitare che le impurità vadano a contatto con il campione; i due vetrini, posti l'uno sull'altro, vengono separati da due strisce di Parafilm che, oltre ad avere la funzione di separatore permette di tenerli uniti, in quanto se riscaldato ad una temperatura maggiore di 90°*C* diventa adesivo. Il campione da analizzare viene iniettato per capillarità tra i due vetrini mediante una pipetta Gilson P20, che permette di dosare un liquido fino a $20 \mu l$; il volume del campione tra i due vetrini è di circa $10 \mu l$.



Fig.5.18 - Celletta porta-campione

Per monitorare la temperatura del campione la celletta viene posta tra due piastre di metallo all'interno di una delle quali è presente una sonda, si tratta di un termistore NTC (Negative Temperature Coefficient): al variare della temperatura varia il valore della resistenza che è visualizzato con un ohmetro digitale. La legge che lega la temperatura al valore della resistenza è la legge di Steinhart-Hart:

$$\frac{1}{T} = A + B(\ln R) + C(\ln R)^3$$
(5.2)

La calibrazione della sonda NTC è stata fatta misurando la temperatura di un campione di acqua distillata contemporaneamente con un termometro e con la sonda. Con i valori di R e T così ottenuti abbiamo eseguito un fit che ha permesso di stimare le costanti A, B e C, come illustrato in Figura 5.19.



Fig.5.19 – Curva di calibrazione della sonda NTC

La celletta, pronta per la misura, viene posta sul carrellino portaoggetto del microscopio con il vetrino più sottile rivolto verso l'obiettivo.

Questo carrellino è un traslatore motorizzato che consente di spostare il campione, lungo le direzioni x e y, con velocità costante in un range compreso tra $10\mu m/s$ e 1mm/s. Tali spostamenti possono essere regolati sia attraverso un joystick collegato al microscopio, che direttamente da un software del PC.

5.3.4 SENSORE DI POSIZIONE

Il moto Browniano delle particelle intrappolate fornisce informazioni sulle proprietà reologiche dei campioni analizzati; la misura degli spostamenti di tali sonde è data da un fotodiodo a quadranti, QD50-0-SD, illustrato in Figura 5.20. Come si vede dalla foto, per questo tipo di rivelatori l'area sensibile è divisa in quattro quadranti, quando il fascio incide sul rivelatore ogni quadrante genera un segnale.



Fig.5.20 - Fotodiodo a quadranti

I quattro segnali S_1 , S_2 , S_3 e S_4 vengono prima amplificati e poi sommati e sottratti da quattro amplificatori operazionali per generare S_x , S_y e S_z nel seguente modo:

$$S_{x} = \frac{(S_{1} + S_{2}) - (S_{3} + S_{4})}{S_{0}}$$
(5.3)

$$S_{y} = \frac{(S_{1} + S_{4}) - (S_{2} + S_{3})}{S_{0}}$$
(5.4)

$$S_{z} = \frac{(S_{1} + S_{2}) + (S_{3} + S_{4})}{S_{0}}$$
(5.5)

Gli S_i con i = x, y, z sono i segnali relativi allo spostamento della sferetta lungo le tre direzioni mentre S_0 è il segnale di normalizzazione che si ottiene quando non è presente alcun oggetto nella trappola. I modelli teorici che spiegano come i segnali emessi dal fotodiodo sono legati agli spostamenti della particella sono due: quello di Pralle, [24], che analizza il caso di una particella di dimensioni più piccole della lunghezza d'onda della radiazione incidente, e quello di Rohrbach e Stelzer che invece tratta il caso di una particella di dimensioni arbitrarie. In entrambi i casi si dimostra che il segnale del fotodiodo a quadranti è dato dall'interferenza tra la luce diffusa dall'oggetto intrappolato e quella non diffusa (cioè quella non interagente con l'oggetto stesso).

5.3.5 CALIBRAZIONE DEL SENSORE DI POSIZIONE

Il segnale elettrico fornito dal fotodiodo è un segnale in tensione legato allo spostamento della particella che è invece misurato in unità di lunghezze. E' quindi necessario calibrare il fotodiodo, cioè determinare le funzioni che legano i segnali in tensione alle lunghezze assolute:

$$x = f(S_x) \tag{5.6}$$

$$y = f(S_y) \tag{5.7}$$

$$z = f(S_z) \tag{5.8}$$

Per piccoli spostamenti della particella dal centro della trappola la teoria di Pralle prevede che il segnale sia proporzionale allo spostamento, ad esempio nel caso di spostamento laterale lungo *x* ci aspettiamo una relazione del tipo $x = \beta \cdot V$, dove β è il parametro di calibrazione tensione-spostamento.

La calibrazione del fotodiodo a quadranti si ottiene intrappolando la sonda in un campione di acqua distillata , registrandone il moto e calcolando la densità di potenza spettrale (PSD).

Abbiamo visto nel Capitolo 3 che la PSD di una particella intrappolata otticamente in un fluido viscoso e che si muove di moto Browniano è una curva Lorentziana descritta dall'equazione (3.20). La densità di potenza spettrale riferita ai segnali in volt è invece data da:

$$S_{V}(f) = \frac{k_{B}T}{\beta^{2}\gamma\pi^{2}(f_{c}^{2} + f^{2})} = \frac{A}{f_{c}^{2} + f^{2}}$$
(5.9)

con frequenza di taglio f_c e ampiezza $A = \frac{k_B T}{6\beta^2 \pi^3 \eta a}$.

Eseguendo un fit Lorentiano dei valori sperimentali della densità di potenza spettrale riusciamo a stimare f_c ed A da cui ricaviamo il valore di β , dando per noto il valore della viscosità:

$$\beta = \sqrt{\frac{k_B T}{6A\pi^3 \eta a}} \tag{5.10}$$

In questo modo è stata ricavata una stima del fattore di calibrazione del sensore di posizione per le misure effettuate in glicerina, che è risultata essere di $6.3 \cdot 10^{-7} \frac{m}{V}$ per una concentrazione al 90%.

Poiché la viscosità del citoplasma dell'oocita non è nota per le misure fatte in queste cellule la calibrazione è stata effettuata in maniera diretta nel seguente modo: abbiamo posizionato la sferetta nel centro del fascio laser, a tal fine ci siamo avvalsi del segnale d'uscita dell'oscilloscopio per cui eravamo sicuri che la pallina fosse al centro quando il segnale era zero su entrambi i canali. Una volta posizionata la sferetta il carrellino è stato mosso avanti e indietro con legge oraria lineare avendo fissato l'ampiezza dell'oscillazione ad un valore di $\pm 200 nm$. Acquisendo un segnale mediato dall'oscilloscopio abbiamo potuto ricavare il fattore di calibrazione del rivelatore di posizione che è risultato essere di $2.2 \cdot 10^{-6} m/V$.

5.3.6 TELECAMERA CCD

Il microscopio Olympus utilizzato in questo lavoro di tesi è dotato di quattro uscite per l'immagine del campione, quindi oltre all'osservazione diretta, per mezzo degli oculari, è stato possibile collegare una telecamera CCD, SICURIT TMO500, che in rete con una scheda grafica ci ha permesso di visualizzare sul monitor del PC l'immagine fornita dal microscopio. La risoluzione del sensore di questa telecamera CCD è di 500×582 *pixel*. E la velocità massima di acquisizione è di 30 *frame/s*.

5.3.7 ANALISI NEL DOMINIO DELLE FREQUENZE

Il rumore termico è caratterizzato, nel dominio delle frequenze, dal suo spettro di potenza che è ottenuto passando il segnale in tensione rivelato dal fotodiodo attraverso un insieme di filtri a banda stretta e riportando le intensità misurate come funzione della frequenza centrale della banda. Lo strumento che realizza tutto ciò è l'analizzatore di spettro (Spectrum Analyzer). Il passaggio dal dominio dei tempi a quello delle frequenze, e viceversa, si ottiene per mezzo delle trasformate di Fourier che trasformano un insieme di numeri reali (punti acquisiti nello spazio dei tempi) in un insieme di numeri complessi, conservando tutte le informazioni dei dati originari.

Nella trattazione per il calcolo della PSD, riportata nel Capitolo 3, la funzione x(t) che determina la posizione della sferetta intrappolata ad ogni istante è una funzione continua. Se invece consideriamo N dati sperimentali $x_{1,}x_{2}..x_{N}$ acquisiti con una risoluzione temporale $\delta t = \frac{1}{f_{s}}$ (dove f_{s} è la frequenza di campionamento) la trasformata di Fourier per $f = f_{m}$ è il numero:

$$\widetilde{x}(f_m) = \sum_{n=1}^{N} x_n e^{\frac{2\pi i m}{N}}$$
(5.11)

dove $f_m = m\delta f$ con $-\frac{N}{2} \le m \le \frac{N}{2}$ e $\delta f = \frac{1}{N\delta t}$.

Poiché i punti x_n sono numeri reali, le componenti $\tilde{x}(f_m)$ e $\tilde{x}(-f_m)$ sono complesse coniugate e hanno lo stesso modulo. Lo spettro di potenza $S_x(f_m)$ è calcolato dal quadrato di questi moduli nel modo seguente:

$$S_{x}(f_{m}) = \frac{2}{N^{2} \delta f} \left| \widetilde{x}(f_{m}) \right|^{2}$$
(5.12)

$$S_{x}(f=0) = \frac{2}{N^{2} \delta f} \left| \tilde{x}(0) \right|^{2}$$
(5.13)

103

$$S_{x}(f_{N/2}) = \frac{2}{N^{2} \delta f} \left| \tilde{x}(f_{N/2}) \right|^{2}$$
(5.14)

Lo spettro di potenza si presenta quindi come un insieme di N/2+1punti indipendenti che vanno da $S_x(0)$ a $S_x(f_{N/2})$.

Dall'equazione (5.11) e (5.14) segue che $S_x(0)$ of coincide con il quadrato del valor medio dello spostamento della particella:

$$S_{x}(0) \partial f = \frac{1}{N^{2}} \left| \sum_{n=1}^{N} x_{n} \right|^{2} = \left\langle x \right\rangle^{2}$$
(5.15)

e che la somma sullo spettro di potenza è uguale al valor medio dei quadrati degli spostamenti:

$$\sum_{m=0}^{N/2} S_x(f_m) \delta f = \left\langle x^2 \right\rangle \tag{5.16}$$

Da queste ultime due relazioni si evince il significato statistico dello spettro di potenza: S(f) è la varianza del segnale (Var(x)):

$$\sum_{m=1}^{N/2} S_x(f_m) \delta f = \left\langle x^2 \right\rangle - \left\langle x \right\rangle^2 = Var(x)$$
(5.17)

Quest'ultima equazione mostra che la densità di potenza spettrale è espressa in m^2/Hz .

La densità di potenza spettrale viene calcolata con un algoritmo sviluppato in ambiente Matlab. L'insieme di punti, nel dominio del tempo,

rappresentano la traccia acquisita dall'oscilloscopio, pertanto le posizioni della sferetta non sono espresse in unità di lunghezza ma in Volt.

Ciò implica che $S(f_m)$, calcolata dall'algoritmo, è espressa in V^2/Hz e la sua forma analitica contiene il fattore di calibrazione β :

$$S_{x}(f_{m}) = \beta^{2} S_{V}(f_{m})$$
(5.18)

I segnali elettrici forniti dal fotodiodo a quadranti sono visualizzati su un oscilloscopio digitale a quattro canali, TDS5034D, con banda passante di 350 *MHz*. Il tempo di campionamento δt viene scelto in base al campione in esame. Poiché il numero di punti acquisiti, *N*, è fissato ad un valore massimo di 2.10⁶ punti, risulta che il tempo totale d'acquisizione è $T_s = N\delta t$.

Nel calcolo della PSD abbiamo che la minima frequenza rilevabile è $1/T_s$, mentre la massima frequenza, data dal teorema di Nyquist, è pari a $1/2\delta t$. Per avere una PSD che fornisca informazioni utili all'analisi del moto Browniano (basse frequenze e frequenza di taglio) è necessario scegliere in modo opportuno il tempo di campionamento, δt . Infatti, dal momento che il punti è stato fissato al massimo valore consentito numero di dall'oscilloscopio, aumentare la frequenza di campionamento significa ridurre il tempo totale d'acquisizione e cioè perdere informazioni alle basse frequenze. Tipicamente abbiamo scelto frequenze di campionamento pari a $200 \ kHz \ (T_s = 10 \ s).$

Per ridurre il rumore della PSD, abbiamo suddiviso la registrazione da due milioni di punti in 50 segmenti da 20.000 punti e abbiamo quindi calcolato 50 PSD che sono state mediate tra loro. In conclusione la PSD risultante spaziava in un range di frequenze compreso tra 5 H_z e 100 kH_z . Poiché i segnali di nostro interesse hanno frequenze caratteristiche molto

minori di 100 kHz, abbiamo tagliato la PSD ad un valore massimo di frequenza pari a 25 kHz.

5.4 APPARATO DEL VIDEOTRACKING

L'apparato sperimentale finalizzato al rilevamento video della traccia della sferetta-sonda, mostrato in Figura 5.21, è costituito da:

- un microscopio invertito
- una celletta porta-campione
- due telecamere CCD
- un PC per l'analisi dei dati

Il microscopio invertito utilizzato in questo lavoro di tesi è l'Olympus IX70 descritto nell'apparato sperimentale della Pinzetta Ottica. Anche la celletta porta-campione è quella precedentemente descritta. Le telecamere CCD utilizzate sono due: una è la JVC KY-F55B (CCD1), con risoluzione di 768×494 *pixel* e velocità di acquisizione fino a 30 *frame/s*, usata per l'osservazione del campo visivo del microscopio; l'altra è la SICURIT TMO500 (CCD2), già descritta nell'apparato sperimentale della Pinzetta Ottica, usata per osservare l'immagine ingrandita.

Con l'ingrandimento standard del microscopio Olympus una sferetta da 1µm risulta avere dimensioni di una decina di *pixel*, questo implica che la risoluzione spaziale è di circa 100nm. Tale risoluzione, anche utilizzando le tecniche *sub-pixel* descritte nel Capitolo 4, è troppo bassa per poter rivelare il moto Browniano della particella. Per incrementarla è stato necessario ingrandire l'immagine della sonda attraverso un sistema telescopico esterno al microscopio. In questo modo abbiamo ottenuto l'immagine della pallina con dimensioni di circa 180-200 *pixel*.



Fig.5.21 – Schematizzazione dell'apparato sperimentale per il Videotracking

5.4.1 CALIBRAZIONE DELLA CCD

Come descritto nel Capitolo 4, mediante l'ausilio di un algoritmo sviluppato in ambiente Matlab, è possibile determinare le coordinate $X \in Y$ del centro della sferetta, ottenute dall'immagine del centroide. Per ricavare lo spostamento in nanometri dalla posizione $X \in Y$ della sferetta è necessario calibrare il sistema di risposta.

A tal fine è sufficiente spostare un oggetto piccolo come la stessa particella attaccata al vetrino o, preferibilmente, una macchia più piccola sul vetrino stesso. Abbiamo eseguito la calibrazione utilizzando sia la particella che la macchia con la conclusione che pur essendo consistenti i valori ottenuti, l'utilizzo di una piccola macchiolina consente una maggiore riproducibilità.

La calibrazione è stata effettuata secondo la seguente procedura: una volta individuata la macchia sul vetrino la si sposta ad intervalli di $0.5 \mu m$ lungo la direzioni *x* per tutta la lunghezza della regione attiva della CCD, per un totale di circa 7-8 passi. Ad ogni spostamento viene memorizzata l'immagine fornita dalla telecamera. Questa sequenza viene ripetuta nuovamente dopo aver spostato di circa 2 μm la macchia lungo l'asse *y*, in modo da registrare le posizioni su tutta la superficie attiva della telecamera.

Per ogni singola riga viene misurata la posizione della macchia con l'algoritmo del centroide, [21]. I valori ottenuti in funzione degli spostamenti di $0.5 \,\mu m$ sono riportati in Figura 6.12.

Effettuando un best-fit lineare abbiamo ottenuto il valore di calibrazione della telecamera in $\mu m / pixel$.

La nostra telecamera fornisce un segnale di uscita video standard in cui i pixel sono di forma quadrata per cui la calibrazione lungo l'asse x e l'asse y è la stessa.



Fig.6.12 – Tipica curva di calibrazione della CCD
CAPITOLO 6

RISULTATI SPERIMENTALI

Le misure svolte in questo lavoro di tesi sono finalizzate alla caratterizzazione della proprietà viscoelastiche del citoplasma di oociti di stella marina. Questo Capitolo è articolato in cinque parti: nella prima sono riportate le misure preliminari fatte in campioni di glicerina con due tecniche sperimentali: il Laser-Tweezer e il Video-Tweezer; nella seconda parte sono invece riportati i risultati sperimentali relativi agli oociti di stella marina investigati con la tecnica del Laser-Tracking; la terza parte è dedicata ad una breve discussione sul metodo del Laser-Tracking; nella quarta parte sono riportati i risultati sperimentali relativi agli oociti di stella marina investigati con la tecnica del Laser-Tracking; nella quarta parte sono riportati i risultati sperimentali relativi agli oociti di stella marina investigati con la tecnica del Video-Tracking; infine nell'ultima parte sono raccolte le conclusioni del lavoro svolto.

6.1 MISURE MICROREOLOGICHE PRELIMINARI IN GLICERINA

Prima di iniziare lo studio *in vivo* su oociti di stella marina abbiamo messo a punto il nostro apparato di misura con una sostanza che simulasse i campioni biologici, ovvero che presentasse almeno una viscosità elevata. Tale sostanza è stata individuata in soluzioni di glicerina e acqua con diverse concentrazioni. In particolare sono stati da noi prodotti campioni con concentrazioni pari al 70%, 80%, 90% e 100% di glicerina.

Nella Tabella 6.1 sono riportati i valori di viscosità noti dalla letteratura.

Concentrazione	Viscosità [<i>Pa</i> · <i>s</i>]
70%	0.018
80%	0.044
90%	0.165
100%	0.974

Tab.6.1 – Viscosità della glicerina, note in letteratura, a diverse concentrazioni

Come riferimento ricordiamo che la viscosità dell'acqua distillata vale $0.89 \cdot 10^{-4} Pa \cdot s$ alla temperatura di 25° *C*.

Come descritto nei capitoli precedenti la nostra analisi microreologica si basa sull'osservazione del moto Browniano di sonde micrometriche disperse nel mezzo di investigazione (nel nostro caso sferette di polistirene con diametro pari a $1.25 \mu m$). Al fine di monitorare le coordinate x e y nel piano ortogonale alla direzione di propagazione del fascio laser abbiamo seguito due tecniche diverse che, come vedremo, sono tra loro abbastanza complementari: la tecnica del Laser-Tweezer e quella del Video-Tweezer. In entrambe le tecniche si parte da una sferetta otticamente confinata.

Una volta calibrato il sensore di posizione (basato su un fotodiodo a quadranti) ed i pixel della CCD (usata per l'immagine della sferetta), come spiegato nel Capitolo 5, abbiamo proceduto con la registrazione dei segnali stocastici riferiti all'asse x e y per le diverse concentrazioni di glicerina.

Poiché le soluzioni considerate costituiscono fluidi semplici (Newtoniani) abbiamo potuto applicare la teoria basata sull'equazione di Langevin (vedi Capitolo 3). In particolare abbiamo potuto calcolare le potenze spettrali (Power Spectral Density, PSD) per entrambe le tecniche. In Figura 6.1 sono mostrati gli andamenti delle PSD riferiti agli assi x e y ottenuti con la tecnica del Laser-Tweezer per una concentrazione di glicerina del 90%. Nella stessa figura si osserva che gli andamenti sperimentali sono ben descritti dalla teoria che è rappresentata dalle curve Lorentziane di best-fit. Inoltre si osserva che la trappola ottica è abbastanza simmetrica nelle due direzioni x e y.



Fig.6.1 – PSD riferite agli assi x e y per una concentrazione di glicerina del 90%, ottenuta con il Laser-Tweezer

In Figura 6.2 sono invece confrontate le PSD ottenute con la tecnica del Laser-Tweezer e quella del Video-Tweezer per solo tre concentrazioni di glicerina: 80%, 90% e 100%. Per la concentrazione al 70%, nel caso dei dati acquisiti con la CCD, non è stato possibile calcolare la PSD in quanto la frequenza caratteristica risulta essere maggiore della frequenza di Nyquist.



Fig.6.2 – Confronto tra le PSD ottenute con la tecnica del Laser-Tweezer e quella del Video-Tweezer per le quattro concentrazioni esaminate

Come si può vedere esiste un buon accordo tra le due tecniche. In particolare ricordando che la PSD è data da:

$$S_{x}(f) = \left| \tilde{x}(f) \right|^{2} = \frac{k_{B}T}{\gamma \pi^{2} (f_{c}^{2} + f^{2})}$$
(6.1)

con una procedura di fit è stato possibile ricavare la costante elastica k, detta *stiffness*, della trappola che è direttamente collegata alla frequenza di taglio f_c stimata dal fit:

$$k = 2\pi \gamma f_c \tag{6.2}$$

essendo $\gamma = 6\pi\eta a$ (*a* = raggio della sferetta-sonda).

In Tabella 6.2 sono mostrate le stiffness stimate per le diverse concentrazioni. Anche in questo caso si osserva che le due tecniche forniscono risultati consistenti.

Concentrazioni	$k\left[\frac{N}{m}\right] \cdot 10^{-7}$ stimata	$k\left[\frac{N}{m}\right] \cdot 10^{-7}$ stimata
	dal	dal
	Laser-Tweezer	Video-Tweezer
70%	297.3±14.9	277.5±13.9
80%	222.6±11.1	219.1±11.0
90%	119.6±5.0	118.9±5.9
100%	109.5±5.5	104.1±5.2

Tab.6.2 – *Stiffness* della Pinzetta Ottica ricavata con entrambe le tecniche (Laser-Tweezer e Video-Tweezer) per diverse concentrazioni di glicerina Se osserviamo però le PSD di Figura 6.2 notiamo che mentre la tecnica del Laser-Tweezer copre un intervallo di frequenze che va da 5 H_z a 25 kH_z , la tecnica del Video-Tweezer copre un intervallo assai più ridotto (0-15 H_z). Ciò è dovuto alla diversa frequenza di campionamento delle due tecniche che vede la Video-Tweezer limitata dalla velocità d'acquisizione dei singoli *frame* da parte della CCD.

Questo aspetto è stato anche riscontrato quando sono stati calcolati gli spostamenti quadratici medi lungo i due assi. Gli andamenti riferiti all'asse y sono mostrati in Figura 6.3 per le concentrazioni esaminate.



Fig.6.3 – Confronto tra gli spostamenti quadratici medi, lungo l'asse y, ottenuti con le due tecniche (Laser-Tweezer e Video-Tweezer) per diverse concentrazioni della glicerina

Come discusso nel Capitolo 3 gli andamenti di Figura 6.3 si spiegano nella maniera seguente: per tempi brevi (ossia alte frequenze) la sferetta intrappolata si comporta in regime di diffusione libera (andamento lineare) mentre per tempi lunghi (basse frequenze) risente del confinamento ottico (regione di plateau).

6.2 MISURE MICROREOLOGICHE IN OOCITI: TECNICA DEL LASER-TRACKING

Per chiarezza del lettore ricordiamo che sia le misure eseguite con il Laser-Tracking che quelle con il Video-Tracking sono state fatte tutte in oociti differenti, salvo dove esplicitato specificamente. Inoltre per facilitare la lettura dei grafici gli andamenti in essi riportati sono etichettati con delle sigle, del tipo oo3 MB oppure oo5 IB, che hanno il seguente significato: le prime due lettere "oo" sono l'abbreviazione di oocita, il numero si riferisce a quale oocita stiamo analizzando e in fine "MB" indica che l'oocita è maturo (M) ed iniettato (contiene cioè delle sferette, in inglese *beads* (B)), mentre "IB" indica che l'oocita è immaturo (I) ed iniettato (B).

6.2.1 TRAIETTORIE BROWNIANE

Come già discusso nei capitoli precedenti le misure di viscoelasticità all'interno di oociti di stella marina sono stati eseguiti con un lavoro preliminare di microiniezione di sferette-sonda di polistirene (diametro = $1.25 \ \mu m$). In Figura 6.4 è mostrata una porzione ingrandita dell'immagine di un oocita iniettato dove è possibile vedere alcune microsfere introdotte.

Purtroppo abbiamo subito notato che il citoplasma dei nostri oociti era talmente viscoso che l'effetto dell'intrappolamento ottico risultava sostanzialmente trascurabile; ovvero la trappola ottica posizionata sulla sonda non era abbastanza forte da riuscire ad intrappolarla. La sferetta rimaneva intrappolata dallo stesso mezzo viscoelastico in cui era immersa. A questo punto abbiamo considerato la possibilità di utilizzare lo stesso fascio laser semplicemente per rilevare il moto Browniano a cui era sottoposta la sferetta per effetto della sua interazione con il citoplasma. Questa tecnica sperimentale va sotto il nome di *Laser-Tracking* per differenziarla dalla tecnica di *Laser-Tweezer* su cui avevamo puntato inizialmente. Analogamente, nel prossimo paragrafo vedremo i risultati ottenuti con la tecnica del Video-Tracking.



Fig.6.4 – Ingrandimento della zona dell'oocita di stella marina dove sono state iniettate le sferette

Un tipico andamento dei segnali stocastici relativi al movimento lungo l'asse x ed y è mostrato in Figura 6.5. Queste misure sono state effettuate con una frequenza di campionamento di 100kHz (cioè due punti sono separati di $5\mu s$) per un tempo d'acquisizione totale di 10s.

Graficando simultaneamente i due segnali stocastici x(t) e y(t) si ottiene la traiettoria Browniana della nostra sferetta. In Figura 6.6 è illustrata una tipica traiettoria Browniana, nel piano x - y, di una microsferetta immersa nel citoplasma dell'oocita. Dalla forma irregolare e non confinata della macchia è evidente che la sonda non è otticamente intrappolata; inoltre

la sua forma è legata all'eterogeneità della distribuzione delle masse interne alla cellula determinata dalla pluralità dei suoi componenti (l'apparato del Golgi, il reticolo endoplasmatico, etc..).



Fig.6.5 – Tipico segnale stocastico di una microsferettasonda dovuto alle collisioni molecolari con il citoplasma in cui è immersa



Fig.6.6 – Traccia del moto Browniano di una sferetta all'interno di un oocita , nel piano x-y, ottenuta con il Laser-Tracking

6.2.2 ANALISI DELLO SPOSTAMENTO QUADRATICO MEDIO

Dal moto Browniano è stato ricavato, come spiegato nel Capitolo 3, lo spostamento quadratico medio della sferetta nel citoplasma dell'oocita. La Figura 6.7 mostra l'andamento degli $\langle r^2 \rangle$ di un oocita immaturo, le diverse curve si riferiscono a misure ripetute nello stesso punto a distanza di 1 *min*. La curva in rosso illustrata in Figura 6.7 è frutto della media degli $\langle r^2 \rangle$ (riportati in blu) ricavati da una serie di 40 acquisizioni. Il numero *N* delle acquisizioni ripetute dipende da quanto la sferetta rimane sovrapposta sul fascio laser (nel nostro caso *N* è variato da un minimo di 10 acquisizioni ad un massimo di 60).

Infatti abbiamo osservato che spesso nell'oocita si verificavano movimenti intracellulari che spostavano la sonda rispetto al fascio e quindi l'acquisizione doveva essere interrotta.



Fig.6.7 – Spostamento quadratico medio di una sferetta iniettata in un oocita maturo: sono riportati i singoli $\langle r^2 \rangle$ per ogni acquisizione (in blu) e la media di questi (in rosso)

In Figura 6.8 è riportato il confronto, in scala lineare, tra gli $\langle r^2 \rangle$ ricavati da oociti immaturi e maturi da cui emerge un comportamento abbastanza diverso. Se $\langle r^2 \rangle$ viene graficato in scala log-log (Fig.6.9) tali differenze sono più chiare e si possono evidenziare regimi differenti per diversi intervalli temporali.

Si vede infatti che negli oociti immaturi la pendenza dell'andamento risulta essere <1, per tutto l'intervallo di tempo misurato, rispetto al caso di diffusione libera (regime sub-diffusionale). Invece nell'oocita maturo è possibile distinguere due regimi differenti: per tempi brevi la pendenza dell'andamento è di circa 1, rispecchiando quindi un comportamento sostanzialmente viscoso mentre per tempi lunghi si nota che non si raggiunge un plateau cosa che invece dovrebbe avvenire per un mezzo puramente elastico.

Queste osservazioni sugli andamenti confermano il carattere di fluido complesso del citoplasma.



Fig.6.8 – Confronto tra gli $\langle r^2 \rangle$ di oociti immaturi (magenta e blu) e maturi (verde) su scala lineare.



Fig.6.9 – Confronto tra gli $\langle r^2 \rangle$ di oociti immaturi (verde e blu) e maturi (magenta) su scala logaritmica.

6.2.3 ANALISI DELLO SPETTRO DI POTENZA

Un modo equivalente di analizzare il segnale stocastico derivante dal moto Browniano è quello basato sul calcolo dello spettro di potenza (PSD), (vedi Capitolo3). In Figura 6.10 è mostrato l'andamento di una PSD ottenuta con un oocita immaturo (i dati di partenza sono gli stessi che hanno portato agli spostamenti quadratici medi di Fig.6.7).

Anche dall'analisi nel dominio delle frequenze si può evincere il carattere non Newtoniano del citoplasma. Infatti dalla Figura 6.10 si vede che una curva Lorentziana, tipica per un fluido semplice, non è in grado, specie alle frequenze elevate, di approssimare i dati sperimentali. D'altra parte, mentre per un fluido Newtoniano la pendenza segue una legge di potenza del

tipo $1/f^2$, nel caso del citoplasma la pendenza osservata è stata di $1/f^{\alpha}$ dove $\alpha < 2$. Sempre in Figura 6.10 si notano diversi picchi (*spike*) alla frequenza di circa 50 Hz e dei suoi multipli superiori. Tali picchi sono dovuti al rumore proveniente dalla rete e purtroppo tutte le misure ne sono state affette.



Fig.6.10 – Andamento della PSD di un oocita immaturo (blu) e Fit Lorentziano (rosso). Gli spike sono dovuti al rumore proveniente dalla rete

In ogni caso se si confrontano gli andamenti di un oocita immaturo con quelli di un oocita maturo, come illustrato in Figura 6.11, si evidenziano vistose differenze analoghe a quelle già osservate dall'analisi degli $\langle r^2(t) \rangle$.



Fig.6.11 – Confronto delle PSD di oociti immaturi (blu e verde) e maturo (magenta). Gli spike negli andamenti sono dovuti al rumore proveniente dalla rete

6.2.4 MISURE DI *G*' **e** *G*''

Per quanto detto nel Capitolo 3, un'analisi quantitativa di un fluido complesso deve essere effettuata riferendoci alla risposta complessa $\alpha(f) = \alpha'(f) + i\alpha''(f)$ di una sferetta-sonda immersa nel mezzo in esame; ovvero al modulo viscoso G''(f) e a quello elastico G'(f). Questo calcolo è stato effettuato seguendo una routine in ambiente Matlab, appositamente sviluppata nel nostro laboratorio.

I moduli viscosi, G'', e i moduli elastici, G', calcolati sono riportati in Figura 6.12 e 6.13 rispettivamente. Le diverse curve si riferiscono ad oociti diversi. Dal grafico dei G'' si vede che gli oociti immaturi risultano essere più viscosi di quello maturo di circa due ordini di grandezza; analogamente nel grafico dei *G*' gli oociti immaturi risultano essere più elastici di quello maturo di circa due ordini di grandezza. In entrambi i casi, viscoso ed elastico, le escursioni di alcuni ordini di grandezza tra il comportamento degli oociti immaturi rispetto a quelli maturi sono attribuibili al processo stesso di maturazione. La maturazione, come già detto, comporta un riarrangiamento intracellulare.

In particolare, per quanto concerne il modulo viscoso è possibile ricavare la viscosità η dalla relazione:

$$G''(f) = 2\pi\eta(f) \cdot f \tag{6.1}$$

In Figura 6.14 è infatti mostrato l'andamento di $\eta(f)$. Per avere un'idea del tipo di viscosità riscontrata nei nostri oociti basta ricordare che la viscosità dell'acqua distillata è di $0.00089 \cdot Pa \cdot s$ alla temperatura di 25° C.

Possiamo concludere che dall'analisi effettuata con il Laser-Tracking gli oociti immaturi sembrano mostrare una viscosità ed un'elasticità maggiore degli oociti maturati.



Fig.6.12 – Confronto tra i moduli viscosi di oociti immaturi (blu e verde) e maturi (magenta)



Fig.6.13 – Confronto tra i moduli elastici di oociti immaturi (blu e verde) e maturi (magenta)



Fig.6.14 – Andamento della viscosità in funzione della frequenza

6.3 CRITICA AL METODO DI LASER-TRACKING

Il metodo di Laser-Tracking finora discusso offre dei vantaggi rispetto ad altri metodi, ma presenta anche dei problemi importanti che ne limitano la sua applicabilità. Tra i vantaggi più importanti di questo metodo c'è l'elevata frequenza di campionamento del segnale stocastico. Ciò è dovuto alla banda passante molto ampia del sensore di posizione (fotodiodo a quadranti) che può raggiungere fino a diverse decine di kHz. Per contro però questa tecnica, sviluppata su un campione *in vivo*, presenta non poche difficoltà. Come abbiamo potuto notare nei nostri esperimenti, una volta posizionato il fascio laser su una sferetta iniettata, la misura doveva svolgersi in tempi rapidi perchè il movimento intrinseco dell'oocita portava ad un disallineamento della sferetta rispetto al fascio laser. Ciò era riscontrabile nelle nostre osservazioni da un vistoso sbilanciamento dei segnali delle diverse zone attive del fotodiodo a quadranti.

Inoltre è utile ricordare (vedi Capitolo 5) che un tale tipo di sensore fornisce un segnale proporzionale alla coordinata della sferetta-sonda fintanto che la sferetta non si discosta dalla posizione iniziale di una distanza di circa 300-400 *nm*. Superata questa distanza il sensore esce dalla zona di linearità e, di conseguenza, i segnali stocastici registrati sono affetti da un artefatto che non è possibile correggere. Addirittura se la sferetta dovesse muoversi di una distanza superiore al suo raggio il segnale del sensore di posizione non dipenderebbe più dalla sferetta-sonda ma semmai dal fondo costituito dall'eterogeneità del mezzo attraversato dal laser.

Questi limiti ci hanno indotto a vagliare un'altra tecnica sperimentale, quella del Video-Tracking analoga alla tecnica del Video-Tweezer già vista per il caso della glicerina con la differenza che ora la sferetta-sonda non è otticamente intrappolata. Questa tecnica effettivamente non presenta il limite sopra discusso del fotodiodo a quadranti (almeno fintanto che la sferetta-sonda rimanga a fuoco nel campo d'osservazione del microscopio) ma introduce altri problemi. Il più importante riguarda la frequenza di campionamento che è superiormente limitata dalla velocità di acquisizione dei *frame* da parte della CCD, che nel nostro caso risulta di 30 *Hz*. Da questo punto di vista, volendo confrontare le due tecniche, possiamo dire che mentre il minimo δt raggiungibile con il fotodiodo a quadranti è di pochi μs , nel caso del Video-Tracking esso è di 33 *ms*.

In termini di banda esplorabile con il Laser-Tracking si possono raggiungere diverse decine o centinaia di kHz mentre nel caso del Video-Tracking solo pochi Hz. Di contro, con il Laser-Tracking, il \mathcal{F}_{min} risulta limitato da un tempo d'osservazione non troppo lungo per contenere il numero totale di punti acquisiti (nel nostro esperimento dell'ordine di 10⁶).

Sotto questo aspetto le due tecniche risultano tra loro complementari e potrebbero, quindi, fornire stime sui moduli G' e G'' a intervalli di frequenze diverse (come verrà descritto nel prossimo paragrafo).

Un altro limite del Video-Tracking è la sensibilità. Mentre il Laser-Tracking presenta una sensibilità di 1-2 *nm*, il Video-Tracking presenta invece una sensibilità di circa 10 *nm*.

6.4 MISURE MICROREOLOGICHE IN OOCITI: TECNICA DEL VIDEO-TRACKING

La successione delle immagini video della traccia di una sferetta-sonda immersa in un campione permette di stimare i baricentri delle sferette (vedi Capitolo 4) e, quindi, gli spostamenti nanometrici della sonda stessa. Dallo spettro delle fluttuazioni termiche è possibile ricavare G' e G'' in modo del tutto simile a quanto fatto con il Laser-Tracking.

6.4.1 TRAIETTORIE BROWNIANE

Anche con la tecnica del Video-Tracking per poter caratterizzare reologicamente il campione partiamo dallo studio del moto Browniano di una microsonda immersa al suo interno. In Figura 6.15 sono mostrate le tracce, nel piano x - y, del moto Browniano di sferette iniettate in oociti immaturi, riferite ad un tempo d'acquisizione di circa 100s. Da un confronto con le tracce Browniano di Figura 6.6 si può osservare che con il Video-Tracking si possono seguire movimenti di diversi μm mentre con il Laser-Tracking erano limitati a poche centinaia di nm. Le Fig.6.15 A e B mostrano le tracce di due diverse sferette poste nella zona centrale di uno stesso oocita; le Fig.6.15 C e D sono invece riferite a due sferette iniettate in due oociti diversi: nell'immagine C la sferetta si trova circa nel centro della cellula, nell'immagine D invece la sferetta si trova nella zona periferica dell'oocita, la *corteccia*.

Le tracce delle sonde mostrano l'andamento del classico moto Browniano libero, rispecchiando quindi una distribuzione statistica casuale, in un intervallo di tempo di circa 120*s*. La durata dell'acquisizione della traccia nel tempo è stata limitata dal fatto che lo spostamento indotto dal moto Browniano comportava una defocalizzazione della sonda rispetto al piano d'osservazione, impedendo quindi il seguito dell'acquisizione stessa.

Dall'immagine D si deduce inoltre che la migrazione della sferetta nella corteccia sembra essere più confinata, ciò dimostra una maggiore viscoelasticità ed omogeneità della zona.



Fig.6.15 – Tracce dei moti Browniani di microsferette iniettate in oociti immaturi, ottenute con il Video-Tracking: A) e B)) sferette differenti posizionate nella zona centrale di uno stesso oocita; C) sferetta posizionata nel centro della cellula; D) sferetta posizionata nella corteccia della cellula

6.4.2 ANALISI DELLO SPOSTAMENTO QUADRATICO MEDIO

Dallo studio dello spostamento quadratico medio, mostrato in Figura 6.16, si evince che l'andamento del moto della sferetta nella corteccia cresce più lentamente nel tempo rispetto alle altre zone delle cellule investigate. Ciò è anche dovuto sempre ad una diversa viscoelasticità nella corteccia.



Fig.6.16 – Spostamento quadratico medio: A) lungo la direzione x; B) lungo la direzione y

6.4.3 MISURE DI G' e G''

Dal grafico del modulo viscoso, illustrato in Figura 6.17, si vede che G'' varia di poco da oocita ad oocita, mentre una variazione maggiore si riscontra all'interno di uno stesso oocita a secondo che la sferetta si trovi nel centro della cellula o nella zona più periferica. La viscosità nella corteccia risulta essere maggiore fino a circa un ordine di grandezza rispetto alla zona più centrale della cellula.

Dal grafico del modulo elastico, illustrato in Figura 6.18, si vede che anche G' varia di poco da oocita ad oocita, mentre è sempre presente una discrepanza nell'elasticità dell'oocita a secondo che la sferetta si trovi nel centro della cellula o nella zona più periferica. Come per la viscosità anche l'elasticità nella corteccia risulta essere maggiore fino a circa un ordine di grandezza rispetto alla zona più centrale della cellula.



Fig.6.17 - Confronto tra i moduli viscosi di oociti immaturi



Fig.6.18 - Confronto tra i moduli elastici di oociti immaturi

Le misure relative ai moduli viscoelastici sono state interrotte a causa della mancanza degli oociti. Queste cellule infatti sono prodotte dalle stelle di mare solo per un determinato periodo dell'anno e questo varia a secondo della specie (nella specie da noi usata questo periodo va da Marzo a Maggio). Non è stato quindi possibile effettuare un confronto tra cellule immature e mature, come mostrato invece con la tecnica del Laser-Tracking.

6.5 CONFRONTO TRA LE TECNICHE

Per effettuare un confronto tra le due tecniche utilizzate abbiamo riportato su uno stesso grafico i moduli viscosi ed elastici ottenuti dalle nostre analisi, Fig.6.19 e Fig.6.20. Purtroppo questo confronto è stato possibile farlo solo per oociti immaturi. Come abbiamo già detto, le due tecniche lavorano in regimi differenti: il Video-Tracking raggiunge frequenze dell'ordine di pochi H_z mentre il Laser-Tracking esplora fino a diverse decine di kH_z a partire da



circa 10 Hz. L'aspetto interessante da notare è che esiste un buon accordo tra le due curve a basse ed alte frequenze.

Fig.6.19 – Confronto tra i moduli viscosi ottenuti con le due tecniche: linee rosso, verde e blu ottenute con il Video-Tracking; linee celeste e magenta ottenute con il Laser-Tracking



Fig.6.20 – Confronto tra i moduli elastici ottenuti con le due tecniche: linee rosso, verde e blu ottenute con il Video-Tracking; linee celeste e magenta ottenute con il Laser-Tracking

6.6 CONFRONTO CON ALTRI LAVORI

Le due tecniche impiegate in questo lavoro di tesi, il Laser-Tracking ed il Video-Tracking, sono quelle più comunemente utilizzate per la determinazione dei moduli viscoelastici all'interno di cellule viventi. Nel nostro lavoro le cellule in questione sono cellule germinali di stella marina, gli oociti. In questo paragrafo vogliamo fare un confronto tra i risultati ottenuti dalle nostre analisi e quelli riportati in altri lavori. Sebbene il nostro lavoro e quello di altri abbiano un fine comune (misure microreologiche all'interno di cellule vive) non è possibile fare un paragone diretto perchè in nessun altro lavoro vengono utilizzate le nostre stesse cellule. Confronteremo allora le eventuali corrispondenze e differenze tra le cellule stesse.

Nell'esperimento eseguito dal gruppo di Yamada dell'Università di Baltimora, [25], sono state fatte misure di viscoelasticità all'interno di cellule COS7. La tecnica da loro impiegata è quella del Laser-Tracking e le sonde utilizzate non sono sferette di polistirene, come nel nostro caso, bensì granuli (aventi le stesse dimensioni delle sferette) presenti all'interno della cellula stessa. Viene dimostrato nel loro lavoro che questi granuli si comportano esattamente come delle sferette. In Figura 6.21 è riportato l'andamento dell' $\langle r^2 \rangle$, in scala logaritmica, relativo al moto Browniano del granulo-sonda.

La pendenza dell'andamento risulta essere <1 per tutto l'intervallo di tempo misurato e non si raggiunge mai un plateau (atteso per un materiale puramente elastico). Questo comportamento sub-diffusivo l'abbiamo ritrovato anche nei nostri andamenti relativi agli oociti immaturi, come è evidente dalla Figura 6.9.



Fig.6.21 – Andamento dell' $\langle r^2 \rangle$, in scala logaritmica, relativo al moto Browniano di un granulo-sonda presenta all'interno di cellule COS7

Le inconsistenze riscontrate tra diverse tipologie di cellule sono dovute alla loro differente specializzazione. Spesso si verificano variazioni anche tra cellule dello stesso tipo; queste sono attribuibili ad una differente coordinazione del ciclo cellulare. Questa affermazione trova riscontro nel lavoro svolto dal gruppo di Tseng [11], in cui viene mostrato un grafico (Fig.6.22) raffigurante gli spostamenti quadratici medi per cinque fibroblasti (cellule tipiche del tessuto connettivo). Nonostante le cinque cellule svolgano la stessa funzione sono evidenti variazioni da cellula a cellula. Andando a stimare le pendenze degli andamenti in Figura 6.22 si vede che anche in questo tipo di cellule l' $\langle r^2 \rangle$ cresce in modo non lineare con *t* ma più lentamente, cioè come t^{α} dove $\alpha < 1$, descrivendo un comportamento subdiffusivo.



Fig.6.22 – Spostamenti quadratici medi, $\langle r^2 \rangle$, per cinque fibroblasti

Un altro lavoro che possiamo citare e che trova riscontro con i nostri risultati è quello svolto dal gruppo di Nemoto dell'Università di Ochanomizu,[6]. In questo lavoro viene effettuata una stima della rigidità degli oociti immaturi semplicemente comprimendo la cellula, con una forza nota, tra due piatti paralleli. Dal rapporto dei diametri dell'oocita, prima e dopo la deformazione, si ottiene una stima semiquantitativa della rigidità dello stesso.

In Figura 6.23 è riportato un grafico che mostra come varia la rigidità dell'oocita in funzione del tempo, dopo l'aggiunta dell'ormone 1-MA.

Dall'andamento si vede che la rigidità dell'oocita diminuisce notevolmente durante la GVBD (rottura della vescicola germinale) cioè quando l'oocita diventa maturo. Questo risultato rispecchia il fatto che la viscoelasticità nell'oocita maturo è inferiore a quella dell'oocita immaturo, come da noi riscontrato con entrambe le tecniche (vedi Figure 6.12-6.13 per la tecnica del Laser-Tracking e 6.17-6.18 per la tecnica del Video-Tracking).



Fig.6.23 – Effetto dell'1-MA sulla rigidità degli oociti di stella marina; i tre andamenti sono relativi a tre oociti differenti (appartenenti alla stessa stella) aventi un diametro iniziale leggermente diverso

CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi sono state studiate le proprietà microreologiche del citoplasma all'interno di cellule vive. Le cellule esaminate sono state cellule germinali di stella marina, gli oociti. Questo studio è stato condotto grazie allo sviluppato di una tecnica microreologica passiva basata sull'analisi del moto Browniano di sonde micrometriche.

Prima di iniziare lo studio in *vivo* su oociti di stella marina abbiamo fatto misure preliminari con una sostanza che avesse caratteristiche il più vicino possibile ai campioni biologici, ovvero che presentasse una viscosità elevata. Tale sostanza è stata individuata in soluzioni di glicerina e acqua a diverse concentrazioni: 70%, 80%, 90%, 100%. Ognuna di queste concentrazioni è stata diluita con delle microsferette di polistirene (aventi un diametro pari a $1.25 \mu m$) che sono state utilizzate come sonde.

Al fine di monitorare il moto Browniano di tali sonde sono state impiegate due tecniche diverse, la tecnica del Laser-Tweezer e quella del Video-Tweezer, che partono dallo stesso presupposto: la sferetta-sonda è otticamente confinata.

Dal moto Browniano, descritto dall'equazione di Langevin, passando nel dominio delle frequenze e facendo uso del teorema di Fluttuazione-Dissipazione è possibile ricavare informazioni circa la funzione complessa di risposta, $\alpha(f)$, del materiale in esame. Questa è relazionata al modulo viscoelastico G(f), a cui siamo interessati, attraverso il teorema di Stokes-Einstein.

In particolare abbiamo potuto calcolare le potenze spettrali (Power Spectral Density, PSD) per entrambe le tecniche. Dal confronto delle PSD ottenute con la tecnica del Laser-Tweezer e quella del Video-Tweezer, per le quattro concentrazioni considerate, abbiamo verificato che esiste un buon accordo tra le due tecniche. Inoltre le due tecniche si sono rivelate complementari nel senso che la tecnica del Laser-Tweezer copre un intervallo di frequenze che va da circa $10 H_z$ a diverse decina di kHz mentre la tecnica del Video-Tweezer copre un intervallo a basse frequenze (0-15 Hz). Ciò è dovuto alla diversa frequenza di campionamento che vede la tecnica del Video-Tweezer limitata dalla velocità d'acquisizione dei singoli *frame* da parte della CCD.

Successivamente si è passati allo studio delle caratteristiche viscoelastiche del citoplasma degli oociti di stella marina. Alcune microsfere di polistirene (aventi un diametro pari a $1.25\mu m$) sono state iniettate all'interno delle cellule. Abbiamo subito notato che il citoplasma degli oociti era talmente viscoso che l'effetto dell'intrappolamento ottico risultava sostanzialmente trascurabile; ovvero la trappola ottica posizionata sulla sonda non era abbastanza forte da riuscire ad intrappolarla. La sferetta rimaneva intrappolata dallo stesso mezzo viscoelastico in cui era immersa.

A questo punto abbiamo considerato la possibilità di utilizzare lo stesso fascio laser semplicemente per rilevare il moto Browniano a cui era sottoposta la sferetta per effetto della sua interazione con il citoplasma. Per questo studio sono quindi state impiegate delle varianti delle tecniche messe a punto per la glicerina: la tecnica microreologica del Laser-Tracking e quella del Video-Tracking. Entrambe si sono dimostrate attendibili per l'investigazione di proprietà microreologiche locali in cellule vive.

Seguendo infatti la stessa procedura matematica applicata per la glicerina si sono ricavati i moduli viscosi ed elastici del citoplasma. Con entrambe le tecniche è risultato che gli oociti immaturi risultano essere più viscosi e più elastici rispetto agli oociti maturi (Figure 6.12-6.13 e 6.17-6.18).

Inoltre abbiamo riscontrato che all'interno di uno stesso oocita immaturo ci sono variazioni nelle proprietà viscoelastiche a seconda della zona della cellula investigata. Ad esempio la zona relativa alla corteccia dell'oocita risulta essere più viscoelastica rispetto al centro dell'oocita stesso. Poichè nella corteccia della cellula vi è una concentrazione maggiore di F-actina; questo risultto conferma che l'F-actina è una proteina responsabile della rigidità della cellula e dela maggiore viscoelasticità della corteccia.

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi sono piuttosto originali e si aggiungono ai pochi studi analoghi disponibili in letteratura. Purtroppo non è stato possibile confrontare i nostri dati con quelli della letteratura derivanti da ricerche compiute su cellule diverse. Pertanto i nostri risultati costituiscono il presupposto per una serie di studi volti ad analizzare le proprietà bio-meccaniche del citoplasma in *vivo*.

E' nostra intenzione continuare per confrontare ad esempio le differenze tra il citoplasma di oociti immaturi e di oociti maturi. Come già detto gli stimoli fisiologici a cui siamo interessati sono due: la maturazione e la fecondazione. E' noto che in entrambi i processi cellulari si ha un rilascio di ioni di calcio all'interno della cellula. L'onda di calcio differisce nelle sue caratteristiche a seconda dello stimolo fisiologico: con la stimolazione ormonale (che induce la maturazione dell'oocita) si ha la propagazione di un'onda veloce di calcio che dura circa 15-20 *s* nella corteccia; invece in seguito alla fecondazione si ha un'onda di calcio, che dura circa 4-5, e che propaga anche nel citoplasma.

Sarà quindi nostro interesse sondare eventuali variazioni nel comportamento viscoelastico del citoplasma e della corteccia prima e dopo il passaggio dell'onda di calcio per capire i meccanismi molecolari della regolazione e della liberazione del calcio nella cellula da parte dell'F-actina e delle proteine che legano l'actina.

BIBLIOGRAFIA

- L. Santella D. Lim F. Moccia 2004, "Calcium and Fertilization: the beginnig of life", TRENDS in Biochemical Sciences Vol.29 No.8
- B. Alberts A. Johnson J. Lewis M. Raff K. Roberts P. Walter,
 "Biologia Molecolare della Cellula" IV edizione, Zanichelli.
- [3] T.E. Schroeder S.A. Stricker 1983, "Morphological Changes during Maturation of Starfish Cocytes: surface ultrastructure and cortical actin", Development Biology 98, 373-384
- [4] S.A. Stricker G. Schatten 1991, "The Cytoskeleton and Nuclear Disassembley durin Germinal Vescicle Breakdown in Starfish Oocytes", Development Growth & Differentiation 33, 163-171
- [5] H. Shirai H. Kanatani 1982, "Oocyte Maturation in Starfish: Sequential Changes of Oocyte Shape Induced by 1-Methyladenine Associated with Germinal Vescicle Breakdown", Development Growth & Differentiation 24, 521-529
- [6] S. Nemoto-M. Yoneda I. Uemura 1980, "Marked Decrease in the Rigidity of Starfish Oocytes induced by 1-Methyladenine", Development Growth & Differentiation 22, 315-325
- [7] R.A. Heil–Chapdelaine J. Otto 1996, "Characterization of Changes in F-actin during Maturation of Starfish Oocytes", Development Biology 177, 204-216
- [8] F.R. Eirich "Rheology: theory and Applications" Vol.3-4, Academic Press Inc. Publishers, New York
- [9] M. Doi S.F. Edwards 1988, "The Teory of Polymer Dynamics", Claredon Press: Oxford, England

- [10] L.D. Landau E.M. Lifshits L.P. Pitaevskii 1986, "Theory of Elasticity" Vol.7, Pergamon Press, Oxford
- [11] Y. Tseng T.P. Kole D. Wirtz 2002, "Micromechanical Mapping of Live Cells by Multiple-Particle-Tracking Microrheology", Biophysical Journal Vol.83, 3162-3176
- [12] J.C. Croker D.G. Grier 1996, "Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies", J.Colloidal Interface Sci 179, 298-310
- [13] A. Palmer T.G. Mason J. Xu S.C. Kuo D. Wirtz 1999,
 "Diffusing Wave Spectroscopy Microrheology of Actin Filament Networks", Biophysical Journal Vol.76, 1063-1071
- [14] A.R. Bausch W. Moller E. Sackmann 1999, "Measurement of Local Viscoelasticity and Forces in Living Cells by Magnetic Tweezers", Biophysical Journal Vol. 76, 573-579
- [15] R.M. Mazo, "Brownian Motion: Fluctations, Dynamics and Application", Oxford Science Publication
- [16] H.C. Berg 1993, "Random Walk in Biology", Princenton, NJ: Princeton University Press
- [17] Y. Harada T. Asakura 1996, "Radiation Forces on a Dielectric Sphere in the Rayleigh Scattering Regime", Optics Comunication 124, 529-541
- [18] K. Svoboda S.M. Block 1994, "Biological Application of Optical Force", Biopys.Biomol.Struct. 23, 247-285
- [19] A. Askin 1992, "Forces of a Single Beam Gradient Laser Trap on a Dielectric Sphere in the Ray Optics Regime", Biopysical Journal 61, 569-582

- [20] K.F. Ren G. Grehan G. Gouesbet 1996, "Prediction of Reverse Radiation Pressure by Generalized Lorent-Mie Theory", Appl.Opt. 35, 2702-2710
- [21] M.K. Cheezum W.F. Walker W.H. Guilford 2001, "Quantitative Comparison of Algorithms for Tracking Single Fluorescent Particles", Biophysical Journal Vol.81, 2378-2388
- [22] K.C. Neuman E.H. Chadd G.F. Liou K.Bergman S.M. Block 1999, "Characterization of Photodamage to Escherichia Coli in Optical Traps", Biophysical Journal Vol.77, 2856
- [23] M.PM Sheetz 1998, "Methods in Cell Biology" Vol.55, Academic Press
- [24] A. Pralle M. Prummer E.L. Florin E.H.K. Stelzer J.K.H. Horber 1999, "Three Dimensional High-Resolution Particle Tracking for Optical Tweezers by Forward Scattered Light", Microscopy Research and Technique 44, 378-386
- [25] S. Yamada D. Wirtz S.C. Kuo 2000, "Mechanics of Living Cells Measured by Laser Tracking Microrheology", Biophysical Journal Vol.78, 1736-1747
- [26] D. Lim K. Lange L. Santella 2002, "Activation of oocytes by latrunculin A", FASEB 16(9), 1050-1056
- [27] D. Lim E. Ercolano K. Kyozuka GA. Nusco F. Moccia K. Lange – L. Santella 2003, "The M-phase-promoting factor modulates the sensitivity of the Ca2+ stores to inositol 1,4,5-trisphosphate via the actin cytoskeleton", Bio. Chem. 278(42), 42505-42514

[28] D. Lim – E. Ercolano - K. Kyozuka – JT. Chn - GA. Nusco – G. Gragnaniello - L. Santella 2006, "Modulation of calcium signalling by the actin-binding protein cofilin", Biochem.Biophys.Res.Commun 348(1), 109-11