

Оптические манипуляторы микрочастицами, использующие излучение фемтосекундных лазеров

В.В.Бучанов, В.А.Державин, А.Д.Залесский, И.В.Решетов, О.М.Саркисов, А.И.Шушин

Разработаны две установки для манипулирования (перемещение, растягивание, вращение) микрообъектами (с размерами от нескольких нанометров до десятков микрометров) на основе оптического захвата излучением фемтосекундных лазеров. Показана возможность перемещения одиночных клеток. Продемонстрирована возможность деструкции раковых клеток и отрезания фрагмента от скопления раковых клеток за счёт разрыва связей при многофотонном поглощении фемтосекундных световых импульсов. Продемонстрирована возможность голографического управления перемещением нескольких частиц одновременно.

Ключевые слова: фемтосекундная голография, оптическая ловушка, оптический манипулятор.

1. Введение

В конце 20-го столетия значительный прогресс в методах исследований привел к возможности изучения процессов, происходящих за очень короткие времена в микроскопических объемах. Это связано с появлением такого инструмента, как лазерные импульсы фемтосекундной длительности, которые позволили изучать процессы с фемтосекундным временным разрешением, и различных методов микроскопии, в первую очередь – оптической, позволивших проводить исследования с нанометровым пространственным разрешением. В результате произошел «взрыв» в исследованиях в биологии (особенно клеточной и молекулярной), что привело к востребованности оптического манипулирования микроскопическими объектами. Оригинальная работа Ашкина [1] вооружила исследователей «оптической рукой» для захвата отдельных частиц микрометровых размеров или множества нанометровых частиц. Новые методы измерений сделали эту «руку» чувствительной к различным свойствам образца. Оптическая манипуляция микрообъектами в сочетании с воздействием на них фемтосекундных импульсов излучения является перспективным методом исследований, обладающим широким спектром применений в физике, химии, биологии.

Основная идея метода состоит в том, что в сфокусированных лазерных пучках возможен оптический захват объектов, размеры которых лежат в диапазоне от нескольких нанометров до нескольких микрометров. Если пере-

мещать фокус лазерного пучка, то вместе с ним будет перемещаться и захваченный объект или его фрагмент. Это позволяет манипулировать захваченными объектами. Наибольшие перспективы открываются в случае применения данного метода к наночастицам и биологическим объектам. Сегодня этот метод уже находит множество применений. Он используется для перемещения наночастиц золота размером свыше 18 нм [2]; сортировки клеток, бактерий и др. по различным критериям [3]; измерения сил адгезии между двумя клетками [4]; создания сложных трёхмерных биологических структур [5]; разработки направленной доставки и прицельного воздействия на биологические мишени; манипулирования отдельными органеллами внутри живой клетки [6] и т. д. В настоящее время активно изучается вопрос о применении оптических манипулятора и скальпеля в области онкологии и микрохирургии.

Описание физических процессов при захвате зависит от отношения размера частицы к длине волны излучения, с помощью которого проводится захват. Существуют два предельных случая: размер частицы много меньше и много больше длины волны.

В первом случае полагают, что частица в фокусе объекта 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 и рассеянием света (F_{abs} и F_{sc}), а также градиентом интенсивности излучения (F_{grad}). При этом

$$F_{\text{grad}} = \frac{\alpha}{2} \overline{\nabla |E|^2},$$

где α – поляризуемость; E – напряженность электромагнитного поля. Сила F_{grad} направлена вдоль градиента интенсивности к области её максимума (если поляризуемость частиц выше, чем окружающей среды). Эта сила может превышать другие упомянутые силы (F_{abs} и F_{sc}), что приводит к эффекту «ловушки»: частица попадает в потенциальную яму, образованную за счёт градиентной силы.

В.В.Бучанов, О.М.Саркисов, А.И.Шушин. Институт химической физики им. Н.Н.Семенова РАН, Россия, 117977 Москва, ул. Косыгина, 4; e-mail: sarkisov@femto.chph.ras.ru

В.А.Державин, И.В.Решетов. ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А.Герцена», Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский пр., 3

А.Д.Залесский. Московский физико-технический институт (государственный университет), Россия, Московская обл., 141700 Долгопрудный, Институтский пер., 9; e-mail: aleksandr.zalasskij@phystech.edu

Поступила в редакцию 28 мая 2009 г., после доработки – 22 марта 2010 г.

Поведение прозрачных частиц, размеры которых много больше длины волны падающего излучения, может быть описано классической теорией преломления и отражения. Результат такого рассмотрения совпадает с вышеописанным: частица попадает в потенциальную яму и становится «захваченной».

Первоначально оптический манипулятор представлял собой устройство, позволяющее фокусировать лазерное излучение на микрообъекте. Совмещение положений фокуса и микрообъекта осуществлялось механическим путем. Захват частиц и их движение обеспечивались перемещением либо образца на предметном столике, либо элементов оптической системы. Предметный столик перемещался «вручную» или с помощью позиционных двигателей (причём в последнем случае достигалась точность перемещений порядка десяти нанометров).

Голографический оптический манипулятор является усовершенствованным вариантом оптического манипулятора. Основная идея его работы заключается в использовании пространственного оптического модулятора, представляющего собой зеркальную жидкокристаллическую матрицу. Принцип её работы состоит в том, что каждый элемент этой матрицы можно запрограммировать на определённую фазовую задержку лазерного излучения. После того как лазерный пучок отражается от такого модулятора, изначально плоский фронт лазерного излучения преобразуется. Далее этот преобразованный пучок проходит через линзу объектива и фокусируется в заранее запрограммированную трёхмерную «картинку».

Таким образом, мы можем получить уже не одну ловушку, а множество независимо и трёхмерно управляемых ловушек, программируя модулятор на фокусировку пучка в необходимое число точек. Число ловушек ограничивается параметрами модулятора (предельная мощность падающего излучения, размеры жидкокристаллического зеркала).

С помощью данной методики можно манипулировать наночастицами золота (размером более 10–20 нм), углеродными нанотрубками, прозрачными микрочастицами (0.5–10 мкм), клетками, скоплениями клеток, бактериями и т. д.

Настоящая работа посвящена созданию оптических манипулятора и скальпеля, в которых используются фемтосекундные импульсы (подобная установка разрабатывается также и в ОИВТ РАН [7]). Одна из особенностей фемтосекундных импульсов состоит в том, что благодаря их малой длительности становится возможным получать высокую пиковую мощность при малой энергии. Это даёт ряд преимуществ при применении фемтосекундных лазеров в оптических манипуляторах и скальпеле. Во-первых, при малой энергии импульса уменьшается разогрев изучаемого объекта. Во-вторых, легко осуществляется многофотонное поглощение, позволяющее визуализировать перемещения захваченного объекта по флуоресценции. В-третьих, можно с успехом использовать оптическую ловушку как наноскальпель, что открывает возможности для развития нанохирургии. При этом такой скальпель может работать не за счёт нагрева образца, а за счёт разрыва связей при многофотонном поглощении фемтосекундного светового импульса. В работе [8] с помощью сфокусированного излучения фемтосекундного лазера проведено разрушение одной митохондрии внутри клетки *Hela*.

2. Поведение частицы в потенциальной яме

При рассмотрении перемещения броуновской частицы импульсным фемтосекундным лазерным излучением было получено, что в случае выполнения условия $D\tau < l_w^2$ (где τ – время между импульсами; l_w – ширина потенциальной ямы, обусловленной взаимодействием частицы с электромагнитным полем, D – коэффициент диффузии частицы) оптический захват излучением импульсного лазера возможен, т. к. за время между импульсами частица не успевает значительно сместиться из точки захвата. Используя соотношение Эйнштейна $D = k_B T \mu$ между коэффициентом диффузии и подвижностью μ , а также то, что по формуле Стокса $\mu = 1/(6\pi\eta a)$ (где η – вязкость растворителя, a – радиус частицы), определим коэффициент диффузии для сферической частицы: $D = k_B T / (6\pi\eta a)$. Для частиц радиусом $a \approx 10^{-7}$ см в невязком растворителе (например, воде) эта формула даёт $D \sim 10^{-6}$ см²/с при комнатной температуре. Условие $D\tau < l_w^2$ выполняется для лазера с частотой повторения импульсов ~ 1 МГц. Большинство фемтосекундных лазеров работают на частоте несколько десятков мегагерц. Был сделан также следующий вывод: при равенстве мощности излучения непрерывного лазера и средней мощности импульсного лазера поведение броуновской частицы в оптической ловушке для этих двух лазеров одинаково. Оценка предельной скорости V перемещения частицы с помощью оптической ловушки вытекает из условия, что сила трения, действующая на частицу и обусловленная движением ловушки, не должна превышать максимальную градиентную силу, притягивающую частицу к центру ловушки:

$$V = \mu U / l_w = [U / (a l_w)] / (6\pi\eta),$$

где U – глубина потенциальной ямы. Предельная скорость пропорциональна интенсивности лазерного излучения и обратно пропорциональна радиусу частицы и ширине ловушки. Эта оценка справедлива при условии $l_w \gg a$. Более подробные выкладки приведены в нашей предыдущей публикации [9].

3. Экспериментальные установки

В рамках данной работы для осуществления оптического захвата была создана экспериментальная установка, схема которой представлена на рис. 1. Основой установки является инвертированный оптический микроскоп (Olympus IX71), в который заводилось лазерное излучение. В микроскопе происходит фокусировка излучения с помощью объектива, обладающего высокой числовой апертурой (в экспериментах применялись объективы Olympus Apo 100 \times /1.4, Olympus LCAch N 40 \times /0.55). В установке используется фемтосекундный лазер Mai Tai (Spectra-Physics, 690–1000 нм, 3 Вт, 80 МГц). Сфокусированное излучение попадает на предметную плоскость, где находится исследуемый образец.

Визуальный контроль осуществлялся с помощью ПЗС-камеры (Sony ExwaveHAD). Образец, находящийся на предметном столике, перемещался «вручную» или с помощью позиционных двигателей (причём в последнем случае обеспечивалась точность перемещений порядка десяти нанометров).

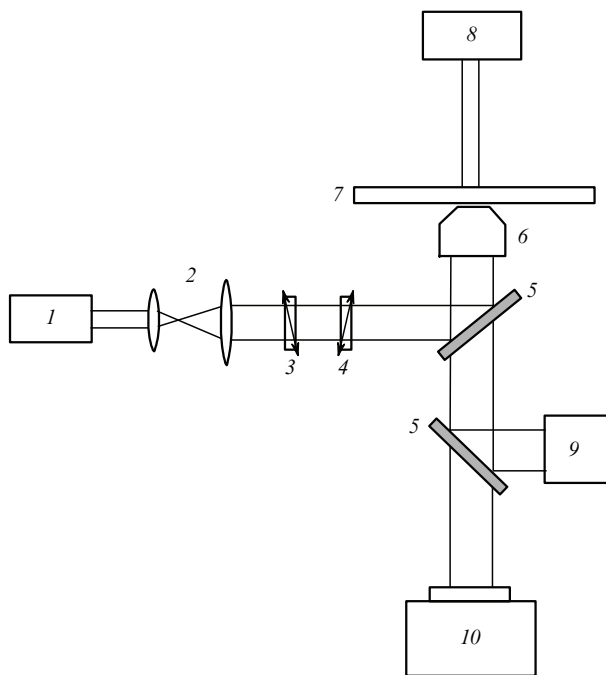


Рис.1. Схема установки:

1 – лазер; 2 – линзы, расширяющие пучок; 3 и 4 – поляризатор и анализатор; 5 – дихроичные зеркала; 6 – объектив; 7 – предметный столик; 8 – осветитель; 9 – спектрометр/счётчик фотонов; 10 – камера.

В установке также может использоваться спектрометр, что позволяет одновременно осуществлять манипулирование объектом и регистрацию спектра флуоресценции. Для регистрации флуоресценции наночастиц можно применять систему счёта фотонов. Это даёт возможность регистрировать оптический захват частиц, которые нельзя увидеть в оптический микроскоп.

Голографический манипулятор также создан на базе микроскопа (рис.2). Между объективом и окуляром располагается полупрозрачное зеркало, которое отражает лазерное излучение, но пропускает видимый свет. Плоскости жидкокристаллического фазового оптического модулятора (ФОМ) и входного зрачка объектива конъюгируют. Это достигается с помощью линз 1 и 2, между которыми формируется заданное поле излучения в образце. Для этого применяется ФОМ, управляемый компьютером.

Используемый в работе ФОМ (HOLOEYE Photonics) представляет собой жидкокристаллический отражательный экран размером 15.36×8.64 мм с разрешением 1952×1088 пикселей. Напряжение на отдельные ячейки жидкокристаллической матрицы подается через интерфейсный блок, рассчитанный на 256 дискретных значений напряжения. Каждому напряжению соответствует свой сдвиг фазы в ячейке ФОМ в диапазоне $0-2\pi$. Верхняя граница диапазона изменения напряжения, обеспечивающая фазовую задержку 2π , зависит от длины волны излучения и может настраиваться инструментальными методами. На вход интерфейсного блока с монитора компьютера подается изображение голограммы с 256 оттенками серого цвета. ФОМ освещается лазерным излучением. Линза 3 обеспечивает плоский фронт излучения и полное облучение всей площади транспаранта.

Линза 2 формирует первое действительное изображение вблизи фокуса линзы 1. Уменьшенное изображение формируется вблизи фокуса объектива микроскопа. На-

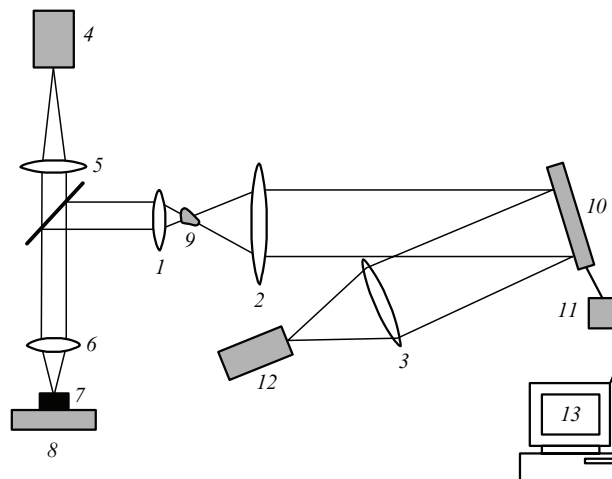


Рис.2. Общая схема голографической установки:

1, 2 и 3 – двояковыпуклые (собирающие) линзы; 4 – видеокамера; 5 – окуляр; 6 – объектив; 7 – образец; 8 – предметный столик; 9 – изображение; 10 – жидкокристаллический транспарант; 11 – интерфейсный блок; 12 – источник лазерного излучения; 13 – компьютер.

блюдение объекта осуществляется по схеме традиционного микроскопа с помощью цифровой видеокамеры.

Была разработана компьютерная программа для построения голограммы заданного объемного объекта. Управление манипулированием частиц осуществляется с помощью специального управляющего окна на экране монитора. Предусмотрена возможность захвата реальных частиц и перемещения их в нужное место, а также выполнения других действий (ориентация и изменение формы макромолекул, деформация клеток, фотохимические реакции и т. п.) в реальном времени. Предусмотрено перемещение частиц с помощью курсора либо путём задания траекторий движения для выбранных частиц. Трёхмерные траектории задаются с помощью мыши либо аналитически.

4. Результаты экспериментов

Были проведены эксперименты по манипулированию отдельными клетками и клеточными агломератами. В первом случае в качестве объекта исследования была взята клетка крови – эхиноцит, а во втором исследовались раковые клетки эпителиальной ткани.

В первом эксперименте осуществлялось перемещение единичной клетки. Длина волны лазерного излучения составляла 800 нм при мощности 25 мВт. На рис.3 представлены последовательные кадры видеозаписи, полученной в ходе эксперимента.

Изменение положения эхиноцита в ловушке во время эксперимента вызвано, по-видимому, несовпадением центра тяжести клетки и центра ловушки. Также сказывается существенная трёхмерность градиента интенсивности лазерного излучения по оси лазерного пучка. Центр тяжести клетки стремится попасть в максимум интенсивности, однако на периферические части клетки также действует градиентная сила. Вследствие этого возникает вращающий момент силы, и в итоге клетка занимает положение устойчивого равновесия (кадр 4). После прекращения действия лазерного излучения клетка принимала исходную плоскую конформацию (такую же, как в кадре 1). Таким образом, с помощью оптического захвата можно манипулировать отдельно взятой клеткой.

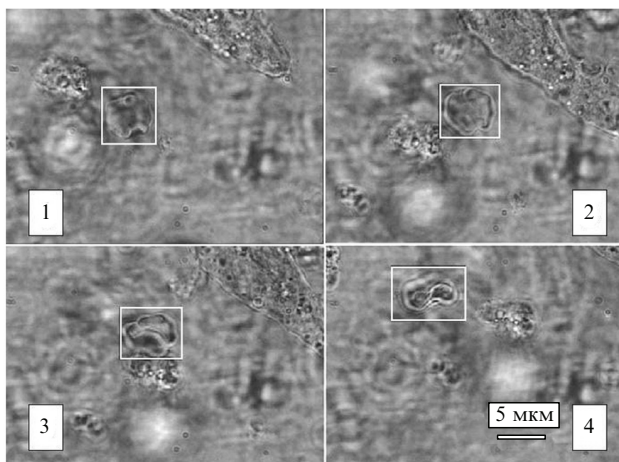


Рис.3. Эксперимент по перемещению отдельной клетки (эхиноцита): кадр 1 – начальное положение эхиноцита; кадр 2 – смещение эхиноцита вверх; кадр 3 – эхиноцит смещается влево, при этом его конформация начинает изменяться; кадр 4 – эхиноцит смещён влево и его конформация существенно отличается от первоначальной.

Второй эксперимент демонстрирует, что при увеличении мощности лазерного излучения оптический «пинцет» можно использовать как скальпель. На рис.4 представлены последовательные кадры видеозаписи воздействия на агломерат эпителиальных раковых клеток. В данном эксперименте длина волны лазерного излучения составляла 800 нм, мощность лазерного излучения – 50 мВт.

В настоящее время методики хирургического лечения онкологических больных постоянно совершенствуются. Современную хирургию отличает более прецизионный подход и реконструктивно-пластический компонент, что требует обязательного привлечения высоких технологий.

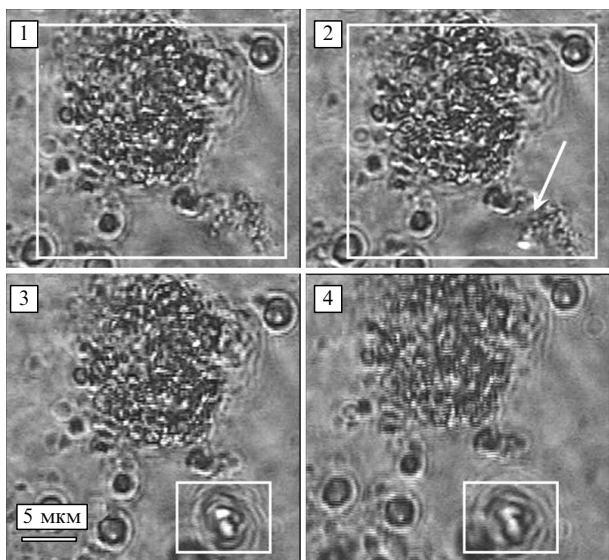


Рис.4. Микрохирургическое воздействие за счёт многофотонных процессов на скопление клеток раковой эпителиальной ткани при фокусировке фемтосекундного лазерного излучения: кадр 1 – начальное состояние скопления клеток; кадр 2 – в пятно, указанное стрелкой, фокусируется фемтосекундное лазерное излучение; кадр 3 – небольшой фрагмент скопления клеток отделяется от основной части и попадает в оптическую ловушку, несколько деформируясь (деформация связана с высокой интенсивностью лазерного излучения); кадр 4 – фрагмент скопления клеток отделён и отведён в сторону от основной части.

Полученные результаты свидетельствуют о принципиальной возможности влияния метода «фемтосекундного оптического манипулятора» на клеточную структуру злокачественной опухоли, а также о перспективе использования метода при изучении именно внутриклеточных процессов опухолевой клетки.

Применение фемтосекундных импульсов для воздействия на биологические объекты обладает тем преимуществом, что высокая интенсивность (пиковая мощность) фемтосекундных импульсов света (при их малой энергии) позволяет эффективно осуществлять многофотонные процессы поглощения света. В этих случаях поглощенная энергия тратится не на нагрев, а на разрыв химических связей и ионизацию [10]. Это открывает новые возможности для развития микро- и нанохирургии. Стоит отметить, что характер оказываемого воздействия существенно зависит от энергии, фазовых характеристик и частоты следования импульсов.

Возможность использования фемтосекундных импульсов света для одновременной манипуляции несколькими объектами продемонстрирована на рис.5 и 6. В наших экспериментах применялась фемтосекундная голографическая установка. В первом эксперименте несколько оптических ловушек создавались на пластинке, покрытой флуоресцентной краской (максимум поглощения на длине волны, близкой к 400 нм). Двухфотонная флуоресценция возбуждалась фемтосекундным импульсным излучением на длине волны 800 нм (длительность 100 фс, средняя мощность излучения 40 мВт).

С помощью компьютера задавались траектории движения нескольких ловушек. Они перемещались одновременно и независимо друг от друга. Направления перемещений показаны стрелками на рис.5, где приведены два кадра видеозаписи эксперимента – первый и последний. В оптической схеме применялось делительное зеркало, пропускающее видимое излучение и не пропускающее ИК излучение в видеокамеру (засветка камеры отражённым ИК излучением практически отсутствовала).

Во втором эксперименте (рис.6) в качестве объектов использовались полимерные шарики диаметром 4.4 мкм. Была реализована манипуляция пятью шариками одновременно, причём каждый шарик перемещался независимо от остальных. Использовалось фемтосекундное импульсное излучение на длине волны 725 нм (длительность импульса 100 фс, средняя мощность 80 мВт). Управление положением шариков осуществлялось в автоматическом режиме с помощью компьютера. На рис.6 приведены

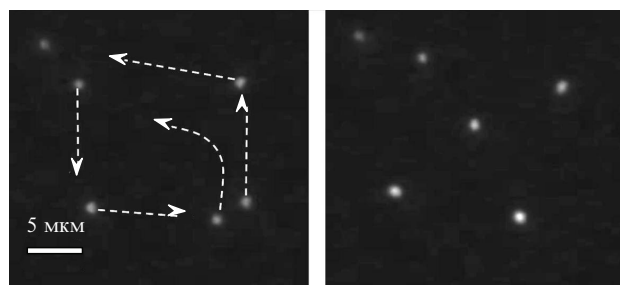


Рис.5. Фокусировка фемтосекундного излучения в несколько оптических фокусов, визуализированных двухфотонной флуоресценцией. Представлены два кадра (первый и последний) видеозаписи эксперимента; штриховые линии – изначально заданные траектории перемещения точек фокусировки.

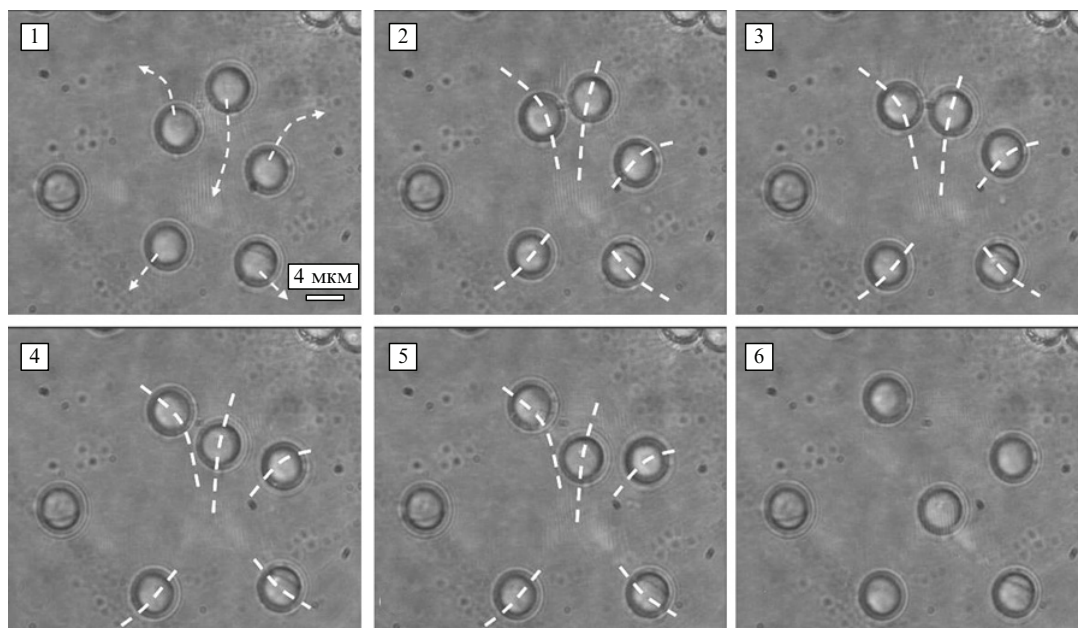


Рис.6. Одновременное манипулирование полимерными шариками (диаметром 4.4 мкм) с помощью голографической установки; штриховые линии – изначально заданные траектории движения частиц.

шесть кадров видеозаписи эксперимента. На кадре 1 стрелками обозначены направления движения шариков.

5. Заключение

Таким образом, в лабораторных условиях разработаны две установки для манипулирования (перемещение, растягивание, вращение) микрообъектами (с размерами от нескольких нанометров до десятков микрометров), в которых используется оптический захват излучением фемтосекундных лазеров. Нами показана возможность перемещения одиночных клеток, деструкции раковых клеток и отрезания фрагмента от скопления раковых клеток за счёт разрыва связей при многофотонном поглощении фемтосекундных световых импульсов в случае использования разработанных установок. Продемонстрирована возможность голографического управления перемещением нескольких частиц одновременно с помощью фемтосекундного лазерного излучения.

Динамическое управление излучением фемтосекундных лазеров позволяет манипулировать микрочастицами, оказывая при этом активное физико-химическое воздействие на них. Эффективность многофотонных процессов обуславливает применение фемтосекундных импульсов для воздействия на биоматериалы, изучения микрочастиц или их скоплений в оптической ловушке методом многофотонной флуоресцентной микроскопии, для визуализации перемещения захваченного объекта по двухфотонной флуоресценции.

Голографическое управление излучением значительно расширяет спектр его возможных применений, поскольку позволяет манипулировать одновременно и независимо многими частицами. Мы полагаем, в частности, что представляет интерес использовать множество ловушек в качестве скальпелей, т.е. воздействовать на раковую ткань (деструкция, отрезание фрагментов) в различных ее участках одновременно. Перспективно применение лазерного голографического манипулятора в онкологии в качестве как микроманипулятора, так и высокоточного микроскальпеля.

1. Ashkin A. *Phys. Rev. Lett.*, **24**, 156 (1970).
2. Svoboda K., Block S.M. *Opt. Lett.*, **19**, 930 (1994).
3. Chapin S.C., Germain V., Dufresne E.R. *Opt. Express*, **14** (26), 13095 (2006).
4. Mammen M., Helmerson K., Kishore R., Choi S.K. *Chem. Biol.*, **3**, 757 (1996).
5. Jordan P., Leach J., Padgett M., Blackburn P., Isaacs N. *Lab Chip*, **5**, 1224 (2005).
6. Sacconi L. et al. *Appl. Opt.*, **44**, 2001 (2005).
7. Ракитянский М.М., Агранат М.Б., Ашитков И.С., Комаров П.С., Овчинников А.В., Ситников Д.С., Карагаюг М.Н., Стамбольский Д.В., Шевелев И.Н. *Тез. докл. Международного форума по нанотехнологиям* (М., 2008, т. 2, с. 479).
8. Shimada T., Watanabe W. *Opt. Express*, **13**, 9869 (2005).
9. Залесский А.Д., Шушин А.И., Решетов И.В., Державин В.А., Бучанов В.В., Саркисов О.М. *Труды МФТИ*, **1** (1), 53 (2009).
10. Vogel A., Noak J., Huttman G., Paltauf G. *Appl. Phys. B*, **81**, 1015 (2005).