

УДК 535.015

*А.Д. Залесский<sup>1,2</sup>, А.И. Шушин<sup>2</sup>, И.В. Решетов<sup>3,4</sup>, В.А. Державин<sup>3</sup>,  
В.В. Бучанов<sup>2</sup>, О.М. Саркисов<sup>2,1</sup>*

<sup>1</sup> Московский физико-технический институт (государственный университет)

<sup>2</sup> Институт химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН

<sup>3</sup> Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена

<sup>4</sup> Клиническая больница № 6 им. А.И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства России

## Оптический лазерный манипулятор фемтосекундными импульсами

Разработана установка для манипулирования (перемещение, растягивание, вращение) нано или мезоразмерными объектами на основе «оптического захвата». Выполнен теоретический анализ параметров, в области которых для манипулирования объектами можно использовать фемтосекундные световые импульсы. Экспериментально показана возможность использования фемтосекундных импульсов для перемещения и ориентации одиночных клеток. Продемонстрирована возможность деструкции раковых клеток и отрезания фрагмента от их скопления за счёт разрыва связей при многофотонном поглощении фемтосекундных световых импульсов.

**Ключевые слова:** оптический лазер, фемтосекундные световые импульсы, «оптический захват», нано- и мезоразмерные объекты, перемещение и ориентация одиночных клеток, раковые клетки, многофотонное поглощение.

### I. Введение

Оптический манипулятор — перспективный метод исследований, обладающий колоссальным спектром применений в таких областях, как физика, химия, биология. Основная идея метода состоит в том, что в сфокусированных лазерных пучках возможен оптический захват объектов, размер которых лежит в диапазоне от нескольких нанометров до нескольких микрон. Для осуществления хорошего оптического захвата необходимо, чтобы образец не поглощал свет на облучающей его длине волны. Если перемещать фокус лазерного пучка, то вместе с ним будет перемещаться и захваченный объект или его часть. Это открывает возможность для манипулирования захваченными объектами. Наибольшие перспективы открываются при применении этого метода к наночастицам и биологическим объектам. Сегодня этот метод уже находит множество применений: перемещение золотых наночастиц размером больше 18 нм [1]; измерение потоков жидкости в микроскопических объектах [2]; сортировка клеток, бактерий и т. д. по различным критериям [3]; измерение сил адгезии между двумя клетками [4]; создание сложных трёх-

мерных биологических структур [5]; разработка направленной доставки и прицельного воздействия на биологические мишени; измерение силы, необходимой для разрыва двойной спирали ДНК [6]; манипулирование отдельными органеллами внутри живой клетки [7] и т. д. В настоящее время активно изучается вопрос о применении оптического манипулятора и «скальпеля» в области онкологии и микрохирургии.

Данная работа посвящена созданию оптического манипулятора и «скальпеля» с применением фемтосекундных импульсов. Одной из особенностей фемтосекундных импульсов является возможность из-за малой длительности импульса получать световые импульсы большой пиковой мощности при его маленькой энергии. Поэтому применение фемтосекундных лазеров для оптических манипуляторов и «скальпеля» даёт ряд преимуществ. Во-первых, маленькие энергии импульса уменьшают разогрев изучаемого объекта. Во-вторых, легко осуществлять многофотонное поглощение, чтобы визуализировать перемещения захваченного объекта по флуоресценции. В-третьих, при увеличении пиковой интенсивности фемтосекундных импульсов можно с успехом использовать их как «на-

носкальпель», что открывает возможности для развития нанохирургии. При этом такой «скальпель» может работать не за счёт нагревания образца, а за счёт разрыва связей при многофотонном поглощении фемтосекундного светового импульса. В работе Tomoko Shimada с помощью фокусированного фемтосекундного лазера произведено разрушение одной митохондрии внутри клетки Hella [8].

## II. Принцип действия оптического манипулятора

Оптический манипулятор основан на оптическом захвате объекта. Описание физики захвата зависит от отношения размера частицы и длины волны излучения, с помощью которого производится захват. Существует два предельных случая: 1) частица много меньше длины волны и 2) частица много больше длины волны.

В первом случае полагают, что частица в фокусе объектива под действием лазерного излучения становится однородно поляризованной, и далее её рассматривают как точечный диполь. На частицу подобного типа, в общем случае, действуют силы, обусловленные поглощением, рассеянием света ( $F_{\text{погл.}}$  и  $F_{\text{расс.}}$ ), а также градиентом интенсивности излучения ( $F_{\text{град.}}$ ).

Сила  $F_{\text{град}}$  пропорциональна поляризуемости:

$$F_{\text{град}} = \frac{|\alpha|}{2} \nabla \langle E^2 \rangle \quad (1)$$

и всегда направлена вдоль градиента интенсивности к ограниченному дифракцией фокальному пятну. Эта сила может превосходить другие упомянутые силы ( $F_{\text{погл.}}$  и  $F_{\text{расс.}}$ ), что приводит к эффекту «ловушки»: частица попадает в потенциальную яму, которую в данном приближении можно описывать гармоническим потенциалом:

$$U = \frac{1}{2} k \langle (x - x_0)^2 \rangle,$$

где  $k$  является характеристической константой захвата, а  $x_0$  — центр ловушки.

Поведение прозрачных частиц, размеры которых много больше длины волны падающего излучения, может быть описано классическими теориями преломления и отражения. В качестве иллюстрации рассмотрим прозрачный шарик, центр которого смещён относительно положения фоку-

са объектива (рис. 1). Два луча  $a$  и  $b$  испытывают преломление в шарике и отклоняются от начального направления распространения. Таким образом, шарик изменяет импульс фотонов, ассоциированных с лучами  $a$  и  $b$ . Как видно из рисунка, шарик «толкает» луч  $a$  вправо и вверх. Следовательно, отклонённые фотоны придают импульс шарик, направленный в противоположном направлении, то есть влево и вниз. Рассуждая аналогично, приходим к тому, что луч  $b$  «толкает» шарик влево и вверх. Это приводит к появлению действующих на шарик сил  $F_a$  и  $F_b$ , которые дают результирующую силу  $F$ , направленную к оптической оси. Аналогично возникают возвращающие силы при смещении шарика вверх и вниз. Таким образом, поле излучения создаёт силу, направленную к фокусу излучения. При достаточно сильном поле излучения частице трудно изменить положение вблизи фокуса, и она оказывается в «ловушке».

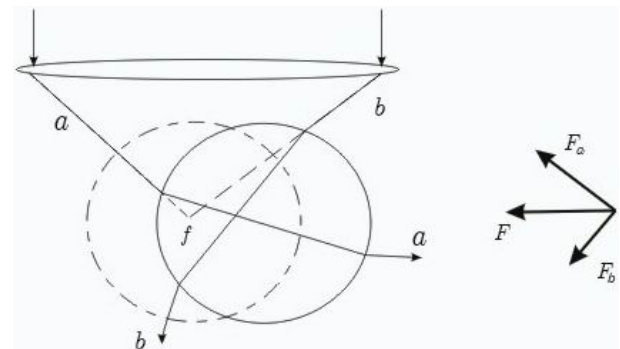


Рис. 1. Иллюстрация возникновения сил, толкающих шарик к точке фокуса. Пунктир — для конечного положения шарика, сплошные линии — для смещённого положения шарика

Следует отметить, что положение ловушки будет смещено относительно точки фокусировки силами, вызванными отражением света от поверхности шарика.

В промежуточном режиме, когда длина волны сравнима с размерами частицы, необходимо прибегнуть к полной теории электромагнетизма и при этом учитывать, что амплитуда поля переменна вдоль частицы.

### III. Движения частицы в потенциальной яме под действием света

С целью установления необходимых параметров установки при использовании фемтосекундного лазера для оптического захвата было проведено теоретическое описание перемещения броуновской частицы импульсным лазером.

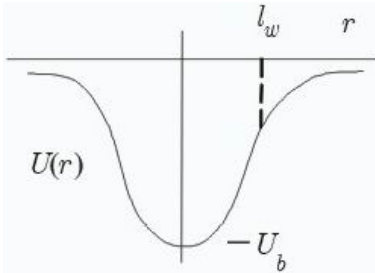


Рис. 2

Для непрерывного лазера рассмотрим поведение захваченной частицы в потенциальной яме  $U(r) \equiv U(r)$  глубины  $U_b$  и ширины  $l_w$  (рис. 2). Последняя величина определяется из равенства  $U(l_w) = -k_B T$ . Потенциал  $U(r)$  обусловлен взаимодействием частицы с электрическим полем (1):

$$U(r) \sim -\alpha E^2(r) \sim -\alpha W(r),$$

которое пропорционально квадрату электрического поля лазерного излучения  $E(r)$ , то есть мощности лазера  $W(r) \sim E^2(r)$  и поляризуемости частицы  $\alpha$ . Ширина  $l_w$  и глубина  $U_b$  ямы определяются длиной волны лазера  $\lambda$ , мощностью излучения  $W$ , фокусирующим объективом (есть зависимость от параметров установки).

Кинетика движения частицы описывается функцией распределения (ФР)  $\rho(r, t)$  этой частицы, которая удовлетворяет уравнению Смолуховского  $\dot{\rho} = D\nabla(\nabla\rho + \rho\nabla u)$ , где  $u(r) = U(r)/(k_B T)$  и  $\nabla$  — оператор градиента в трёхмерном пространстве.

Модуляция напряжённости электрического поля лазера  $E(r, t)$  приводит к зависимости потенциала от времени. Пусть зависимость  $E(t)$  имеет импульсный вид,  $E_p$  — амплитуда импульсов,  $\tau_p$  — их длительность, а  $\tau_d$  — время между импульсами, причём  $\tau_d \gg \tau_p$ .

В пределе быстрой модуляции  $E(r, t)$ , когда за время «модуляции»  $\tau_p + \tau_d$  частица практически не смещается внутри ямы:

$D\tau \ll l_w^2$ , где  $\tau = \tau_p + \tau_d$ , поставленная задача существенно упрощается. В этом пределе кинетика частицы может быть описана с помощью ФР, усреднённой по некоторому периоду  $T_e$ , который удовлетворяет неравенствам  $\tau \ll T_e \ll l_w^2/D$ :

$$\bar{\rho}(r, t) = T_e^{-1} \int_{t-T_e/2}^{t+T_e/2} dt_1 \rho(r, t_1).$$

ФР  $\bar{\rho}(r, t)$  подчиняется усреднённому уравнению Смолуховского:

$$\dot{\bar{\rho}} = D\nabla(\nabla\bar{\rho} + \bar{\rho}\nabla\bar{u}),$$

где  $\bar{u}(r) = \bar{U}(r)/(k_B T)$ , в котором средний потенциал  $\bar{U}(r)$  не зависит от времени и определяется потенциалом  $U_p(r) \sim \alpha E_p^2(r) \sim W_p(r)$ :

$$\begin{aligned} \bar{U}(r) &= T_e^{-1} \int_{t-T_e/2}^{t+T_e/2} dt_1 U(r, t_1) = \\ &= \tau_p(\tau_d + \tau_p)^{-1} U_p(r). \end{aligned}$$

Таким образом, в пределе быстрой модуляции кинетика броуновской частицы также описывается уравнением Смолуховского (аналогичным уравнению, относящемуся к случаю cw-лазера, то есть остаётся захваченной), но с потенциалом  $U(r)$ , заменённым на средний  $\bar{U}(r)$ , который может быть легко определён. Можно сделать следующий вывод: для успешного оптического захвата броуновской частицы необходимо использовать импульсный лазер с высокой частотой повторения импульсов, чтобы за время между импульсами частица не успевала значительно сместиться из точки захвата. Определим коэффициент диффузии, используя формулу Стокса:  $D = (k_B T)/(6\pi\eta a)$ . Здесь  $\eta$  — вязкость растворителя,  $a$  — радиус частицы (предполагается, что частица имеет сферическую форму). Для невязкого растворителя, такого, как вода и  $a \approx 10^{-4}$  см, эта формула даёт  $D \sim 10^{-9}$  см<sup>2</sup>/с, для  $a \approx 10^{-7}$  см получаем  $D \sim 10^{-6}$  см<sup>2</sup>/с при комнатной температуре. Условие  $D\tau \ll l_w^2$  выполняется как в первом, так и во втором случае для лазера с частотой повторения импульсов порядка 1 МГц. Таким образом, оптический захват фемтосекундными импульсами возможен для широкого диапазона размеров объектов.

Отметим, что в рассмотренном пределе  $\tau_d \gg \tau_p$  усреднённая потенциальная яма намного мельче ямы  $U_p(r)$ :  $\bar{U}(r) \approx (\tau_p/\tau_d)U_p(r) \ll U_p(r)$ .

Также видно, что в рассмотренном пределе при равенстве мощности излучения непрерывного лазера и средней мощности импульсного лазера поведение броуновской частицы идентично.

#### IV. Эффект движения потенциальной ямы

Кинетика движения броуновской частицы в потенциальной яме, которая перемещается в пространстве со скоростью  $v_p = \dot{r}_p$  (здесь  $r_p(t)$  — положение точки минимума исходной потенциальной ямы к моменту времени  $t$ ), также может быть описана с помощью уравнения Смолуховского, но с заменой потенциала  $\bar{U}(r)$  на  $\bar{U}_t(r, t) = \bar{U}(r - r_p(t))$ :

$$\dot{\rho} = D\nabla(\nabla\rho + \rho\nabla\bar{u}_t),$$

где  $\bar{u}_t(r, t) = \bar{U}(r - r_p(t))/(kT)$ . В этом случае процесс удобно анализировать в системе отсчёта, связанной с потенциальной ямой, то есть в координате  $x = r - r_p(t)$ , в которой уравнение имеет вид

$$\dot{\rho} = D\nabla_x(\nabla_x\rho + \rho\nabla_x\bar{u}_x),$$

где  $\bar{u}_x(x, t) = \bar{U}_x(x, t)/(kT) = \bar{u}(x) + f_p(t)x$  и  $f_p(t) = F_p(t)/(kT) = v_p(t)/D$ . Сила  $F_p(t) = (kT/D)v_p(t) = v_p(t)/\mu$ , в которой  $\mu = D/(kT)$  — подвижность частицы, описывает эффект «трения», действующего со стороны среды на броуновскую частицу. Потенциал  $\bar{U}_x(x, t)$  схематически изображён на рис. 3 как функция координаты  $x$  вдоль вектора  $v_p$ . Энергия  $U_a$  может быть оценена как  $U_a \sim (kT)fl_w$ , таким образом потенциальная яма «разрушается» (частица «уходит» из ямы с большой скоростью), когда  $U_a \approx (kT)f_p l_w \approx U_b$ , или

$$v_p \approx (D/l_w)(U_b/kT) = \mu(U_b/l_w). \quad (2)$$

Формула (2) даёт зависимость максимальной скорости перемещения броуновской частицы с помощью фемтосекундного оптического захвата от характеристик частицы (подвижность, поляризуемость) и установки (значение глубины потенциальной ямы зависит от мощности лазерного

излучения). Проведём небольшую оценку: для невязкого растворителя, такого как вода и  $a \approx 10^{-4}$  см,  $D \sim 10^{-9}$  см<sup>2</sup>/с (получено ранее). Тогда для  $U_b/(kT) = 10$  и  $l_w = \lambda \sim 8 \cdot 10^{-5}$  см мы получаем значение предельной скорости перемещения:  $v_p \sim 2$  мкм/с. Таким образом, используя фемтосекундный оптический захват, можно манипулировать захваченным объектом. Следует отметить, что предельная скорость перемещения напрямую зависит от формы потенциальной ямы, которая, в свою очередь, зависит от параметров установки. Следовательно, полученная из формулы (2) скорость  $v_p$  может использоваться как критерий эффективности оптического захвата.

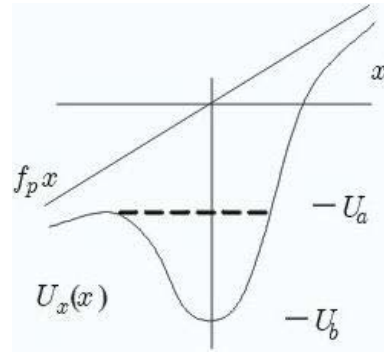


Рис. 3

#### V. Экспериментальная установка

В рамках данной работы для осуществления оптического захвата была создана экспериментальная установка, схема которой представлена на рис. 4. Основу установки составляет инвертированный оптический микроскоп (Olympus IX71), в который заводится лазерное излучение. В микроскопе происходит фокусировка излучения с помощью объектива с высокой числовой апертурой (в экспериментах использовались объективы: ЛОМО М-ФЛЮАР 100x/1.3, Olympus LC Ach N 40x/0.55 Ph2). Установка использует фемтосекундный лазер (Mai Tai, 690–1000 нм, 3 Вт). Сфокусированное излучение попадает в предметную плоскость, где находится исследуемый образец.

Визуальный контроль осуществляется с помощью камеры (Sony ExwaveHAD). Перемещение образца, находящегося на предметном столике, может быть осуществлено «вручную» или с помощью по-

зиционных двигателей (причём в последнем случае обеспечивается точность перемещений порядка десятка нанометров).

Также установка может использовать спектрометр, что позволит одновременно осуществлять манипулирование и снимать спектр флюоресценции. Аналогичным образом можно использовать систему счёта фотонов для регистрации флюоресценции наночастиц. Это позволит регистрировать оптический захват частиц, которые нельзя увидеть в оптический микроскоп.

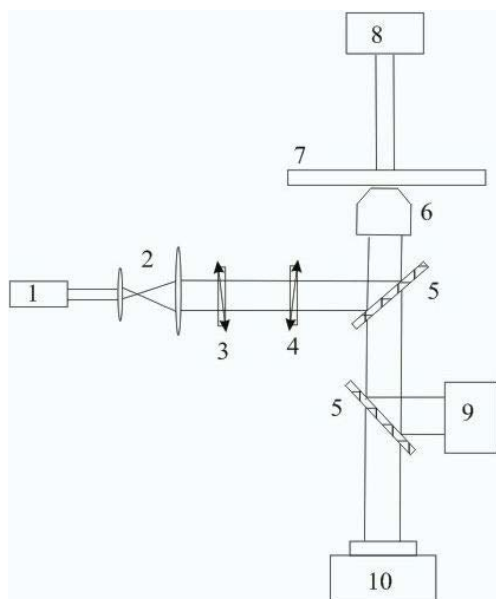


Рис. 4. Схема установки: 1 — лазер; 2 — линзы, расширяющие пучок; 3, 4 — поляризатор, анализатор; 5 — дихроическое зеркало; 6 — объектив; 7 — предметный столик; 8 — освещение; 9 — спектрометр/счётчик фотонов; 10 — камера

## VI. Результаты экспериментов

Были произведены эксперименты по манипуляциям отдельными клетками и клеточными агломератами. В эксперименте по манипулированию клеткой была взята клетка крови — лейкоцит, в экспериментах по манипулированию скоплением клеток в качестве объекта исследования были взяты раковые клетки эпителиальной ткани. Показано, что помимо перемещения объекта, также становится возможным установление трёхмерной конформации объекта с определённой степенью точности.

В первом эксперименте было осуществлено перемещение единичной клетки. Длина волны лазерного излучения 800 нм, мощность 25 мВт.

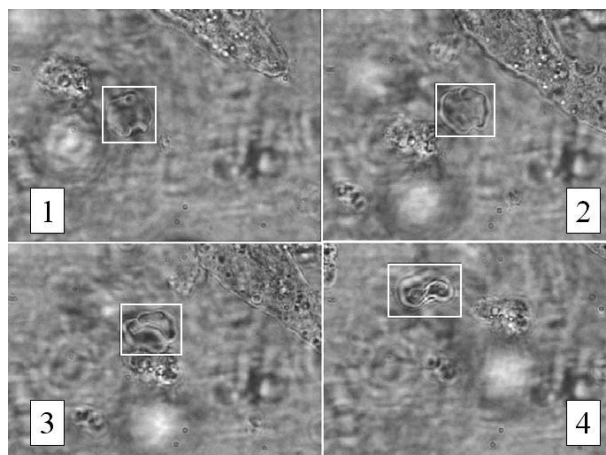


Рис. 5. Эксперимент по перемещению отдельной клетки (эхиноцита)

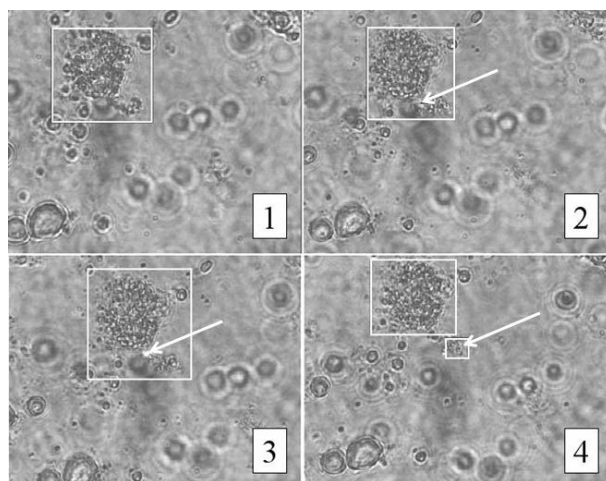


Рис. 6. Микрохирургическое воздействие за счёт многофотонных процессов

На рис. 5 представлены последовательные кадры видеозаписи, полученной в ходе работы: кадр 1 — начальное положение лейкоцита; кадр 2 — смещение лейкоцита вверх; кадр 3 — лейкоцит смещается влево, при этом он начинает ориентироваться по полю лазерного излучения; кадр 4 — лейкоцит смещён влево и ориентирован вертикально по полю.

Ориентация лейкоцита вызвана взаимодействием наведённой поляризации и поляризации излучения. Изменяя поляризацию лазера можно изменять направленность этого взаимодействия. Таким образом, с помощью оптического захвата можно манипулировать отдельно взятой клеткой, наблюдая объект в разных плоскостях.

Второй эксперимент демонстрирует, что при увеличении мощности лазерного излучения «пинцет» можно использовать как «скальпель».

На рис. 6 также представлены последовательные кадры видеозаписи работы с агломератом эпителиальных клеток: кадр 1 — начальное состояние скопления клеток; кадр 2 — в пятно, указанное стрелкой, фокусируется фемтосекундное лазерное излучение; кадр 3 — наблюдается свечение в точке фокусировки; кадр 4 — небольшой фрагмент клеток отделён от основной части.

В данном эксперименте длина волны лазерного излучения составляла 800 нм, мощность лазерного излучения 120 мВт. При получении видеозаписи использовался фильтр, отсекавший инфракрасное излучение. Таким образом, свечение на кадре 3 можно объяснить многофотонным поглощением.

В настоящее время онкология движется по пути совершенствования методик хирургического лечения больных. Современный хирургический уровень включает более претенциозный подход и реконструктивно-пластический компонент, что требует обязательного привлечения высоких технологий.

«Оптический захват» — метод, обладающий возможностью пространственного манипулирования и воздействия на опухолевые клетки на микроскопическом уровне (*in vitro*). Использование в качестве исследуемого материала клеток плоскоклеточного рака требует более совершенного метода приготовления препарата, требуются ультратонкие гистологические срезы, наличие в препарате изолированных раковых клеток, отсутствие примесей и липидных включений. В процессе эксперимента были определены размеры, поддающихся оптическому захвату клеток. Размеры расположены в примерном диапазоне от 5 до 40 мкм.

Полученные результаты свидетельствуют о принципиальной возможности метода «фемтосекундного оптического манипулятора» влиять на клеточную структуру

злокачественной опухоли, а также о перспективе использования метода в изучении именно внутриклеточных процессов опухолевой клетки.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Svoboda K., Block S.M. Optical trapping of metallic Rayleigh particles // *Optics Letters*. — 1994. — V. 19, I. 13. — P. 930–932.
2. Di Leonardo R., Leach J., Mushfique H., Cooper J.M. Multipoint Holographic Optical Velocimetry in Microfluidic Systems // *Phys.Rev.Lett*. — 2006. — V. 96. — 134502.
3. Chapin S.C., Germain V., Dufresne E.R. Automated trapping, assembly, and sorting with holographic optical tweezers // *Optics Express*. — 2006. — V. 14, N. 26. — 13095.
4. Mammen M., Helmersen K., Kishore R., Choi S.-K. Optically controlled collisions of biological objects to evaluate potent polyvalent inhibitors of virus-cell adhesion // *Chemistry & Biology*. — 1996. — V. 3. — P. 757–763.
5. Jordan P., Leach J., Padgett M., Blackburn P., Isaacs N. Creating permanent 3D arrangements of isolated cells using holographic optical tweezers // *Lab Chip*. — 2005. — V. 5. — P. 1224–1228.
6. Lang M.J., Fordyce P.M., Block S.M. Combined optical trapping and single-molecule fluorescence // *Journal of Biology*. — 2003. — V. 2, I. 1. — P. 6.
7. Sacconi et al. Optical Micromanipulations inside Yeast Cells // *Applied Optics*. — 2005. — V. 44, N. 11. — P. 2001.
8. Shimada T., Watanabe W. Intracellular disruption of mitochondria in a living HeLa cell with a 76-MHz femtosecond laser oscillator // *Optics Express*. — 2005. — V. 13, N. 24. — P. 9869.

Поступила в редакцию 14.01.2008.