

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ имени М.В. ЛОМОНОСОВА
ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

на правах рукописи

УДК 535.214+534.138

Любин Евгений Валерьевич

ФОТОННО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ МАГНИТНЫХ
ЧАСТИЦ, КЛЕТОК КРОВИ И ВОЛНОВОДНЫХ МОД
ФОТОННЫХ КРИСТАЛЛОВ

01.04.21 - лазерная физика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук

А.А. Федянин

Москва – 2014

Оглавление

Введение	5
Глава I	
Обзор литературы: применение метода оптического пинцета для исследования физических явлений	13
1. Метод оптического пинцета	13
2. Калибровка установки оптического пинцета	19
3. Применения и научные задачи, решаемые методом оптического пинцета . .	22
3.1. Микрореологические исследования методом оптического пинцета . .	22
3.2. Метод анализа корреляционных функций броуновских смещений частиц в оптических ловушках	22
3.2.1. Автокорреляционная функция броуновских смещений одиночной оптически захваченной частицы	23
3.2.2. Авто- и кросс-корреляционные функции броуновских смещений двух частиц, захваченных в две независимые оптические ловушки	24
3.2.3. Рассмотрение броуновских смещений двух оптически захваченных частиц из центров ловушек в виде коллективной и относительной моды	28
3.3. Измерение угловой скорости вращения оптически захваченной частицы	30
3.4. Изучение взаимодействия магнитных микрочастиц	30
3.4.1. Одиночная захваченная оптическим пинцетом микрочастица во вращающемся внешнем магнитном поле	32
3.4.2. Измерения методом оптического пинцета зависимости магнитного момента микрочастиц от внешнего магнитного поля . .	33
3.5. Изучение свойств эритроцитов методом оптического пинцета	38
3.5.1. Эритроциты: функции и строение	39
3.5.2. Измерения эластичности и деформируемости эритроцитов . .	40

3.5.3. Спектроскопия комбинационного рассеяния эритроцитов	44
3.5.4. Агрегация эритроцитов	44
4. Применение оптического пинцета для измерения пондеромоторных сил, действующих на микрочастицы со стороны ближнеполюсной компоненты электромагнитного поля вблизи границы раздела сред	50
4.1. Общие свойства поверхностных электромагнитных волн	51
4.2. Поверхностные плазмон-поляритоны	52
4.3. Поверхностные электромагнитные волны и волноводные моды в одномерных фотонных кристаллах	55
5. Задачи диссертационной работы	58

Глава II

Изучение силового взаимодействия магнитных микрочастиц методом оптического пинцета 60

1. Получение аналитического вида корреляционных функций броуновского движения взаимодействующих магнитных микрочастиц в оптическом пинцете	60
2. Экспериментальное изучение броуновского движения оптически захваченных магнитных микрочастиц	64
2.1. Экспериментальная установка	64
2.2. Экспериментальные результаты и их анализ	68
3. Численное моделирование броуновского движения двух магнитных частиц в оптических ловушках	76
4. Применение метода активной микрореологии для изучения магнитного взаимодействия микрочастиц	78

Глава III

Применение оптического пинцета для определения силовых характеристик эритроцитов в аутологичной плазме крови 83

1. Отработка методики активной реологии в оптическом пинцете: измерение передаточных амплитудно-частотных и фазочастотных характеристик смещений захваченных частиц	83
---	----

2. Диагностика упруго-вязких свойств одиночных эритроцитов.	89
2.1. Подготовка исследуемого образца.	89
2.2. Захват эритроцита в оптическую ловушку.	89
2.3. Калибровка силы оптического захвата эритроцита.	90
2.4. Определения коэффициента эффективной жесткости эритроцита. .	93
2.5. Применение метода активной реологии в оптическом пинцете для измерения вязко-упругих характеристик эритроцита.	95
3. Определение силы для дезагрегации эритроцитов.	100
3.1. Подготовка исследуемого образца.	100
3.2. Искусственная агрегация и дезагрегация эритроцитов в оптическом пинцете.	101
3.3. Результаты измерения силы дезагрегации эритроцитов.	102

Глава IV

Фотонно-силовая микроскопия электромагнитного поля вол- новодных мод одномерных фотонных кристаллов	104
1. Исследуемый образец фотонного кристалла.	104
2. Экспериментальная установка для одновременного проведения угловой спектроскопии коэффициента отражения и фотонно-силовой микроскопии вблизи границы раздела сред.	113
3. Экспериментальные результаты по фотонной микроскопии первой волно- водной моды в одномерном фотонном кристалле.	123

Заключение	129
-------------------	------------

Список литературы	132
--------------------------	------------

Введение

Методы исследования вязких и упругих характеристик микрообъектов, а также сил взаимодействия между микрообъектами имеют важное практическое и фундаментальное значение для медицины, коллоидной химии, клеточной биологии и т. д. Один из таких методов основан на возможности жесткой фокусировки лазерного излучения. Пространственно неоднородное оптическое поле вблизи перетяжки сильно сфокусированного лазерного луча формирует эффективную пространственную потенциальную яму. Захват микрообъектов в такую потенциальную яму, а также управление захваченными микрообъектами, называется *методом оптического пинцета* [1, 2]. Возможность управления положением микрообъектов позволяет применять этот метод для широкого круга задач, в том числе для искусственного упорядочения и сортировки микрочастиц, предоставляет уникальную возможность изучения свойств одиночных микрообъектов без влияния их взаимодействия с подложкой или зондом. Эту возможность используют, например, для исследования люминесцентных [3] и нелинейно-оптических [4] свойств одиночных микрочастиц, а также изучения поведения магнитных частиц в переменном магнитном поле [5]. Наибольшее распространение оптический пинцет получил в микробиологических приложениях, так как позволяет фиксировать и перемещать живые клетки в близкой к естественной для них среде. В частности, метод широко используется для изучения свойств эритроцитов. Оптический пинцет позволяет проводить количественное измерение сил взаимодействия фемтоньютонного масштаба между единичными микрообъектами, например, для изучения сил взаимодействия между биологическими клетками [6], определения упругих свойств клеточных мембран [7] и отдельных макромолекул [8], измерения магнитного момента микрочастиц [9, 10] и т. д. Применение метода оптического пинцета для измерения силовых взаимодействий получило название *фотонно-силовой микроскопии* [11, 12].

Вторая глава диссертационной работы посвящена развитию метода оптического пинцета для измерения свойств магнитных микрочастиц. Суспензии магнитных микрочастиц имеют ряд практических приложений, например, они используются в магнитной гипертермии для уничтожения раковых опухолей [13]. Единичные магнитные частицы применяются в качестве локальных зондов свойств среды [14, 15], а

также в качестве инструмента, позволяющего осуществлять манипуляции с отдельными биологическими клетками и макромолекулами, например, для измерения модуля кручения ДНК [16]. В данной диссертационной работе приводятся результаты по измерению силы, действующей между магнитными частицами, исследуется статистика их теплового движения в ловушках, и предлагается метод по измерению магнитных моментов микрочастиц на основе анализа движения пары взаимодействующих микрочастиц, локализованных в двух оптических ловушках.

Третья глава работы посвящена применению лазерной методики оптического пинцета для изучения силового взаимодействия эритроцитов при их агрегации. Способность красных кровяных телец к агрегации является одним из важнейших компонентов в микроциркуляции крови, а значит и функционирования организма в целом. До сих пор исследование агрегации эритроцитов актуально из-за неоднозначности в трактовке ее причин и механизмов, а также из-за значимости этого процесса в развитии различных заболеваний, связанных с гемореологическими нарушениями. Возрастание степени агрегации и затруднение процесса дезагрегации клеток приводит к тому, что кровоток в венулах затрудняется, что ведет к ухудшению процесса снабжения тканей кислородом и является одной из причин развития ишемии и тромбоза, приводит к нарушению микроциркуляции крови. Поэтому изучение явления агрегации представляет не только фундаментальный, но и прикладной интерес для медицины. Помимо изучения сил агрегации эритроцитов в работе предложено совмещение фотонно-силовой микроскопии с анализом движения оптически захваченного одиночного эритроцита, как объекта с ярко выраженными вязко-упругими свойствами. Такой подход позволяет выделить колебания краев эритроцита, вызванные осцилляциями положения оптической ловушки, много меньшие характерной амплитуды их броуновского движения в ловушке. Определяя разность фаз между колебаниями противоположных краев клетки в зависимости от частоты вынуждающей силы со стороны оптических ловушек, можно количественно характеризовать вязко-упругие свойства отдельного эритроцита.

В четвертой главе диссертационной работы методом фотонно-силовой микроскопии исследуются свойства электромагнитного поля волноводной моды фотонного кристалла оказывать силовое воздействие на микрообъекты вблизи поверхности кристалла. Фотонные кристаллы — это структуры с периодическим изменением показателя

преломления на масштабах, сравнимых с длиной волны электромагнитного излучения. Эти структуры интересны своими оптическими свойствами. Одним из таких свойств является возникновение при определенных условиях поверхностных электромагнитных волн и волноводных мод с существенной локализацией электромагнитного поля вблизи границы фотонного кристалла. Их характеризуют высокая степень пространственной локализации, направленность распространения, малая расходимость. Благодаря своим свойствам они могут получить применение в современных устройствах, таких, например, как компьютерные чипы или оптические сенсоры. Они могут быть использованы в литографии, а также как средство эффективной передачи информации.

Целями работы является изучение влияния магнитного взаимодействия между микрочастицами на статистику их броуновского движения в оптических ловушках, разработка метода измерения сил магнитного взаимодействия микрочастиц с помощью оптического пинцета, изучение упруго-вязких и агрегационных свойств одиночных эритроцитов методом двухлучевого оптического пинцета и изучение методом фотонно-силовой микроскопии свойств электромагнитного поля волноводной моды фотонного кристалла.

Актуальность работы обусловлена как фундаментальным интересом к проблемам, связанным с управлением одиночными микрообъектами неоднородным лазерным излучением, так и интересом к исследованию магнитного взаимодействия микрочастиц в суспензиях магнитных жидкостей, развитию методов диагностики вязко-упругих характеристик клеток крови и применении фотонно-кристаллических структур в сенсорах. Обоснованность и достоверность экспериментальных результатов определяется использованием современного оборудования и многократным повторением экспериментов. Экспериментальные данные подтверждены теоретическими расчетами, основанными на адекватно выбранных физических моделях анализируемых процессов, а также не противоречат результатам других исследователей. Результаты экспериментальных и теоретических исследований неоднократно обсуждались на семинарах и докладывались на специализированных научных конференциях по проблемам, связанным с тематикой диссертационной работы. Результаты опубликованы в международных и российских журналах. Большинство представленных результатов являются новыми и получены впервые.

Научная новизна результатов диссертации заключается в следующих положениях:

- Впервые экспериментально методом фотонно-силовой микроскопии измерены силы притяжения магнитных микрочастиц. Предложен новый метод определения величины и градиента силы взаимодействия между двумя магнитными микрочастицами на основе корреляционного анализа смещений этих частиц из оптических ловушек.
- Предложен новый метод для диагностики вязко-упругих свойств эритроцитов. Метод основан на анализе фазового сдвига в осцилляциях краев клетки, захваченных одновременно в две оптические ловушки, положение одной из которых периодически меняется со временем. Впервые измерена средняя сила, необходимая для сдвига эритроцитов на заданное расстояние друг относительно друга в парном агрегате в аутологичной плазме крови.
- Впервые методом фотонно-силовой микроскопии экспериментально обнаружено силовое воздействие электромагнитного поля первой волноводной моды одномерного фотонного кристалла на пробную микрочастицу, расположенную в воде вблизи его границы.

Практическая значимость работы состоит в возможном использовании полученных результатов для задач, связанных с управлением и характеризацией микрообъектов методом оптического пинцета, исследованием и применением магнитных жидкостей, развитием методов диагностики заболеваний, связанных с изменением реологических свойств крови, разработкой сенсоров на основе фотонных кристаллов, а также развитием методов управления движением микрочастиц электромагнитным полем вблизи границ разделов сред.

Научные положения и результаты, выносимые на защиту:

- Силы взаимодействия магнитных микрочастиц могут быть измерены методом двухлучевого оптического (лазерного) пинцета. Корреляционная функция броуновских смещений двух магнитных частиц, локализованных в две оптические ловушки, зависит от силы магнитного взаимодействия микрочастиц.

- Притяжение между магнитными микрочастицами приводит к уменьшению значений корреляционной функции броуновских смещений вдоль оси, проходящей через центры частиц, а отталкивание – к возрастанию. Для системы из двух захваченных в оптические ловушки частиц отношение амплитуды смещений частицы в неподвижной ловушке к амплитуде смещений частицы в осциллирующей ловушке растет при увеличении градиента силы магнитного взаимодействия частиц, если частоты смещений осциллирующей ловушки меньше частоты отсечки, равной отношению жесткости оптической ловушки к коэффициенту вязкого трения частицы в среде.
- Сила сдвиговой дезагрегации красных кровяных телец и их вязко-упругие свойства могут быть определены методом двухлучевого оптического (лазерного) пинцета. Расстояние между центрами клеток в парном агрегате возрастает с увеличением сил, приложенных со стороны оптических ловушек и направленных на разъединение клеток.
- Тангенс фазовой задержки колебаний одного края эритроцита, удерживаемого за противоположные края в двух оптических ловушках, относительно другого края, испытывающего периодическое механическое воздействие вдоль линии, связывающей ловушки, пропорционален частоте этого воздействия в диапазоне от 0,1 до 1 кГц.
- Метод фотонно-силовой микроскопии применим для исследования электромагнитного поля в волноводной моде одномерного фотонного кристалла.
- Микрочастица, находящаяся вблизи поверхности фотонного кристалла, испытывает силовое воздействие со стороны электромагнитного поля в волноводной моде, возбужденной лазерным излучением в схеме нарушенного полного отражения. При этом сила, действующая на пробную частицу, возрастает вблизи резонанса возбуждения волноводной моды фотонного кристалла, а также при приближении пробной частицы к поверхности фотонного кристалла.

Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, заключения, содержащего выводы и списка литературы. Основная часть работы имеет следующую структуру:

- Глава 1 посвящена обзору литературы по объектам изучения и экспериментальным методам, используемым в работе.
- Глава 2 посвящена определению влияния магнитного взаимодействия между парой микрочастиц на статистику их броуновского движения в оптических ловушках расположенных на заданном расстоянии друг от друга, а именно экспериментальному, численному и теоретическому определению корреляционной функции броуновских смещений двух магнитных микрочастиц, расположенных на расстоянии друг от друга в двух оптических ловушках, выявлении зависимости вида этой функции от силы магнитного взаимодействия между частицами, развитии метода определения сил магнитного взаимодействия микрочастиц с помощью двухлучевого оптического пинцета.
- Глава 3 посвящена разработке метода диагностики упруго-вязких свойств одиночных эритроцитов по их отклику на внешнее периодическое механическое воздействие с частотами в диапазоне от 0,1 до 1 кГц, измерению методом оптического пинцета с двумя лазерными ловушками зависимости среднего расстояния между центрами эритроцитов в парном агрегате от приложенной силы, приводящей к сдвиговой дезагрегации.
- Глава 4 посвящена реализации фотонно-силовой микроскопии электромагнитного поля волноводных электромагнитных мод, возбуждаемых в одномерных фотонных кристаллах (брэгговских зеркалах), а именно экспериментальному определению силового воздействия на пробную микрочастицу, расположенную в воде вблизи границы раздела с одномерным фотонным кристаллом, в котором присутствует электромагнитное поле, соответствующее первой волноводной моде с существенной локализацией электромагнитного излучения вблизи рассматриваемой границы раздела.

Основные результаты работы являются оригинальными и *опубликованы в следующих статьях*:

- М.Н. Скрябина, Е.В. Любин, М.Д. Хохлова, А.А. Федянин. Диагностика парного взаимодействия магнитных микрочастиц методом оптического пинцета// Письма в ЖЭТФ. 2012. Т. 95, С. 638–642.

- E.V. Lyubin, M.D. Khokhlova, M.N. Skryabina, A.A. Fedyanin. Cellular viscoelasticity probed by active rheology in optical tweezers// J. Biomed. Opt. 2012. V.17. P.101510.
- M.D. Khokhlova, E.V. Lyubin, A.G. Zhdanov, S.Yu. Rykova, I.A. Sokolova, A.A. Fedyanin. Normal and system lupus erythematosus red blood cell interactions studied by double trap optical tweezers: direct measurements of aggregation forces// J. Biomed. Opt. 2012. V.17. P.025001.
- Д.А. Шилкин, Е.В. Любин, И.В. Соболева, А.А. Федянин. Управление положением ловушки вблизи отражающих поверхностей в оптическом пинцете// Письма в ЖЭТФ. 2013. Т.98, С.720–724.

Также результаты диссертации изложены в более чем 20 работах в материалах всероссийских и международных конференций, в том числе *апробация работы проводилась на следующих международных конференциях:*

- E. Lyubin, M. Khokhlova, A. Zhdanov and A. Fedyanin, “Magneto-optical tweezers for magnetic nanoparticles diagnostics,” 4-th International Conference on Materials Science and Condensed Matter Physics (MSCMP), Chisinau, Moldova, Book of Abstracts, p. 190 (2008).
- E. Lyubin, M. Skryabina, M. Khokhlova and A. Fedyanin, “Direct measurements of femtonewton forces between two magnetic Brownian microparticles,” 12th Joint MMM-INTERMAG Conference, Chicago, Illinois, USA, Abstract Book, p. 617 (2013).
- E.V. Lyubin, M.D. Khokhlova, M.N. Skryabina, A.G. Zhdanov, A.A. Fedyanin “Laser trapping for optical manipulation of functional micro- and nanoparticles”, 19th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT), Golden Sands resort, Bulgaria, Book of abstracts, p. 66 (2011).
- E.V. Lyubin, M.D. Khokhlova, M.N. Skryabina, A.A. Fedyanin, “Diagnostic of red blood cells viscoelastic properties by means of optical tweezers,” SPIE Photonics Europe, Brussels, Belgium, Technical Abstract Digest, p. 109 (2012).

-
- E.V. Lyubin, M.D. Khokhlova, A.G. Zhdanov, S.Y. Rykova, I.A. Sokolova, A.A. Fedyanin, “Red blood cell aggregation’s properties studied by double trap optical tweezers,” International Conference on Lasers, Applications, and Technologies (LAT), Kazan, Russia, Technical Digest, LThN10 (2010).
 - E.V. Lyubin, I.V. Soboleva, A.A. Fedyanin, “Measurement of Radiation Forces Generated by Guided Mode of One-Dimensional Photonic Crystals,” International Conference on Coherent and Nonlinear Optics (ICONO), Moscow, Russia, Technical Digest, p. 11 (2013).
 - E.V. Lyubin, D.A. Shilkin, I.V. Soboleva, and A.A. Fedyanin, “Photonic-Force Microscopy of Surface Modes in One-Dimensional Photonic Crystals,” Frontiers in Optics (FiO), Orlando, Florida, USA, Technical Digest, FTh1D (2013).

Глава I

Обзор литературы: применение метода оптического пинцета для исследования физических явлений

1. Метод оптического пинцета

Излучение лазеров может обладать высокой степенью пространственной когерентности, что позволяет сфокусировать его в область, размеры которой сравнимы с длиной волны этого излучения. Жестко сфокусированный лазерный пучок формирует в области перетяжки пространственно неоднородное распределение электрического поля световой волны и создает эффективную потенциальную яму для частиц, обладающих большей диэлектрической проницаемостью по сравнению с окружающей их средой. Захват в такую потенциальную яму единичных микрообъектов и управление их положением принято называть *методом оптического пинцета*.

Пионерская работа по оптическому управлению положением микрочастиц была проведена Робертом Эшקיным еще в 1970 году [17]. В его работе представлены результаты наблюдения действия сил давления света на различные прозрачные микрочастицы, и впервые показана экспериментальная возможность оптического захвата микрочастиц. А в 1986 году он совместно с коллегами опубликовал работу с описанием первого оптического пинцета на одном сильно сфокусированном лазерном луче [1].

Возникновение сил, действующих на частицу вблизи перетяжки, проще всего объяснить, поставив условие сильного неравенства на размер частицы и длину волны захватывающего излучения.

Пусть, например, линейный размер частицы a много меньше длины волны. В этом случае определяющим параметром оказывается поляризуемость частицы, пропорциональная ее размеру. Электрическое поле волны $\mathbf{E}$ наводит в частице дипольный момент $\mathbf{d}$, что ведет к появлению силы

$$\mathbf{F} = \nabla(\mathbf{d}\mathbf{E}) \propto a^3 \nabla E^2, \quad (1)$$

направленной вдоль градиента интенсивности электромагнитной волны, то есть к перетяжке сфокусированного лазерного пучка.

Пусть теперь размер частицы много больше длины волны. В этом случае взаимодействие частицы со световым полем может быть описано в приближении геометрической оптики [18, 19]. Упрощенная схема, иллюстрирующая принцип работы оптического пинцета в этом приближении, представлена на рисунке 1. При попадании в область перетяжки лазерного пучка прозрачная микрочастица преломляет и рассеивает падающее на нее излучение. Если эта частица изготовлена из материала с показателем преломления больше, чем у окружающей ее среды, то существует положение, в котором направление и величина суммарного импульса после прохождения через нее светового пучка не меняется, и микрочастица находится в положении равновесия. Это положение является центром оптической ловушки. При смещении микрочастиц в результате какого-либо внешнего возмущения происходит изменение направления суммарного импульса света после рассеяния на частице. Вследствие закона сохранения импульса возникают действующие на микрочастицу силы, возвращающие ее в положение равновесия. Если же материал частицы имеет меньший по сравнению с окружающей средой показатель преломления, то лазерное излучение будет выталкивать эту частицу из перетяжки [17, 19]. При более строгом описании следует учитывать поглощение света в частице и отражение от ее границ, что приводит к возникновению дополнительной силы, направленной вдоль распространения светового пучка. Если эта добавка велика, ловушка в области перетяжки не образуется, и частица выталкивается из нее. По этой причине при захвате частиц, особенно для тех, размер которых имеет порядок длины волны и более, существенно требование прозрачности на длине волны захватывающего излучения.

Относительный вклад, соответствующий отражению света от границ частицы, тем меньше, чем больше апертурный угол формирующего перетяжку пучка. Этим обусловлена важность использования высокоапертурных объективов при формировании перетяжки. Такой принцип действия оптического пинцета является универсальным для любых размеров частиц и любых мод лазерного пучка. Существует множество различных реализаций установок оптического пинцета. Принципиальная схема одной из них приведена на рисунке 2. Оптическое излучение одномодового лазерного источника (1) проходит через оптическую систему линз (2), в которой пучок расширяется. Затем пучок отражается от светоделителя (3), и поступает на вход объектива с большой числовой апертурой (4). Объектив фокусирует лазерное излучение в кювете с

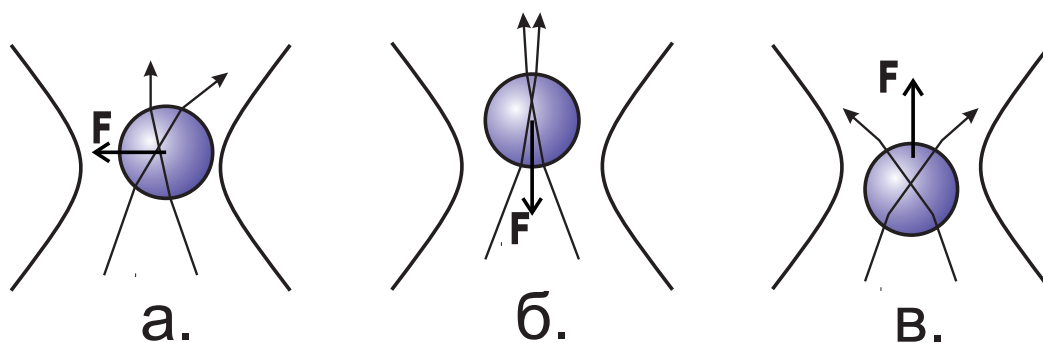


Рис. 1: Иллюстрация принципа работы оптического пинцета. $\mathbf{F}$ — возвращающая сила, действующая на сферическую частицу при смещении этой частицы из перетяжки лазерного пучка перпендикулярно оптической оси (а), параллельно этой оси (б, в).

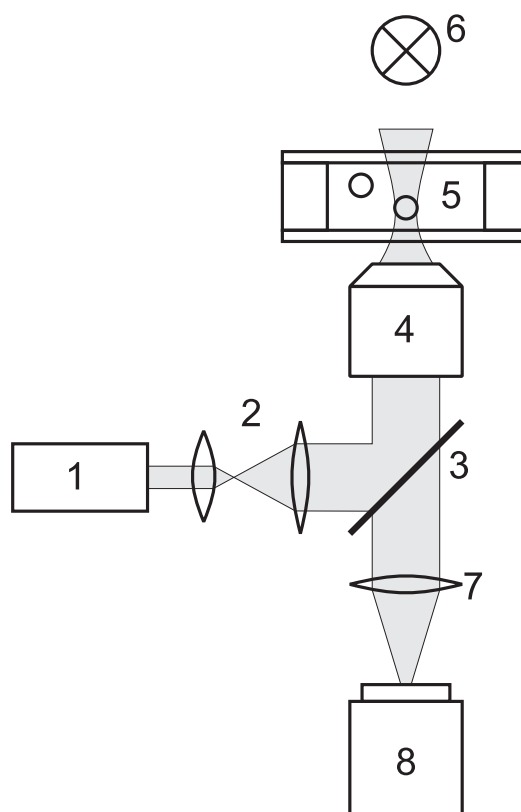


Рис. 2: Принципиальная схема реализации метода оптического пинцета. 1 — лазер, 2 — формирователь пучка, 3 — диэлектрическое зеркало, 4 — объектив, 5 — исследуемый образец, 6 — осветитель, 7 — линза, 8 — видеокамера.

исследуемым образцом (5), которая помещается на предметный столик. Для визуализации оптического захвата свет от осветителя (6) проходит через кювету с образцом, затем собирается объективом (4), проходит через светоделитель (3) и с помощью линзы (7) направляется на чувствительную матрицу цифровой камеры (8). Система линз (2) настроена таким образом, чтобы полностью заполнить апертуру объектива для создания максимально возможного градиента электромагнитного поля (то есть жесткой перетяжки лазерного пучка).

Для изучения взаимодействия между несколькими микрообъектами, а также для управления протяженными микрообъектами часто используют *многолучевые* оптические пинцеты, которые позволяют работать одновременно с несколькими оптическими ловушками. Для создания многолучевых пинцетов часто применяют несколько источников лазерного излучения, разбиение одного лазерного луча на два по поляризации, применяют акустооптические дефлекторы, осуществляющие развертку и временную модуляцию лазерного луча с высокой частотой [20], жидкокристаллические пространственные модуляторы света [21–23] и т.п.

В первых опытах, посвященных оптическим ловушкам, использовались взвешенные в жидкости диэлектрические частицы, прозрачные на длине волны захватывающего излучения. В классической работе Эшкина [1] экспериментально показан захват частиц с размерами от 25 нм до 10 мкм в воде. Размер захватываемых частиц был ограничен по следующим причинам. Во-первых, с увеличением размера растет сила тяжести, действующая на частицу, тогда как сила со стороны ловушки ограничена мощностью лазерного излучения. Поэтому для управления большими частицами используют более грубые методы, например, микропипетки. Во-вторых, поскольку поляризуемость частицы пропорциональна ее объему, то при уменьшении размера частицы глубина потенциальной ловушки уменьшается и при некотором значении становится соизмеримой с энергией теплового движения. В этом случае броуновские силы выбивают частицу из ловушки, то есть захват оказывается нестабильным.

Впоследствии, однако, было показано, что в иных схемах эксперимента ограничения снизу на размер практически отсутствуют: перетяжка жестко сфокусированного лазерного луча может быть также использована как ловушка для отдельных атомов [24]. В случае, если размер частицы существенно меньше длины волны, отсутствует и требование прозрачности. В этом случае метод оптического пинцета позволяет

работать с металлическими частицами [25], обладающими высокой поляризуемостью.

Следует не забывать, что для реальных исследований свойств частиц и силовых взаимодействий между ними методом оптического пинцета так же необходима визуализация этих частиц. По критерию Рэлея разрешающая способность объектива с распространенной для оптического пинцета числовой апертурой $N.A. = 1.3$ на длине волны $\lambda = 450$ нм составляет:

$$R = \frac{1.22\lambda}{2N.A.} \approx 0.2 \text{ мкм.} \quad (2)$$

Поэтому для визуализации меньших частиц необходимо применять специальные контрастирующие методы. Например, в работе [26] было показано, что метод голографического пинцета позволяет захватывать кремниевые нанотрубки диаметром 1,3 нм, что дает возможность контролируемо осаждать их на подложку, упорядочивать в нужные структуры. Связки из нескольких нанотрубок регистрировались с помощью метода темного поля. В работе [27] для визуализации золотых наночастиц размером менее 72 нм использовалась дифференциальная интерференционно-контрастная микроскопия.

Помимо манипулирования микрообъектами, метод оптического пинцета позволяет проводить количественные измерения сил, действующих на микромасштабах. Это обусловлено тем, что в случае смещений из перетяжки, на частицу начинает действовать возвращающая сила. Таким образом, если известна зависимость возвращающей силы от смещения, можно определить внешнюю силу, действующую на частицу, наблюдая за ее смещением. Такой способ изучения взаимодействий получил название *фотонно-силовой микроскопии*.

Существует несколько методов, позволяющих с высокой точностью детектировать изменение положения частицы [2]. В частности, для этого могут использоваться цифровые видеокамеры с последующей обработкой полученных изображений. Точность определения координат таким методом может составлять до единиц нанометров, однако временное разрешение при этом не удовлетворяет требованиям большинства задач. Как правило, в фотонно-силовой микроскопии видеокамеры выполняют лишь функцию визуализации эксперимента. Более востребованными в определении относительных смещений частицы оказались методы, основанные на наблюдении за карти-

ной рассеяния сфокусированного на частице лазерного излучения. Для этого используют, например, квадрантные и позиционно-чувствительные фотодиоды. Временное разрешение таких методов обычно ограничено скоростью аналого-цифровых преобразователей и может составлять единицы мкс. Недостатком же является необходимость дополнительной калибровки, то есть определения связи между сигналом фотодиода и реальным смещением частицы.

Чтобы понимать масштаб сил, действующих на микрочастицу в оптической ловушке, рассмотрим водную суспензию микрочастиц полистирола диаметром $a = 3 \text{ мкм}$ и плотностью $\rho = 1,1 \text{ г/см}^3$ ($\Delta\rho \approx 0,1 \text{ г/см}^3$). На микрочастицу в суспензии действует сила тяжести, частично скомпенсированная силой Архимеда:

$$F_g = \Delta\rho\pi a^3 g/6 \simeq 10 \text{ фН}. \quad (3)$$

Теперь оценим действие давления света на частицу. Благодаря преломлению, отражению или поглощению падающего на частицу света импульс этого света за промежуток времени dt изменяется на величину dp . Вследствие закона сохранения импульса эта частица должна приобрести такой же по величине импульс, но направленный в другую сторону. Тогда из второго закона Ньютона следует, что на частицу со стороны светового излучения действует сила $F = \frac{dp}{dt}$. В приближении рассмотрения плоской волны и полностью поглощающей свет частицы, зная выражение для объемной плотности импульса света $G = I/c^2$ [19], можем найти эту силу как

$$F = SI/c, \quad (4)$$

где I — интенсивность излучения, S — площадь освещенной поверхности. Так, для падающего на частицу излучения мощностью 10 мВт оценка величины светового давления дает $F \simeq 10 \text{ пН}$, что на три порядка превышает силу тяжести (3), действующую на частицу. Разумеется, это оценка сверху, ввиду принятого приближения о полностью поглощающей частице, но она позволяет сделать вывод о возможности управления микрообъектами посредством оптического излучения. В обзорной статье [2] приведен характерный масштаб сил в оптическом пинцете. Максимальная захватывающая сила оптической ловушки составляет величину порядка 1 пН на каждые 10 мВт лазерного излучения в области перетяжки для частиц микронного размера. Таким образом

фотонно-силовая микроскопия используется для измерения сил пиконьютонового масштаба.

2. Калибровка установки оптического пинцета

Расчет сил, действующих на микрочастицу в реальной оптической ловушке является довольно сложной задачей. Для этих целей можно использовать численные методы, которые в большинстве случаев вычисляют профиль потенциальной ямы ловушки посредством расчета картины интенсивности излучения до и после прохождения лазерного пучка через микрочастицу (поля рассеяния). Пример алгоритма для вычисления характеристик оптической ловушки можно найти в работах [28, 29].

Обычно прибегают к калибровке установки оптического пинцета, основанной на сравнении силы захвата с какой-либо “эталонной” силой. Чаще всего в ходе калибровки определяют так называемую *эффективную жесткость ловушки*, то есть отношение возвращающей силы, действующей на частицу со стороны оптической ловушки, к смещению этой частицы из центра ловушки. Ниже описаны некоторые способы калибровки оптического пинцета.

Самым простым в интерпретации методом калибровки жесткости оптической ловушки является сравнение силы захвата с известной силой вязкого трения. Для сферической частицы диаметром a ее значение определяется формулой Стокса:

$$F_{visc} = -\gamma v = -3\pi\eta a v, \quad (5)$$

где η – динамическая вязкость среды, а v – скорость движения частицы относительно жидкости. При такой калибровке суспензия исследуемых микрочастиц помещается в проточную кювету, в которой известно распределение скоростей потока жидкости, или же кювета приводится в движение относительно ловушки. Далее в этой кювете производится захват одной из микрочастиц суспензии. На частицу начинает дополнительно действовать возвращающая сила ловушки:

$$F_{trap} = -kx, \quad (6)$$

где x — расстояние между центром частицы и центром ловушки, k — эффективную

жесткость ловушки. Изменяя скорость потока, измеряют значения смещения x . Таким образом, если параметры задачи известны, искомая жесткость определяется как отношение известной силы вязкого трения, действующей на частицу, к смещению этой частицы, т.е. $k = \gamma v/x$.

Другой разновидностью этого метода является рассмотрение динамики захвата микрочастицы. В ходе эксперимента измеряются временные зависимости координаты частицы при оптическом захвате. Затем, по результатам измерений решается обратная задача – восстанавливается потенциал, соответствующий взаимодействию микрочастицы с оптической ловушкой. Подробное описание метода можно найти, например, в работах [30,31]. В описанных экспериментах было проведено исследование динамики частицы при быстром изменении положения ловушки. Процесс смены положения равновесия частицы регистрировался. Закон движения частицы в таких условиях выражается как $m\ddot{x} + \gamma\dot{x} + kx = 0$, где m – масса частицы. Если трение достаточно велико, массой частицы можно пренебречь, и решением этого уравнения является затухающее движение частицы $x(t) = x_0 \exp\left(-\frac{k}{\gamma}t\right)$, где x_0 – расстояние между ловушкой и частицей в начальный момент времени, соответствующий резкому изменению положения ловушки. Таким образом, зная вязкость окружающей частицу жидкости и ее диаметр, можно получить значение жесткости оптической ловушки.

Широкое распространение получили методы, основанные на изучении теплового движения в оптической ловушке [2, 32–35]. Основное их преимущество заключается в том, что, помимо определения жесткости ловушки, с их помощью можно провести также калибровку шкал системы детектирования.

В качестве экспериментальных данных при этом могут выступать автокорреляционная функция временного сигнала броуновских смещений частиц $x(t)$:

$$\langle x(t)x(t+\tau) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T x(t)x(t+\tau) dt, \quad (7)$$

или спектр мощности сигнала этих смещений:

$$P_x(f) = \frac{|x(f)|^2}{T} = \frac{1}{T} \left| \int_0^T x(t) e^{i2\pi ft} dt \right|^2, \quad (8)$$

связанные соотношением Винера-Хинчина (T — время записи сигнала в эксперименте).

Можно показать [32], что в случае теплового движения во внешнем гармоническом потенциале спектр мощности имеет вид функции Лоренца:

$$P_x(f) = \frac{D/(2\pi^2)}{f_c^2 + f^2}, \quad (9)$$

где $D = k_B T / \gamma$ — коэффициент диффузии, $f_c = k / (2\pi\gamma)$ — частота отсечки.

При достаточно малых x показания фотодиода V пропорциональны смещению:

$$x = S V. \quad (10)$$

Тогда спектр мощности регистрируемого сигнала

$$P_V(f) = S^2 \frac{D/(2\pi^2)}{f_c^2 + f^2}. \quad (11)$$

Таким образом, частота отсечки определяет жесткость ловушки, а значение $P_V(0)$ — коэффициент связи S .

Тепловые флуктуации захваченного объекта также могут быть использованы для получения жесткости оптической ловушки через теорему о равномерном распределении энергии по степеням свободы. Для гармонического потенциала с жесткостью k она приводит к уравнению

$$\frac{k_B T}{2} = \frac{k}{2} \langle x^2 \rangle. \quad (12)$$

Вероятность для смещения захваченного в потенциальную яму объекта будет определяться распределением Больцмана

$$P(x) \propto \exp\left(-\frac{U(x)}{k_B T}\right) = \exp\left(-\frac{kx^2}{2k_B T}\right). \quad (13)$$

Но для определения жесткости из выражений (12) или (13) необходимо заранее сопоставить шкалу детектора со смещением частицы. То есть параметр S необходимо определить другим способом.

Таким образом, для случая захвата микрочастиц в вязкой среде калибровка оптического пинцета может быть проведена с помощью анализа тепловых флуктуаций

положения захваченной в оптические ловушки частицы [32]. Однако в случае вязко-эластичной среды, для которой коэффициенты вязкости и эластичности не известны, измерения броуновских смещений недостаточно для калибровки оптического пинцета [33].

3. Применения и научные задачи, решаемые методом оптического пинцета

3.1. Микрореологические исследования методом оптического пинцета

Обычно, когда говорят о микрореологии, подразумевают технику определения таких реологических свойств среды, как вязкость или упругость. Измерения микрореологических параметров ведутся путем наблюдения за траекторией пробной частицы микронного размера в исследуемой среде. При этом различают два вида данной техники: пассивная микрореология и активная микрореология [33, 34]. В пассивной микрореологии частица движется за счет тепловой энергии и ее движение является в общем случае броуновским, а в активной микрореологии движение частицы обусловлено внешней силой, например, силой со стороны оптического пинцета, магнитного или электрического полей, силой давления света и т.д. Методы активной и пассивной реологии также делятся на те, в которых используется одна пробная частица и те, в которых используются две частицы. С появлением оптического пинцета методы микрореологии стали применять для изучения движения оптически захваченных частиц.

3.2. Метод анализа корреляционных функций броуновских смещений частиц в оптических ловушках

Выше был описан метод калибровки оптического пинцета, основанный на пассивной микрореологии в оптическом пинцете с анализом спектральной плотности мощности смещения частиц из положения равновесия. Также было упомянуто об альтернативном подходе, основанном на анализе вида корреляционных функций смещений микрочастиц. Введем общее обозначение для таких корреляционных функций:

$$C_{ij}(\tau) = \langle x_i(t)x_j(t+\tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T x_i(t)x_j(t+\tau)dt, \quad (14)$$

где x_i — смещение вдоль оси Ox i -ой оптически захваченной микрочастицы из центра соответствующей ловушки, если $i = j$, то функция является автокорреляционной. Если $i \neq j$, то функция является кросс-корреляционной. Автокорреляционная функция броуновских смещений частицы содержит информацию о ее отклике на действующую случайную броуновскую силу. Она отражает, насколько движение частицы в момент времени $t + \tau$ связано с движением частицы в момент времени t , то есть автокорреляционная функция движения частицы отражает “память” системы. Время затухания корреляций зависит от параметров всей системы, включая оптическую ловушку и окружающую жидкость. Это позволяет по автокорреляционной функции смещения частицы определять микрореологические параметры среды.

Кросс-корреляционные функции смещения частиц определяют связанность движения двух частиц. Корреляции в движении частиц появляются за счет их взаимодействия. Частицы всегда взаимодействуют посредством общей среды, так как движение одной частицы создает распределение скоростей во всей окружающей ее жидкости, и это движение жидкости влияет на движение второй частицы. Таким образом, величины корреляций движения частиц зависят от свойств среды и ловушки. Это позволяет измерять эффективную жесткость оптической ловушки и коэффициент вязкого трения среды.

Также между частицами могут действовать силы прямого взаимодействия, например силы притяжения и отталкивания магнитной природы. Наличие этих сил также делает движение частиц более “связанным” и влияет на вид кросс-корреляционной функции. Поэтому целесообразно использовать измерение кросс-корреляционных функции движения частиц для измерения сил взаимодействия между ними [9].

3.2.1 Автокорреляционная функция броуновских смещений одиночной оптически захваченной частицы

Автокорреляционную функцию $C(\tau) = \langle x(t)x(t+\tau) \rangle$ броуновских смещений для одиночной оптически захваченной частицы в несжимаемой ньютоновской жидкости можно получить, записав уравнение Ланжевена:

$$\dot{x}(t) = b_0[f(t) - kx(t)]. \quad (15)$$

где согласно формуле Стокса $b_0 = 1/6\pi\eta a$ — коэффициент подвижности частицы, a — радиус частицы, η — динамическая вязкость жидкости, а $f(t)$ — случайная броуновская сила, имеющая следующие моменты распределения:

$$\begin{aligned}\langle f(t) \rangle &= 0, \\ \langle f(t)f(t') \rangle &= \frac{2k_B T}{b_0} \delta(t - t').\end{aligned}\tag{16}$$

Уравнение Ланжевена имеет стандартное решение [36]:

$$x(t) = b_0 e^{-\omega_k t} \int_0^t e^{\omega_k t_1} f(t_1) dt_1,\tag{17}$$

где $\omega_k = kb_0$ — характерная частота движения частицы в оптической ловушке. С помощью этого решения можно найти автокорреляционную функцию броуновских смещений частицы:

$$C(\tau) = b_0^2 e^{-\omega_k(2t+\tau)} \int_0^t \int_0^t e^{\omega_k(t_1+t_2)} \langle f(t_1)f(t_2) \rangle dt_1 dt_2.\tag{18}$$

Подставляя соотношения для корреляции случайной броуновской силы и учитывая, что нас интересует стационарный случай, получаем [37]:

$$C(\tau) = \frac{k_B T}{k} e^{-\omega_k \tau}.\tag{19}$$

Характерное время затухания корреляции $\tau_{cor} = 1/\omega_k$ равно времени за которое частица пройдет из центра ловушки до точки поворота в гармоническом потенциале. Точка поворота определяется пересечением энергетического уровня $k_B T$ с потенциалом оптической ловушки.

3.2.2 Авто- и кросс-корреляционные функции броуновских смещений двух частиц, захваченных в две независимые оптические ловушки

Две частицы, захваченные в ловушки, взаимодействуют посредством окружающей их жидкости, поэтому уравнения движения оказываются связанными. Для дальнейшего описания движения частиц принимаются следующие допущения [37]:

- (1) захваченные частицы имеют одинаковый диаметр, а оптические ловушки ха-

рактически характеризуются одинаковыми коэффициентами жесткости.

(2) между частицами не действует никаких сил, помимо сил гидродинамического взаимодействия.

Силы гидродинамического взаимодействия, действующие между двумя частицами, были вычислены в нескольких работах [38–41]. Было показано, что для жидкостей с низким числами Рейнольдса гидродинамическое взаимодействие между частицами может быть описано в приближении линейного отклика, то есть скорость или момент вращения частицы можно выразить как линейную комбинацию всех сил и моментов сил, действующих на частицы. Для начала будем рассматривать случай, когда на частицу не действуют внешние вращательные моменты, тогда можно рассматривать только поступательные степени свободы.

Пусть центр первой частицы имеет координаты $\mathbf{r}_1$, а центр второй частицы имеет координаты $\mathbf{r}_2$, на первую частицу действует сила $\mathbf{F}_1$, а на вторую $\mathbf{F}_2$. Запишем мгновенные значения обеих скоростей $\mathbf{U}_{1,2}$ через элементы тензора подвижности $\mathbf{b}_{ij}$ и величины сил [38]:

$$\begin{aligned}\mathbf{U}_1 &= \mathbf{b}_{11}\mathbf{F}_1 + \mathbf{b}_{12}\mathbf{F}_2, \\ \mathbf{U}_2 &= \mathbf{b}_{21}\mathbf{F}_1 + \mathbf{b}_{22}\mathbf{F}_2.\end{aligned}\tag{20}$$

Тензор подвижности обратно пропорционален коэффициенту вязкого трения, а также зависит от взаимного расположения частиц, то есть от вектора $\mathbf{r} = \mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2$. Так как система двух сфер симметрична относительно направления вектора $\mathbf{r}$, то компоненты тензора подвижности можно записать в виде:

$$\mathbf{b}_{ij} = A_{ij}(r) \frac{\mathbf{r} \otimes \mathbf{r}}{r^2} + B_{ij}(r) \left(\mathbf{I} - \frac{\mathbf{r} \otimes \mathbf{r}}{r^2} \right),\tag{21}$$

где $i, j = 1, 2$ — индексы, нумерующие частицы, $r = |\mathbf{r}|$. Коэффициенты $A_{ij}(r)$ и $B_{ij}(r)$ — величины продольной и поперечной подвижности.

По теореме Лоренца о взаимности, симметричность системы позволяет выписать следующие соотношения:

$$\begin{aligned}A_{11}(r) &= A_{22}(r), \\ A_{12}(r) &= A_{21}(r), \\ B_{11}(r) &= B_{22}(r), \\ B_{12}(r) &= B_{21}(r).\end{aligned}\tag{22}$$

То есть если частицы эквивалентны, то $\mathbf{b}_{11} = \mathbf{b}_{22}$ и $\mathbf{b}_{12} = \mathbf{b}_{21}$. Рассмотрим случай, когда $\mathbf{F}_1 = \mathbf{F}$, а $\mathbf{F}_2 = \mathbf{0}$, в приближении $r \gg a$ можно пренебречь влиянием второй частицы на движение первой. Движение первой частицы создает поле скоростей в жидкости, которое убывает обратно пропорционально квадрату расстояния от нее, движущаяся жидкость действует на вторую частицу, и ее движение создает вторичное поле скоростей. В приближении $r \gg a$, этим влиянием вторичного поля можно пренебречь, поэтому можно считать, что первая частица движется со скоростью $\mathbf{U}_0 = b_0 \mathbf{F} = \mathbf{F}/6\pi\eta a$. Она создает поле скоростей жидкости $\mathbf{v}$ [42]:

$$\mathbf{v}(\mathbf{r}') = \mathbf{U}_0 \left\{ \mathbf{I} \left(\frac{3a}{4r'} + \frac{a^3}{4r'^3} \right) + \frac{\mathbf{r}' \otimes \mathbf{r}'}{r'^2} \left(\frac{3a}{4r'} - \frac{3a^3}{4r'^3} \right) \right\}, \quad (23)$$

где $\mathbf{r}'$ — радиус вектор, проведенный из точки центра первой частицы в произвольную точку пространства. Рассмотрим скорость движения свободной от внешних сил частицы под действием этого поля скоростей. По теореме Факсена [43] скорость движения второй частицы выражается в виде:

$$\mathbf{U}_2 = \mathbf{v}(\mathbf{r}) + \frac{1}{6} a^2 \nabla^2 \mathbf{v}(\mathbf{r}). \quad (24)$$

Используя выражение (23), пренебрегая слагаемыми со степенями ниже r^{-3} , запишем скорость второй частицы:

$$\mathbf{U}_2 = \mathbf{U}_0 \left\{ \mathbf{I} \left(\frac{3a}{4r} + \frac{a^3}{2r^3} \right) + \frac{\mathbf{r} \otimes \mathbf{r}}{r^2} \left(\frac{3a}{4r} - \frac{3a^3}{2r^3} \right) \right\}. \quad (25)$$

Или, если записать в другом виде:

$$\mathbf{U}_2 = b_0 \mathbf{F} \left\{ \left(\mathbf{I} - \frac{\mathbf{r} \otimes \mathbf{r}}{r^2} \right) \left(\frac{3a}{4r} + \frac{a^3}{2r^3} \right) + \frac{\mathbf{r} \otimes \mathbf{r}}{r^2} \left(\frac{3a}{2r} - \frac{a^3}{r^3} \right) \right\}. \quad (26)$$

Используя это выражение и равенства (20) и (21), можно получить выражения для

коэффициентов матрицы подвижности в этом приближении:

$$\begin{aligned}\frac{A_{11}(r)}{b_0} &= 1 + O\left[\left(\frac{a}{r}\right)^4\right], \\ \frac{A_{12}(r)}{b_0} &= \frac{3a}{2r} - \left(\frac{a}{r}\right)^3 + O\left[\left(\frac{a}{r}\right)^7\right], \\ \frac{B_{11}(r)}{b_0} &= 1 + O\left[\left(\frac{a}{r}\right)^4\right], \\ \frac{B_{12}(r)}{b_0} &= \frac{3a}{4r} + \frac{1}{2}\left(\frac{a}{r}\right)^3 + O\left[\left(\frac{a}{r}\right)^7\right].\end{aligned}\tag{27}$$

Полученный тензор гидродинамического взаимодействия $\mathbf{b}_{ij}$ принято называть гидродинамическим тензором Ротне-Прагера [44]. Но обычно, описывая броуновское движение частиц, пренебрегают членами ниже порядка $(a/r)^2$, тензор подвижности, полученный в таком приближении называют тензором Озеена [45]. Многие авторы находили выражения для слагаемых более высокого порядка разложения. Например, в статье [44] можно найти выражения для коэффициентов матрицы подвижности с учетом вплоть до слагаемых, пропорциональных $(a/r)^{11}$. Количество слагаемых, которое необходимо учитывать в расчетах, в большой степени зависит от отношения a/r . В случае, когда частицы находятся близко друг к другу $r \approx 2a$, лучше использовать другие способы вычисления компонент тензора подвижности, например применять разложение по параметру $\frac{r-2a}{r}$, приведенное в работе [39]. В работе [44] были исследованы области применения различных приближений. Для этого проводилось моделирование броуновского движения частиц, где гидродинамическое взаимодействие учитывалось в разных приближениях: Озеена, Ротне-Прагера, используя разложение до степени $(a/r)^7$ и с численно рассчитанным тензором подвижности, полученным с помощью программного пакета, ошибка вычислений которого менее 1%. Далее строились кросс-корреляционные функции их движения. Было показано, что результаты, полученные с помощью приближения Озеена на расстояниях $r = 4a$, имеют ошибку порядка 4%, на расстояниях $r = 6a$ имеет ошибку 3,5% и только на расстояниях порядка $r = 20a$ практически совпадает с результатами, полученными при точном учете тензора подвижности (ошибка менее 1%). Аналогичные результаты для приближения Ротне-Прагера: $r = 4a$ — ошибка 4%, $r = 6a$ — 2,5%, $r = 20a$ — менее 1%. Для разложения величин тензора подвижности вплоть до членов, пропорциональных ρ^{-7} , результаты практически совпадают с эталонными для всех трех расстояний.

Во второй и третьей главах данной диссертационной работы изучаются свойства движения частиц в оптических ловушках вдоль направления, ранее связанного с осью Ox . Соотношения для скоростей частиц вдоль этой оси:

$$\begin{pmatrix} \dot{x}_1 \\ \dot{x}_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A_{11} & A_{12} \\ A_{21} & A_{22} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} f_1(t) - kx_1 \\ f_2(t) - kx_2 \end{pmatrix}, \quad (28)$$

где $f_1(t)$ и $f_2(t)$ — случайные броуновские силы, действующие на первую и вторую частицы. Они имеют следующее распределение моментов:

$$\begin{aligned} \langle f_i(t) \rangle &= 0, \\ \langle f_i(t) f_j(t') \rangle &= 2(A^{-1})_{ij} k_B T \delta(t - t'). \end{aligned} \quad (29)$$

Следует учитывать, что в этом рассмотрении пренебрегается изменением величин подвижности из-за броуновских смещений частиц, то есть величины градиента подвижности $\frac{1}{2}k_B T \sum_j \frac{\partial A_{ij}}{\partial x_j}$ считаются пренебрежимо малыми. Это можно сделать в случае, когда броуновские флуктуации положения частицы много меньше расстояния между ними, то есть $x_{1,2} \ll r$.

3.2.3 Рассмотрение броуновских смещений двух оптически захваченных частиц из центров ловушек в виде коллективной и относительной моды

Для того чтобы решить систему уравнений Ланжевена (28), можно перейти в систему нормальных координат:

$$\begin{aligned} X_1 &= \frac{1}{\sqrt{2}}(x_1 + x_2), \\ X_2 &= \frac{1}{\sqrt{2}}(x_1 - x_2). \end{aligned} \quad (30)$$

В этом случае уравнения Ланжевена можно записать в следующей форме [46]:

$$\dot{X}_i(t) = -k\lambda_i X_i + F_i(t), \quad (31)$$

где

$$\begin{aligned} \lambda_1 &= A_{11} + A_{12}, \\ \lambda_2 &= A_{11} - A_{12}. \end{aligned} \quad (32)$$

Таким образом, нормальные координаты представляют собой коллективную и относительную моды движения частиц. Коллективная мода описывает поступательное движение центра масс частиц, а относительная мода определяет расстояние между частицами.

Случайные силы $F_i(t)$ являются линейными комбинациями сил $f_i(t)$, а их моменты имеют вид:

$$\begin{aligned}\langle F_i(t) \rangle &= 0, \\ \langle F_i(t) F_j(t') \rangle &= 2\delta_{ij} \lambda_i k_B T \delta(t - t').\end{aligned}\tag{33}$$

Случайные силы $F_i(t)$ являются независимыми, поэтому уравнения Ланжевена для коллективной и относительной мод движения не связаны, и каждое из них решается аналогично уравнению Ланжевена для одиночной частицы:

$$\langle X_i(t) X_j(t + \tau) \rangle = \delta_{ij} \frac{k_B T}{k} e^{-k\lambda_i \tau}.\tag{34}$$

Введем нормированные корреляционные функции смещений частиц:

$$\begin{aligned}g(t) &= \frac{C_{12}(\tau)}{C_{11}(0)} = \frac{C_{12}(\tau)k}{k_B T}, \\ G(t) &= \frac{C_{11}(\tau)}{C_{11}(0)} = \frac{C_{11}(\tau)k}{k_B T}.\end{aligned}\tag{35}$$

Произведя обратное преобразование можно выразить координаты x_i через нормальные координаты X_i . Тогда получаем выражения для нормированных корреляционных функций [37, 47]:

$$\begin{aligned}G(\tau) &= \frac{1}{2} [\exp(-k\lambda_1 \tau) + \exp(-k\lambda_2 \tau)], \\ g(\tau) &= \frac{1}{2} [\exp(-k\lambda_1 \tau) - \exp(-k\lambda_2 \tau)].\end{aligned}\tag{36}$$

Интересно, что кросс-корреляционная функция броуновских сил отрицательна для любого τ . Это можно объяснить таким образом: на броуновские силы, действующие на частицы, влияют флуктуации объема жидкости между частицами. При уменьшении объема, частицы стремятся сблизиться, а при увеличении — отдалиться друг от друга. Отметим, что кросс-корреляционная функция имеет минимум при [46]:

$$\tau_{min} = \frac{1}{kA_{11}} \left\{ 1 + \frac{1}{3} \left(\frac{A_{12}}{A_{11}} \right)^2 + O \left[\left(\frac{A_{12}}{A_{11}} \right)^4 \right] \right\}.\tag{37}$$

Глубина этого минимума равна:

$$g(\tau_{min}) = -\frac{1}{e} \left\{ \frac{A_{12}}{A_{11}} + O \left[\left(\frac{A_{12}}{A_{11}} \right)^3 \right] \right\}. \quad (38)$$

Следовательно, имея экспериментальные данные о положении и величине минимума кросс-корреляционной функции, мы получаем два уравнения (38) и (37) для определения двух неизвестных A_{11} и A_{12} . Таким образом, метод корреляционного анализа позволяет находить величины матрицы подвижности A_{ij} .

3.3. Измерение угловой скорости вращения оптически захваченной частицы

В литературе можно найти несколько способов определения скорости вращения микрочастиц в оптическом пинцете, например, анализ видеоизображения [48] или сигнала с квадрантного фотодетектора [49]. Также угловую скорость захваченных объектов можно определять с помощью корреляционных функций их броуновского движения [50].

В работе [50] полистироловые сферы диаметром 1 мкм захватывались с помощью оптического пинцета, использующего излучение лазера с длиной волны 785 нм. Для передачи углового момента применялся непрерывный лазер 532 нм, трансформированный с помощью голографической маски в пучок с продольным распределением интенсивности Лагерра-Гаусса с $l = 10$ и мощностью $P = 3$ мВт. Броуновское смещение частиц регистрировалось по картине рассеяния захватывающих лучей лазера с помощью квадрантных фотодиодов (см. рисунок 3).

По экспериментальным данным строились автокорреляционные функции броуновского смещения частиц (рисунок 4). Полученные зависимости имеют вид гармонических функций, моделированных спадающей экспонентой. Как было показано авторами работы, период этих гармонических функций совпадает с периодом вращения частиц.

3.4. Изучение взаимодействия магнитных микрочастиц

Анализ литературы показывает, что до изобретения оптического пинцета для изучения суспензий магнитных микрочастиц существовало два основных подхода: первый подход — исследование гидродинамических и магнитных свойств магнитной жид-

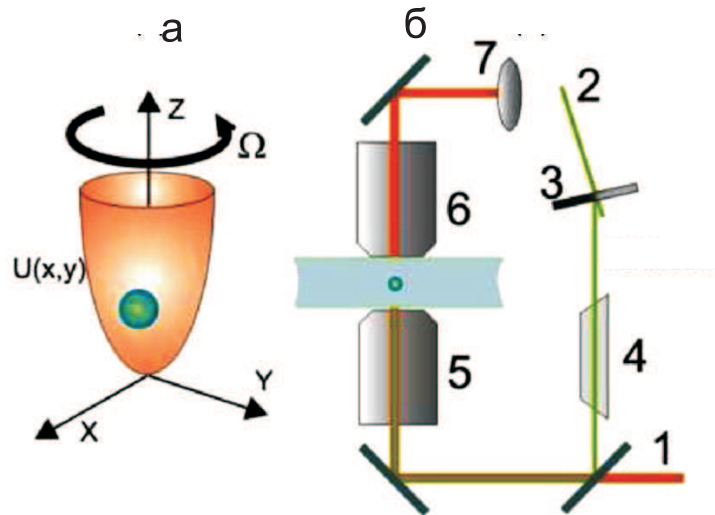


Рис. 3: (а) – Микрочастица в гармоническом потенциале ловушки $U = \frac{k}{2}(x^2 + y^2)$. Частица вращается вокруг оси z с частотой Ω . (б) – Экспериментальная установка: 1 – захватывающий лазерный луч с длиной волны 785 нм, 2 – лазерный луч с длиной волны 532 нм, 3 – голографическая маска, 4 – призма Дове, 5 – $100\times 1,3$ NA объектив, 6 – собирающий $40\times$ объектив, 7 – квадрантный фотодетектор [50].

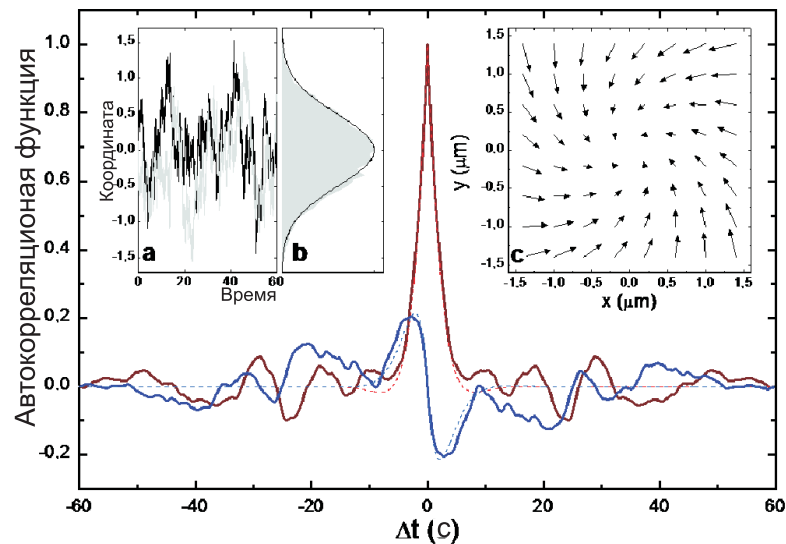


Рис. 4: Автокорреляционные функции броуновского движения вращающейся микрочастицы; в левом верхнем углу — распределение смещений частицы, в правом верхнем углу — распределение момента вращения лазерного луча [50].

кости на макромасштабах [51], второй подход — исследование свойств отдельных взвешенных в жидкости микрочастиц с помощью оптической микроскопии [52]. При использовании первого метода можно получить феноменологическую информацию о свойствах жидкости. Данный подход дает возможность выяснить, как взаимодействие между частицами влияет на ее макроскопические параметры, например, на динамическую вязкость, но остается только предполагать о том, как ведут себя отдельные частицы. Второй подход дает информацию о динамике движения частиц и конгломератов нескольких магнитных частиц под действием внешнего магнитного поля, причем зачастую исследуется динамика их движения во вращающемся магнитном поле. Однако с помощью оптической микроскопии не проводилось прямых измерений сил взаимодействия между магнитными частицами. Возможно это вызвано тем, что эти силы имеют очень сильную зависимость от расстояния, поэтому при достаточно больших расстояниях между частицами силы магнитного взаимодействия практически не влияют на движение этих частиц, а при близких расстояниях быстро приводят к “слипанию” частиц.

3.4.1 Одиночная захваченная оптическим пинцетом микрочастица во вращающемся внешнем магнитном поле

В работах [5, 53] предложена схема комбинированного магнитооптического пинцета. Для этого вокруг образца была построена система электромагнитов, позволяющая прикладывать как постоянное, так и переменное магнитное поле порядка 100 Гс (см рисунок 5).

Первая работа по изучению магнитных микрочастиц методом оптического пинцета [53] посвящена суперпарамагнитным частицам диаметром 1 мкм. В работе использовалось вращающееся магнитное поле напряженностью до 100 Гс. Была продемонстрирована возможность управления ориентацией группы захваченных в оптическую ловушку суперпарамагнитных частиц с помощью магнитного поля. Таким образом, магнитооптический пинцет позволяет контролировать не только положение захваченного магнитного микрообъекта (3 степени свободы), но и его ориентацию в пространстве (3 степени свободы).

В следующей работе тех же авторов [5] была проведена калибровка магнитооптического пинцета. В ходе калибровки по броуновскому движению была определена

эффективная жесткость оптической ловушки. Кроме того был измерен момент сил, действующий на суперпарамагнитную частицу, захваченную в оптическую ловушку, со стороны магнитного поля. В серии экспериментов были получены угловые скорости вращения магнитных частиц около 1 Гц. Угол поворота частицы при помощи магнитного поля контролировался с точностью до 10 мрад. В работе предложено применить данную методику для изучения деформационных свойств биологических макромолекул, в частности для измерения модулей кручения.

3.4.2 Измерения методом оптического пинцета зависимости магнитного момента микрочастиц от внешнего магнитного поля

Другой пример магнитооптического пинцета предложен в работе [10]. Рассмотренный вариант установки магнитооптического пинцета был собран на базе инвертированного микроскопа, числовая апертура объектива была равна 0,5. Длина волны лазера, осуществляющего оптический захват, была равна $\lambda = 533$ нм, мощность составляла 50 мВт. Суспензия изучаемых парамагнитных микрочастиц диаметром 1,4 мкм помещалась в однородное магнитное поле электромагнитной катушки, напряженность поля составляла 15 кА/м, поле было направлено вдоль оси лазерного пучка. Размер оптической ловушки достигал 30 мкм, в работе осуществлялся одновременный оптический захват до 10 частиц. Так как оптическая ловушка не позволяла осуществить стабильный захват по оси Oz , направленной вдоль лазерного луча, частицы прижимались к верхнему стеклу образца. На рисунке 6 приведены микрофотографии двух (А) и трех захваченных частиц (С) в отсутствие магнитного поля и в поле напряженностью 12480 А/м (В, D), направленного вдоль оси Oz . В присутствии магнитного поля частицы отталкивались друг от друга.

Самой простой моделью взаимодействия двух магнитных частиц является модель взаимодействия двух диполей с магнитным дипольным моментом $\mathbf{M}$. Для разных типов частиц величина $\mathbf{M}$ имеет разную зависимость от величины напряженности внешнего магнитного поля, это определяются как материалом из которого сделаны частицы, так и размером частиц (в случае ферромагнетиков размер определяет доменную структуру).

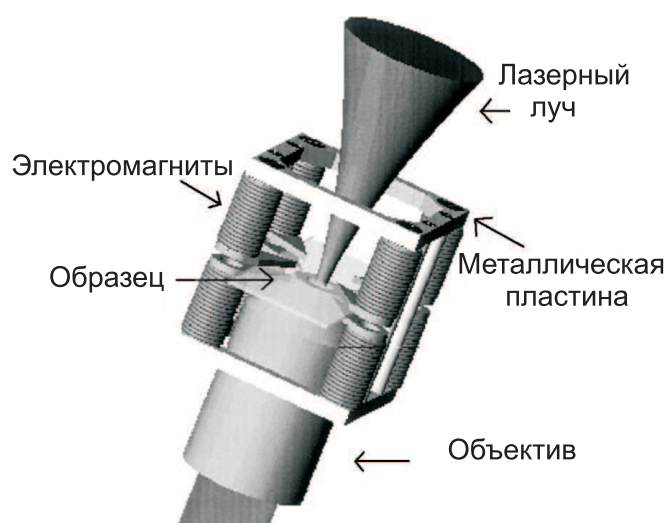


Рис. 5: Магнитооптический пинцет [53].

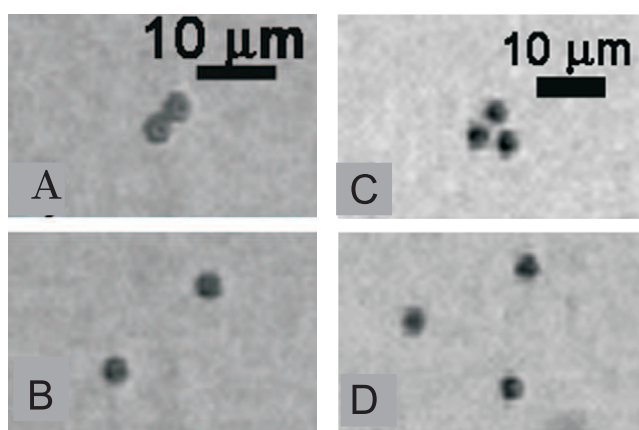


Рис. 6: Две(A) и три (C) оптически захваченные парамагнитные микрочастицы, (B,D) — те же частицы в магнитном поле 12480 А/м [10].

Поле, создаваемое магнитным диполем в немагнитной среде, можно записать [54]:

$$\mathbf{H}_{dip} = \frac{3(\mathbf{M}\mathbf{r})\mathbf{r}}{r^5} - \frac{\mathbf{M}}{r^3}, \quad (39)$$

где $\mathbf{r}$ — вектор, проведенный из центра частицы в произвольную точку пространства, $r = |\mathbf{r}|$. Формула для силы, действующей на магнитный диполь во внешнем магнитном поле $\mathbf{H}$, имеет вид:

$$\mathbf{F} = \nabla(\mathbf{M}\mathbf{H}). \quad (40)$$

Теперь рассмотрим взаимодействие двух магнитных частиц. Учтем, что частицы находятся в поле, являющемся суперпозицией внешнего магнитного поля $\mathbf{H}$ и поля $\mathbf{H}_{dip}(\mathbf{R})$, создаваемого соседней частицей, $\mathbf{R}$ — радиус-вектор, проведенный от одной частицы к другой. Если внешнее поле $\mathbf{H}$ однородное, то в формуле (40) действие оператора дифференцирования на напряженность внешнего поля дает ноль, также равно нулю слагаемое, в котором оператор дифференцирования действует на величину магнитного момента, так как он постоянный и не зависит от расстояния. Тогда выражение для силы, с которой первый диполь действует на второй имеет вид:

$$\mathbf{F} = (\mathbf{M}\nabla)\mathbf{H}_{dip}. \quad (41)$$

Эту формулу можно применить для двух частиц, разнесенных на расстояние R друг от друга, с параллельно направленными магнитными дипольными моментами при произвольной ориентации магнитных моментов относительно радиус-вектора $\mathbf{R}$, соединяющего точки положения диполей. Тогда сила, действующая со стороны первого диполя на второй имеет вид:

$$\mathbf{F} = \frac{3M^2\mathbf{R}}{R^5} + \frac{6\mathbf{M}(\mathbf{M}\mathbf{R})}{R^5} - \frac{15(\mathbf{M}\mathbf{R})^2\mathbf{R}}{R^7}. \quad (42)$$

Введем декартову систему координат, в которой ось Ox направлена вдоль вектора $\mathbf{R}$. Рассмотрим две простейшие ориентации поля: параллельную — когда вектор поля параллелен линии, соединяющей положения ловушек, то есть вдоль оси Ox (см. рисунок 7а), и перпендикулярную — когда вектор поля направлен вдоль оси Oy , перпендикулярной вектору, соединяющему точки положения ловушек (см. рисунок 7б).

В случае параллельной ориентации поля величина силы, действующей на вторую частицу со стороны первой:

$$F_{\parallel} = -\frac{6M^2}{R^4}, \quad (43)$$

а в случае перпендикулярной ориентации:

$$F_{\perp} = \frac{3M^2}{R^4}, \quad (44)$$

Видно, что эти проекции силы имеют разные знаки. Это значит, что направление силы — притяжение или отталкивание, зависит от угла между дипольными моментами частиц и радиус-вектором **R**. К такому же выражению для силы отталкивания пришел автор работы [10]. В этой работе два параллельно направленных магнитных диполя отталкиваются вследствие диполь-дипольного взаимодействия. При равенстве сил магнитного взаимодействия и притяжения оптической ловушки магнитные частицы достигают равновесия. Измерив расстояния между частицами при этом равновесии, с помощью формулы (44) вычислялась зависимость магнитного момента от величины приложенного поля (см. рисунок 8).

Результаты сравнивались с данными, полученными с помощью вибрационного магнитометра — прибора, с помощью которого измерялся магнитный момент определенного количества раствора магнитных микрочастиц, и по данным о концентрации раствора вычислялся магнитный момент отдельных частиц. Результаты хорошо согласовались при низких величинах магнитного поля, но при больших величинах поля магнитный момент, полученный методом оптического пинцета, оказывался больше полученного с помощью магнитометра. Авторы выдвигают предположение, что магнитный момент, полученный с помощью магнитометра, является заниженным, так как не учитывается разброс в направлениях магнитного момента частиц в растворе. С другой стороны, недостатком данной работы является то, что частицы захватывались вблизи поверхности покровного стекла образца, что могло существенно повлиять на результаты измерений.

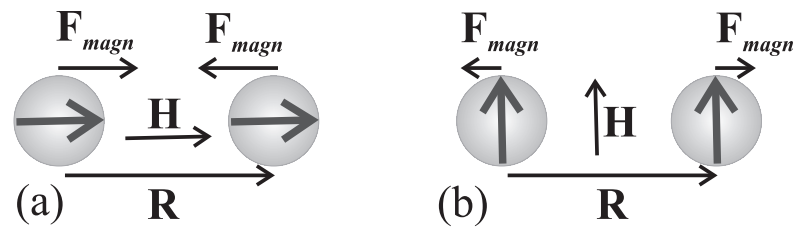


Рис. 7: Расположение магнитных моментов и сил взаимодействия для (а) — параллельной ориентации поля, (б) — перпендикулярной ориентации поля

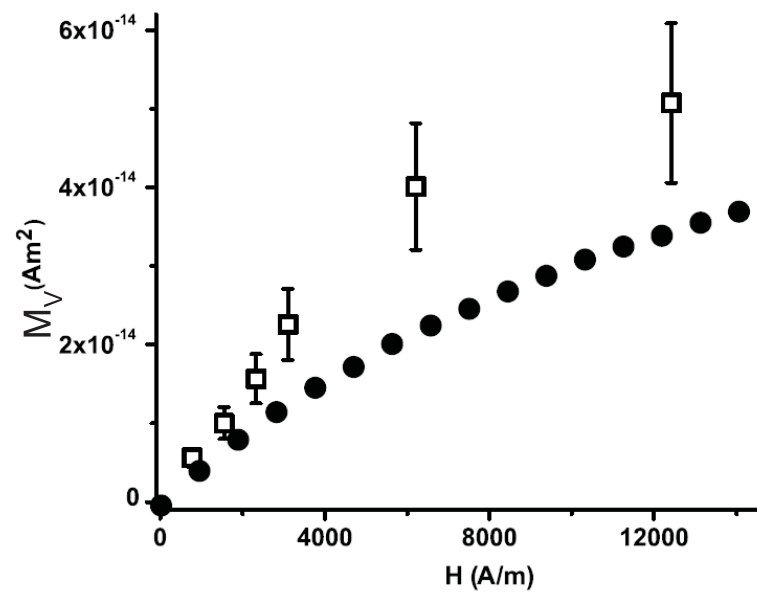


Рис. 8: Зависимость магнитного момента частицы от приложенного поля. Квадратные точки — измерения с помощью оптического пинцета, черные круглые точки — измерения на стандартном магнитометре, усредненные по большому числу частиц [10].

3.5. Изучение свойств эритроцитов методом оптического пинцета

В большинстве работ, посвященных применению метода оптического пинцета, предметом исследования являются биологические объекты. Такое широкое распространение в биофизических приложениях метод оптического пинцета получил благодаря возможности неразрушающего оптического захвата исследуемых образцов. При помощи оптического пинцета изучаются механические свойства молекул ДНК [55], молекулярных моторов [56], проводят спектроскопию комбинационного рассеяния света одиночных живых клеток [57].

Многие живые клетки и другие биологические объекты практически не поглощают в инфракрасном диапазоне длин волн, поэтому для создания ловушек используют лазеры с излучением на длинах волн в так называемом окне прозрачности биотканей 650–1200 нм. С другой стороны, обычно в оптической ловушке интенсивности излучения, сфокусированного в пятно размером около 1 мкм, имеют порядок МВт/см², поэтому важно оценить нагрев захваченных объектов для корректной интерпретации биофизических экспериментов. Существуют работы, специально направленные на изучение эффекта нагрева и негативного воздействия лазерного излучения на биологические объекты. В работе [55] эффект нагревания в оптической ловушке был измерен для липосом, имеющих размер 1 мкм. В сфокусированном в пятно 0,8 мкм лазерном пучке с длиной волны 1064 нм и интенсивностью излучения $\sim 10^7$ Вт/см² липосома, захваченная в оптическую ловушку, нагревалась на $\sim 1,45 \pm 0,15$ К/0,1 Вт. Таким образом, для интенсивностей лазерного излучения, используемых в оптических ловушках, на инфракрасных длинах волн эффект нагревания биологических объектов мал и не носит разрушающего характера.

Самым изучаемым объектом в экспериментах с применением оптического пинцета является кровь. Кровь — это составная жидкость, представляющая собой концентрированную взвесь частиц — форменных элементов крови — в плазме. Плазма крови состоит из воды на 91,5%, солей и мелких органических молекул на 1,5%, высокомолекулярных белков (фибриноген, альбумин, иммуноглобулины) на 7%. Форменными элементами крови являются эритроциты, лейкоциты и тромбоциты. Количественные соотношения составных частей крови следующие: на 1 лейкоцит приходится 25 тромбоцитов и 500 эритроцитов [58]. Реологические свойства крови определяются главным

образом объемными свойствами эритроцитов, характером их поверхностного межклеточного взаимодействия, а также процессами гидродинамического взаимодействия эритроцитов с плазмой.

Для изучения эритроцитов обычно используют инфракрасное лазерное излучение, чаще всего непрерывный лазер на алюмоиттриевом гранате, легированном неодимом АИГ-Nd [59–63], встречаются работы, в которых используют лазер на фториде иттрия-лития с легированием неодимом [64], диодные лазеры с длинами волн в диапазоне 0,8–1 мкм [65], то есть в области спектра, где раствор гемоглобина практически ничего не поглощает. Есть работы с применением фемтосекундных лазеров для управления положением эритроцитов [66], однако показано, что, например, при средних мощностях более 2,8 мВт лазерного излучения с длительностью импульса 30 фс, частотой повторения 82 МГц и длиной волны 800 нм наблюдаются необратимые изменения формы клетки.

3.5.1 Эритроциты: функции и строение

Основными функциями эритроцитов является перенос кислорода из легких к тканям тела и транспорт углекислого газа в обратном направлении. Это происходит за счет наличия в них гемоглобина, который, соединяясь с кислородом воздуха, содержащемся в легочных альвеолах, образует оксигемоглобин. Оксигемоглобин, являясь непрочным соединением гемоглобина с кислородом, легко отдает кислород клеткам организма.

Эритроциты представляют собой безъядерные клетки, имеющие в покое форму двояковогнутого диска, что обеспечивает избыточную площадь поверхности клетки: поверхность эритроцита больше, чем если бы он имел форму шара того же объема. Это способствует прохождению эритроцитов через узкое сечение капилляров, так как клетки легко могут изменить свою форму. Характерные размеры эритроцитов: 7,2–9,2 мкм в длину, 1,7–2,4 мкм в толщину в широкой части на периферии клетки и 0,9 мкм в центре. Объем эритроцита составляет 70–100 мкм³. Содержимое эритроцита — почти насыщенный раствор (около 32% по массе) гемоглобина, обуславливающего красный цвет крови. Важную роль в эритроците выполняет клеточная мембрана, пропускающая газы, ионы и воду. Мембрана эритроцита имеет толщину около 10 нм и представляет собой липидный бислой, пронизанный трансмембранными белками,

и белковый (спектриновый) скелет. Трансмембранные белки контактируют с жидкой средой по обеим сторонам мембраны, образуют каналы, через которые в клетку и из клетки проникают молекулы. Они также выполняют защитную и сигнальную функцию. Спектриновый скелет во многом определяет механические свойства мембраны. Взаимодействие белкового цитоскелета с липидным бислоем мембраны обеспечивает стабильность структуры эритроцита.

Мембрана эритроцитов несет отрицательный поверхностный электрический заряд (ζ -потенциал) [58]. Находясь в электролите, эритроциты притягивают ионы из окружающей среды, таким образом, формируется так называемый двойной электрический слой. Также известно, что поверхностный заряд рассредоточен по мембране эритроцита не равномерно, а отдельными очагами [67].

3.5.2 Измерения эластичности и деформируемости эритроцитов

Одним из традиционных и активно развивающихся направлений в области метода оптического пинцета является изучение и измерение эластичности эритроцитов, а также диагностика изменений механических свойств клеток при заболеваниях [68], под действием лекарственных средств [69], в результате длительного хранения крови [63] и даже из-за воздействия гамма-излучения крови, применяемого для исключения иммунной реакции после переливания крови [70]. Известно, что красные кровяные тельца способны выдерживать огромные напряжения ($3 - 5 \text{ Н/м}^2$) при деформациях, которые они испытывают при прохождении через мелкие сосуды и капилляры. Так как внутреннее строение эритроцитов представляет собой жидкость, основной вклад в сопротивление нагрузкам вносит мембрана клеток. Поэтому способность эритроцитов проходить сквозь мелкие капилляры напрямую зависит от эластичных свойств мембраны. Эластичные свойства мембраны можно определить тремя параметрами: коэффициентом растяжения поверхности K , модулем сдвига μ и жесткостью при изгибе B . Однако за эластичность при деформации в сосудах отвечают лишь K и μ , так как жесткость при изгибе имеет порядок от нескольких $k_B T$ до десятков $k_B T$ и ей можно пренебречь [61].

В работе [60] методом оптического пинцета был измерен модуль сдвига мембраны эритроцита μ . К эритроциту в натрий-фосфатном буферном растворе с двух противоположных краев прикреплялись 2 частицы из диоксида кремния размером 2,1 мкм.

Затем к частицам с помощью оптического пинцета прикладывали заданную силу F , направленную на растяжение клетки. При каждом значении силы по микроскопии определяли изменение диаметра клетки D по сравнению с исходным D_0 (рис. 9а). Авторы показали, что при слабых деформациях ($F \lesssim 15$ пН) зависимость диаметра от силы линейная:

$$D = D_0 - \frac{F}{2\pi\mu}. \quad (45)$$

Аппроксимация экспериментальных (рис. 9б) данных этой зависимостью дала значение $\mu = 2,5 \pm 0,4$ мкН/м. При сильных деформациях данная зависимость уже не применима и необходимо использовать методы численного моделирования (некоторые методы описаны в работах [71–75]). Позже той же научной группой была опубликована работа [61], в которой сообщается о том, что были измерены коэффициент растяжения поверхности K , модуль сдвига μ белкового скелета мембраны эритроцита. На эритроцит прикреплялись три частицы из оксида кремния (2 мкм в диаметре), каждая из которых захватывалась в оптическую ловушку. После этого в кювету с исследуемыми эритроцитами впрыскивалось вещество, растворяющее липидный бислой мембраны эритроцитов. В образце оставался только спектриновый скелет мембраны, на котором были прикреплены диэлектрические сферы. Спектриновый скелет растягивался при приложении к диэлектрическим частицам фиксированных калиброванных сил оптических ловушек, и измерялся коэффициент растяжения поверхности $K \approx 4,8 \pm 2,7$ мкН/м и модуль сдвига $\mu \approx 2,4 \pm 0,7$ мкН/м.

В статье [64] при изучении эластичности мембраны также прикладывали силу через прикрепленные микрочастицы, однако авторы предприняли попытку охарактеризовать пластичные свойства мембраны, связанные с возможными изменениями структуры спектринового скелета клетки под действием внешней силы. Мотивацией стало то, что ярко выраженные пластические деформации клеточных мембран эритроцитов сопровождают ряд генетических заболеваний. В экспериментах к предварительно опустошенной от содержимого клетки сферической мембране эритроцита прилагали периодическую силу путем смещения одной из ловушек с частотой 1–2 Гц. Значение силы определяли по смещению второй частицы из положения равновесия, а удлинение мембраны определяли по расстоянию между частицами. В результате на графике зависимости растяжения мембраны клетки от приложенной силы была полу-

чена петля гистерезиса, говорящая о нелинейном отклике изучаемой системы. Таким образом, можно заключить, что в статье впервые предложено использовать метод активной микрореологии в оптическом пинцете для изучения эластичных свойств мембраны эритроцита, однако авторы сознательно выбрали низкочастотное возмущение, чтобы исключить из рассмотрения любые эффекты, связанные с вязкостью жидкости и самой мембраны. Более систематическое исследование отклика эритроцита приведено в работе [76], также рассмотрено влияние истощения запаса аденозинтрифосфата на механические свойства живой клетки. В ней рассмотрены цельные эритроциты, а диапазон частот, на которых регистрировался их отклик, составлял от долей до десятков герц. Следует отметить, что для прикрепления диэлектрических микрочастиц на мембрану эритроцита необходимо использование различных химических реагентов или инкубирование образцов в течение нескольких часов при низкой температуре [74]. Это может нарушать нормальное функционирование и исходные свойства эритроцита. Поэтому такой способ исследования эластичных и деформационных свойств клеток эритроцитов является возмущающим. Однако даже в такой реализации эксперимента возможно применение оптического пинцета для диагностики заболеваний. Например, в статье [68] показано, что пораженные малярией эритроциты имеют существенно отличающиеся механические свойства по сравнению со здоровыми клетками.

Динамика восстановления исходной формы эритроцита после снятия напряжения рассматривалась, например, в работе [59]. Эритроцит захватывался одновременно в три оптические ловушки и растягивался, как показано на рис. 10(а). Такой тип деформации схож с деформацией эритроцита в капиллярах. Затем ловушки одновременно выключали и измеряли время восстановления формы клетки (см. рис. 10(в)). Было установлено, для молодых клеток время релаксации составляет около 0,16 с, в то время как для старых — 0,35 с. В работе [60] также была рассмотрена динамика восстановления формы эритроцита, чтобы исключить из экспериментов клетки с поврежденной мембраной. В данной работе время релаксации предварительно растянутого эритроцита составило $\tau \cong 0,2$ с.

В работе [77] исследовались механические (вязкость мембраны, сила агрегации) и электрические (толщина двойного электрического слоя, ζ -потенциал) свойства эритроцитов с использованием двухлучевого оптического пинцета. Для измерения вязко-

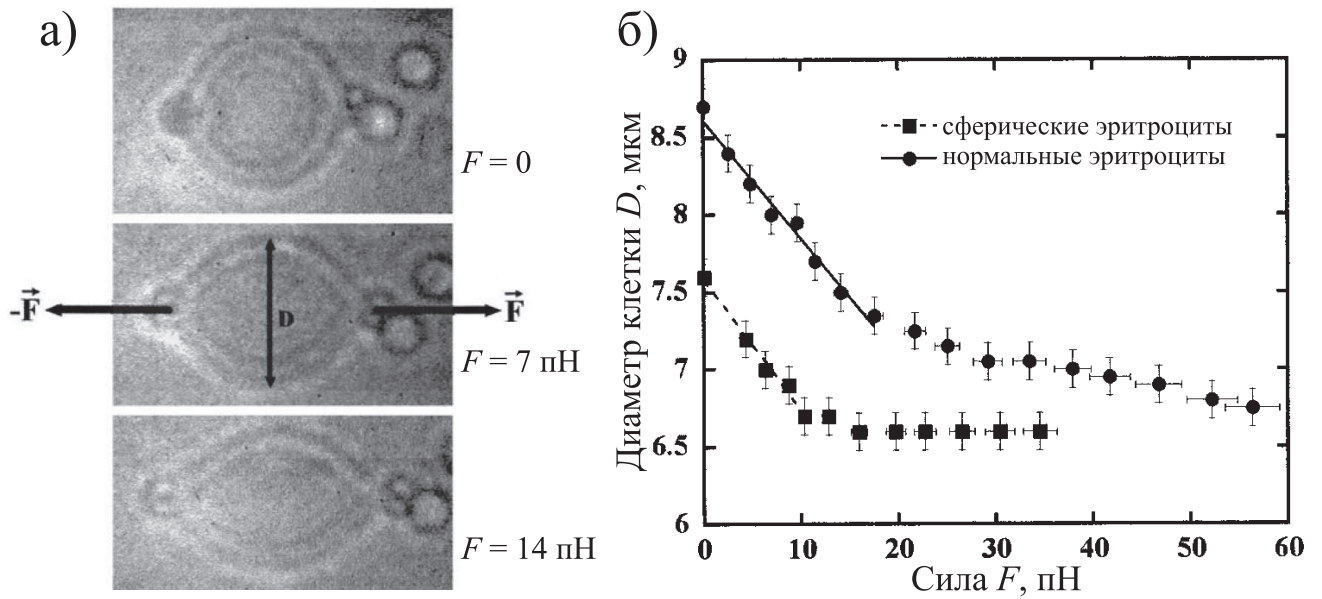


Рис. 9: Иллюстрация экспериментальных результатов, представленных в работе [60]: а) эритроцит с двумя частицами, прикрепленными за диаметрально противоположные края клетки; б) зависимость диаметра эритроцита D от силы F .

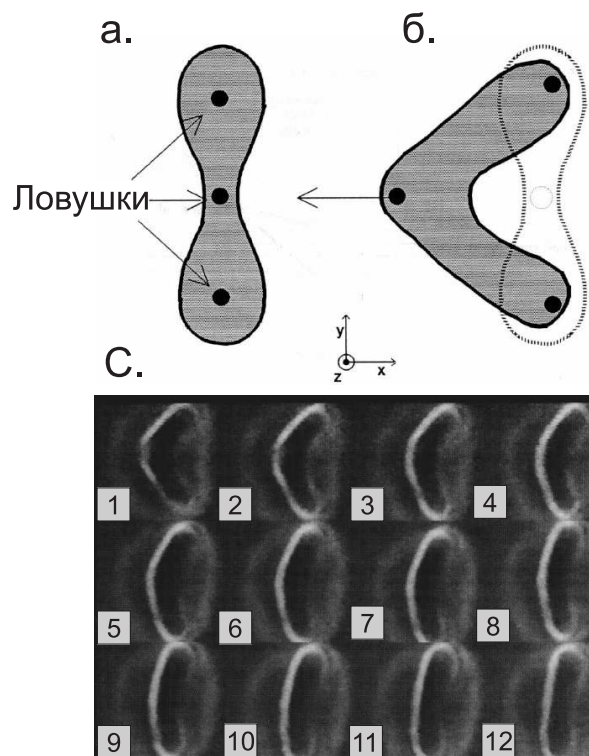


Рис. 10: Схема захвата эритроцита для определения времени восстановления формы. Захват производился одновременно тремя ловушками. а — невозмущенная форма эритроцита до деформации. б — деформированная клетка. в — процесс восстановления формы эритроцита после выключения всех ловушек [59].

сти мембраны к одному из эритроцитов, формирующих двойной агрегат, прикреплялась сферическая диэлектрическая частица. Фиксированная в пространстве первая ловушка захватывала прикрепленную к одному из эритроцитов частицу, вторая ловушка захватывала край второго эритроцита, после чего передвигалась, разъединяя эритроцитарный агрегат. Измеряя смещение диэлектрической частицы при перемещении второй ловушки (см. рис. 11а), вычислялась сила оптических ловушек, необходимая для скольжения одного эритроцита по другому, как функция от скорости передвижения второй ловушки (рис. 11в). Так же вычислялась видимая вязкость мембраны эритроцитов, которая составила $9,5 \cdot 10^{-4}$ пз·см и согласовывалась со значениями, полученными другими методиками [78].

3.5.3 Спектроскопия комбинационного рассеяния эритроцитов

Метод оптического пинцета применяется в спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) света. В работе [65] этот метод применялся для изучения спектров КР красных кровяных телец. Использовалась двухлучевая модификация оптического пинцета, причем захват клеток проводился с помощью излучения лазерного ИК-диода (830 нм), а резонансное рамановское рассеяние возбуждалось тремя линиями аргон-криптонового ионного лазера (488, 514,5 и 568,2 нм). Стоксовы и антистоксовы компоненты проявлялись в инфракрасных спектрах поглощения. В работе основное внимание уделялось концентрации и распределению гемоглобина в эритроците. Было показано, что видимое излучение, используемое для возбуждения рамановского рассеяния, вызывает заметные повреждения клеток. Линии 488 и 514,5 нм оказывали большее воздействие на захваченные эритроциты, чем линия 568,2 нм. При этом инфракрасное излучение не влияло на эритроциты и не изменяло рамановские спектры рассеяния. Связь спектра комбинационного рассеяния эритроцитов с их механическими свойствами исследуется, например, в работах [79, 80].

3.5.4 Агрегация эритроцитов

Одним из характерных свойств эритроцитов является их склонность к *агрегации*. Так, взаимодействуя друг с другом, эритроциты слипаются и образуют так называемые “монетные столбики” (рис.12). В организме непрерывно происходит динамический процесс “агрегация — дезагрегация”, а вязкость крови значительно зависит от

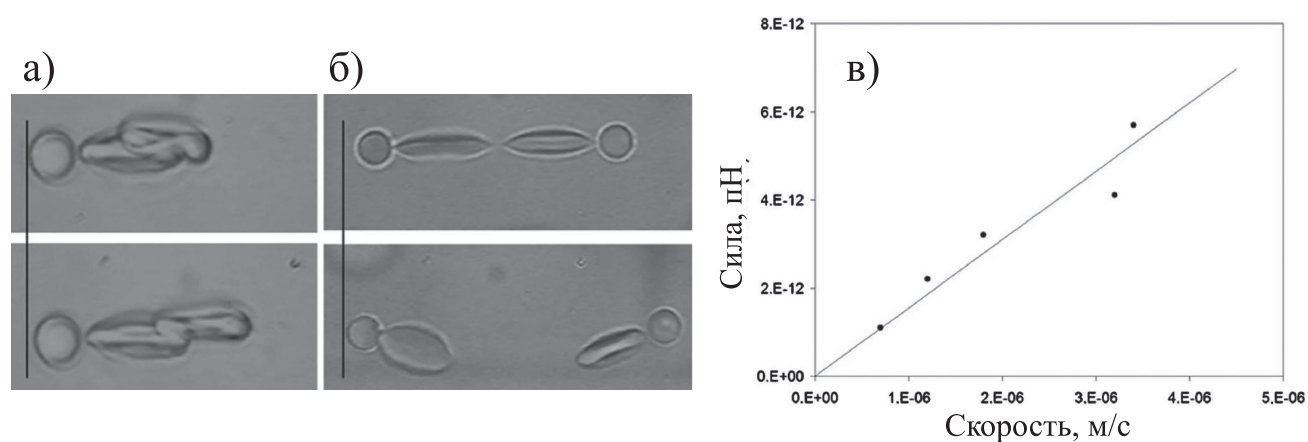


Рис. 11: Применение оптического пинцета для измерения механико-электрических свойств эритроцитов. а — измерение вязкости мембраны эритроцитов в агрегате, б — измерение силы агрегации пары эритроцитов, в — зависимость силы действующей на агрегат эритроцитов от скорости передвижения ловушек. [77].



Рис. 12: Микро-фотография эритроцитов, образовавших “монетный столбик” [81].

агрегации эритроцитов.

Агрегация эритроцитов была обнаружена еще в 18 веке [82], однако систематическое исследование механизмов агрегации началось в конце 20-х годов прошлого века с работы [83]. Было замечено, для образования агрегатов эритроцитов необходимо наличие в плазме крупных молекул, в основном, фибриногена [83]. В отсутствие таких молекул агрегация не происходит. Тем не менее, физические механизмы агрегации эритроцитов до сих пор точно не установлены. Для ее объяснения используют две основные теории. В основу первой, классической *“мостиковой” теории* [84] положено представление о том, эритроциты способны адсорбировать на своей поверхности крупномолекулярные белковые структуры. Сближаясь в кровотоке, эритроциты могут одновременно адсорбировать эти крупные структуры, которые становятся своего рода *“мостиками”*, связывающими эритроциты. Считается, что агрегации эритроцитов в наибольшей мере способствуют молекулы фибриногена, способные к образованию трехкомпонентных агрегатных структур. Полагают, что взаимодействие фибриногена с эритроцитом носит неспецифический характер и осуществляется за счет слабых ван-дер-ваальсовых и водородных связей. Согласно *теории “истощенного слоя”*, напротив, считается, что вблизи поверхности эритроцитов крупных белковых молекул меньше, чем в окружающей плазме крови. При сближении эритроцитов в потоке между ними возникает истощенный слой. Возникающий при этом градиент онкотического давления (доля осмотического давления, создаваемая высокомолекулярными компонентами раствора) приводит к дальнейшему сближению эритроцитов [85].

Одним из самых широко используемых в клинической практике методов непрямого измерения агрегационных свойств крови является оценка скорости оседания эритроцитов (СОЭ). Для этого образец крови помещают в узкую пробирку. Так как кровь уже не находится в потоке, где одновременно с агрегацией постоянно происходила дезагрегация, вызванная сдвиговыми напряжениями, эритроциты постепенно начинают собираться в более крупные агрегаты, взаимодействуя между собой. Через некоторое время фракция плазмы полностью отделяется от эритроцитов, которые в агрегированном состоянии оседают на дно. По времени оседания судят о скорости агрегации [86].

Метод втягивания мембраны эритроцитов в микропипетку является прямым методом измерения деформационных и агрегационных свойств клеток. Однако такой

способ является контактным, что сопряжено с риском неконтролируемых клеточных изменений. К примеру, в работе [87] было обнаружено изменение формы эритроцита после частичного втягивания его в микропипетку. До эксперимента эритроцит имел форму дискоцита (обычную форму), после — форму эхиноцита (клетка имеет шипы одинаковых размеров, располагающиеся равномерно по поверхности эритроцита).

Другим распространенным методом исследования агрегационных свойств эритроцитов является фотометрический метод. С помощью этого метода возможна количественная оценка агрегатного состояния крови — размеров и плотности агрегатов эритроцитов. Метод основан на том, что интенсивность света, прошедшего через слой суспензии эритроцитов, изменяется в соответствии с их агрегатным состоянием. Неагрегирующая суспензия эритроцитов должна рассеивать свет максимально, так как в таком объекте имеется максимальная концентрация рассеивающих центров. В процессе агрегации происходит прогрессивное уменьшение концентрации рассеивающих центров, что приводит к уменьшению интенсивности рассеянного света.

Для получения изображений эритроцитарных агрегатов, а так же сведений о молекулярной структуре мембраны в ряде работ использовалась электронная микроскопия [88] (рисунок 13). Однако при таком способе визуализации терялась возможность исследования функционирующих эритроцитов в естественной среде.

Кинетика спонтанной агрегации изучалась в работе [89]. В эксперименте небольшое количество крови ресуспендировалось в аутологичной плазме для достижения небольших концентраций клеток в суспензии. Капля суспензии помещалась на покровное стекло. После этого сразу же детектировалась кинетика взаимодействия эритроцитов с помощью инвертированного оптического микроскопа. На 24 парах эритроцитов от 4 различных доноров было показано, что спонтанная агрегация клеток представляет собой трехступенчатый процесс. После соприкосновения клетки начинают сближаться вследствие деформации и уплощения краев эритроцитов, далее клетки начинают “наползать” друг на друга. Максимальная скорость скольжения достигалась примерно в середине перекрытия эритроцитов и составляла в среднем около 0,35 мкм/с. Скольжение практически останавливалось при достижении почти полного перекрытия, и затем происходило с уже намного меньшей скоростью. Однако в данной работе не контролировалось наличие начальной скорости клеток при их взаимодействии, которую они приобретали в результате действия силы тяжести.

Метод оптического пинцета можно рассматривать в качестве альтернативного способа изучения эритроцитов и их агрегации. Этот метод позволяет одновременно проводить количественные измерения агрегационных и деформационных свойств эритроцитов в естественной для них среде, а также визуализировать эксперимент в режиме реального времени. Методом оптического пинцета возможно экспериментальное исследование одиночных эритроцитов, не взаимодействующих с подложкой, зондом, микропипеткой или другими клетками. Несмотря на то, что явление агрегации эритроцитов интенсивно изучалось на протяжении последних 20 лет, попытки определения механизмов агрегации методом оптического пинцета представлены в единичных работах [77, 90]. В работе [90] была реализована двухлучевая модификация оптического пинцета. Использовался АИГ-Nd лазер (1064 нм), мощность, приходящаяся на каждую из ловушек, составляла около 100 мВт. Кровь четырех здоровых доноров центрифугировалась, эритроциты отделялись от плазмы, затем изготавливалась суспензия из той же плазмы или различных полимерных растворов, но с малой концентрацией эритроцитов. Из такой суспензии готовился образец. Типичный эксперимент заключался в следующем. В каждую из ловушек захватывался эритроцит, затем ловушки сближались до соприкосновения клеток, после чего ловушки выключались, и происходило образование двойного агрегата в течение 3–5 секунд. Далее агрегат разрывали с помощью тех же ловушек, разводя эритроциты в противоположные стороны со скоростью около 5 мкм/с. Наблюдения показали, что в плазме разрыв агрегата возможен только путем соскальзывания одного эритроцита по другому. Разъединение агрегата в направлении, перпендикулярном к мембране, не представлялось возможным. Более того, в большинстве случаев полного разъединения агрегата эритроцитов не наблюдалось. Чаще всего оставались небольшие “связки” между клетками (см. рисунок 14), что дает еще один аргумент в пользу “мостиковой” теории. Такое же поведение эритроцитов при разъединении агрегата методом оптического пинцета наблюдалось в работе [77] (рисунок 11в). Также была замечена зависимость поведения агрегата при разрыве от времени формирования эритроцита при выключенных ловушках. Разрыв агрегата происходил только тогда, когда время формирования было меньше 8 секунд. В экспериментах, где эритроциты были взвешены в различных полимерных растворах, поведение агрегата при разрыве было таким же, как и в плазме, за исключением разницы в силе агрегации эритроцитов. Например, при повышении концентрации

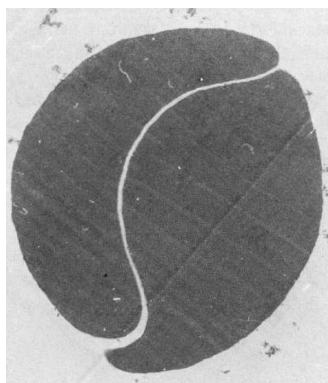


Рис. 13: Изображение эритроцитарного агрегата, полученное методом электронной микроскопии.

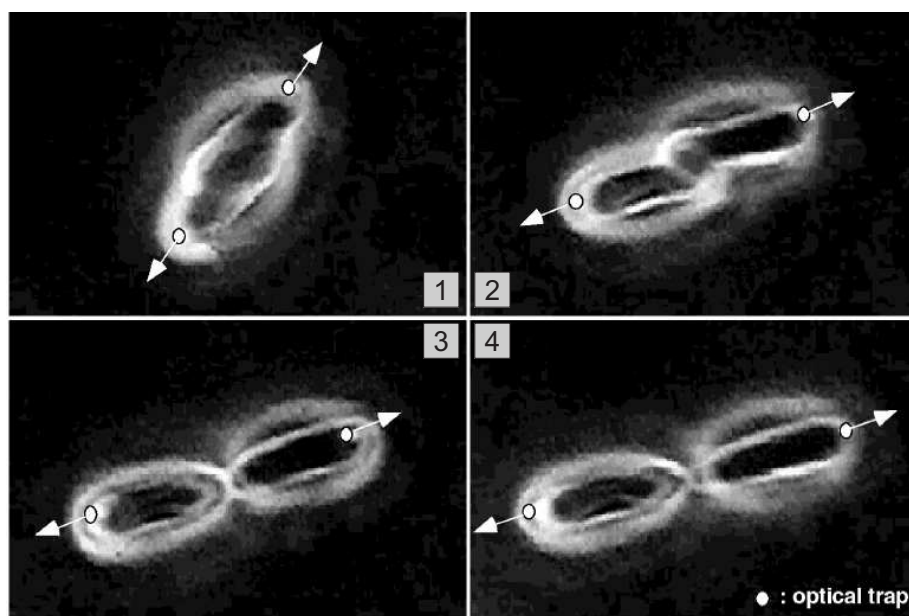


Рис. 14: Дезагрегация эритроцитов методом оптического пинцета [90].

фибриногена усиливалось взаимодействие эритроцитов, и скорость разведения оптических ловушек для разъединения агрегата необходимо было уменьшать.

Авторы [90] считают, что данные наблюдения подтверждают гипотезу о том, что во время агрегации эритроцитов происходит формирование мостиков. Однако они не опровергают гипотезу об агрегации за счет “истощенной зоны”, предполагая, что процесс агрегации может быть двухступенчатым. Сначала механизм “истощенной зоны” способствует сближению клеток на расстояние, на котором возможно образование перекрестных мостиков, в результате чего происходит агрегация.

В работе [77] была продемонстрирована возможность измерения максимальной силы агрегации для пары эритроцитов. К обоим эритроцитам в двойном агрегате прикреплялись диэлектрические частицы, захват которых в оптические ловушки более эффективен и, соответственно, позволяет прикладывать большие силы. Среднее значение для силы агрегации двух эритроцитов вычислялось непосредственно по смещению диэлектрических частиц из положения равновесия (рисунок 11в) при передвижении ловушек в противоположные стороны и составило 14 ± 10 пН.

Описанная работа [90] является единственной попыткой исследования агрегации эритроцитов методом оптического пинцета без использования химической обработки клеток и прикрепления к ним диэлектрических сфер. Однако в этой работе статистика измерений крайне мала: в ходе работы использовались образцы крови четырех доноров. Также не было проведено количественных оценок сил агрегации и дезагрегации эритроцитов при разведении их друг относительно друга с помощью оптических ловушек.

4. Применение оптического пинцета для измерения пондеромоторных сил, действующих на микрочастицы со стороны ближнеполюсной компоненты электромагнитного поля вблизи границы раздела сред

В последние годы растет интерес к методам оптического манипулирования с помощью ближнего поля. В частности, большое количество работ посвящено изучению поведения частиц, локализованных вблизи поверхности, где реализуется полное внутреннее отражение [91–93]. Применение метода фотонно-силовой микроскопии для изучения воздействия на ближнего поля на пробную частицу вблизи поверхности впервые опи-

сано в работе [91]. Авторы показывают, что при полном внутреннем отражении лазерного излучения от границы раздела стекла с водой, возникает сила, действующая на частицу, которую в эксперименте удерживали оптической ловушкой в воде вблизи границы раздела. Эта сила имеет две составляющие, первая — является силой градиентной природы, сдвигает частицу к поверхности, вторая — связана с рассеянием излучения на частице — направлена вдоль границы раздела. Таким образом, со стороны затухающего поля на частицы действуют силы, которые могут иметь применение, в частности, в методах оптической сортировки. Для увеличения силового воздействия на частицу можно использовать поверхностно-активные структуры, в которых возможно распространение поверхностных электромагнитных волн.

4.1. Общие свойства поверхностных электромагнитных волн

Поверхностными электромагнитными волнами, или поверхностными поляритонами, называют волны, распространяющиеся вдоль границы раздела двух разнородных сред и существующие одновременно в них обеих [94]. Поле этих волн локализовано вблизи поверхности и экспоненциально затухает по обе стороны от нее.

Благодаря высокой локализации поверхностных поляритонов и, как следствие, значительному усилению поля, они вызывают интерес в нелинейной оптике [95], а благодаря высокой чувствительности к изменениям свойств границы — при разработке оптических сенсоров [96].

Поверхностная электромагнитная волна может возбуждаться на границе среды с отрицательной действительной частью диэлектрической проницаемости. Такие среды в контексте поверхностных волн называют поверхностно-активными.

Отрицательная диэлектрическая проницаемость присуща, в частности, металлам на частотах, лежащих ниже плазменной, а также сильно легированным полупроводникам [94]. Поверхностные волны при этом называют поверхностными плазмон-поляритонами, поскольку в этом случае отрицательная диэлектрическая проницаемость определяется поляризуемостью газа свободных электронов.

Иным примером поверхностно-активных сред служат, например, диэлектрики и полупроводники в среднем ИК-диапазоне, где поверхностные волны, так называемые фонон-поляритоны, возбуждаются при взаимодействии света с атомной решеткой [97].

Поверхностные волны в видимом диапазоне можно возбуждать на искусственно

созданных поверхностно-активных средах – одномерных фотонных кристаллах [98, 99]. Причем свойства таких волн существенно отличаются от обсуждаемых выше. В частности, они могут возбуждаться как в ТМ-, так и в ТЕ-поляризациях.

В силу граничных условий поляритон не может быть возбужден объемной волной, распространяющейся в поверхностно-активной среде. Поэтому при световом возбуждении поверхностных волн необходимо использовать специальные методы, которые можно разделить на две основные группы: дифракционные и призмные [100].

В первом случае на поверхностно-активную среду наносится дифракционная решетка. Если волна, претерпевшая дифракцию на такой решетке, направлена вдоль поверхности, то она представляет собой поверхностный поляритон. В случае призмных методов объемная волна, возбуждающая поверхностный поляритон, падает из среды с показателем преломления, большим показателя преломления, на границу раздела со средой с меньшим показателем, и испытывает полное внутреннее отражение. Однако в этом случае часть энергии излучения может перейти в поверхностную волну. При этом возможны две принципиальные схемы, изображенные на рисунке 15.

В более популярной схеме Кречмана тонкий слой поверхностно-активной среды 2 расположен между призмой 3 и диэлектриком 1. Если толщина этого слоя достаточно мала (обычно она составляет несколько десятков нанометров), поле объемной волны, распространяющейся в призме, способно возбуждать поверхностные волны на противоположной грани слоя.

В схеме Отто слой диэлектрика 1 расположен между поверхностно-активной средой 2 и призмой 3. Благодаря тому, что поле поверхностной волны в этой геометрии убывает на масштабах, сравнимых с шириной диэлектрического слоя, этот метод, в частности, находит применение в тех задачах, где помимо возбуждения поверхностных волн необходимо добиться их обратного преобразования в объемные [101].

4.2. Поверхностные плазмон-поляритоны

Усиление поля при возбуждении поверхностных плазмон-поляритонов может значительно увеличивать силы, действующие на частицы в такой геометрии.

В работе [102] было показано, что золотая частица диаметром 250 нм, находясь в поле поверхностного плазмон-поляритона, приобретает скорость направленного движения вплоть до 20 мкм/с. Схема установки, используемой в эксперименте, изображе-

на на рисунке 16а. Поверхностный плазмон-поляритон распространяется на границе золотой пленки толщиной 55 нм. Во избежание адгезии золотых наночастиц поверхность дополнительно покрыта слоем диоксида кремния толщиной 5 нм.

В поле поверхностной волны на частицу действует сила, связанная со световым давлением, толкающая ее в направлении, обозначенном осью Ox . Перпендикулярная составляющая связана с тем, что золотая частица обладает высокой поляризуемостью, и в неоднородном электромагнитном поле на нее действует градиентная сила, направленная к максимуму интенсивности. В результате частица локализуется вблизи поверхности и приобретает скорость направленного движения вдоль оси Ox . Экспериментально полученная зависимость этой скорости от угла падения лазерного излучения изображена на рисунке 16б. Показанный также угловой спектр отражения свидетельствует о возбуждении поверхностной волны. Различие в полученном экспериментально и рассчитанном теоретически спектрах отражения авторы объясняют расходимостью пучка.

Измерение сил, действующих на частицы вблизи поверхностных электромагнитных волн, может быть проведено методом фотонно-силовой микроскопии. Так, в 2006 году была опубликована работа [103], где были измерены силы, действующие на полистироловые частицы в поле поверхностного плазмон-поляритона, возбужденного на границе золотой пленки толщиной 40 нм. Схема экспериментальной установки изображена на рисунке 17а. Для возбуждения поверхностной волны авторы использовали лазерное излучение с длиной волны 633 нм. Размер диэлектрических частиц составлял при этом от 600 нм до 4,5 мкм. Было показано, что в условиях резонанса силы, действующие на частицы вблизи поверхности, увеличиваются в 40 раз относительно нерезонансного освещения. На рисунке 17б показано изменение профиля потенциальной энергии при возбуждении на золотой пленке поверхностной волны. Первый столбец соответствует частице, захваченной на расстоянии $h = 500$ нм до поверхности, второй — $h = 300$ нм. Характерные силы, наблюдаемые авторами, составили сотни фемтоньютон.

В работе [104] была реализована двумерная локализация диэлектрических частиц, основанная на возбуждении поверхностных волн в золотых дисках, нанесенных на поверхность призмы. На рисунке 18 изображена схема такого захвата. В направлении, перпендикулярном поверхности, на частицы действует градиентная сила, соот-

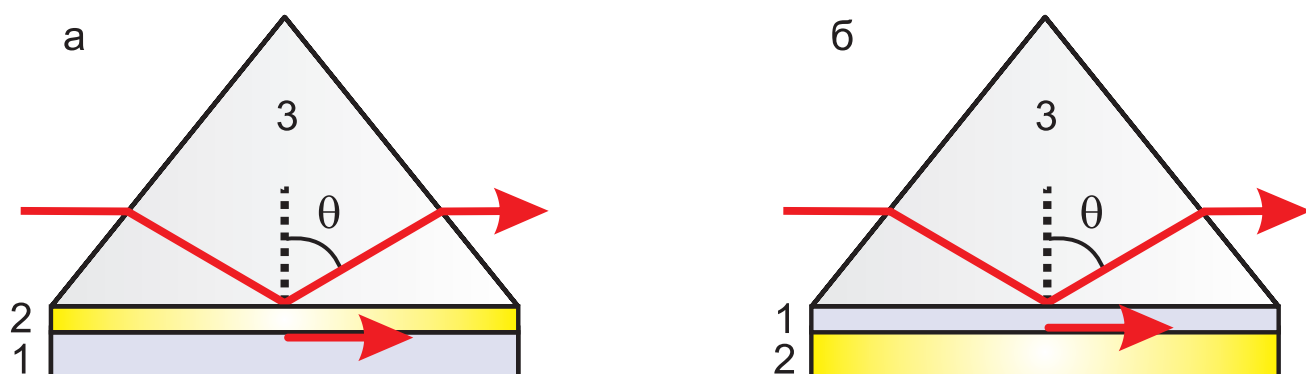


Рис. 15: Призменный метод возбуждения поверхностных волн: а – схема Кречманна; б – схема Отто. 1 – диэлектрик; 2 – поверхностно-активная среда; 3 – призма.

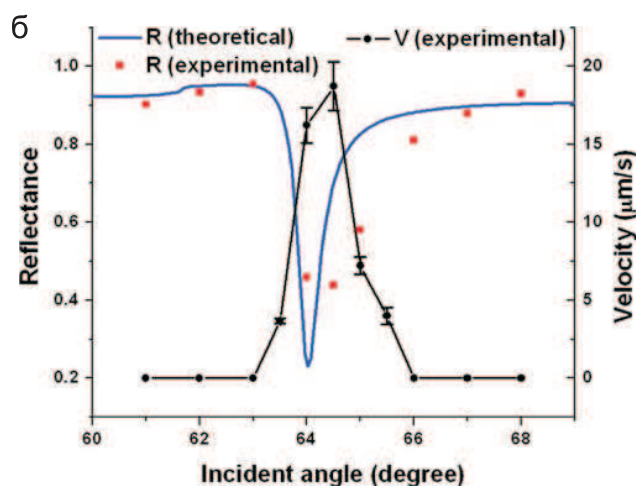
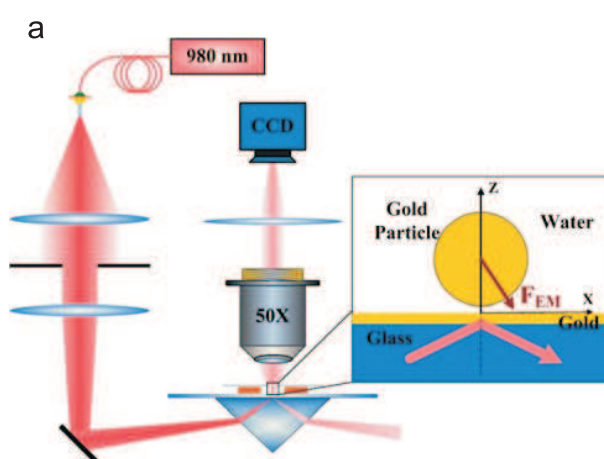


Рис. 16: Управление золотой наночастицей посредством поля поверхностного плазмон-поляритона: а – схема экспериментальной установки; б – зависимость коэффициента отражения и скорости частицы от угла падения лазерного излучения [102].

ветствующая экспоненциальному затуханию поля поверхностной волны. В плоскости поверхности действуют сила, связанная с давлением света, и добавка, соответствующая градиенту поля в поперечном направлении.

Возбуждению поверхностного плазмон-поляритона соответствует узкий провал как в частотном, так и в угловом спектре отражения от металлической пленки, положение и глубина которого зависят от оптических свойств границы. Этим обусловлено то, что одной из основных областей применения плазмонного резонанса являются оптические сенсоры [96]. Чувствительность такого метода ограничена шириной плазмонного резонанса, которая, в свою очередь, определяется поглощением в металле. Преодолеть это ограничение оказалось возможным, используя искусственно созданные поверхностно-активные среды – одномерные фотонные кристаллы.

4.3. Поверхностные электромагнитные волны и волноводные моды в одномерных фотонных кристаллах

Области отрицательной диэлектрической проницаемости в фотонных кристаллах соответствует запрещенная зона. Объемные электромагнитные волны на длинах волн, лежащих в этих зонах, не распространяются, однако, в этом диапазоне частот могут существовать решения, представляющие собой поверхностные волны и волноводные моды [99, 105]. В связи с тем, что поглощение в фотонном кристалле может быть намного меньше, нежели в металлах, практически вся энергия возбуждающего излучения может перейти в энергию поверхностной волны или волноводной моды. Кроме того, для фотонных кристаллов характерен более узкий провал, соответствующий возбуждению этих состояний, в угловом и частотном спектрах отражения. Это позволяет наблюдать даже незначительные изменения оптических свойств границы.

Например, в работе [106] были исследованы поверхностные волны и волноводные моды одномерного фотонного кристалла на основе пористого кремния. Возбуждение проводилось в схеме Отто на границе с воздухом. Было показано, что спектр отражения значительно меняется при пропускании через воздушный слой паров спирта.

Иной особенностью поверхностных волн и волноводных мод в фотонных кристаллах является то, что положение резонанса особенно чувствительно к свойствам граничного слоя. В связи с этим свойством в работе [107] было предложено использовать фотонные кристаллы для характеристики тонких пленок, напыленных на их поверх-

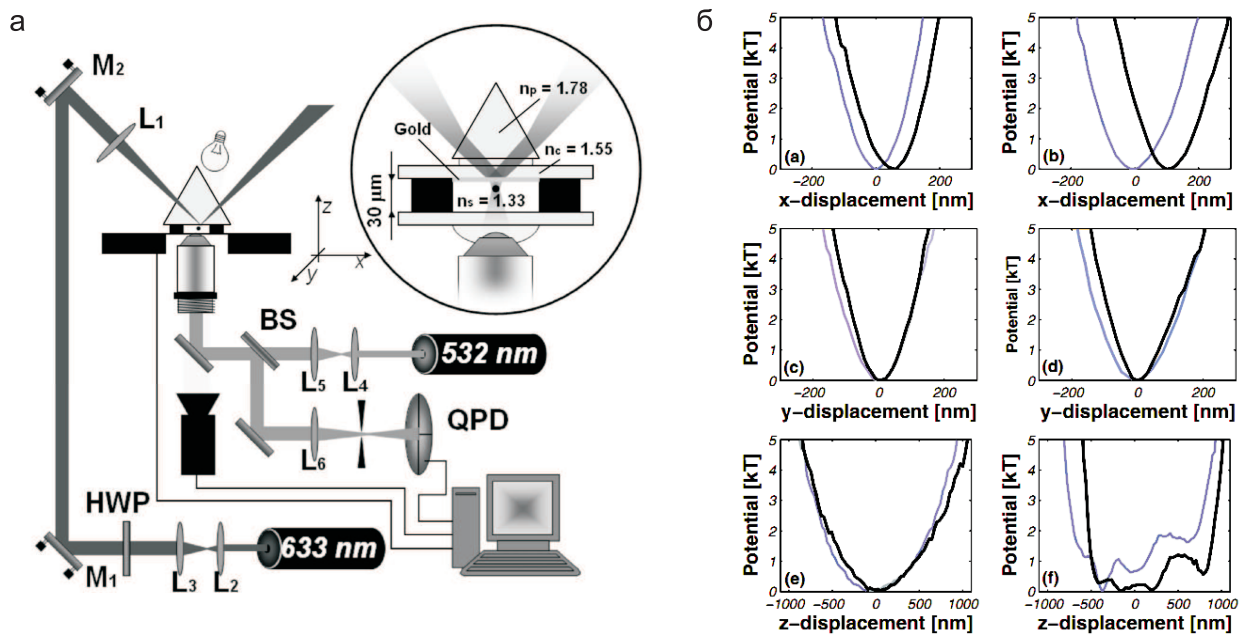


Рис. 17: Измерение сил, действующих на диэлектрическую частицу в поле поверхностных плазмон-поляритонов: а) схема экспериментальной установки; б) профиль потенциальной энергии в отсутствии (серые линии) и в присутствии (черные линии) поверхностной волны. Излучение с длиной волны 532 нм используется для создания оптической ловушки и детектирования положения частицы на квадрантном фотодиоде QPD. Лазер с длиной волны 633 нм фокусируется на поверхности золотой пленки, возбуждая поверхностный плазмон-поляритон [103].

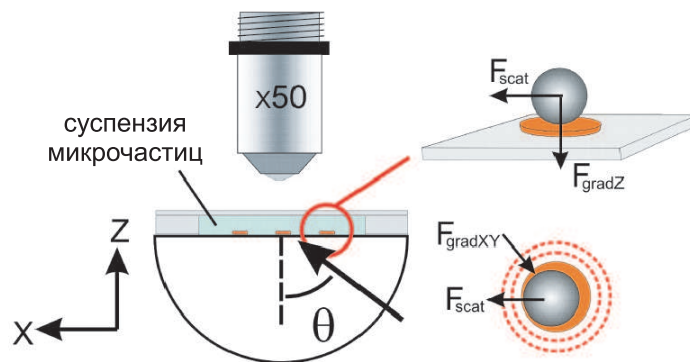


Рис. 18: Схема установки для наблюдения оптического захвата диэлектрических микро-частиц в поле поверхностных плазмон-поляритонов. Частицы локализуются вблизи золотых дисков, расположенных на верхней грани призмы. В направлении, перпендикулярном поверхности, на частицы действует градиентная сила F_{gradZ} , соответствующая экспоненциальному затуханию поля поверхностной волны. В плоскости поверхности действуют сила F_{scat} , связанная с давлением света, и добавка F_{gradXY} , соответствующая градиенту поля в поперечном направлении [104].

ность.

5. Задачи диссертационной работы

Анализ литературы показывает, что актуальной задачей является разработка метода измерения зависимости характеристик магнитных частиц в жидкости от внешнего магнитного поля и расстояния между ними. Интересны для изучения силы магнитного взаимодействия между частицами, магнитная восприимчивость частиц и наведенные магнитные моменты. Для измерения данных характеристик в исследуемых пространственных масштабах видится целесообразным использовать метод оптического, или лазерного, пинцета. Однако, фундаментальная задача о броуновском движении двух взаимодействующих силами магнитной природы частиц во внешнем потенциале лазерных ловушек сама по себе является не решенной и в то же время ее решение является актуальным и востребованным. Таким образом, выбранный подход подразумевает создание модификации установки двухлучевого оптического пинцета для изучения магнитного взаимодействия микрочастиц и измерение параметров магнитного взаимодействия пары оптически захваченных микрочастиц, теоретический анализ влияния магнитного взаимодействия на статистику движения частиц в оптическом пинцете. Этому посвящена вторая глава диссертационной работы. Рассматривается модель двух магнитных микрочастиц, локализованных в двух оптических ловушках, расположенных на заданном расстоянии друг от друга. Для данной модели проводится теоретический анализ статистики броуновских смещений из центров оптических ловушек и выявление влияния сил взаимодействия между частицами на эту статистику. Разрабатывается метод определения сил взаимодействия между частицами с помощью анализа корреляционных функций броуновских смещений из центров оптических ловушек. Изучается влияние внешней периодической силы, приложенной к одной частице, на движение второй частицы.

Литературный обзор показывает, что самое активное распространение оптический пинцет получил в клеточной биологии, как инструмент, позволяющий управлять клетками в естественной для них среде. Так, актуальной проблемой является измерение вязко-упругих характеристик эритроцита, т.к. они определяют многие свойства кровообращения. Оптический пинцет дал возможность исследовать отклик эритроцита на внешнее механическое воздействие. Однако нет информации об исследовании такого отклика при воздействии с частотами выше 100 Гц. Также кровообращение

определяется другой характеристикой – это их агрегация, т.е. склонность к слипанию. Есть несколько работ, где показано, что с помощью оптического пинцета можно провести искусственную дезагрегацию, при определенных условиях измерена сила, необходимая для разделения двух клеток. Однако, существуют достоверные данные, что по небольшим капиллярам эритроциты могут двигаться в агрегированном состоянии с непостоянной площадью контакта клеток. Поэтому по-прежнему остается интересным измерение того, какую силу нужно приложить к клеткам, чтобы сдвинуть их друг относительно друга в агрегате на определенное расстояние. Данные проблемы являются целями третьей главы.

Целью четвертой главы является фотонно-силовая микроскопия волноводных мод фотонного кристалла. В рамках работы необходимо провести характеризацию исследуемых образцов методом спектроскопии и угловой спектроскопии коэффициента отражения, а также отработать методику фотонно-силовой микроскопии электромагнитного поля вблизи границы раздела жидкость/фотонный кристалл. В процессе выполнения работы необходимо собрать установку оптического пинцета для фотонно-силовой микроскопии со схемой детектирования нанометровых смещений захваченных частиц, совмещенную с установкой для угловой спектроскопии коэффициента отражения образца. Нужно определить частотно-угловое положение резонанса возбуждения волноводной моды методами спектроскопии и угловой спектроскопии коэффициента отражения ФК и исследовать влияние электромагнитного поля вблизи поверхности раздела фотонный кристалл—вода на статистику движения захваченных в оптическую ловушку микрочастиц.

Глава II

Изучение силового взаимодействия магнитных микрочастиц методом оптического пинцета

Данная глава работы посвящена развитию метода оптического пинцета для изучения парного взаимодействия магнитных микрочастиц в жидкости. В главе рассмотрены корреляционные функции броуновских смещений пары локализованных на заданном расстоянии друг от друга оптическим пинцетом частиц. Показано, что корреляции в движении микрочастиц существенным образом определяются градиентом силового, в частности магнитного, взаимодействия между частицами, величина сил может быть определена с точностью единиц фН, а магнитный момент микрочастиц с точностью единиц $\text{фА}\cdot\text{м}^2$.

1. Получение аналитического вида корреляционных функций броуновского движения взаимодействующих магнитных микрочастиц в оптическом пинцете

Рассмотрим две одинаковые сферические магнитные микрочастицы в оптических ловушках, как показано на рисунке 19. Пусть ось x проведена через центры оптических ловушек, а L — расстояние между этими ловушками. Из-за наличия тепловых флуктуаций и силы магнитного взаимодействия частицы могут сдвигаться из центров оптических ловушек на расстояния $x_{1,2}$. Тогда расстояние между частицами равно:

$$r = L + x_2 - x_1. \quad (46)$$

Считая, что $|x_{1,2}| \ll L$, здесь и далее движение частиц в ортогональной оси x плоскости не учитывается. Тогда проекция силы магнитного воздействия на вторую частицу со стороны первой зависит от расстояния между ними и выражается величиной $F_m(r)$. Согласно третьему закону Ньютона, сила, действующая на первую частицу со стороны второй, имеет такую же величину и противоположна по направлению. Величины смещений частиц из центров оптических ловушек можно записать

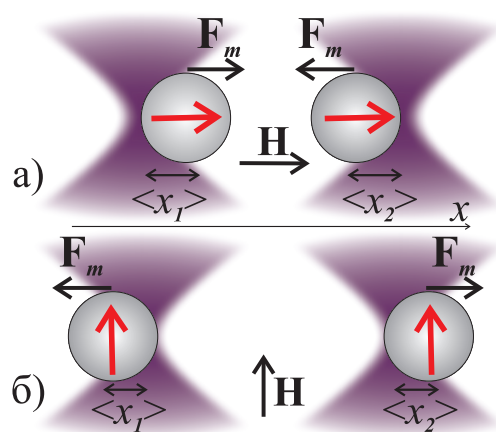


Рис. 19: Схематическое изображение двух захваченных магнитных частиц в оптические ловушки в присутствии внешнего магнитного поля $\mathbf{H}$. а) Параллельная конфигурация — линии напряженности внешнего поля направлены вдоль оси Ox , соединяющей центры ловушек. б) Перпендикулярная конфигурация — линии напряженности ортогональны этой оси. Магнитные моменты частиц показаны стрелками внутри частиц, $\langle x_{1,2} \rangle$ — средние величины смещений частиц из центров оптических ловушек вследствие действия силы магнитного взаимодействия $\mathbf{F}_m$

как:

$$x_{1,2} = \langle x_{1,2} \rangle + \Delta x_{1,2}, \quad (47)$$

где $\langle x_{1,2} \rangle$ — величины средних смещений частиц из центров оптических ловушек, а $\Delta x_{1,2}$ — смещения, связанные с броуновскими флуктуациями. Ненулевые значения средних смещений являются следствием магнитного взаимодействия между частицами, поэтому в состоянии равновесия можно записать:

$$F_m(R) = k \langle x_2 \rangle = -k \langle x_1 \rangle, \quad (48)$$

где k — эффективная жесткость оптической ловушки, а $R = L + \langle x_2 \rangle - \langle x_1 \rangle$ — расстояние между точками равновесия частиц в оптических ловушках, то есть в этом положении сила магнитного взаимодействия уравновешена возвращающей силой оптической ловушки. Но из-за броуновского движения частиц вокруг положений равновесия происходят постоянные изменения расстояния между частицами. Разложим силу магнитного взаимодействия микрочастиц в ряд по малому параметру $(\Delta x_2 - \Delta x_1) / R$:

$$\begin{aligned} F_m(r) = F_m(R) + \frac{dF_m}{dr}(R) \cdot (\Delta x_2 - \Delta x_1) + \\ + \frac{d^2 F_m}{2dr^2}(R) \cdot (\Delta x_2 - \Delta x_1)^2 + \dots \end{aligned} \quad (49)$$

Броуновские смещения микрочастиц можно оценить из теоремы о равномерном распределении энергии по степеням свободы, так среднее значение потенциальной энергии единичной микрочастицы в оптической ловушке с жесткостью k можно записать как $\langle U \rangle = k \langle \Delta x^2 \rangle / 2 = k_B T / 2$. Обычно жесткости оптической ловушки составляют величины порядка единиц пН/мкм, тогда среднеквадратичное отклонение $\sqrt{k_B T / k} \lesssim 0.1$ мкм, что много меньше расстояния между частицами $R \gtrsim 1$ мкм. Поэтому в дальнейшем рассмотрении ограничимся первыми двумя членами в разложении (49):

$$F_m(r) \approx F_m(R) + k' (\Delta x_2 - \Delta x_1), \quad (50)$$

где $k' = \frac{dF_m}{dr}(R)$ — есть величина проекции на ось x градиента силы магнитного взаимодействия микрочастиц в точке $r = R$.

Для описания движения микрочастиц используем подход, описанный в работах

[37, 47, 108–110]. Запишем уравнения Ланжевена для движения магнитных микрочастиц:

$$\begin{pmatrix} \dot{x}_1 \\ \dot{x}_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A_{11} & A_{12} \\ A_{21} & A_{22} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} f_1(t) - kx_1 - F_m(r) \\ f_2(t) - kx_2 + F_m(r) \end{pmatrix}, \quad (51)$$

где компоненты тензора подвижности в приближении Озеена равны $A_{11} = A_{22} = 1/6\pi\eta a$ и $A_{12} = A_{21} = 1/4\pi\eta R$, a — радиус частиц, η — коэффициент динамической вязкости окружающей частицы жидкости, $f_{1,2}(t)$ — случайные броуновские силы которые удовлетворяют следующим корреляционным условиям:

$$\begin{aligned} \langle f_i(t) \rangle &= 0, \\ \langle f_i(t)f_i(t+\tau) \rangle &= \frac{2A_{11}}{A_{11}^2 - A_{12}^2} k_B T \delta(\tau), \\ \langle f_i(t)f_j(t+\tau) \rangle &= -\frac{2A_{12}}{A_{11}^2 - A_{12}^2} k_B T \delta(\tau), \end{aligned} \quad (52)$$

где $i, j = 1, 2$ и $i \neq j$.

Для того чтобы решить уравнения Ланжевена (51), введем координаты, соответствующие коллективному и относительному движению микрочастиц:

$$\begin{aligned} X_1 &= (\Delta x_1 + \Delta x_2)/\sqrt{2}, \\ X_2 &= (\Delta x_1 - \Delta x_2)/\sqrt{2}. \end{aligned} \quad (53)$$

Используя выражение (50), уравнения движения для этих координат можно записать следующим образом:

$$\begin{aligned} \dot{X}_1 &= (A_{11} + A_{21}) \left(\frac{f_1(t) + f_2(t)}{\sqrt{2}} - kX_1 \right), \\ \dot{X}_2 &= (A_{11} - A_{21}) \left(\frac{f_1(t) - f_2(t)}{\sqrt{2}} - (k - 2k')X_2 \right). \end{aligned} \quad (54)$$

Как видно из полученных выражений, сила магнитного взаимодействия не входит в уравнение для коллективной моды движения X_1 , а влияет только на относительную моду движения X_2 . Переход к относительным модам позволяет получить функцию корреляции смещений магнитных микрочастиц из положения равновесия:

$$g(\tau) = \frac{\langle \Delta x_1(t) \Delta x_2(t+\tau) \rangle}{\sqrt{\langle \Delta x_1^2 \rangle \langle \Delta x_2^2 \rangle}} = \frac{k - 2k'}{2(k - k')} e^{-\frac{k(1+\varepsilon)}{\gamma}\tau} - \frac{k}{2(k - k')} e^{-\frac{(k-2k')(1-\varepsilon)}{\gamma}\tau}, \quad (55)$$

где $\varepsilon = A_{12}/A_{11}$ и $\gamma = 1/A_{11}$, дисперсии смещений частиц выражаются:

$$\langle \Delta x_{1,2}^2 \rangle = \frac{k_B T (k - k')}{k(k - 2k')}. \quad (56)$$

Следует заметить, что корреляционная функция зависит от градиента силы магнитного взаимодействия $k' = \frac{dF_m}{dr}(R)$, и напрямую не зависит от постоянной составляющей этой силы $F_m(R)$. Также можно записать выражение для автокорреляционной функции смещений каждой из частиц:

$$G(\tau) = \frac{\langle \Delta x_1(t) \Delta x_1(t + \tau) \rangle}{\langle \Delta x_1^2 \rangle} = \frac{k - 2k'}{2(k - k')} e^{-\frac{k(1+\varepsilon)}{\gamma} \tau} + \frac{k}{2(k - k')} e^{-\frac{(k-2k')(1-\varepsilon)}{\gamma} \tau}, \quad (57)$$

Таким образом, наличие сил взаимодействия между частицами не только смещает среднее положение частиц в оптических ловушках, но и влияет на статистику их броуновского движения. Броуновское движение в данной методике может являться индикатором для выявления сил взаимодействия [9].

2. Экспериментальное изучение броуновского движения оптически захваченных магнитных микрочастиц

2.1. Экспериментальная установка

Схема экспериментальной установки для изучения магнитного взаимодействия микрочастиц показана на рисунке 20. В установке оптического пинцета реализуются одновременно две оптических ловушки, совмещенные с системой приложения магнитного поля в области образца. Для формирования оптических ловушек используются два непрерывных инфракрасных лазера (элементы 1, 2 на рисунке 20) с длиной волны излучения 975 нм. Мощность лазеров может плавно изменяться в пределах 0–330 мВт. Лазеры имеют выходы в поляризационно-сохраняющие одномодовые оптические волокна, поэтому для получения параксиальных лучей используется асферические линзы с фокусным расстоянием 6,24 мм. Луч одного из лазеров проходит через систему конфокально расположенных линз (6–8), которая позволяет управлять положением оптической ловушки внутри образца путем перемещения линзы (6) перпендикулярно оптической оси. Положение другой ловушки управляется акусто-оптическим дефлектором, или АОД (5). После прохождения через поляризационный делительный

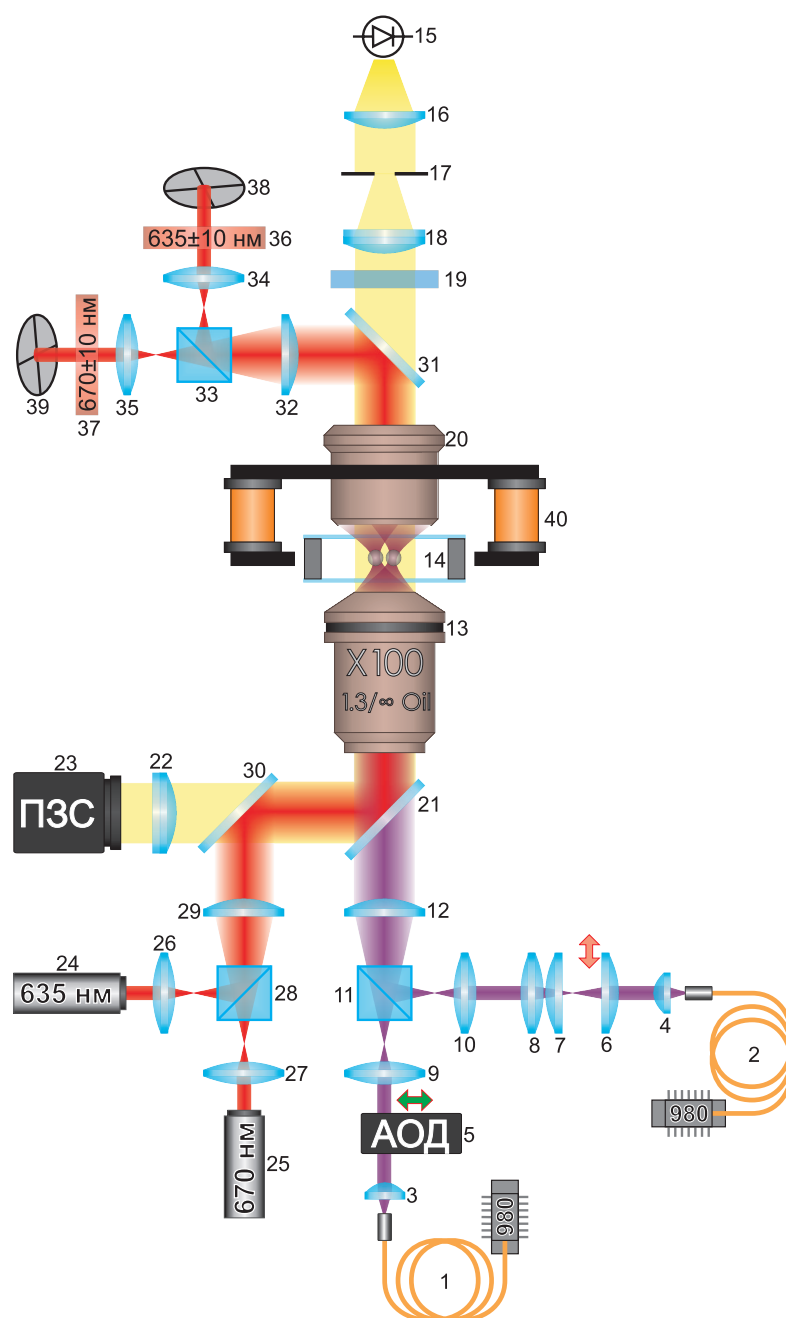


Рис. 20: Схема экспериментальной установки оптического пинцета для изучения взаимодействия микрочастиц. 1,2 — диодные лазеры с волоконным выходом; 3,4 — асферические линзы, коллимирующие пучки лазеров; 5 — акусто-оптический дефлектор; 6–8 — система линз для смещения ловушки; 9–12 — система заведения лазерных пучков в объектив 13; 14 — кювета с суспензией исследуемых микрочастиц; 15–19 — осветитель; 21, 30, 31 — дихроичные светоделители; 22 — ахроматический линзовый дуплет; 23 — видеокамера; 26–30 — система заведения излучения лазеров 24, 25 в объектив 13; 32–39 — система регистрации малых смещений микрочастиц на основе квадратных фотодиодов 38, 39.

кубик, который предназначен для сведения лучей обоих инфракрасных лазеров, систему из линз (9, 10, 12) для расширения лазерных пучков до полной входной апертуры объектива, а также дихроичное зеркало (21) лазерные пучки попадают на план полу-апохроматический масляно-иммерсионный объектив (13). При этом все линзы подобраны таким образом, чтобы смещение лазерных пучков не приводило к существенному изменению засветки входной апертуры объектива (13), и, тем самым, не приводило к изменению мощности излучения, формирующего оптическую ловушку. Объектив (13) имеет фокусное расстояние 1,8 мм, скорректирован на бесконечность. На длине волны падающего излучения 975 нм пропускная способность этого объектива составляет около 60%. Числовая апертура объектива контролируется встроенной ирисовой диафрагмой и может изменяться от 0,55 до 1,3. Рабочее расстояние объектива (13) составляет 0,2 мм при работе с покровными стеклами 0,17 мм. С помощью данного объектива лазерные лучи фокусируются внутри образца (14), расположенного на предметном столике. Образец представляет собой суспензию исследуемых магнитных композитных микрочастиц диаметром 3 мкм, состоящих из полистирола с вкраплениями магнетита (PMPEG-3.0COOH производства компании “Kisker Biotech GmbH&Co”). Предметный столик оборудован автоматизированной системой двухкоординатного смещения. Система позволяет перемещать ячейку с образцом перпендикулярно оптической оси объектива на 17 мм вдоль каждой оси. Минимальный шаг смещения составляет 0,04 мкм.

Освещение для визуализации образца проводилось в геометрии “на просвет”. Система осветителя состоит из массива белых светодиодов (15), коллекторной линзы (16) и полевой ирисовой диафрагмы (17), ахроматического дуплета (18) с фокусным расстоянием 200 мм и объектива-микрофлюара (20) с числовой апертурой 0,85. Свет, проходящий через образец, собирается объективом (13) и ахроматической линзой (22) ($f=150$ мм) на матрице ПЗС-камеры (23), подключенной к персональному компьютеру. ПЗС-камера выдает цветное видеоизображение разрешением 768x576 пикселей с частотой 25 кадров в секунду. Для заведения видимого излучения на ПЗС-камеру используется диэлектрическое зеркало (21). На одну из поверхностей этого зеркала нанесено интерференционное покрытие, имеющее хорошее пропускание для инфракрасного излучения и высокий коэффициент отражения для видимого диапазона при угле падения 45° . Вторая поверхность зеркала имеет просветляющее покрытие для

ближнего ИК диапазона длин волн излучения.

Для приложения магнитного поля к области, в которой располагался образец, была изготовлена система из четырех электромагнитов (40). Снизу к сердечникам электромагнитов прикреплены концентраторы магнитного потока – магнитомягкие пластины толщиной 0,5 мм. К электромагнитам подводится напряжение, управляемое с помощью компьютерной программы. Система электромагнитов, была расположена над образцом, как изображено на рисунке 21. Она позволяет создавать магнитное поле в образце с вектором напряженности, лежащим в плоскости наблюдения.

Регистрация малых смещений захваченных в оптические ловушки микрочастиц осуществляется с помощью системы на основе четырехсекционных (квадрантных) фотодиодов (КФД) (элементы 38, 39 на рисунке 20). Квадрантные фотодиоды — это четыре независимых фотодиода, рабочая поверхность которых представляет собой квадранты одного круга. Независимые измерения сигнала с каждого сектора позволяют определить интенсивности падающих на них лучей. Определение положения частиц, захваченных ловушками, осуществляется по рассеянному ими излучению дополнительно установленных лазеров (24, 25) с излучением на длине волны 635 и 670 нм. Рассеянное исследуемыми объектами излучение лазеров (24, 25) заводится на квадрантные фотодиоды (38, 39) с помощью делительных поляризационных кубов (28, 33) и дихроичных зеркал (30), (21), (31). Для того чтобы на КФД не попадало переотраженное излучение от светодиода (15), установлен фильтр СЗС-11 (19), поглощающий красную часть спектра излучения светодиода. Используемые КФД сопряжены с блоками электроники. Каждый блок имеет 3 выхода. Напряжения на этих выходах пропорциональны следующим величинам:

$$\begin{aligned} V_0 &\sim I_1 + I_2 + I_3 + I_4, \\ V_x &\sim I_1 - I_2 - I_3 + I_4, \\ V_y &\sim I_1 + I_2 - I_3 - I_4, \end{aligned} \tag{58}$$

где I_i – интенсивность света падающего на i -тый сектор КФД. В линейном диапазоне работы КФД смещения лучей по осям Ox и Oy считаются пропорциональными, соответственно, напряжениям V_x и V_y .

2.2. Экспериментальные результаты и их анализ

В эксперименте проводился захват двух микрочастиц в две оптические ловушки, расположенные на расстоянии 4.5–9 мкм друг от друга и 20 мкм над покровным стеклом кюветы с образцом. Процедура оптического захвата частиц заключается в следующем. Сначала фокус захватывающего объектива наводится на образец. Зная положения ловушек на получаемом с камеры изображении, совмещают предварительно выбранную на экране монитора частицу с положением одной из ловушек с помощью шаговых двигателей, осуществляющих перемещение предметного столика. При этом должен наблюдаться захват этой частицы в оптическую ловушку. Аналогично проводится захват частицы во вторую ловушку. После захвата двух частиц в две независимые оптические ловушки положение одной из частиц можно изменять в плоскости наблюдения с помощью поворота микрометрических винтов транслятора линзы (6). Для смещения другой ловушки достаточно изменить напряжение, подаваемое на управляющий вход акусто-оптического дефлектора (5). После захвата частицы фотографировались для определения расстояния между ними R . Типичная фотография двух захваченных микрочастиц изображена на вставке рисунка 22. Далее проводились измерения временной зависимости величины сигнала с квадрантных фотодиодов $V_{x,1}$ и $V_{x,2}$, соответствующих смещениям частиц вдоль оси Ox . Измерения проводились в течение 100 секунд при частоте сбора данных аналогово-цифровым преобразователем $5 \cdot 10^5$ отсчетов в секунду на каждый канал. Определялись величины средних значений сигнала с каждого фотодиода, дисперсии этих сигналов и нормированная на эти дисперсии корреляционная функция сигналов с двух фотодиодов. Результаты были усреднены по 5 различным парам микрочастиц. Так как сигнал с фотодетектора линейно связан со смещением микрочастицы из положения равновесия в оптических ловушках, то полученная корреляционная функция совпадает с выражением (55).

На рисунке 22 показаны типичные графики нормированной корреляционной функции броуновских смещений микрочастиц из положений равновесия вдоль оси Ox . Незакрашенные точки соответствуют корреляционной функции, полученной при измерении смещений в отсутствии внешнего магнитного поля. Наличие минимума при $\tau \approx 0,01$ с обусловлено гидродинамическим взаимодействием микрочастиц через жидкую среду. При наличии внешнего магнитного поля, создаваемого в области образ-

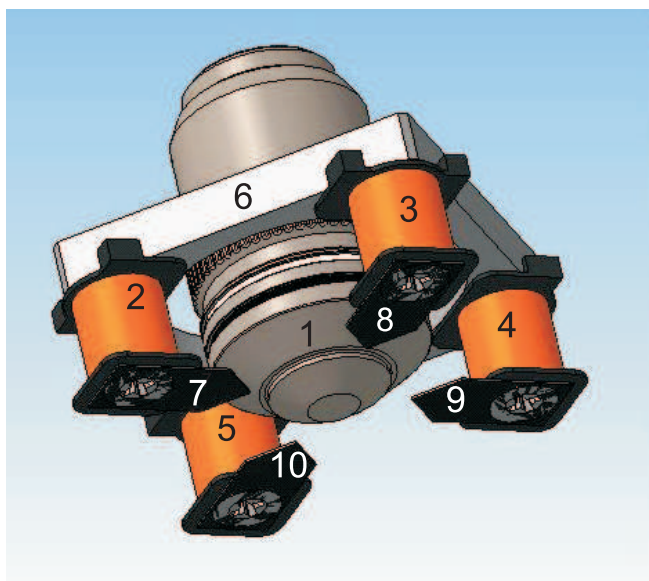


Рис. 21: Система электромагнитов для приложения магнитного поля к образцу. 1 — объектив системы освещения образца; 2, 3, 4, 5 — электромагниты; 6 — замыкающий магнитопровод; 7, 8, 9, 10 — концентраторы магнитного потока;

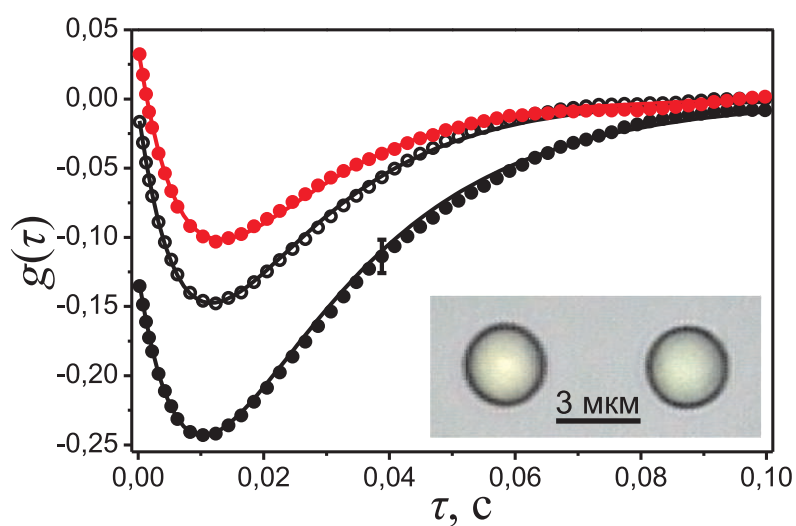


Рис. 22: Нормированные на среднегеометрическую дисперсию корреляционные функции смещения двух частиц в оптических ловушках. Черные и красные закрашенные точки относятся, соответственно, к случаям ориентации линий напряженности внешнего магнитного поля вдоль и перпендикулярно оси Ox , проведенной через центры оптических ловушек. Величина напряженности магнитного поля $H = 62 \text{ Э}$, расстояние между оптическими ловушками $L = 6 \text{ мкм}$. Черные открытые точки соответствуют измерениям в отсутствии внешнего магнитного поля. Линии — теоретическая аппроксимация значений выражением (55).

ца, корреляционная функция меняется. В случае, когда силовые линии магнитного поля направлены вдоль оси Ox , то есть вдоль прямой, проходящей через положения ловушек, наблюдается уменьшение значений корреляционной функции (закрашенные черные точки). Если же силовые линии направлены перпендикулярно оси Ox , корреляционная функция возрастает (красные точки). Данные экспериментальные результаты можно объяснить следующим образом. Во внешнем магнитном поле парамагнитные частицы приобретают наведенные магнитные моменты. Если вектор напряженности магнитного поля параллелен или перпендикулярен рассматриваемой оси Ox , то магнитные моменты становятся сонаправленными друг с другом и внешним полем (см. рисунок 19). В случае, когда два магнитных момента направлены вдоль соединяющей их линии, они испытывают притяжение, а когда перпендикулярно данной линии — отталкивание, причем чем ближе эти моменты, тем сильнее сила магнитного взаимодействия. Поэтому если сила взаимодействия проявляется в притяжении, то при смещении первой частицы в ходе теплового движения в сторону возрастания координаты x_1 вторая частица будет стремиться в сторону убывания x_2 , и броуновское движение частиц становится “антикоррелированным”, то есть значения корреляционной функции убывают. В случае же отталкивания при смещении первой частицы в сторону возрастания координаты x_1 вторая частица будет стремиться в ту же сторону. И движение становится “скоррелированным”, то есть значения корреляционной функции возрастают. Полученные в эксперименте кросс-корреляционные функции были аппроксимированы теоретической зависимостью (55), используя градиент k' и эффективную жесткость оптических ловушек k как параметры аппроксимации. Среднее значение жесткости обеих оптических ловушек составило $k = (2,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-6}$ Н/м. Имея данные для жесткости и экспериментально измерив дисперсии сигналов V_x , из соотношения (56) можно определить коэффициент связи S между напряжением на выходе фотодетектора и смещением частицы, то есть $x = S \cdot V_x$. Например, в случае отсутствия магнитного взаимодействия ($k' = 0$) можно записать:

$$S = \sqrt{\frac{k_B T}{k \langle \Delta V_x^2 \rangle}}. \quad (59)$$

Используя данную калибровку, можно определить среднее смещение частиц из центров оптических ловушек $\langle x_{1,2} \rangle$ под действием силы магнитного взаимодействия

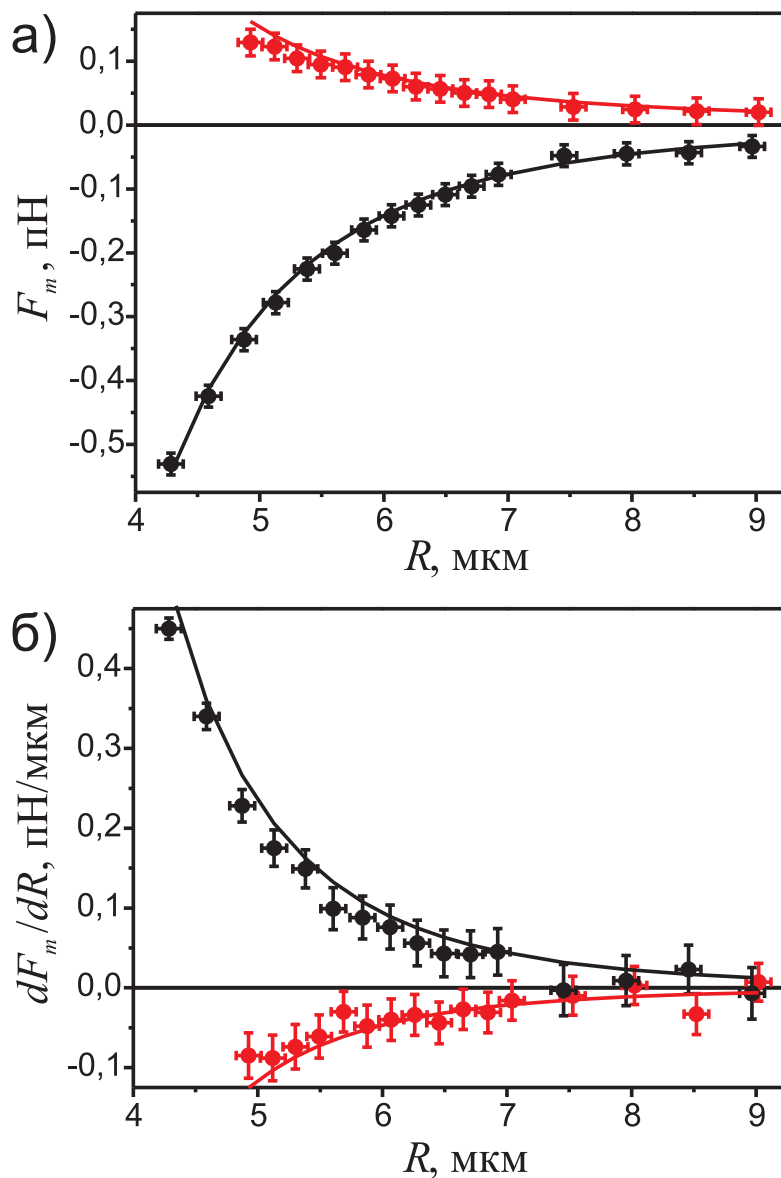


Рис. 23: а) Зависимость силы взаимодействия пары магнитных микрочастиц от расстояния между ними. б) Зависимость градиента этой силы от расстояния между частицами, полученная с помощью аппроксимации корреляционных функций смещений этих частиц из положений равновесия в оптических ловушках. Величина внешнего магнитного поля составляет $H = 62 \text{ Э}$. Черные точки соответствуют ориентации линий напряженности вдоль оси Ox , проведенной через центры ловушек, красные точки — перпендикулярно этой оси. Линии — аппроксимация полученных значений моделью дипольного взаимодействия (60).

$F_m(R)$, а также величину этой силы из выражения (48). На рисунке 23а показана зависимость силы магнитного взаимодействия микрочастиц от расстояния между ними при напряженности внешнего магнитного поля 62 Э. Как видно из графика, когда силовые линии внешнего магнитного поля направлены вдоль оси Ox , наблюдается притяжение парамагнитных микрочастиц. Если вектор напряженности внешнего магнитного поля ориентирован перпендикулярно этой оси, то наблюдается притяжение. Если каждую частицу представить как магнитный дипольный момент M , силу их магнитного взаимодействия можно представить как [15, 111]:

$$F_m^{\parallel} = -\frac{6M^2}{R^4}, \quad F_m^{\perp} = \frac{3M^2}{R^4}, \quad (60)$$

где индекс $\parallel$ указывает, что магнитные моменты ориентированы вдоль соединяющей их прямой, а индекс $\perp$ — перпендикулярно этой прямой. Аппроксимация экспериментальных данных зависимостью (60) дала следующие значения для величины M : $(17.5 \pm 0.8) \cdot 10^{-15} \text{ Ам}^2$ в случае ориентации магнитных моментов вдоль оси Ox и $(17.4 \pm 1.1) \cdot 10^{-15} \text{ Ам}^2$ в случае ориентации перпендикулярно этой оси, т.е. магнитные моменты получились равными в обеих конфигурациях, следовательно, влияние взаимного намагничивания частиц пренебрежимо мало. Рассмотрим идеальный случай, пусть магнитный момент частицы прямо пропорционален напряженности приложенного к ней магнитного поля $\mathbf{M}$:

$$\mathbf{M} = \alpha \mathbf{H}, \quad (61)$$

где α — магнитная поляризуемость частицы. В системе двух взаимодействующих частиц наведенный на одну частицу магнитный момент зависит от приложенного внешнего магнитного поля и от поля, создаваемого соседней частицей. Выражение для величины магнитного диполя второй частицы $\mathbf{M}_2$ во внешнем поле $\mathbf{H}$ и в поле первой частицы $\mathbf{H}_{dip}$ имеет вид:

$$\mathbf{M}_2 = \alpha(\mathbf{H} + \mathbf{H}_{dip}), \quad (62)$$

Согласно формуле (39) для поля, которая первая частица создает в точке, где находится вторая:

$$\mathbf{H}_{dip} = \frac{3\mathbf{R}(\mathbf{M}_1\mathbf{R}) - R^2\mathbf{M}_1}{R^5}, \quad (63)$$

где $\mathbf{M}_1$ — магнитный момент первой частицы. Так как для двух одинаковых частиц задача является симметричной, то величины наведенных дипольных моментов мы считаем равными $\mathbf{M}_1 = \mathbf{M}_2 = \mathbf{M}$. Тогда выражение для магнитного поля, которое создает первая частица в точке положения второй частицы, для двух ориентаций приложенного внешнего поля:

$$\mathbf{H}_{dip}^{\parallel} = \frac{2M_{\parallel}}{R^3} \mathbf{e}_x, \quad (64)$$

$$\mathbf{H}_{dip}^{\perp} = -\frac{M_{\perp}}{R^3} \mathbf{e}_y, \quad (65)$$

где $\mathbf{e}_i$ — единичный вектор вдоль i -той оси. Следовательно, выражение для величины наведенного магнитного момента примет вид:

$$M_{\parallel} = \alpha \left(H + \frac{2M_{\parallel}}{R^3} \right), \quad (66)$$

$$M_{\perp} = \alpha \left(H - \frac{M_{\perp}}{R^3} \right). \quad (67)$$

Используя эти равенства, можно вычислить наведенный момент:

$$M_{\parallel} = \frac{\alpha H R^3}{R^3 - 2\alpha}, \quad (68)$$

$$M_{\perp} = \frac{\alpha H R^3}{R^3 + \alpha}. \quad (69)$$

Таким образом, влияние взаимного намагничивания должно вносить поправки порядка α/R^3 к искомой величине, где $\alpha \approx M/H = (3,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-18} \text{ м}^3$ по крайней мере в 20 раз меньше величины R^3 .

Зависимость градиента силы магнитного взаимодействия k' от расстояния между частицами, полученная при аппроксимации корреляционных функций смещения микрочастиц выражением (55) показана точками на рисунке 23б. С другой стороны, градиент силы взаимодействия в дипольном приближении можно записать следующим образом:

$$\frac{dF_m^{\parallel}}{dR} = \frac{24M^2}{R^5}, \quad \frac{dF_m^{\perp}}{dR} = -\frac{12M^2}{R^5}. \quad (70)$$

Сплошными линиями на графике показаны эти модельные зависимости градиента силы, соответствующие ранее найденным значениям магнитного момента частиц M .

Как видно, эти модельные зависимости находятся в хорошем согласии с данными, полученными из анализа корреляционных функций. Следует отметить, что для описанного эксперимента ошибка определения градиента силы взаимодействия из анализа корреляционных функций составляет около 5%, что намного точнее прямого дифференцирования значений этой силы, представленных на рисунке 23а, которое дает ошибку примерно в 25%.

Для определения свойств магнитных микрочастиц была измерена зависимость силы их парного взаимодействия от напряженности внешнего магнитного поля. Расстояние между ловушками равнялось $L = 6$ мкм. Измерения проводились, начиная с максимально значения 62 Э, в сторону уменьшения напряженности магнитного поля. Полученная зависимость представлена на рисунке 24. Сплошными линиями показана аппроксимация экспериментальных точек функциями (60), в которых $M = M_0 + \beta H$, M_0 и β — параметры аппроксимации. Используя полученную зависимость силы взаимодействия от величины внешнего магнитного поля и формулу для этой силы в дипольном приближении (60), были рассчитаны величины магнитных моментов микрочастиц. Эти значения показаны на рисунке 25 точками. Для сравнения на этом же рисунке сплошными линиями показаны результаты, полученные с помощью вибрационного магнитометра для суспензии таких же микрочастиц. Зависимость магнитных моментов от напряженности внешнего магнитного поля имеет петлю гистерезиса и характерный для суперпарамагнитных материалов вид. На вставке рисунка показаны полученные значения магнитного момента в диапазоне полей, используемых в измерениях с помощью оптического пинцета. Согласие экспериментальных данных, полученных двумя способами, показывает возможность применения методики оптического пинцета для определения свойств магнитных суспензий с помощью прямого измерения сил парного взаимодействия микрочастиц.

В описанных выше экспериментах использовались сферические частицы известного размера. Однако в обзоре литературы была приведена формула 38 для глубины минимума нормированной корреляционной функции в случае присутствия только гидродинамического взаимодействия микрочастиц посредством среды. В приближении Озеена эту формулу можно записать как:

$$g(\tau_{min}) \approx -\frac{3a}{2eR}, \quad (71)$$

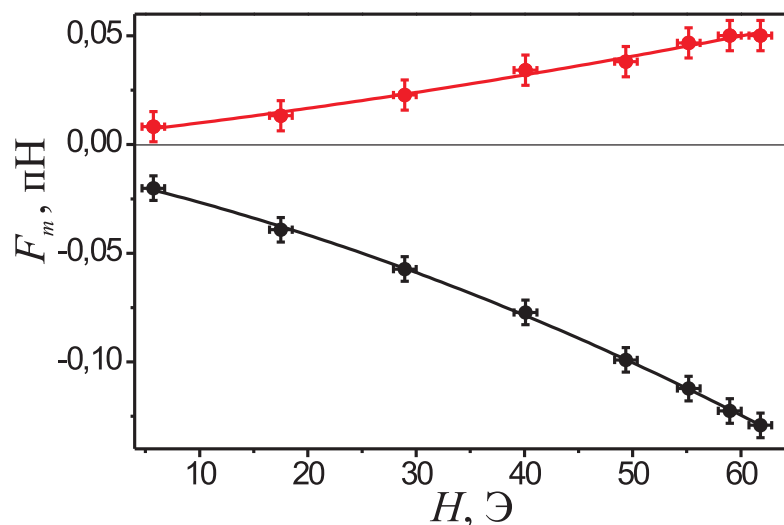


Рис. 24: Зависимость силы взаимодействия микрочастиц от величины внешнего магнитного поля, измеренная при ориентации линий напряженности поля вдоль оси Ox (черные точки) и перпендикулярно этой оси (красные точки). Линии — аппроксимация данных параболическим законом. Расстояние между центрами оптических ловушек $L = 6 \text{ мкм}$.

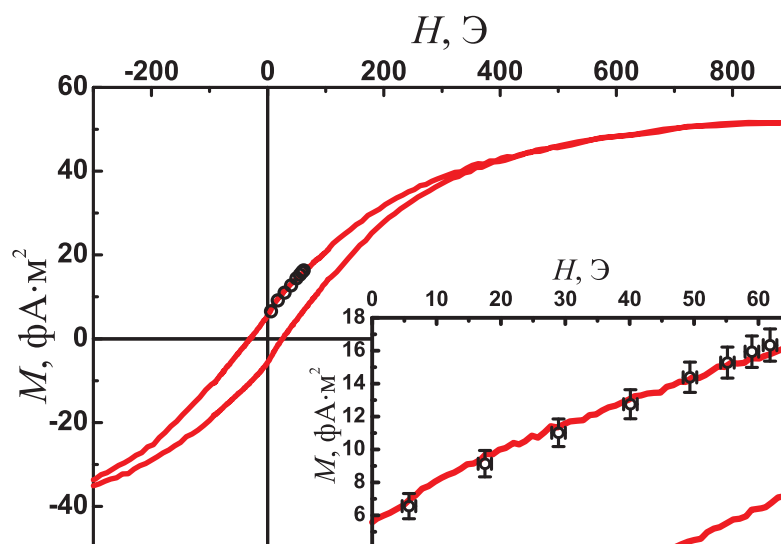


Рис. 25: Зависимость магнитного момента микрочастиц от величины внешнего магнитного поля. Точками показаны значения, полученные с помощью метода оптического пинцета, сплошными линиями показаны данные, полученные с помощью вибрационного магнитометра. На вставке та же зависимость в увеличенном масштабе.

где $\tau_{min} \approx 6\pi\eta a/k$. Следовательно, из корреляционной функции, полученной в отсутствии магнитного поля, можно получить не только жесткость оптической ловушки, но и размер частиц. Например, в работе [9] таким образом определен размер магнитных частиц из оксида железа (III), покрытых оболочкой из диоксида кремния. В эксперименте две частицы захватывали в ловушки, расположенные на расстоянии 3 мкм друг от друга. Полученные функции корреляции имеют минимум на временах около 0,3 мс, причем в отсутствии магнитного поля глубина минимума составляет величину около $-0,04$ (см. рисунок 26), что соответствует жесткости оптических ловушек порядка $k \approx 2$ пН/мкм и радиусу частиц $a = 0,2$ мкм. В случае наличия магнитного поля напряженностью 100 Э наблюдалось изменение вида корреляционной функции, что позволило оценить силу взаимодействия и магнитный дипольный момент частиц, которые составили, соответственно, величины порядка 0,1 пН и $5 \cdot 10^{-14}$ А м². Таким образом, предложенная лазерная методика является мощным инструментом для определения свойств частиц магнитных жидкостей.

3. Численное моделирование броуновского движения двух магнитных частиц в оптических ловушках

В пункте 1 использовалось приближение, в котором выражение для силы магнитного взаимодействия частиц было заменено на первые два члена ее разложения по малому параметру $(\Delta x_2 - \Delta x_1)/R$. Для проверки применимости данного приближения было проведено численное моделирование броуновского движения магнитных частиц в оптических ловушках методом Монте-Карло. Моделировалось броуновское движение двух магнитных частиц в двух оптических ловушках.

Запишем уравнения движения двух магнитных частиц в оптических ловушках для смещений x_1, x_2 частиц из центров оптических ловушек в приближении Озеена:

$$\begin{aligned}\gamma\dot{x}_1 &= -kx_1 + f_1(t) - F_m(r) + \varepsilon[-kx_2 + f_2(t) + F_m(r)], \\ \gamma\dot{x}_2 &= -kx_2 + f_2(t) + F_m(r) + \varepsilon[-kx_1 + f_1(t) - F_m(r)].\end{aligned}\tag{72}$$

Эти уравнения можно решить численно, задав функции броуновских сил в виде случайных последовательностей. Пусть эти последовательности будут иметь гауссово распределение со средними значениями, равными нулю, и дисперсией в соответствии

с нормировочными соотношениями для случайных броуновских сил [37]:

$$\begin{aligned}\langle f_i(t)f_i(t+\tau) \rangle &= \frac{2\gamma k_B T}{(1-\varepsilon^2)\Gamma}, \quad \tau < \Gamma, \\ \langle f_i(t)f_j(t+\tau) \rangle &= -\frac{2\varepsilon\gamma k_B T}{(1-\varepsilon^2)\Gamma}, \quad i \neq j, \quad \tau < \Gamma, \\ \langle f_i(t)f_j(t+\tau) \rangle &= 0, \quad \tau > \Gamma,\end{aligned}\tag{73}$$

где Γ больше времени корреляции случайных броуновских сил: $\Gamma > t_{Brown} \sim 10^{-12}$ секунд. В программе время Γ можно выбрать равным величине шага вычислений по времени $\Delta t = 10^{-5}$ секунд. Можно выразить $f_i(t)$ как суперпозицию $\phi_1(t)$ и $\phi_2(t)$ — двух независимых случайных функций, имеющих средние, равные нулю, и дисперсии, равные единице: $f_i(t) = a\phi_i(t) - b\phi_j(t)$, $i \neq j$ причем $a^2 = \frac{(1 + \sqrt{1 - \varepsilon^2})\gamma k_B T}{(1 - \varepsilon^2)\Gamma}$, а $b^2 = \frac{(1 - \sqrt{1 - \varepsilon^2})\gamma k_B T}{(1 - \varepsilon^2)\Gamma}$. Используя данное разложение, уравнения Ланжевена можно решить численно с помощью алгоритма:

$$x_{i,n+1} = x_{i,n} + \frac{\Gamma}{\gamma}(F_{i,n} + \varepsilon F_{j,n}), \quad i \neq j,\tag{74}$$

где

$$F_{i,n} = -kx_{i,n} + (-1)^i F_{m,n} + aw_{i,n} - bw_{j,n}, \quad i \neq j,\tag{75}$$

$w_{i,n}$ — независимые случайные последовательности, имеющие гауссово распределение со средними, равными нулю, и дисперсиями, равными единице, эти последовательности рассчитывались с использованием полярного варианта метода Бокса–Мюллера [112–114].

Силы магнитного взаимодействия рассчитываются по формулам:

$$F_{m,n} = -\frac{6M^2}{(L + x_{2,n} - x_{1,n})^4},\tag{76}$$

при расчете для параллельной ориентации вектора напряженности магнитного поля и при расчете для перпендикулярной ориентации этого вектора:

$$F_{m,n} = \frac{3M^2}{(L + x_{2,n} - x_{1,n})^4}.\tag{77}$$

При расчете задается расстояние между положениями равновесия частиц в оптиче-

ских ловушках R , а расстояние между ловушками вычисляется в случаях параллельной и перпендикулярной ориентаций магнитного поля относительно оси Ox , соответственно, по формулам $L = R + 12M^2/kR^4$ и $L = R - 6M^2/kR^4$.

Для численного расчета были взяты следующие значения: температура $T = 300$ К и вязкость жидкости $\eta = 10^{-3}$ кг/с, магнитные моменты частиц $M = 17,5 \cdot 10^{-15}$ Ам² ориентированны вдоль оси Ox , диаметр частиц $d = 3 \cdot 10^{-6}$ м, жесткость оптических ловушек $k = 2 \cdot 10^{-6}$ Н/м, расстояние между ловушками $L = 4,3$ мкм. С помощью уравнения (74) рассчитывались координаты броуновского движения частиц. Количество шагов вычислений было выбрано равным $N = 10^7$, шаг по времени составил 10 мкс. Далее по полученным данным для координат рассчитывались нормированные функции кросс-корреляции броуновских смещений частиц. Результаты численного расчета представлены на рисунке 27. На графике также показана нормированная функция кросс-корреляции в случае отсутствия магнитного взаимодействия. Для сравнения на графике представлены аналитические зависимости функций кросс-корреляции, рассчитанные по формуле (55).

Функции кросс-корреляции броуновских смещений магнитных частиц во внешнем поле, рассчитанные с помощью численного моделирования и с помощью аналитической формулы, находятся в хорошем согласии: наблюдается характерное уменьшение значений функции кросс-корреляции с ростом поля. Различие значений функций, полученных с помощью численного расчета от значений, полученных по формуле (55), не превышает 0,01, что соответствует ошибке около 3%. Это свидетельствует о применимости разложения сил магнитного взаимодействия по малому параметру $(\Delta x_2 - \Delta x_1)/R$.

4. Применение метода активной микрореологии для изучения магнитного взаимодействия микрочастиц

В качестве индикатора сил взаимодействия между частицами можно использовать не только броуновское движение частиц, но и отклик частиц на внешнее заданное возмущение. Так как силы взаимодействия между частицами зависят от расстояния между ними, то можно по заданному закону изменять это расстояние (например, с помощью метода активной микрореологии) и смотреть отклик системы на это воздействие. Рас-

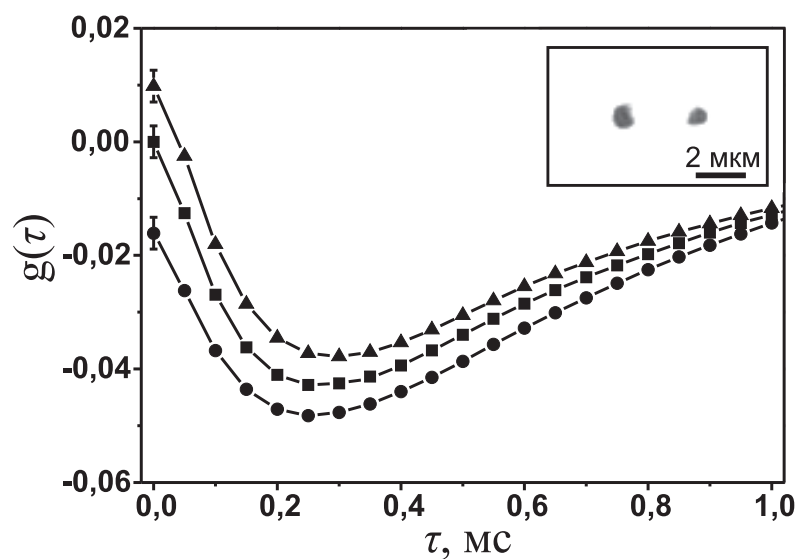


Рис. 26: Функции корреляции броуновского смещения двух магнитных микрочастиц из оксида железа (III), покрытого оболочкой из диоксида кремния. Квадратными точками показан случай отсутствия магнитного поля, круглыми точками представлен случай наличия магнитного поля, направленного вдоль оси Ox , треугольными точками — перпендикулярно этой оси. На вставке изображена микрофотография захваченных частиц. [9]

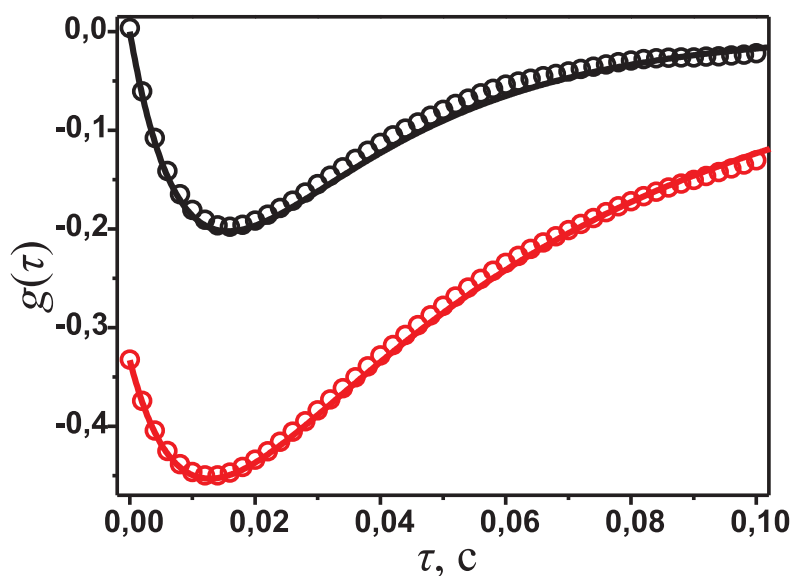


Рис. 27: Функции кросс-корреляции броуновских смещений оптически захваченных частиц. Черные точки — численный расчет в случае отсутствия магнитного взаимодействия; красные точки — случай наличия у частиц магнитных дипольных моментов величиной $M = 17,5 \cdot 10^{-15} \text{ Ам}^2$, ориентированных вдоль оси Ox ; сплошными линиями показан расчет данных функций по формуле (55).

смотрим метод активной микрореологии. Пусть на первую частицу действует внешняя сила, вызванная смещением соответствующей ловушки по гармоническому закону $x_1^{trap} = \tilde{x}_1^{trap} \sin(\omega_0 t)$ с амплитудой $\tilde{x}_1^{trap}$ существенно больше спектральных компонент случайных броуновских сил на частоте ω_0 , тогда выражение для X_2 можно записать в следующем виде:

$$\dot{X}_2(\omega_0) = (A_{11} - A_{12})[(2k' - k)X_2(\omega_0) + kx_1^{trap}]. \quad (78)$$

Для малых частот $\omega_0 \ll k/\gamma$ в этом уравнении можно пренебречь производной, а также принять, что абсолютные значения смещений частиц из своих ловушек равны по величине, то есть $\Delta x_2 = x_1^{trap} - \Delta x_1$. Тогда:

$$k' = \frac{k}{1 - \Delta x_1 / \Delta x_2} \quad (79)$$

Таким образом, измерив отношение амплитуд смещений частиц при фиксированной амплитуде осцилляций первой ловушки, можно получить градиент силы магнитного взаимодействия. Величину самой силы можно определить по смещению среднего положения частицы в ловушке, используя выражение (48).

Для иллюстрации данного утверждения был проведен следующий эксперимент. Проводилось измерение напряжения с КФД при движении частиц в присутствии внешнего магнитного поля параллельной и перпендикулярной ориентаций в случае, когда одна из ловушек смещается по гармоническому закону. Соответствующие величины напряжений с КФД пересчитывались в реальные смещения, используя калибровку, описанную в предыдущем пункте. Координата первой ловушки в фокальной плоскости объектива, формирующего оптические ловушки, изменялась по синусоидальному закону с помощью АОД, амплитуда смещения ловушки ставилась равной $\tilde{x}_1^{trap} = 200$ нм, то есть намного меньше расстояния между частицами, но больше величины броуновских смещений частиц из оптических ловушек. Частота колебаний была выбрана равной $f_0 = \frac{\omega_0}{2\pi} = 1$ Гц, то есть намного меньше характерных релаксационных частот оптических ловушек $\omega_k = \frac{k}{\gamma} \approx 70$ Гц. Для полученных данных о смещениях микрочастиц из центров оптических ловушек вычислялись спектральные амплитуды смещений для обеих частиц $\tilde{x}_1$ и $\tilde{x}_2$. На рисунке 28 показаны зависимости

отношения спектральных амплитуд $\tilde{x}_2/\tilde{x}_1$ от равновесного расстояния между частицами в случае создания в области образца внешнего магнитного поля $H = 62 \text{ Э}$ с линиями напряженности, направленными вдоль и перпендикулярно оси Ox . Как видно, величина измеренного отношения тем больше, чем ближе частицы, его знак определяется ориентацией внешнего магнитного поля. Отношение можно аппроксимировать выражением:

$$\tilde{x}_2/\tilde{x}_1 = 1/(1 - k/k'). \quad (80)$$

Эта аппроксимация показана на графике сплошными линиями, при этом значения k' для данного измерения на одной паре микрочастиц дает величину магнитного момента, равную $M \approx 12 \text{ фАм}^2$.

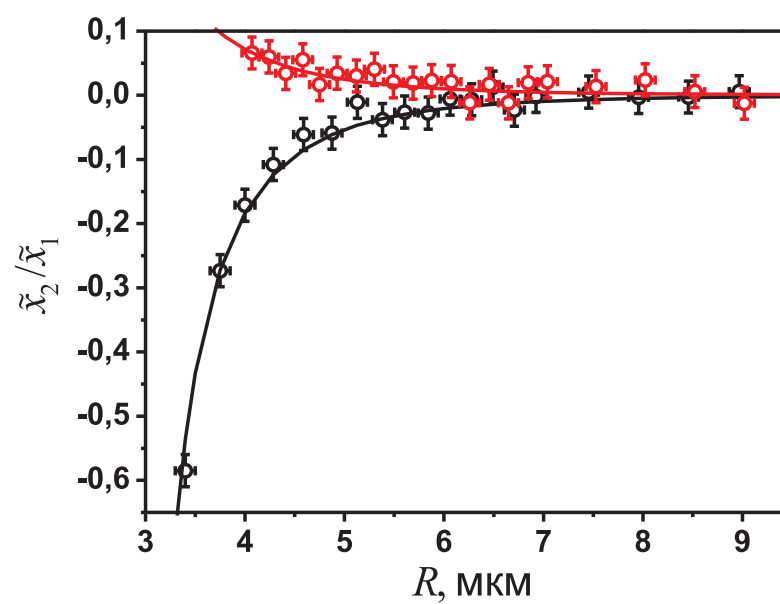


Рис. 28: Зависимости отношения спектральной амплитуды смещений частицы в неподвижной ловушке к амплитуде смещений в осциллирующей ловушке от среднего расстояния между частицами. Красные точки соответствуют случаю притяжения микрочастиц, черные — отталкиванию. Сплошные линии — аппроксимация значения выражением 80

Глава III

Применение оптического пинцета для определения силовых характеристик эритроцитов в аутологичной плазме крови

В данной главе методика оптического пинцета применяется для прямого измерения сил взаимодействия пиконьютонового диапазона между двумя эритроцитами в парном агрегате. Предлагается новый подход для определения вязко-упругих свойств клеток на основе метода активной микрореологии в оптическом пинцете.

1. Отработка методики активной реологии в оптическом пинцете: измерение передаточных амплитудно-частотных и фазочастотных характеристик смещений захваченных частиц

В работе применяется та же экспериментальная установка, что и в предыдущей главе. В используемой установке оптического пинцета реализована двухлучевая схема, позволяющая одновременно производить захват двух микрообъектов на контролируемом расстоянии друг от друга.

Для тестовых экспериментов по калибровке и проверке чувствительности установки использовалась водная суспензия частиц, которые представляли собой полистироловые сферы размером 2,5 мкм с дисперсией размеров 0,4 мкм. Концентрация частиц в суспензии составляла 0,05 мг/мл. Суспензия помещалась в зазор между двумя покровными стеклами. Покровные стекла, используемые для изготовления ячейки с исследуемой суспензией, предварительно обрабатывались последовательно ПАВ, этиловым спиртом, 3% перекисью водорода и промывались дистиллированной водой.

Для определения модулей эффективной жесткости оптических ловушек, как и в предыдущей главе, были экспериментально получены авто- и кросс-корреляционные функции малых смещений двух захваченных в оптический пинцет частиц. Для этого две частицы полистирола оптически захватывались на небольшом расстоянии друг от друга (около 4–5 мкм). Интенсивность захватывающих лазерных пучков составлялась относительно небольшой, около 10 мВт внутри образца для каждой ловушки. Такая интенсивность выбиралась для того, чтобы броуновское движение частиц в ловушках имело амплитуду, достаточную для корреляционного анализа (порядка

10 нм). Далее настраивалось положение верхнего объектива (20) и квадрантных фотодиодов (38, 39) так, чтобы на этих фотодиодах получалась симметричная картина рассеяния частицами лучей лазеров с длинами волн излучения 670 и 635 нм соответственно. С помощью аналого-цифрового преобразователя с частотой дискретизации 100 кГц записывался сигнал одновременно со всех каналов двух КФД (квадрантных фотодиодах) в течении 100 с. По данным, полученным в эксперименте, строились корреляционные функции сигналов с фотодиодов. Предполагая, что эти сигналы линейным образом связаны с малыми смещениями частиц в ловушках, корреляционные функции аппроксимировались приведенными в первой главе данной работы теоретическими зависимостями (36). Из аппроксимации вычислялся коэффициент эффективной жесткости ловушек, который составил $k = 10,6 \pm 0,8$ пН/мкм. По результатам аппроксимации также был найден коэффициент S для перевода напряжения, получаемого с квадрантного фотодиода V_x в абсолютные значения $x = V_x S$. Таким образом, калибровка установки позволила сопоставить величину сигнала КФД со смещением частиц. На рисунке 29 представлены полученные корреляционные функции смещения микрочастиц, а также распределение смещения частицы, захваченной во вторую ловушку. Распределение построено по 100 точкам в диапазоне от -3 до 3 стандартных отклонений. Как видно из графиков, смещение хорошо аппроксимируется функцией Гаусса, значит, верно предположение линейной связи возвращающей силы со смещением частицы из положения равновесия.

После проведения калибровки оптического пинцета по автокорреляционным функциям смещений двух захваченных частиц на фиксированном расстоянии друг от друга, как описано в предыдущем пункте, были измерены амплитудно-частотные и фазо-частотные характеристики смещения второй частицы при периодическом смещении первой частицы. Для этого был проведен следующий эксперимент. На управляющий вход акусто-оптического дефлектора с генератора подавалась сумма постоянного напряжения, соответствующего расстоянию между частицами 4,2 мкм, и переменного синусоидального напряжения с амплитудой 0,02 В, которое приводило к колебаниям положения первой ловушки с амплитудой 40 нм вдоль линии, соединяющей положение ловушек (ось Ox). С помощью КФД в течение 10 секунд непрерывно регистрировались и записывались в файл смещения обеих частиц. Генерация переменного напряжения, подаваемого на вход АОД, и регистрация сигнала с КФД начинались

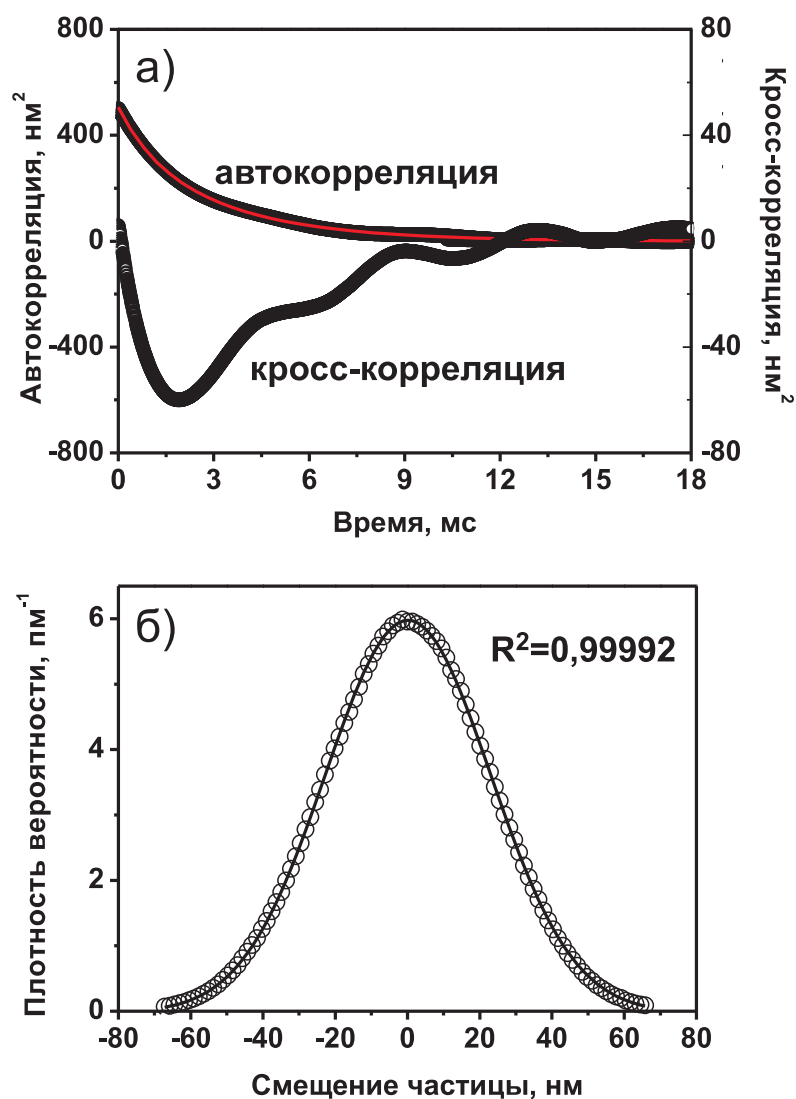


Рис. 29: а) Корреляционные функции смещения частиц из положения равновесия вдоль оси, соединяющей частицы. Красная линия — аппроксимация автокорреляционной функции теоретической зависимостью (36). б) Функция распределения положения частицы, захваченной в одну из ловушек. Сплошная линия – аппроксимация функцией Гаусса. Расстояний между центрами ловушек 4,2 мкм.

одновременно, причем цифро-аналоговый и аналого-цифровой преобразователи работали синхронно. Измерения проводились при частотах f в диапазоне от 10 Гц до 20 кГц. С помощью Фурье-преобразования находились амплитуды и фазы колебаний каждой из частиц. На рисунке 30а показана спектральная зависимость отношения амплитуды колебаний частицы, захваченной в неподвижную ловушку, к амплитуде колебаний частицы, находящейся в осциллирующей ловушке. Погрешность измерений составляет примерно 5%, и оценивалась по амплитудам шумовых фурье-гармоник на частотах отстроенных на 1 Гц от частоты осцилляции ловушки. На рисунке 30б показана соответствующая разность фаз между колебаниями частицы в неподвижной ловушке и колебаниями частицы в осциллирующей ловушке.

Сплошные линии на этих графиках — результат расчета, основанного на следующих соображениях. Число Рейнольдса $Re = uar/\eta$, где u и a — характерные скорость и размер гидродинамической системы. Для погруженной в воду с плотностью $\rho = 10^3$ кг/м и вязкостью $\eta = 10^{-3}$ Па·с сферической частицы такими характерными параметрами могут выступать скорость и радиус этой частицы. В случае колебаний ловушки с амплитудой A , скорость частицы можно оценить из условия равенства возвращающей силы и силы вязкого трения, то есть $\gamma u \simeq Ak$, где согласно формуле Стокса $\gamma = 6\pi a\eta$. Поэтому $Re = Ak\rho/6\pi\eta^2 \simeq 10^{-7} \ll 1$.

Для случая малых чисел Рейнольдса в книге [42] приведен расчет поля скоростей жидкости, окружающей колеблющуюся частицу (в нашем случае частицу, захваченную лазером (1)), при условии малых частот $\omega = 2\pi f \ll \frac{\eta}{a^2\rho}$. Скорость жидкости v на расстоянии R от центра частицы вдоль оси x , выбранной в направлении колебаний частицы, равна

$$v = \left(\frac{3a}{2R} - \frac{a^3}{2R^3} \right) \dot{x}_1 = \zeta \dot{x}_1, \quad (81)$$

где $\dot{x}_1$ — скорость движущейся частицы.

На другую частицу действуют возвращающая сила оптической ловушки $-kx_2$, сила вязкого трения $\gamma(v - \dot{x}_2)$. Тогда без учета броуновской силы уравнение движения для частицы массой m , захваченной лазером (2), запишется в виде:

$$m\ddot{x}_2 + \gamma(\dot{x}_2 - v) + kx_2 = 0, \quad (82)$$

или

$$\frac{m}{\gamma}\ddot{x}_2 + \dot{x}_2 + \frac{k}{\gamma}x_2 = \zeta\dot{x}_1. \quad (83)$$

Положив $x_n = \tilde{x}_n e^{i\omega t}$, где $\tilde{x}_n$ — амплитуда колебаний n -ой частицы, получим

$$\frac{\tilde{x}_2}{\tilde{x}_1} = \frac{\gamma\omega}{\gamma\omega - i(k - m\omega^2)}\zeta. \quad (84)$$

Тогда отношение амплитуд колебаний частиц

$$\left| \frac{\tilde{x}_2}{\tilde{x}_1} \right| = \frac{\gamma\omega}{\sqrt{\gamma^2\omega^2 + (k - m\omega^2)^2}} \left(\frac{3a}{2R} - \frac{a^3}{2R^3} \right). \quad (85)$$

Разность фаз движения второй частицы относительно движения первой примет вид

$$\varphi = -\arctg \left(\frac{k}{\gamma\omega} - \frac{m\omega}{\gamma} \right). \quad (86)$$

Как видно из формул, на низких частотах движение системы слабо зависит от массы. Однако при увеличении частоты инерционные эффекты должны проявляться сильнее. С другой стороны, при выводе формул (85) и (86) никак не учитывалась плотность окружающей частицы жидкости, напротив, соотношение (81) справедливо только при квазистационарном движении. Действительно, при движении частицы увлекают за собой определенный объем воды, поэтому эффективная масса частиц возрастает. На рисунке 30 сплошной линией показаны теоретические кривые при значении эффективной массы m , в 30 раз превышающей реальную массу частицы. Но, как видно из зависимостей, проведенных штриховой линией, на частотах до 1 кГц массой в формулах (85) и (86) можно пренебречь:

$$\left| \frac{\tilde{x}_2}{\tilde{x}_1} \right| = \frac{\omega}{\sqrt{\omega^2 + k^2/\gamma^2}} \left(\frac{3a}{2R} - \frac{a^3}{2R^3} \right). \quad (87)$$

$$\varphi = -\arctg \left(\frac{k}{\gamma\omega} \right). \quad (88)$$

Учет инерционных свойств жидкости даже в данной системе двух сферических частиц — задача достаточно сложная [115], поэтому в случае более сложной системы, такой как, например, эритроцит в двух оптических ловушках, измерения с помощью разработанной установки представляется целесообразным проводить в области частот

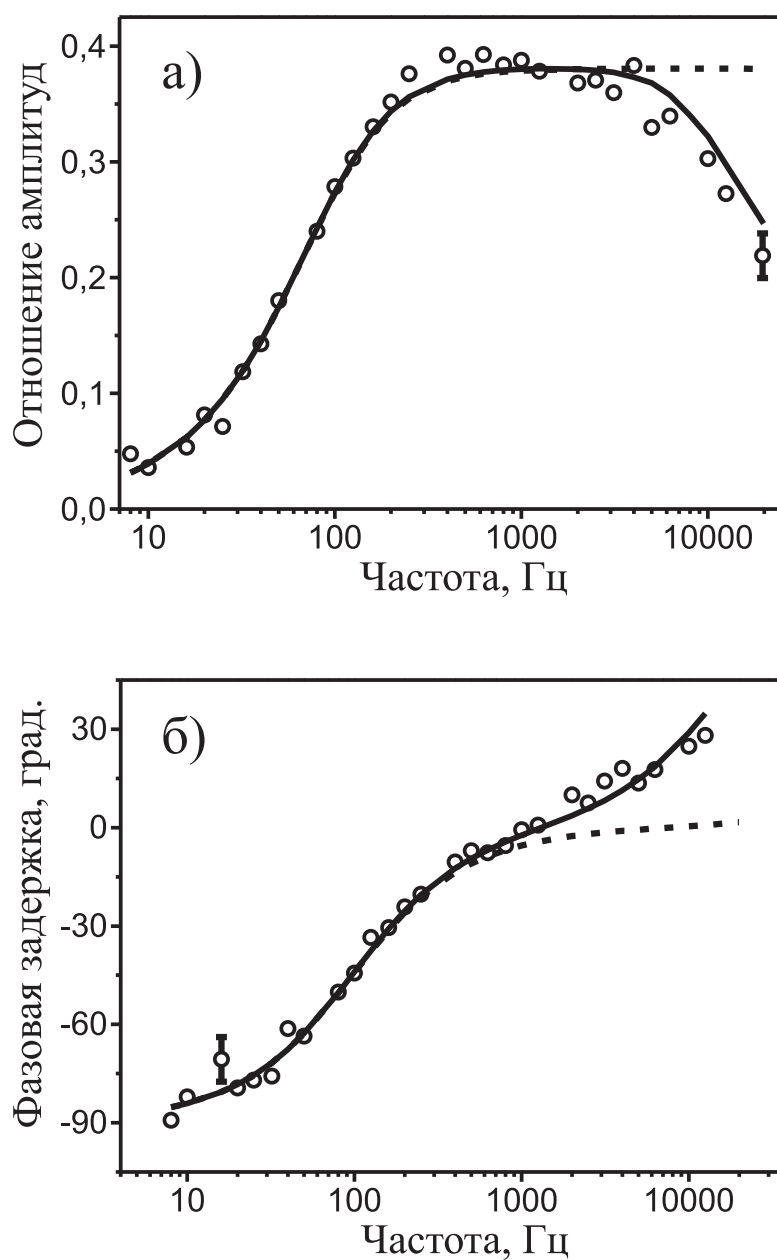


Рис. 30: Передаточные характеристики колебательного движения частиц размером 2,5 мкм на расстоянии 4,2 мкм: а) отношение амплитуды колебаний частицы, захваченной в неподвижную ловушку, к амплитуде колебаний частицы, находящейся в осциллирующей ловушке, б) разность фаз между колебаниями данных частиц. Сплошными линиями показаны теоретические зависимости, рассчитанные по формулам (85) и (86), в которых значение массы в 30 раз превышает реальную массу частицы. Штриховыми линиями указаны теоретические зависимости, рассчитанные по формулам (87) и (88).

до 1 кГц, там где инерционные эффекты незначительны.

2. Диагностика упруго-вязких свойств одиночных эритроцитов

Взаимодействие рассмотренных в предыдущем пункте частиц в основном определяется вязкими характеристиками среды, в которой они захвачены. В качестве объекта с другим типом взаимодействия, упруго-вязкого, был выбран эритроцит. Результаты описанного ниже эксперимента можно найти в работе [7].

2.1. Подготовка исследуемого образца

Для приготовления образца была получена плазма крови человека центрифугированием при комнатной температуре свежесобранной венозной крови. Сначала центрифугирование проводилось на аппарате Eppendorf 5224 при скорости вращения 3500 об./мин., или 1150g, в течении 7 минут. Затем плазма отделялась от осевших форменных элементов крови и проводилось повторное центрифугирование при скорости 14600 об./мин., или 20000g, также в течении 7 минут, чтобы очистить плазму от небольших тромбоцитов, которые могли остаться после первого центрифугирования. Это необходимо из-за того, что небольшие тромбоциты трудно определяются в микроскопии, но, с другой стороны, могут “захватываться” в оптические ловушки одновременно с исследуемыми эритроцитами, и влиять на результаты измерений. Затем 0,2 мкл крови, собранной из пальца, разводилось в 1 мл плазмы крови. 40 мкл приготовленной суспензии помещалось в герметичную ячейку, состоящую из двух покровных стекол толщиной 0,1 мм с зазором около 0,15 мм. Для предотвращения адгезии эритроцитов на поверхность покровных стекол последовательно промывались в растворе поверхностно-активных веществ, в 96% этиловом спирте, деионизированной водой, 3% раствором перекиси водорода, затем высушивались и промывались в 2% растворе человеческого альбумина.

2.2. Захват эритроцита в оптическую ловушку

Так как эритроцит имеет сравнительно большой размер (около 8 мкм) по сравнению с размером перетяжки каждой из ловушек (~ 1 мкм), то оптический захват происходит не в центре клетки, а за ее край, где имеется наибольший контраст показателя

преломления по сравнению с окружающей средой. При этом плоскость эритроцитарного диска содержит ось распространения лазерного излучения, то есть эритроциты в ловушке всегда ориентируются вдоль направления излучения. На рисунке 31а приведены микрофотографии отражающие динамику захвата эритроцита. Эти фотографии сделаны с промежутком в 0,2 секунды. Видно, что эритроцит ориентируется вдоль направления излучения за время менее 1 с. В оптической ловушке эритроцит практически не изменяет свою форму, что указывает на неразрушающий характер действия лазерного излучения ловушки на исследуемую клетку.

2.3. Калибровка силы оптического захвата эритроцита

Для определения каких-либо количественных параметров необходимо знать силу захвата эритроцита в оптическую ловушку. Для этого был проведен следующий эксперимент. Изначально был изготовлен изотонический (имеющий осмотическое давление, равное внутриклеточному) натрий-фосфатный буферный раствор со следующими концентрациями солей: 10 мМ гидрофосфата натрия, 1,76 мМ дигидрофосфата калия, 2,7 мМ хлорида калия и 137 мМ хлорида натрия. Осмотическая концентрация раствора 0,3 осмоль/л, кислотность $\text{pH}=7,4$, и калий-натриевый баланс соответствуют плазме крови. То есть эритроциты, погружённые в такой раствор, должны находиться в равновесном состоянии — молекулы воды диффундируют через клеточную мембрану в равном количестве внутрь и наружу, не накапливаясь и не теряясь клеткой. Отклонение осмотического давления от нормального физиологического уровня может нарушить структуру и целостность клеточных мембран. Полистироловые микрочастицы диаметром 3 мкм (PPs-3.0COOH, G.Kisker GmbH, Германия) промывались центрифугированием в приготовленном растворе три раза по 5 минут со скоростью вращения ротора 3000 об./мин. Затем небольшое количество данных частиц добавлялось в образец, так чтобы концентрация эритроцитов и частиц совпадала. Частицы были изначально функционализированны карбоксильными группами, которые могут химически связываться с некоторыми белками на мембране эритроцита. Затем в одну ловушку оптического пинцета из взвеси захватывали эритроцит на расстоянии 10 мкм от поверхности, а в другую — частицу. Меняя расстояния между оптическими ловушками, эритроцит и частицу соединяли вместе. Через 1–2 минуты частица необратимо приклеивалась к эритроциту. Микрофотография образованного комплекса

показана на рисунке 32б. Мощность ловушки, в которой находился край эритроцита, была 20 мВт, а мощность ловушки, в которой находилась частица, подбирали так, чтобы при увеличении расстояния между ловушками вероятность комплекса остаться в каждой из ловушек была одинаковой. То есть уравнивали максимальную силу, развиваемую ловушками с краем эритроцита и с полистироловой микрочастицей. Для пяти исследованных комплексов силы оказались уравновешены при мощности лазерного излучения 17 ± 1 мВт в ловушке с микрочастицей. Максимальная сила захвата микрочастицы в свою очередь определялась по силе вязкого трения в среде с известным коэффициентом динамической вязкости. Согласно экспериментальным данным полученным с помощью рефрактометра Аббе ИРФ-21, показатели преломления $n = 1.351$ и дисперсии для 15% водного раствора глицерина равны показателям для использованной плазмы, и ожидалось, что сила, развиваемая оптическим пинцетом, будет для обоих сред одинакова. Поэтому в кювету помещалась суспензия таких же микрочастиц в растворе глицерина, и выполнялся оптический захват одной из частиц на высоте 10 мкм над поверхностью стекла (см. рисунок 32в). Затем оборудованный электродвигателями предметный столик с образцом приводился в движение со скоростью v . При этом на частицу начинала действовать сила вязкого трения $F_{visc} = \gamma \cdot v$, где γ — коэффициент вязкого трения для сферической частицы радиуса a , центр которой находится на расстоянии h от поверхности. По уточненной формуле Стокса, учитывающей влияние поверхности кюветы [2, 116–119]:

$$\gamma = \frac{6\pi\eta a}{1 - \frac{9}{16} \frac{a}{h} + O\left[\left(\frac{a}{h}\right)^3\right]}. \quad (89)$$

Согласно литературным данным [120] коэффициент динамической вязкости при температуре 25°C для раствора глицерина составляет $\eta = 1,32 \pm 0,02$ мПа·с. При увеличении скорости движения столика сила вязкого трения, действующая на частицу, увеличивалась до тех пор, пока частица не выпадала из ловушки. Таким образом, для ловушки с мощностью лазерного излучения внутри образца 17 мВт была определена максимальная развиваемая ловушкой сила, которая составила 29 ± 2 пН. Данный подход для определения силы захвата был применим, так как движение частицы в жидкости было ламинарным, число Рейнольдса порядка 10^{-3} (плотность раствора

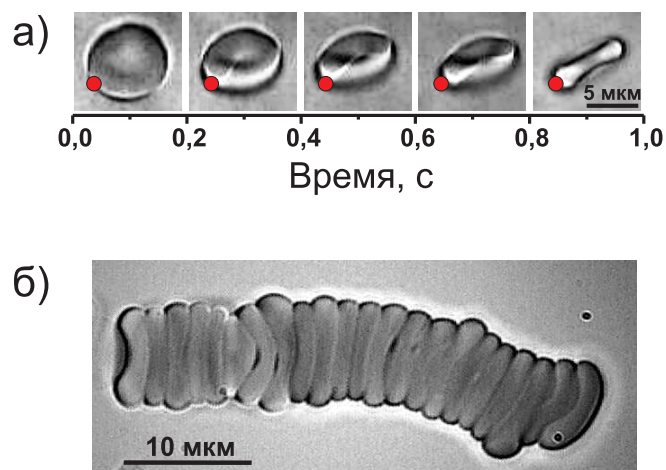


Рис. 31: Микрофотографии эритроцитов в установке оптического пинцета. а) Динамика захвата эритроцита в оптическую ловушку. Микрофотографии сняты в интервалом в 0,2 с. б) Искусственно собранный агрегат эритроцитов.

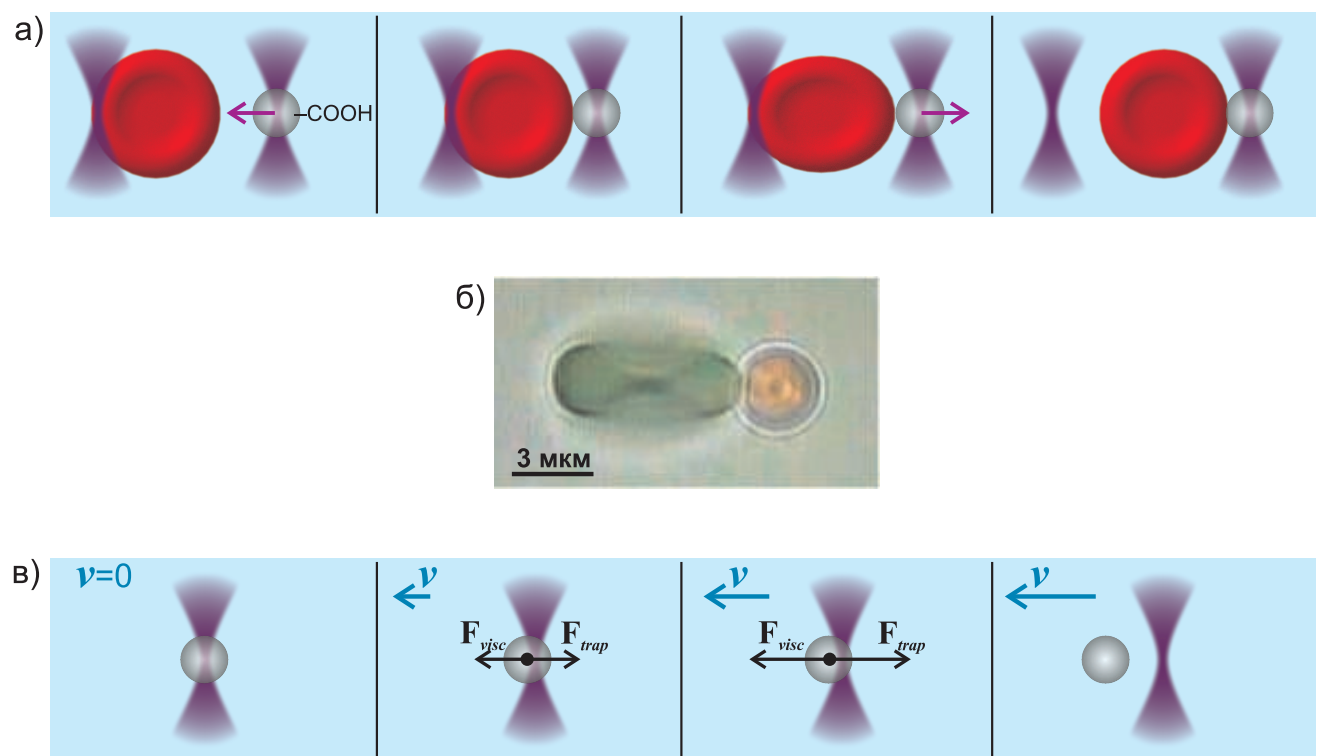


Рис. 32: Определение максимальной силы удержания края эритроцита оптической ловушкой. а) Сравнение силы захвата края эритроцита с силой захвата сферической микрочастицы. б) Микрофотография образованного комплекса эритроцита с полистироловой микрочастицей. в) Калибровка силы захвата сферической микрочастицы F_{trap} по силе вязкого трения F_{visc} .

$\rho = 1036 \text{ кг/м}^3$). Таким образом, в итоге была определена сила захвата края эритроцита $29 \pm 3 \text{ пН}$ при мощности излучения в ловушке 20 мВт . Эта сила пропорциональна мощности ловушки и ее можно выразить:

$$F_{esc} = \alpha P, \quad (90)$$

где P — мощность лазерного излучения в оптической ловушке, $\alpha = 1.45 \pm 0.15 \text{ пН/мВт}$.

2.4. Определения коэффициента эффективной жесткости эритроцита

Зная максимальную силу оптического захвата края эритроцита, можно перейти к исследованию эластичных свойств эритроцита. Для этого в эксперименте одиночный эритроцит в плазме крови захватывался одновременно в две оптические ловушки за противоположные края. Мощность лазерного излучения в первой ловушке была 20 мВт . Меняя положение второй ловушки при различных мощностях лазерного излучения в ней, определяли максимальное удлинение эритроцита dl , которое можно достичь, так чтобы эритроцит оставался захваченным обе ловушки. На рисунке 33б представлена зависимость этого растяжения, полученная с помощью обработки изображения растянутого эритроцита. Каждая точка получена усреднением по 10 экспериментальным реализациям. При силах до 15 пН это удлинение можно аппроксимировать линейным законом с коэффициентом пропорциональности $K = 13 \pm 2 \text{ пН/мкм}$. Погрешность этой величины во многом определяется неточностью определения удлинения посредством обработки видеоизображения. Во время эксперимента также регистрировалось максимальное смещение края эритроцита из первой ловушки dx . Можно определить эффективную жесткость самой оптической ловушки, то есть силу, действующую на край эритроцита при смещении его из центра ловушки на единицу смещения. Для малых смещений сила оказалась пропорциональна смещению с коэффициентом $k = 9 \pm 1 \text{ пН/мкм}$.

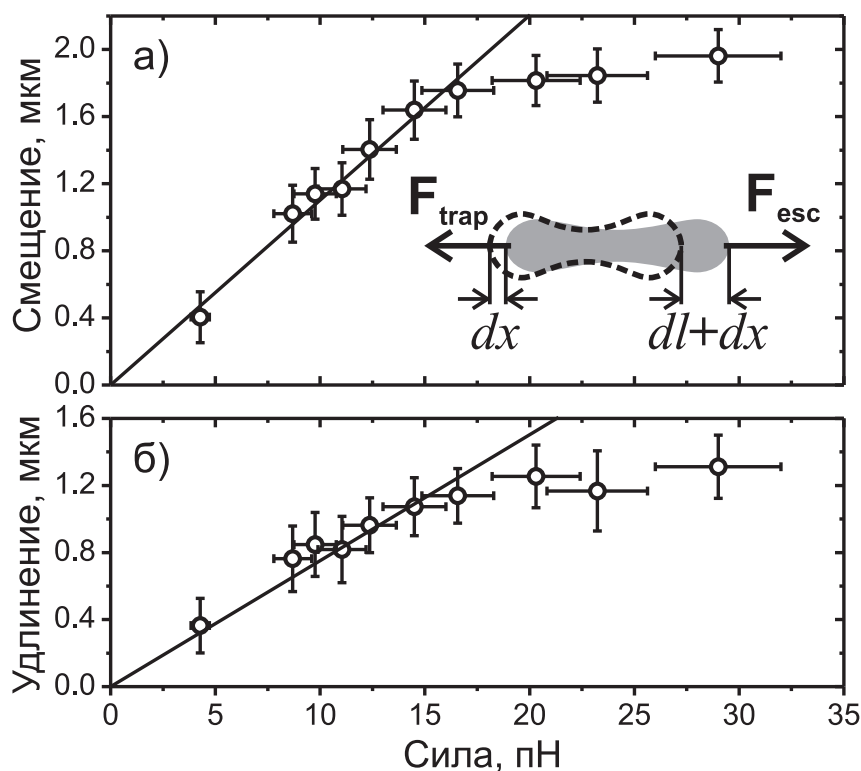


Рис. 33: а) Смещение края эритроцита из первой ловушки при действии на него со стороны второй ловушкой силы F_{trap} . На вставке показана схема проводимого эксперимента, dx — смещение края эритроцита из первой ловушки, dl — удлинение эритроцита, F_{esc} — максимальная сила, развиваемая при выбранной мощности лазерного излучения второй ловушки. б) Зависимость растяжения эритроцита под действием силы со стороны ловушек F_{trap} . Сплошные линии соответствуют линейным аппроксимациям участков зависимостей до 15 пН.

2.5. Применение метода активной реологии в оптическом пинцете для измерения вязко-упругих характеристик эритроцита

Выше мы получили жесткость ловушек и коэффициент упругости самого эритроцита в стационарном режиме. Есть актуальная задача динамического измерения упругих характеристик клеток. Например, детектирования изменения этих характеристик во времени при действии на клетку различных веществ. Для решения этой задачи удобно эритроцит рассматривать как колебательную систему. Из анализа отклика этой системы на внешнее периодическое воздействие можно определить эластичные свойства системы.

В эксперименте одиночный эритроцит в плазме крови захватывался одновременно двумя оптическими ловушками за противоположные края клетки, как это схематично показано на рисунке 34а. Эритроциты выбирались по микроскопии размером 8 мкм, а среднее расстояние между ловушками было равным 7,5 мкм, что соответствует практически недеформированному захваченному эритроциту. Мощность инфракрасных лазеров в образце была 20 мВт для каждой из ловушек, что достаточно для эффективного захвата, но в тоже время не оказывает существенного воздействия оптической ловушки на эритроцит, связанного с нагревом клетки [121]. Затем с помощью акусто-оптического дефлектора положение первой ловушки приводилось в периодическое движение вдоль линии, соединяющей центры ловушек. Положение же второй ловушки оставалось постоянным. Смещение первой ловушки во времени было осуществлено по гармоническому закону с амплитудой 100 нм и частотой в диапазоне от 50 Гц до 1 кГц. Это вызывало осцилляции клетки и, в частности, смещение ее краев. Лазеры с длинами волн излучения в вакууме 670 и 635 нм были сфокусированы на края клеток, а рассеянное излучение собиралось на чувствительную поверхность квадрантных фотодиодов. Чтобы минимизировать влияние на оптический захват, мощность лазеров системы детектирования малых смещений была менее 0,2 мВт. Одной из основных проблем при определении смещений этих краев является то, что в отличие, например, от сферических и изотропных микрочастиц полистирола картина рассеянного излучения от клетки не является симметричной. Это затрудняет прямое измерение абсолютных смещений. Но с другой стороны в эксперименте оказалось, что края эритроцита создают контрастные изображения на соответствующих квадрантных фото-

диодах, что дает возможность с хорошей точностью определять фазу их движения относительно периодического смещения положения ловушки.

Время измерения для каждой частоты осцилляций первой ловушки было T . Тогда, используя преобразование Фурье, сигнал с каждого квадрантного фотодиода можно представить как:

$$\begin{aligned} f(t) &= \frac{A_0}{2} + \sum_{k=1}^{\infty} (A_k \cos k\omega_0 t + B_k \sin k\omega_0 t) = \\ &= \frac{A_0}{2} + \sum_{k=1}^{\infty} C_k \sin(k\omega_0 t - \varphi_k), \end{aligned} \quad (91)$$

где

$$\begin{aligned} A_k &= \frac{2}{T} \int_0^T f(t) \cos k\omega_0 t dt, \\ B_k &= \frac{2}{T} \int_0^T f(t) \sin k\omega_0 t dt, \end{aligned} \quad (92)$$

$$C_k = \sqrt{A_k^2 + B_k^2}, \quad \varphi_k = -\arctg \frac{A_k}{B_k}, \quad (93)$$

и $\omega_0 = 2\pi/T$. При периодическом механическом воздействии с частотой $\omega = n\omega_0$ величина φ_n характеризует сдвиг фазы в смещении краев эритроцита относительно этого воздействия. Таким образом, измеряя в эксперименте временную зависимость смещений краев эритроцита $f(t)_{1,2}$, можно получить величину относительной фазы колебаний противоположных краев эритроцита $\varphi = \varphi_{n2} - \varphi_{n1}$ с помощью стандартного алгоритма численного преобразования Фурье. Здесь и далее индексы “1” и “2” относятся к краям эритроцита в осциллирующей и неподвижной ловушке, соответственно.

Относительная фаза колебаний краев эритроцита φ была измерена как функция частоты колебаний ловушки ω . На рисунке 35 показаны типичные зависимости тангенса этой фазы. Полное измерение занимает 20 с и для контроля воспроизводимости проводится в два направления — при возрастании частоты, и при ее уменьшении. Так как эти зависимости оказались идентичными, то изменениями во времени пренебрегли и результаты для измерений в обоих направлениях были усреднены. Экспериментальные результаты показывают, что тангенс относительной фазы колебаний краев эритроцита пропорционален частоте осцилляций ловушки в диапазоне от 50 Гц до 1 кГц. При этом коэффициент пропорциональности зависит от состояния мембра-

ны эритроцита. В частности, для обычных эритроцитов в плазме крови, которым на графике (рисунок 35) соответствуют незакрашенные точки, этот наклон равен $(-6,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$ с. Закрашенные же точки соответствуют клеткам, предварительно фиксированным путем добавления в образец 2,5% глутарового альдегида, который увеличивает жесткость клетки, связывая трансмембранные белки мембраны. Наклон кривой для зафиксированных эритроцитов оказался равным $(-2,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$ с.

Для объяснения зависимости, представленной на рисунке 35, удобно рассмотреть феноменологическую механическую модель эритроцита, отраженную на рисунке 34б. Жесткости оптических ловушек k и эритроцита K представлены пружинами. Поршнями в модели отражены эффективные коэффициенты вязкого трения γ и Γ модельной системы локализованного в две ловушки эритроцита. Тогда уравнение движения для края эритроцита находящегося в неподвижной (второй) ловушке:

$$m\ddot{x}_2 = -\gamma\dot{x}_2 - k(x_2 - x_2^{trap}) + \Gamma(\dot{x}_1 - \dot{x}_2) - K(x_2 - x_1 - L), \quad (94)$$

где L — длина недеформированной K -пружины, соответствует размеру эритроцита, x_2^{trap} — положение неподвижной (второй) ловушки, x_1 и x_2 — положения краев эритроцита, соответственно, в неподвижной и подвижной ловушках, m отвечает за эффективную массу. Как было показано на примере микрочастиц в начале главы, массой в системах с характерным размером единиц микрометров можно пренебречь. Действительно, средняя масса эритроцита около 10^{-13} кг, и для частот колебаний до 1 кГц должно выполняться условие $m\omega^2 \ll k + K$.

Измеряемыми в эксперименте переменными являются смещения противоположных краев эритроцитов Δx_1 и Δx_2 из точек их равновесия. Тогда уравнение движения:

$$(\gamma + \Gamma)\Delta\dot{x}_2 = \Gamma\Delta\dot{x}_1 - (k + K)\Delta x_2 + K\Delta x_1. \quad (95)$$

Пусть движение краев эритроцита из точек равновесия описывается следующими законами движения $\Delta x_1 = \tilde{x}_1 e^{i\omega t}$, $\Delta x_2 = \tilde{x}_2 e^{i\omega t}$. Подставляя эти решения в уравнение (95), получаем:

$$(k + K + i\omega(\gamma + \Gamma))\tilde{x}_2 = (K + i\omega\Gamma)\tilde{x}_1. \quad (96)$$

В предположении, что частоты рассматриваемого диапазона удовлетворяют условию

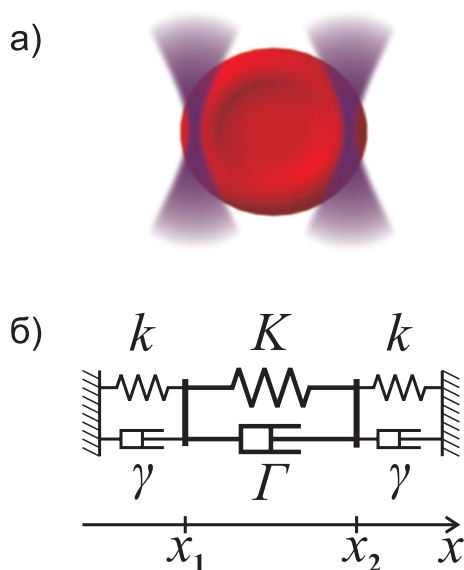


Рис. 34: а) Одиночный эритроцит, находящийся в двух независимых оптических ловушках; б) Феноменологическая механическая модель эритроцита в двух оптических ловушках, k — эффективная жесткость оптических ловушек, K — коэффициент эластичности эритроцита, γ и Γ — эффективные коэффициенты вязкости системы.

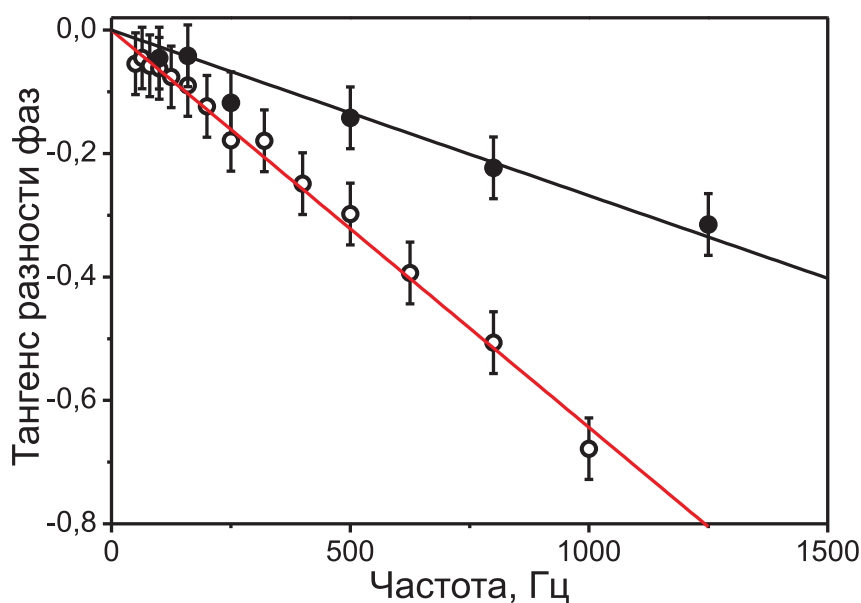


Рис. 35: Зависимость тангенса фазы колебаний края эритроцита в неподвижной ловушке относительно края в осциллирующей ловушке от частоты осцилляций. Не закрашенные точки соответствуют нормальным эритроцитам, а закрашенные относятся к эритроцитам, фиксированным глутаровым альдегидом. Сплошные линии — линейные аппроксимации соответствующих зависимостей.

$\omega^2 \ll k(k + K)/\Gamma(\Gamma + \gamma)$, получаем выражение для тангенса разности фаз колебаний краев эритроцита:

$$\tan \varphi = -\frac{\Gamma k - \gamma K}{k(k + K)}\omega = -\omega\tau. \quad (97)$$

Коэффициент пропорциональности τ определяет вязко-упругие характеристики захваченной в оптическом пинцете биологической клетки, как сложной гидродинамической системы. Коэффициент τ имеет размерность времени, поэтому его можно рассматривать как некое время отклика, связанное с характерным временем распространения механического возмущения в клетке. Экспериментальные данные показывают, что для фиксированного глутаровым альдегидом эритроцита это время сокращается с 640 до 270 мкс, указывая на существенные изменения состояния клетки. Таким образом, величина τ может быть использована для контроля эффективной жесткости клетки.

Длина волны используемых лазеров лежит в так называемом “окне прозрачности” для большинства биологических структур, при этом наименьшее поглощение оптического излучения наблюдается как раз вблизи 970 нм, что соответствует используемым в установке лазерам, формирующим ловушки, с излучением на длине волны 975 нм. Но из-за фокусировки интенсивность лазерного излучения в каждой оптической ловушке достигает величин порядка единиц МВт/см², поэтому необходимо быть уверенным в отсутствии фотоиндуцированных изменений исследуемой клетки в ходе измерения, то есть в том, что предлагаемый метод контроля жесткости клетки сам по себе является неинвазивным. Для проверки данного факта был проведен дополнительный эксперимент. Одиночный эритроцит, как и прежде, был “захвачен” за края в две оптические ловушки. При этом положение первой ловушки осциллировало с частотой 1 кГц и амплитудой 100 нм. Разность фазы колебаний противоположных краев эритроцита измерялась как функция времени. Полученная зависимость показана на рисунке 36. Как видно из графика, на временах до 160 с разность фаз остается постоянной, что говорит об отсутствии существенных изменений в форме или вязко-упругих характеристиках эритроцита в ходе эксперимента. Тем более, что получение полной частотной зависимости разности фаз от 50 Гц до 1 кГц занимает не более 20 с.

3. Определение силы для дезагрегации эритроцитов

Имея данные приведенной выше калибровки силы захвата края эритроцита в оптической ловушке, можно перейти непосредственно к изучению силы взаимодействия эритроцитов между собой. Как было показано в параграфе 3.5.4 обзора литературы, эритроциты подвержены агрегации, то есть эритроциты склонны “прилипать” друг к другу образуя структуры типа “монетных столбиков”. Агрегация/деагрегация эритроцитов влияет на микроциркуляцию крови на уровне микрососудов. В норме и при некоторых патологиях характеристики процессов агрегации/деагрегации различаются, что приводит к ухудшению снабжения тканей кислородом.

3.1. Подготовка исследуемого образца

Способ забора и подготовки крови к исследованиям силового взаимодействия эритроцитов отличался от приведенного выше. Это связано с одновременной отработкой возможного медицинского применения технологии оптического пинцета для диагностики патологий, описанного в работах [6, 122] на примере аутоиммунного заболевания — системной красной волчанки. Поэтому кровь получали согласно нормам забора крови для анализов в Клинике нефрологии, внутренних и профессиональных болезней имени Е.М. Тареева. Пробы крови объемом около 10 мл получали у пациентов из средней локтевой вены натошак между 7.30 и 8.00 часами. Кровь разделяли на части для одновременного исследования различными способами, включая стандартные методы: общий и биохимический анализ крови, а также для экспериментов, посвященных изучению возможности стимулируемого агрегации эритроцитов гемодинамического сопротивления с использованием ветвящейся системы стеклянных трубочек, для исследования реологических свойств эритроцитов с использованием эритроагрегометра и для измерений силы агрегации эритроцитов методом оптического пинцета. В данной работе будут описаны только результаты исследований методом оптического пинцета для контрольной группы здоровых доноров (всего 39 человек).

После забора кровь, стабилизированную EDTA (2 мг/мл), сохраняли в закрытых пластиковых пробирках. Измерения проводили через 3 ± 2 часа. Для этого сначала получали плазму, центрифугированием крови в течении 5 минут при температуре

25°C на центрифуге Eppendorf 5417R с частотой вращения ротора 2500 об/мин, что соответствует ускорению около 660*g*. При центрифугировании форменные элементы крови оседали на дно пробирки, и можно было отделить плазму. Затем исходную кровь разбавляли полученной аутологичной плазмой крови, так чтобы концентрация эритроцитов составляла величину около $5 \cdot 10^3$ мкл⁻¹, что удобно для оптического захвата единичных эритроцитов. Приготовленную суспензию эритроцитов в объеме 40 мкл помещали в герметичную кювету оптического пинцета. При этом покровные стекла кюветы предварительно были очищены в ПАВ и промыты в 3% растворе перекиси водорода.

3.2. Искусственная агрегация и дезагрегация эритроцитов в оптическом пинцете

Для наблюдения процесса агрегации эритроцитов проводился следующий эксперимент. Два одиночных эритроцита захватывались в две оптические ловушки на некотором расстоянии друг от друга. Затем, двигая одну из ловушек, эритроциты сближались до касания. После чего лазерные пучки выключались. Клетки агрегировали самостоятельно, образуя двойной агрегат. Если к полученному агрегату поднести еще одну клетку, то она также прилипнет, и образуется агрегат из трех клеток и т.д. На рисунке 31б показана микрофотография искусственно собранного методом оптического пинцета агрегата эритроцитов.

Измерения силового взаимодействия клеток проводились с использованием только искусственно полученных двойных агрегатов. Для реализации процесса дезагрегации ловушки подводились к краям агрегата и плавно раздвигались в противоположные стороны, разъединяя эритроциты. При этом в процессе проведения экспериментов, в зависимости от мощности лазерного излучения в оптических ловушках, клетки удавалось либо растащить до конечной области соприкосновения эритроцитарных дисков, либо разделить. Обычно с увеличением мощности эритроциты из агрегатов удавалось сдвинуть друг относительно друга на большее расстояние. В используемом диапазоне мощностей излучения в ловушках до 20 мВт из проведенных 85 экспериментальных реализаций только в 8 случаях (9%) наблюдалось разделение агрегата на две отдельные клетки. В остальных случаях сил ловушек даже при 20 мВт не хватало для того, чтобы разделить эритроциты.

3.3. Результаты измерения силы дезагрегации эритроцитов

Результаты для зависимости среднего максимально достижимого расстояния между центрами клеток от силы, приложенной со стороны оптических ловушек, показаны на рисунке 37. В эксперименте после искусственного формирования двойного агрегата эритроцитов расстояние между ловушками увеличивали со скоростью около 0,3 мкм/с. При различных мощностях лазерного излучения в оптических ловушках из диапазона 6–20 мВт, с помощью видеокамеры фиксировали момент, когда агрегат выпадал из одной ловушки, то есть момент, когда сила агрегации эритроцитов F_a становилась равной максимальной силе захвата края клетки F_{esc} . Затем по видеозаписи определяли максимально достижимое расстояние между центрами клеток ΔX от приложенной силы F_{esc} , величину которой можно получить, используя данные приведенной в пункте 2.3 калибровки. На графике представлены данные, относящиеся только к клеткам, разделение которых на две независимых клетки не происходило даже при максимальной силе воздействия со стороны ловушек в 29 ± 3 пН. Это 77 случаев из 85 (91%) экспериментальных реализаций. Важным экспериментальным наблюдением является тот факт, что средняя сила, необходимая для разделения (деагрегации) эритроцитов F_a возрастает с увеличением расстояния между центрами клеток. Более того, эта зависимость имеет пороговый характер. Так, в 8 случаях, когда в эксперименте наблюдалось полное разделение эритроцитов из агрегата, при достижении определенного значения мощности, дезагрегация эритроцитов происходила без приложения больших сил, что указывает на наличие спадающей части зависимости смещения от силы.

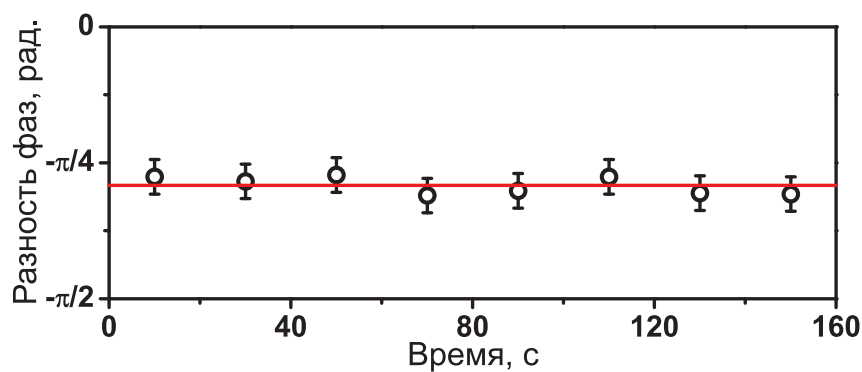


Рис. 36: Временная зависимость разности фаз между колебаниями краев эритроцита в неподвижной и осциллирующей ловушках. Частота осцилляций ловушки составляет 1 кГц, амплитуда — 100 нм. Сплошная линия соответствует среднему значению разности фаз.

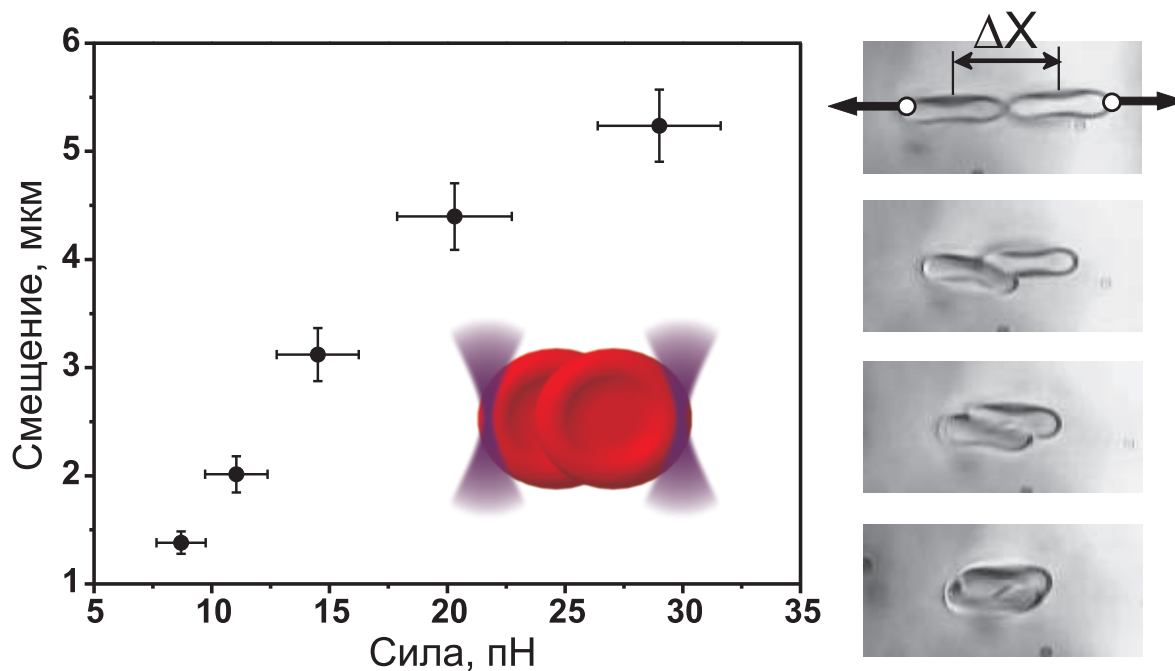


Рис. 37: Зависимость среднего максимально достижимого расстояния между центрами клеток от силы, приложенной со стороны оптических ловушек.

Глава IV

Фотонно-силовая микроскопия электромагнитного поля волноводных мод одномерных фотонных кристаллов

Данная глава работы посвящена изучению силового воздействия на микрочастицу со стороны электромагнитного поля волноводной моды фотонного кристалла. В эксперименте частица была локализована оптической ловушкой в воде вблизи поверхности фотонного кристалла в области экспоненциально спадающей части электромагнитного поля волноводной моды. При этом экспериментально замечено изменение среднего положения микрочастицы при возбуждении волноводной моды, что свидетельствует о силовом воздействии на частицу со стороны электромагнитного поля волноводной моды.

1. Исследуемый образец фотонного кристалла

В данной работе в качестве образца фотонного кристалла исследовалась слоистая структура, выращенная на подложке методом термического напыления. Подложка представляла собой покровное стекло толщиной 0,1 мм. Показатель преломления подложки был определен с помощью рефрактометра Аббе ИРФ-22 и составил $n_d = 1,525$ с показателем дисперсии (число Аббе) $\nu_d = 55$. Образец изготовлен из расчета наличия в нем фотонной запрещенной зоны с центром на длине волны $\lambda_g = 750$ нм при нормальном падении излучения и состоит из 11 пар слоев оксида циркония и диоксида кремния с оптической толщиной $\lambda_g/4$ и одним дополнительным слоем оксида циркония на поверхности толщиной $\lambda_g/8$.

Однако для численного моделирования возбуждения волноводных мод в фотонном кристалле необходимо знание показателей преломления и геометрических толщин слоев. Для этого были проведены дополнительные исследования, проведенные с использованием спектроскопической эллипсометрии на приборе Horiba Uvisel 2. В исследовании с помощью данного прибора были проведены измерения характеристик фотонного кристалла на подложке, а также подложки без фотонного кристалла в спектральном диапазоне от 350 до 2060 нм под углами падения оптического излучения 60 и 70 градусов. Далее производилась аппроксимация данных этих измерений с

помощью программного комплекса, прилагаемого к указанному прибору, используя модель чередующихся слоев и стандартные дисперсионные модели для покровного стекла, оксидов циркония и кремния, входящие в библиотеку программного обеспечения комплекса. Аппроксимация дала следующие значения. Коэффициенты преломления оксида циркония $n = 1,95$, оксида кремния $n = 1,45$ для длины волны 532 нм. Толщины первых 11 слоев оксида циркония 95 нм, оксида кремния 124 нм. Толщина дополнительного слоя оксида циркония составила 38 нм.

Для определения характеристик используемого образца фотонного кристалла были проведены численные расчеты на основе алгоритма, указанного в работе [123]. Этот алгоритм основывается на методике матриц распространения, которую широко используют в решении задач о распространении электромагнитного излучения в слоистых средах.

Рассмотрим среду, состоящую из m слоев с толщинами d_i и величинами комплексной диэлектрической проницаемости ε_i , показателями преломления $n_i = \sqrt{\varepsilon_i}$, где $i = \overline{1, m}$. На эту среду падает плоская электромагнитная волна под углом θ . Введем ортогональную систему координат $x y z$, так, что ось x параллельна плоскости падения и поверхности слоистой среды, ось y перпендикулярна плоскости падения, ось z перпендикулярна поверхности слоистой среды (Рис.38). Будем рассматривать два характерных случая, когда падающее излучение является ТЕ- или ТМ-поляризованным, а в общем случае характеристики линейных многослойных сред можно получить, используя принцип суперпозиции.

Решение уравнений Максвелла в i -м слое для плоских волн, распространяющихся в положительном и отрицательном направлениях оси z , можно представить в виде:

$$\mathbf{E}_i^\pm(\mathbf{r}, t) = \mathbf{E}_i^\pm \exp(\pm i N_i \kappa z + i k_x x - i \omega t), \quad (98)$$

где $k_x = \kappa n_0 \sin \theta$ — тангенциальная составляющая волнового вектора, которая в силу граничных условий сохраняется в каждой из сред, $\kappa = \omega/c$ — значение волнового вектора в вакууме, n_0 — показатель преломления среды, из которой падает излучение на слоистую структуру, $N_i = \sqrt{\varepsilon_i - (k_x/\kappa)^2}$.

Для связи амплитуд i -го и j -го слоев вводятся матрицы перехода $\hat{M}_{ij}$, которые

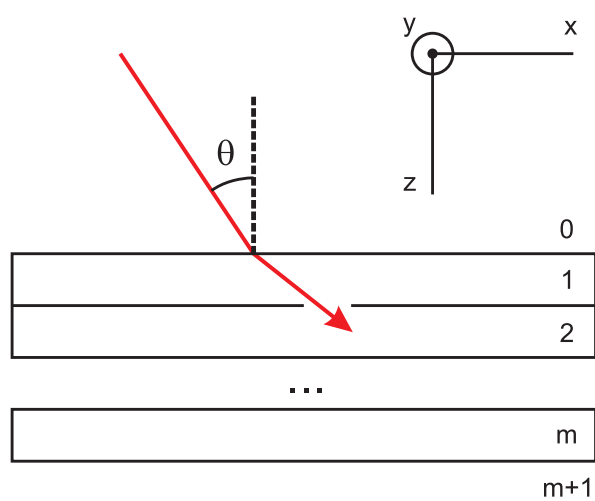


Рис. 38: К описанию метода матриц распространения.

удовлетворяют соотношениям

$$\begin{pmatrix} E_i^+ \\ E_i^- \end{pmatrix} = \hat{M}_{ij} \begin{pmatrix} E_j^+ \\ E_j^- \end{pmatrix}, \quad (99)$$

и в случае линейной среды и фиксированной поляризации выражаются через коэффициенты Френеля

$$\hat{M}_{ij} = \frac{1}{t_{ij}} \begin{pmatrix} 1 & r_{ij} \\ r_{ij} & 1 \end{pmatrix}. \quad (100)$$

Коэффициенты Френеля для для ТЕ-поляризованного света, падающего на границу раздела i -ой и j -ой сред, можно записать как:

$$r_{ij} = \frac{N_i - N_j}{N_i + N_j}, \quad t_{ij} = \frac{2N_i}{N_i + N_j}. \quad (101)$$

А в случае ТМ-поляризованного света:

$$r_{ij} = \frac{\varepsilon_i N_i - \varepsilon_j N_j}{\varepsilon_i N_i + \varepsilon_j N_j}, \quad t_{ij} = \frac{2n_i n_j N_i}{\varepsilon_i N_i + \varepsilon_j N_j}. \quad (102)$$

Учет изменения амплитуды и фазы при распространении в i -м слое проводится с помощью матрицы распространения $\hat{\Phi}_i$:

$$\hat{\Phi}_i = \begin{pmatrix} \exp(iN_i \kappa d_i) & 0 \\ 0 & \exp(-iN_i \kappa d_i) \end{pmatrix}. \quad (103)$$

Тогда матрица, связывающая амплитуды полей до и после прохождения многослойной среды, выражается следующим образом:

$$\hat{T} = \hat{M}_{m+1m} \hat{\Phi}_m \hat{M}_{mm-1} \hat{\Phi}_{m-1} \dots \hat{M}_{10} \quad (104)$$

Итоговый коэффициент отражения по полю от среды выражается через компоненты этой матрицы:

$$r = -T_{21}/T_{22}, \quad (105)$$

а по интенсивности

$$R = |T_{21}/T_{22}|^2. \quad (106)$$

Значения амплитуд на левом крае i -й среды:

$$\begin{pmatrix} E_i^+ \\ E_i^- \end{pmatrix} = \hat{M}_{i+1i} \hat{\Phi}_i \hat{M}_{ii-1} \hat{\Phi}_{i-1} \dots \hat{M}_{10} \begin{pmatrix} 1 \\ r \end{pmatrix} E_0^+. \quad (107)$$

Усиление локального поля вблизи нижней поверхности можно охарактеризовать параметром $L = E_{m+1}^+ / E_0^+ = E_{out} / E_{in}$.

Методом матриц распространения был проведен расчет коэффициентов отражения R и усиления L излучения, падающего из подложки на контактирующий с водой фотонный кристалл, при длине волны, равной $\lambda = 532$ нм. На графике зависимости коэффициента отражения R от угла падения виден минимум при угле падения $\theta = 71,6^\circ$ (см. рисунок 39а), который соответствует максимуму в коэффициенте усиления локального электромагнитного поля $L \approx 2,1$ (см. рисунок 39б). На рисунке 39в показано распределение модуля амплитуды напряженности электрического поля в рассматриваемой структуре вдоль оси z при данном угле падения. Это распределение показывает, что в данной структуре существует волноводная мода с существенной локализацией электромагнитного поля вблизи поверхности фотонного кристалла, контактирующего с водой.

С целью определения спектра пропускания образца фотонного кристалла была собрана установка, показанная на рисунке 40а. В качестве источника света в установке использовалась галогенная лампа накаливания мощностью 60 Вт, ее излучение собиралось коллекторной линзой и с помощью системы линз и диафрагм направлялось через исследуемый образец фотонного кристалла на волоконный вход широкодиапазонного спектрометра (СОЛАР Лазерные Системы, S100). Примененная система позволяла установить с помощью ирисовых диафрагм размер исследуемой области в диапазоне от 1 до 14 мм и числовую апертуру падающего на образец оптического излучения в диапазоне Ч.А. = 0,0013–0,02. Вычитая сигнал со спектрометра, связанный с фоновой засветкой, и нормируя на сигнал в отсутствии образца в держателе, получен спектр пропускания фотонного кристалла для нормально падающего излучения с числовой апертурой 0,008 (см. рисунок 40б). Спектр имеет характерный минимум в окрестности 750 нм, что подтверждает наличие фотонной запрещенной зоны, а следовательно и четвертьволновых слоев в структуре.

Наличие волноводной моды было подтверждено спектроскопией в схеме нарушен-

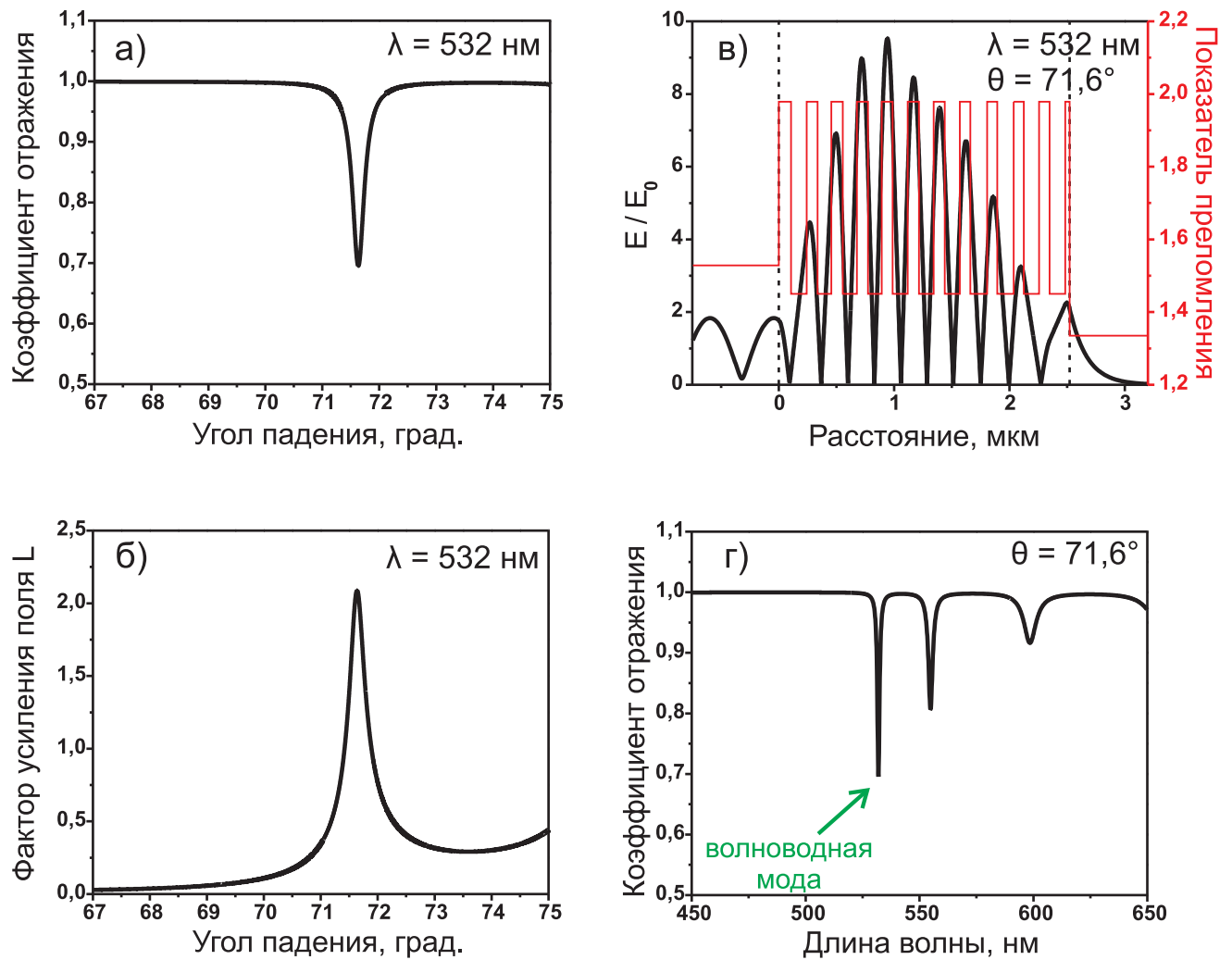


Рис. 39: Результаты расчета методом матриц распространения. Зависимость коэффициента отражения (а) и усиления локального поля вблизи нижней поверхности фотонного кристалла (б) от угла падения излучения с длиной волны в вакууме $\lambda = 532 \text{ нм}$. в) Распределение модуля амплитуды напряженности электрического поля в фотонном кристалле вдоль оси z при возбуждении волноводной моды. г) Спектральная зависимость коэффициента отражения при угле падения из подложки на фотонный кристалл $\theta = 71,6^\circ$.

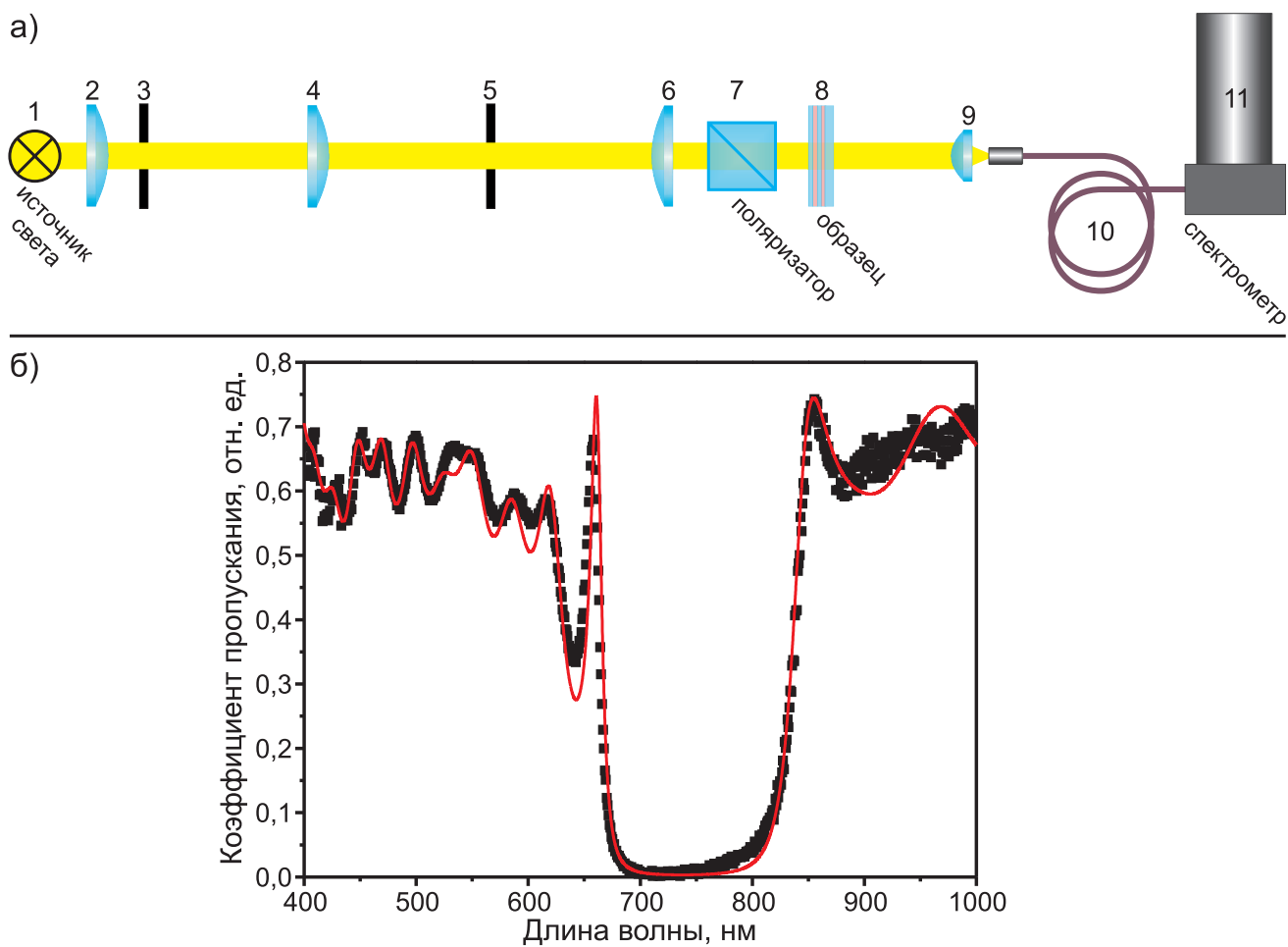


Рис. 40: а) Установка для определения спектра пропускания образца фотонного кристалла. б) Зависимость коэффициента пропускания образца фотонного кристалла от длины волны. Точки соответствуют измеренному спектру пропускания образца, линия — расчет методом матриц распространения.

ного полного отражения в геометрии Кречманна (см. рисунок 41). С этой целью была собрана установка, состоящая из микроскопного предметного столика, на который устанавливался образец, и двух плеч, способных поворачиваться вокруг образца. На левом плече был установлен источник света на основе массива белых светодиодов с коллекторной линзой, поляризатора, и ирисовой диафрагмы, а на правом плече крепился волоконный вход спектрометра. Образец представлял собой герметичную ячейку, состоящую из образца фотонного кристалла и дополнительного покровного стекла с зазором из воды толщиной около 50 мкм. Для заведения излучения в образец использовалась специально изготовленная призма с основанием в виде равнобедренной трапеции. Угол при основании трапеции 55° . Показатель преломления призмы $n_d = 1,659$, коэффициент дисперсии $\nu_d = 33,5$. Оптический контакт между призмой и подложкой фотонного кристалла осуществлялся с помощью невысыхающего иммерсионного масла с показателем преломления $n_d = 1,515$ и коэффициентом дисперсии $\nu_d = 44,3$. Спектр отражения содержит 2 характерных минимума, в окрестности 530 и 560 нм, которые согласуются с расчетами на рисунке 39г и соответствуют первой и второй волноводным модам фотонного кристалла.

Для оценки величины градиентной силы, действующей на пробную полистироловую частицу в электромагнитном поле волноводной моды, используем приближение Релея в предположении, что микрочастица не возмущает оптическую ловушку, как это было сделано в работах [124, 125]. В этом приближении потенциальная энергия системы выражается как интеграл по объему частицы:

$$U = - \int \alpha \mathbf{E}^2(\mathbf{r}) d\mathbf{r}, \quad (108)$$

где α — удельная поляризуемость частицы, которая может быть найдена из формулы Клаузиуса-Моссотти:

$$\alpha = \frac{3}{4\pi} \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2}. \quad (109)$$

Относительный показатель преломления для полистироловых частиц в воде составляет $m = 1,59/1,33$, следовательно $\alpha = 0,03$.

Закон изменения величины амплитуды вдоль оси z имеет вид

$$E = LE_0 \exp(-|z|/z_0), \quad (110)$$

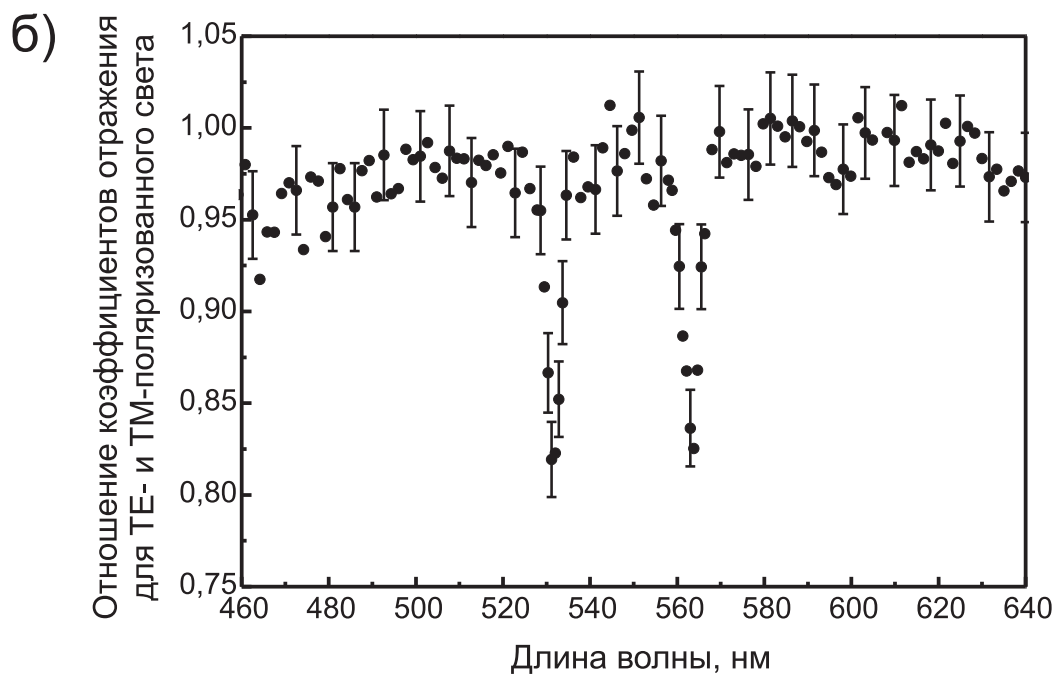
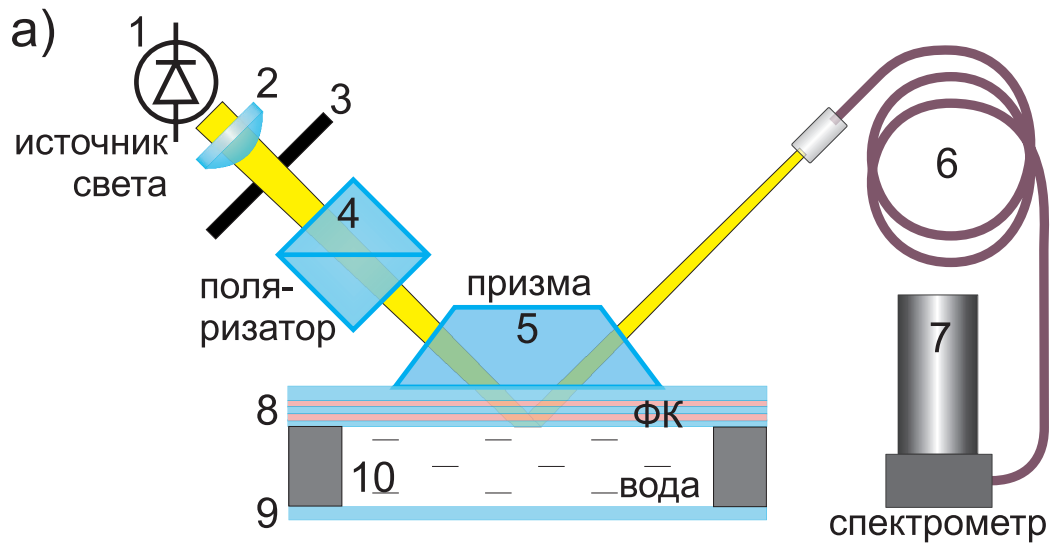


Рис. 41: а) Установка для спектроскопии коэффициента отражения образца фотонного кристалла. б) Спектральная зависимость отношения коэффициентов отражения ТЕ- и ТМ-поляризованного света от образца фотонного кристалла.

где затухание определяется параметром $z_0 = 1/\sqrt{k_x^2 - \varepsilon_{water}\kappa^2}$, ε_{water} — диэлектрическая проницаемость воды, а величину напряженности падающего на фотонный кристалл излучения можно записать как:

$$E_0 = \sqrt{\frac{8\pi W}{cS}}, \quad (111)$$

где W — мощность лазерного излучения, S — площадь поперечного пятна падающего пучка на фотонный кристалл. Рассмотрим сферическую частицу диаметром a , находящуюся в экспоненциально затухающем поле на расстоянии h до поверхности. Тогда выражение для потенциальной энергии можно записать следующим образом:

$$U = -\frac{1}{2}\alpha E_0^2 L^2 \int_h^{h+a} \exp\left(-\frac{2|z|}{z_0}\right) \pi \left(\left(\frac{a}{2}\right)^2 - \left(z - \left(h + \frac{a}{2}\right)\right)^2 \right) dz. \quad (112)$$

Множитель $1/2$ появился после усреднения поля по времени. Тогда величину градиентной силы, действующей на пробную частицу, можно найти дифференцированием выражения (112):

$$F = \frac{dU}{dh} = \frac{\pi\alpha E_0^2 L^2 z_0}{4} \left((a + z_0) \exp\left(-\frac{2a}{z_0}\right) + (a - z_0) \right) \exp\left(-\frac{2h}{z_0}\right). \quad (113)$$

Вычисления дают величину этой силы порядка 10 фН.

2. Экспериментальная установка для одновременного проведения угловой спектроскопии коэффициента отражения и фотонно-силовой микроскопии вблизи границы раздела сред

Экспериментальная установка для фотонно-силовой микроскопии электромагнитного поля вблизи поверхности раздела сред изображена на рисунке 42. Эта установка представляет собой оптический пинцет, совмещенный с установкой для одновременной угловой спектроскопии фотонного кристалла.

Оптическая ловушка формируется при фокусировке инфракрасного лазерного излучения внутри герметичной кюветы. В качестве источника излучения используется одномодовый лазерный диод Lumics LU0975M330-1001F10D с длиной волны 975 нм и выводом излучения мощностью до 330 мВт в одномодовое оптическое волокно. Ста-

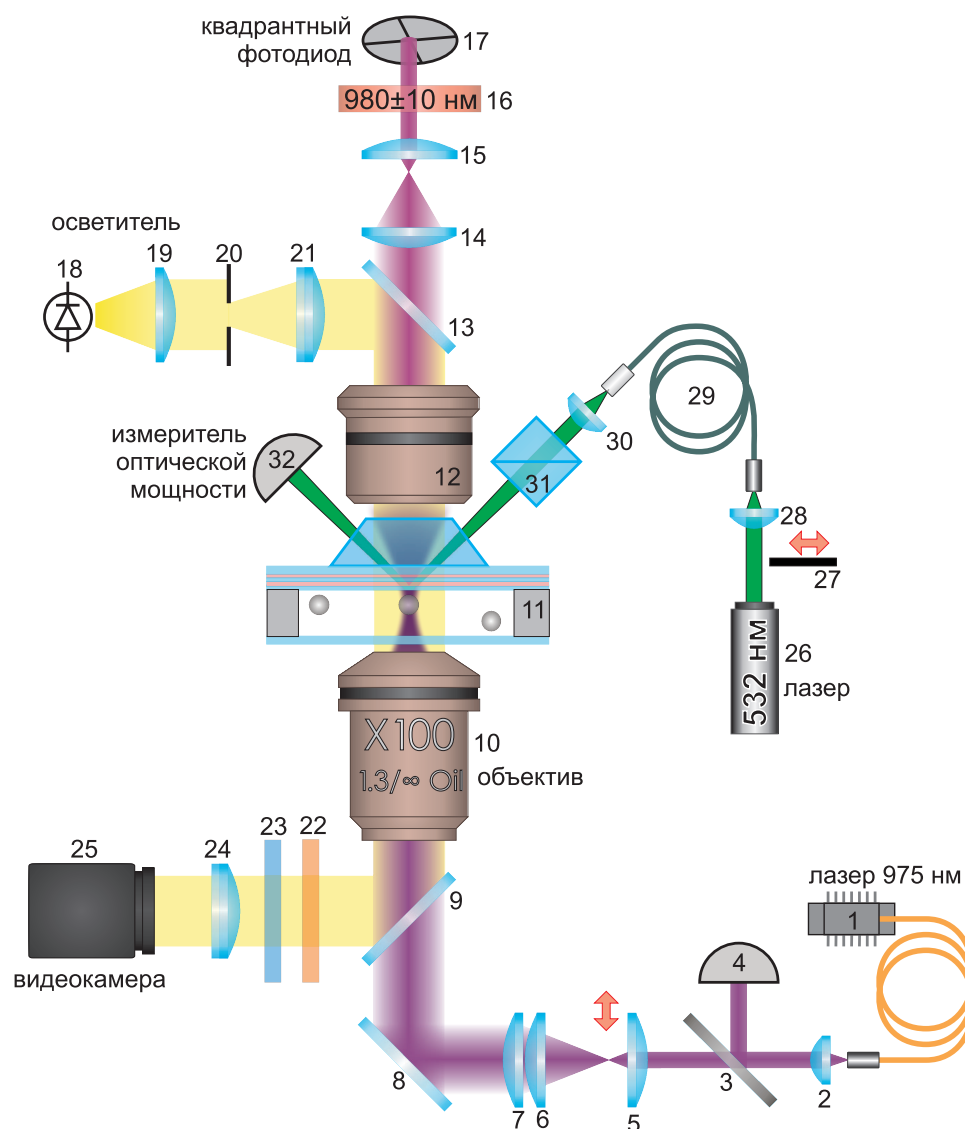


Рис. 42: Установка для фотонно-силовой микроскопии электромагнитного поля вблизи поверхности образца фотонного кристалла. 1 — лазерный диод 975 нм, 2, 30 — коллиматор лазерного излучения, 3 — ослабляющий оптический фильтр, 4 — фотодиод, 5–7 — система линз для управления положением ловушки, 8 — зеркало, 9, 13 — дихроичные светоделители, 10, 12 — объективы, 11 — исследуемый образец, 14–15 — система линз для сопряжения выходной апертуры объектива 12 и светочувствительной области квадрантного фотодиода 17, 16 — оптический фильтр, пропускающий излучение 980 ± 10 нм, 18 — светодиод, 19 — коллекторная линза системы освещения, 20 — полевая ирисовая диафрагма, 21, 24 — ахроматический линзовый дуплет, 22–23 — система оптических фильтров, 25 — ПЗС-видеокамера, 26 — лазер 532 нм, 27 — управляемый с компьютера механический затвор, 28 — асферическая линза для заведения излучения лазера 532 нм в одномодовое поляризационно-сохраняющее оптическое волокно 29, 31 — поляризационная лазерная призма Глана, 32 — измеритель мощности лазерного излучения

бильная работа диода обеспечивается с помощью источника тока Arroyo Instruments LaserSource 4220 и контроллера температуры Arroyo Instruments TECSource 5240. Выходящее из оптического волокна излучение коллимируется с помощью асферической линзы и направляется через ослабляющий оптический фильтр и систему линз и зеркал на входную апертуру объектива. Ослабляющий фильтр установлен под углом 45° и пропускает 7.5% излучения, что позволяет существенно ослабить влияние обратного отражения от “захваченной” в ловушку частицы на работу лазера. Для контроля стабильности работы лазера часть его излучения, отраженная от поверхности ослабляющего фильтра, регистрируется с помощью кремниевого фотодиода Thorlabs DET36A/M, подключенного к одному из каналов аналогово-цифрового преобразователя платы сбора данных National Instruments PCIE-6353. Все измерения в работе проводились в режиме, когда флуктуации сигнала с фотодиода не превышали 1%. Проходя ослабляющий фильтр, лазерное излучение попадает на систему линз для управления положением ловушки в образце. Первый элемент этой системы представляет собой асферическую линзу, установленную на трехкоординатный трансляционный столик. Вращение микрометрических винтов данного столика позволяет изменять угол, под которым излучение попадает в объектив, при этом не меняя интенсивности заводимого в объектив излучения. Второй и третий элементы системы управления положением ловушки представляют собой две линзы с подобранной кривизной поверхностей для минимизации сферических аберраций. Падающее на объектив излучение имеет Гауссов профиль распределения, при этом интенсивность убывает в e^2 раз при смещении на 2,2 мм от оси пучка. Объектив с фокусным расстоянием 1,8 мм и числовой апертурой 1,3 фокусирует излучение инфракрасного лазера в герметичной кювете, образованной покровным стеклом и фотонным кристаллом на подложке с зазором 10–20 мкм, и заполненной водой с небольшим количеством 1-мкм частиц полистирола (концентрация около $5 \cdot 10^6$ мл $^{-1}$). При этом вблизи фокальной точки формируется оптическая ловушка для микрочастиц. Чтобы предотвратить адгезию микрочастиц к поверхности фотонного кристалла, образец фотонного кристалла предварительно очищался с помощью смеси анионных и неионогенных поверхностно-активных веществ, промывался в 3% растворе перекиси водорода, а затем промывался в 1% растворе бычьего сывороточного альбумина. Для повышения эффективности оптического захвата вблизи поверхности фотонного кристалла пока-

затель преломления иммерсионного масла был увеличен с 1,515 до 1,529 добавлением в него 10% по объему 1-бромнафталина, отличающегося высоким показателем преломления (по результатам измерения на рефрактометре — 1,659), покровное стекло имело размер 0,1 мм вместо стандартных для данного объектива 0,17 мм и также немного увеличенный показатель преломления 1,526. Повышение эффективности захвата в данном случае обеспечивалось частичной компенсацией сферических аберраций, возникающих на границе раздела стекло–вода [126–129]. Для позиционирования относительного положения образца и ловушки кювета с образцом расположена на оборудованном микрометрическими винтами предметном столике, который позволяет смещать образец в плоскости поверхности фотонного кристалла, объектив располагается на трансляционном столике, совмещенном с подачей на основе обратного пьезоэффекта, что позволяет перемещать этот объектив и положение ловушки вдоль оптической оси с нанометровой точностью. Рассеянное вперед захваченной частицей излучение инфракрасного лазера затем собирается вторым объективом, имеющим фокусное расстояние 16 мм и числовую апертуру 0,5. Собранное вторым объективом излучение направляется с помощью системы линз на чувствительную поверхность квадрантного фотодиода. Примененная оптическая схема совместно с использованием гальванически развязанного биполярного источника питания фотодиода на основе аккумуляторных элементов и подключения к высокоразрядному дифференциальному аналогово-цифровому преобразователю с уровнем собственных шумов менее 21 мкВ в диапазоне измеряемых напряжений $\pm 0,2$ В позволяет осуществлять контроль положения “захваченной” частицы внутри оптической ловушки с нанометровой точностью. Дополнительный светофильтр, пропускающий излучение в узком спектральном диапазоне 980 ± 10 нм, исключает влияние других источников излучения на регистрируемый квадрантным фотодиодом сигнал. Наблюдение за локализованной в оптической ловушке частицей осуществлялось с помощью подключенной к компьютеру черно-белой КМОП-видеокамеры Thorlabs DCC1545M с разрешением 1280×1024 пикселя. Освещение образца проводилось в геометрии “на просвет” с помощью осветителя на основе белого светодиода. Излучение светодиода собиралось с помощью асферической коллекторной линзы и направлялось на полевую диафрагму. Затем изображение диафрагмы строилось в области образца с помощью ахроматической линзы и второго объектива. Для заведения света в этот объектив применено дихроичное зеркало

Thorlabs DMLP900L, которое пропускает 98% излучения 975 нм и отражает более 97% в диапазоне 400–870 нм. Такое же зеркало служит для направления видимого излучения на видеокамеру после первого объектива. Фотоокуляр видеокамеры изготовлен из ахроматического линзового дуплета для видимого диапазона с фокусным расстоянием 60 мм и обеспечивает 33х кратное увеличение области 200×160 мкм. Для предотвращения засветки видеокамеры перед дуплетом установлены светофильтры Schott OG-570 и S-8612, которые практически полностью поглощают излучение на длинах волн лазерных источников в установке. Для возбуждения волноводной моды в фотонном кристалле используется твердотельный Nd:АИГ лазер с внутрирезонаторным удвоителем и длиной волны излучения 532 нм. Управляемый с компьютера механический затвор может блокировать излучение лазера. В открытом положении затвора излучение данного лазера с помощью асферической линзы заводится в одномодовое сохраняющее поляризацию оптическое волокно. Второй конец оптического волокна установлен на поворотном плече совместно асферической линзой и с лазерной призмой Глана. Линза направляет выходящее из волокна излучение на образец фотонного кристалла, а лазерная призма Глана позволяет установить ТЕ-поляризацию падающего на фотонный кристалл излучения. Специально изготовленная призма с основанием в виде трапеции позволяет не только эффективно возбуждать волноводную моду в геометрии нарушенного полного внутреннего отражения, но оставляет возможность для освещения образца и регистрации рассеянного частицей излучения через верхнюю грань. Для проведения угловой спектроскопии отраженное от фотонного кристалла излучение лазера 532 нм регистрируется с помощью подключенного к компьютеру измерителя мощности Ophir PD300. На рисунке 43 изображена зависимость мощности отраженного ТЕ-поляризованного излучения от угла падения на фотонный кристалл из подложки. Минимум при угле падения около 74° возникает из-за перекачки энергии падающего света в волноводную моду. На вставке показано получаемое с видеокамеры изображение, соответствующее возбуждению волноводной моды в фотонном кристалле. Из-за рассеяния на шероховатостях и дефектах на изображении отчетливо виден след распространяющегося в фотонном кристалле излучения волноводной моды.

При работе на установке нужно учитывать, что, поскольку в эксперименте используется иммерсионный объектив, и показатель преломления иммерсионного масла

существенно отличается от показателя преломления воды 1,333, смещение объектива Δd_0 не равно смещению перетяжки Δd . Действительно, если луч, распространяющийся в иммерсионном масле, составляет угол β с оптической осью (см. рисунок 44), то в воде он будет составлять угол θ с этой осью, причем эти углы связаны законом Снеллиуса $\sin \beta / \sin \theta = 1,333/1,526$. Численные расчеты, проведенные в приближении геометрической оптики с учетом экспериментальных условий (апертура и фокусное расстояние объектива, профиль пучка), показывают, что смещение объектива на 1 мкм соответствует изменению положения ловушки в образце на 0,75 мкм. Чтобы подтвердить результаты расчетов, была дополнительно проведена следующая серия экспериментов. В установку была помещена кювета с суспензией, в качестве верхней стенки которой вместо фотонного кристалла было установлено покровное стекло. Вблизи этого стекла осуществлялся захват микрочастицы и регистрировалось напряжение V_z сигнала с детектора на квадрантном фотодиоде, пропорциональное суммарной освещенности всех секций фотодиода рассеянным на частице излучением лазера с длиной волны 975 нм. В стандартной методике по этому напряжению определяется смещение микрочастицы вдоль оси Oz , так как оно обычно линейно связано со смещением частицы из центра перетяжки в направлении распространения пучка [2]. С другой стороны, среднее значение напряжения $\langle V_z \rangle$ может быть использовано для определения расстояния между поверхностью кюветы и равновесным положением частицы. На рисунке 45а показан пример экспериментальной зависимости $\langle V_z \rangle$ от Δd в случае, когда верхней стенкой кюветы служило покровное стекло. При $\Delta d = 0$ перетяжка формируется выше поверхности стекла, так что частица прижата к поверхности и ее смещение из перетяжки велико. С ростом Δd положение перетяжки приближается к поверхности, и V_z монотонно растет. Наконец, при смещении перетяжки внутри образца частица локализуется в ней, однако наблюдается слабое увеличение V_z , так же монотонное. Это может быть использовано для определения расстояния между частицей и поверхностью.

Однако, когда на поверхность верхнего покровного стекла методом термического вакуумного напыления нанесли полупрозрачный слой серебра толщиной примерно 40 нм и коэффициентом отражения на длине волны 975 нм около 0,9, зависимость перестала иметь монотонный характер (см. рисунок 45б). Это объясняется формированием стоячей волны, которая сама по себе может использоваться для управления

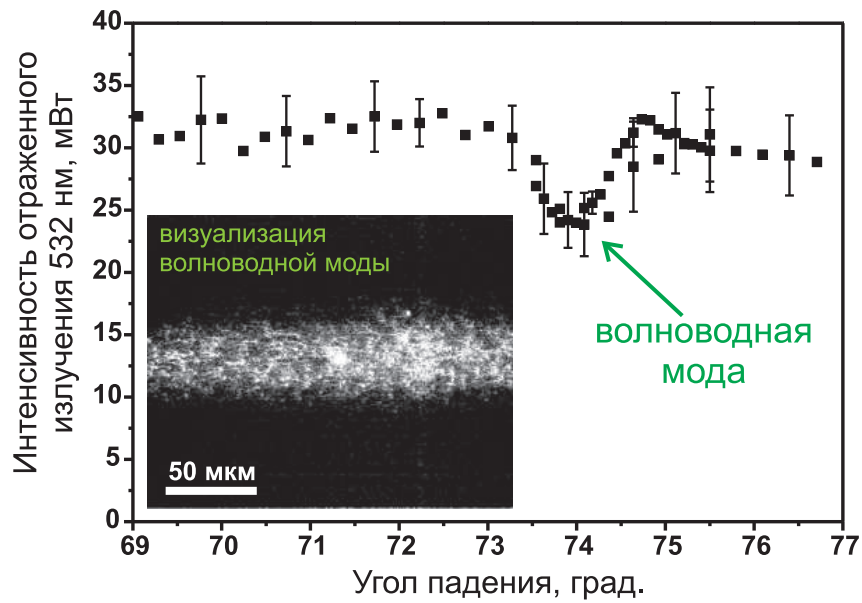


Рис. 43: Зависимость мощности отраженного ТЕ-поляризованного излучения длиной волны 532 нм от угла падения этого излучения на фотонный кристалл из подложки. На вставке показано получаемое с видеокамеры изображение, соответствующее возбуждению волноводной моды в фотонном кристалле.

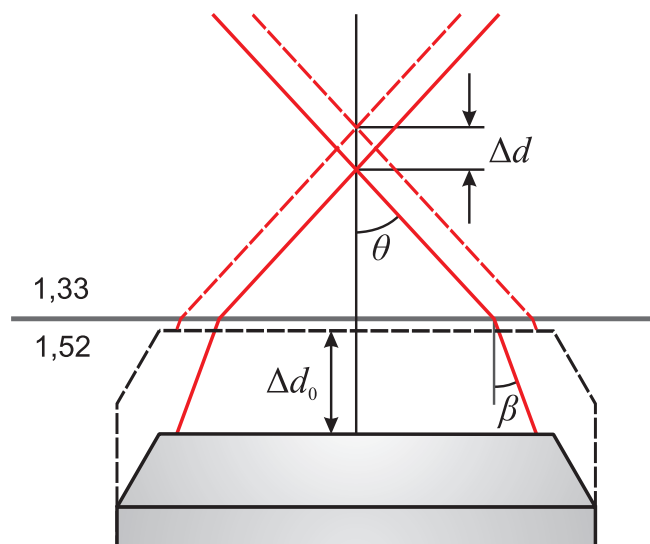


Рис. 44: Иллюстрация к расчету связи между смещением объектива Δd_0 и смещением перетяжки Δd .

положением микрочастиц, что может быть использовано для сортировки [130]. То есть стоячая волна оказывает значительное влияние на потенциал оптической ловушки, так что положение захваченной микрочастицы перестает однозначно управляться перемещением объектива. Несмотря на то, что величина апертурного угла захватывающего объектива составляет более 70° , то есть вклад интенсивности отраженного излучения быстро убывает с расстоянием до поверхности, искажение потенциала ловушки наблюдается более чем на 10 мкм от нее. Характер этой зависимости можно объяснить, положив в первом приближении, что равновесные положения частицы определяются в основном конфигурацией стоячей волны, а положение перетяжки вносит вторичный вклад. Таким образом, в зависимости от размера частицы ее центр в положении устойчивого равновесия может находиться в узлах (см. рисунок 46а), либо в пучностях волны (см. рисунок 46б). Начнем теперь смещать положение перетяжки вниз, увеличивая расстояние от нее до поверхности. Если частица при этом остается неподвижной, ее смещение из перетяжки растет. Вместе с ним растет и сигнал V_z на квадрантном фотодиоде. Наконец, при некотором положении перетяжки частица начинает чувствовать соседнюю потенциальную яму и может локализоваться в ней. При этом V_z резко уменьшается. На малых расстояниях от поверхности вид зависимости отличается для различного направления движения захватывающего объектива. В случае, если фокальная перетяжка объектива приближается к поверхности, характер поведения частицы сохраняется — она меняет свое положение скачком. Если расстояние между перетяжкой и поверхностью увеличивается, то зависимость имеет такой же вид, как если бы частица была зафиксирована вблизи поверхности и не двигалась [131]. Это связано с тем, что ближайшая к поверхности пучность создает наиболее глубокую потенциальную яму для частицы.

Для определения конфигурации устойчивых положений частицы в стоячей волне можно положить, что микрочастица не возмущает оптическую ловушку. Потенциальная энергия системы в этом приближении выражается как интеграл по объему частицы [124, 125]:

$$W = - \int \alpha \mathbf{E}^2(\mathbf{r}) d\mathbf{r}, \quad (114)$$

где α — удельная поляризуемость микрочастицы. В приближении плоских волн ин-

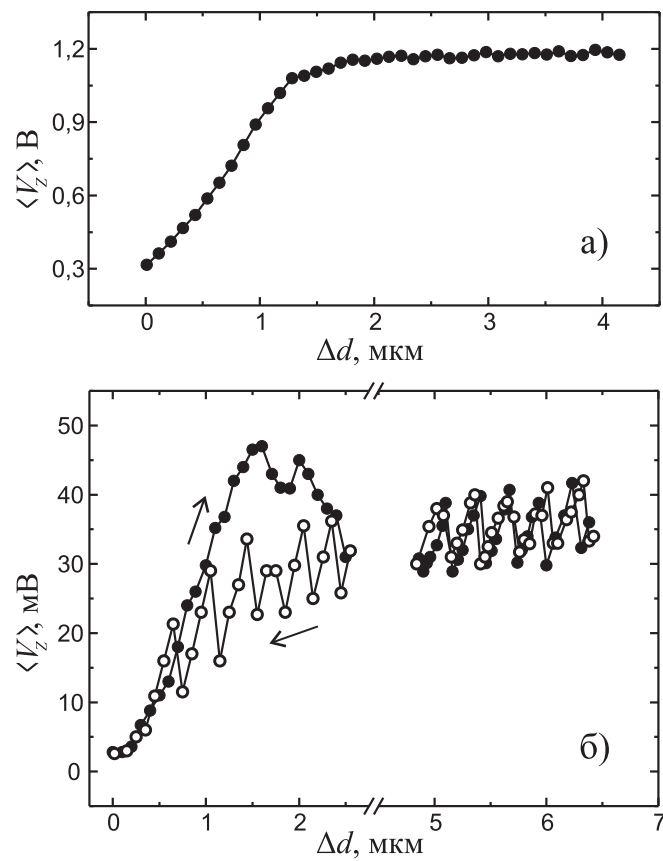


Рис. 45: Зависимость среднего значения напряжения, получаемого с детектора на квадрантном фотодиоде $\langle V_z \rangle$, от смещения перетяжки Δd . а) В качестве верхней стенки кюветы используется покровное стекло. б) На поверхность стекла нанесена серебряная пленка. Черные точки — увеличение расстояния между поверхностью и перетяжкой, белые — уменьшение

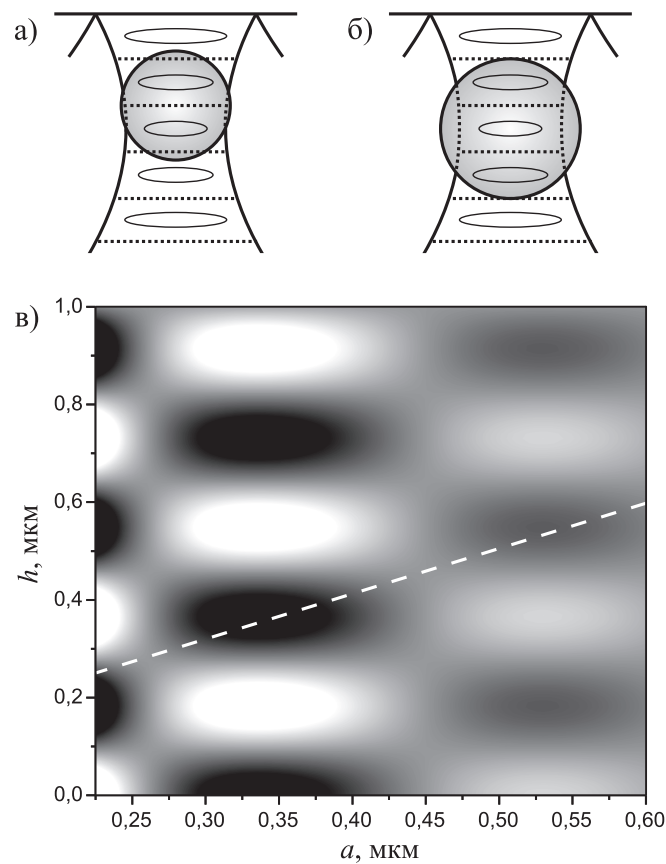


Рис. 46: Стоячие волны вблизи металлической пленки при различных размерах частицы: а) равновесное положение соответствует узлу стоячей волны; б) равновесное положение соответствует пучности. в) Распределение потенциальной энергии, полученное в приближении Релея (a — радиус частицы, h — расстояние между центром частицы и поверхностью). Энергия нормирована на объем частицы, светлые области соответствуют высоким значениям. Штриховая линия — частица касается поверхности, положения частицы под этой линией физически не реализуются.

теграл (114) с точностью до коэффициентов имеет вид:

$$W \propto - \int_{h-a}^{h+a} \sin^2 \left(\frac{\pi z}{\Lambda} \right) (a^2 - (z - h)^2) dz, \quad (115)$$

где $\Lambda = \lambda/(2n)$ — период стоячей волны, a — радиус частицы, n — показатель преломления жидкости в кювете, h — расстояние между поверхностью и центром частицы.

На рисунке 46в представлена зависимость $W(h, a)$, рассчитанная при $\lambda = 975$ нм, $n = 1.33$. Темные области на графике соответствуют минимумам потенциальной энергии, а следовательно, положениям устойчивого равновесия. В эксперименте использовались частицы диаметром 1 мкм, что, как видно из результатов расчета, соответствует конфигурации, изображенной на рисунке 46б. Если частица локализована в трех ближайших к поверхности пучностях, то зазор между ней и поверхностью составляет около 50 нм. Период стоячей волны в веществе составил 365 нм, что соответствует периоду перескоков, изображенном на рисунке 45б, и подтверждает полученное численно соотношение $\Delta d/\Delta d_0 = 0,75$. Результаты исследования явления сдвига ловушки оптического пинцета относительно положения фокальной перетяжки объектива вблизи отражающих поверхностей являются оригинальными и опубликованы в работе [132]. В этой работе предлагается использовать формирование стоячей волны при интерференции волн, формирующих перетяжку, с отраженными от поверхности для локализации микрочастиц на заданном расстоянии от этой поверхности с точностью, соответствующей броуновским флуктуациям в оптическом пинцете.

3. Экспериментальные результаты по фотонной микроскопии первой волноводной моды в одномерном фотонном кристалле

Эксперимент по фотонной микроскопии проводился следующим образом. В оптическую ловушку вблизи поверхности фотонного кристалла захватывалась микрочастица. Расстояние между частицей и фотонным кристаллом выставлялось с точностью 50 нм с помощью пьезоэлектрической подачи объектива. Затем область фотонного кристалла вблизи частицы освещалась через призму с помощью лазера 532 нм. Интенсивность оптического излучения в центре освещаемой области составляла около 1 кВт/см². Сигнал с квадрантного фотодиода, соответствующий смещениям микро-

частицы, регистрировался аналогово-цифровым преобразователем и записывался в постоянную память компьютера с частотой дискретизации 50 кГц в течении 30 секунд. Затем излучение лазера 532 нм блокировался затвором и, аналогично, в течении 30 секунд производилась запись сигнала. Запись в присутствии и отсутствии излучения лазера 532 нм повторялась поочередно по 10–50 раз для каждого из рассмотренных расстояний от частицы до поверхности фотонного кристалла и при всех рассмотренных углах падения лазерного излучения. В эксперименте “захваченные” в ловушку оптического пинцета микрочастицы постоянно смещались в связи с броуновским движением. Эти смещения изменяли картину рассеяния частицами и вызывали изменения в сигнале с секций квадрантного фотодиода, при этом регистрируемое напряжение считалось линейно связанным с данным смещением частицы из центра оптической ловушки. Тогда спектральная плотность мощности сигнала для каждой независимой декартовой координаты определяется выражением:

$$P_V(f) = \frac{S^2 D / (2\pi^2)}{f_c^2 + f^2}, \quad (116)$$

где $f_c = \frac{k}{2\pi\gamma}$ — частота отсечки, k — жесткость ловушки в данном направлении, γ — коэффициент вязкого трения, $D = k_B T / \gamma$ — коэффициент диффузии, S — коэффициент пропорциональности между сигналом с квадрантного фотодиода и реальным смещением частицы из центра оптической ловушки, например, для смещений вдоль оси x можно записать $x = S_x V_x$. Следует отметить, что при нахождении вблизи границы раздела, нужно учитывать влияние поверхности на γ . Так, для движения по оси, направленной вдоль границы раздела, коэффициент вязкого трения γ частицы радиусом a на расстоянии h от ее центра до поверхности записывается в виде [2, 119]:

$$\gamma_{x,y} = \frac{\gamma_0}{1 - \frac{9}{16} \frac{a}{h} + \frac{1}{8} \left(\frac{a}{h}\right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{a}{h}\right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{a}{h}\right)^5}, \quad (117)$$

где $\gamma_0 = 6\pi\eta a$, η — динамическая вязкость жидкости (для воды 0,95 мПа·с). А для направления движения перпендикулярно границе раздела зависимость коэффициента вязкого трения можно выразить через расстояние от поверхности до ближайшего

края частицы $H = h - a$ как [133]:

$$\gamma_z = \frac{6H^2 + 9aH + 2a^2}{6H^2 + 2aH} \gamma_0. \quad (118)$$

Таким образом, аппроксимируя спектральную плотность мощности, полученную по флуктуациям приходящего на детектор сигнала с помощью алгоритма быстрого преобразования Фурье, лоренцевой формой линии (116) для каждого направления были рассчитана жесткость ловушки κ и коэффициент S . Типичный график спектральной плотности мощности сигнала показан на рисунке 47а. Используя полученное значение коэффициента S , из исходных данных можно получить распределение вероятности смещения частицы из центра ловушки, которое при тепловом равновесии должно иметь вид:

$$\rho(\mathbf{r}) \propto \exp\left(-\frac{U(\mathbf{r})}{k_B T}\right). \quad (119)$$

А потенциальную энергию можно найти, используя выражение:

$$U(\mathbf{r}) = -k_B T \ln \rho(\mathbf{r}). \quad (120)$$

На рисунке 47б показаны типичные зависимости потенциальной энергии от смещения частицы из центра ловушки в присутствии излучения волноводной моды фотонного кристалла и при отсутствии возбуждающего излучения лазера 532 нм. Сдвиг положения минимума потенциальной энергии при возбуждении волноводной моды объясняется силовым воздействием на частицу со стороны электромагнитного поля распространяющейся в кристалле моды. Умножая найденную величину жесткости оптической ловушки k на среднюю величину смещения частицы при возбуждении волноводной моды, можно определить величину этого силового воздействия. На рисунке 48 показаны результаты измерения силы. Как видно из графиков, максимальное силовое воздействие на частицу происходит при угле падения лазерного излучения из подложки на фотонный кристалл около 74° , что соответствует резонансному возбуждению волноводной моды в схеме нарушенного полного внутреннего отражения. Серия измерений показывает, что при приближении пробной частицы к поверхности фотонного кристалла сила, действующая со стороны электромагнитного поля

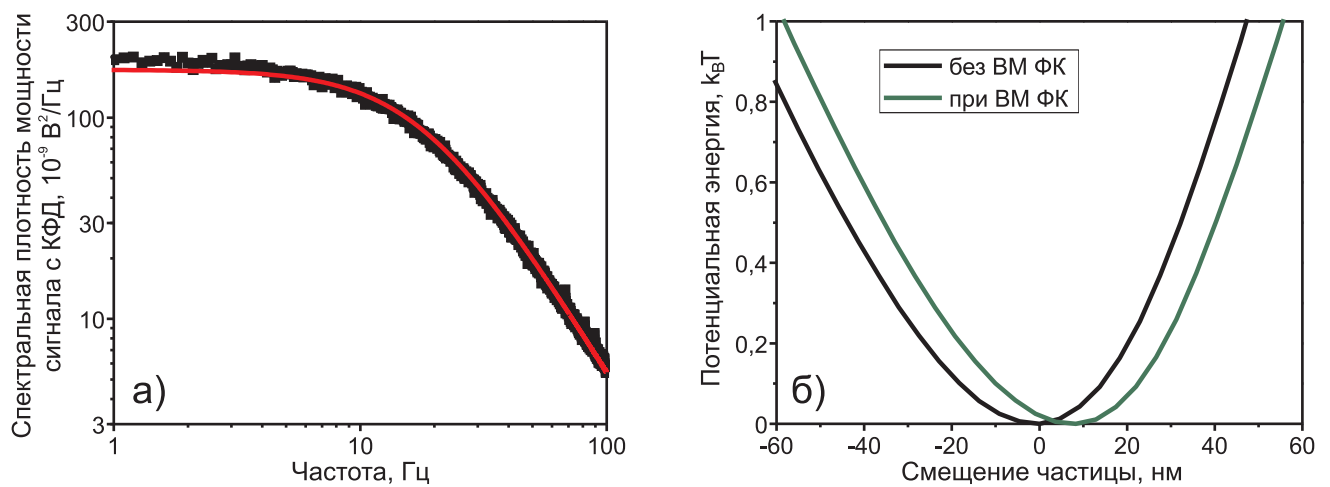


Рис. 47: Эксперимент по фотонно-силовой микроскопии. а) График спектральной плотности мощности сигнала с квадрантного фотодиода (КФД), черные точки — экспериментально полученная зависимость, красная линия — аппроксимация лоренцевым контуром. б) Потенциальная энергия микрочастицы, локализованной в ловушке вблизи поверхности фотонного кристалла; черная кривая соответствует случаю отсутствия излучения лазера 532 нм, возбуждающего волноводную моду в фотонном кристалле (ВМ ФК); зеленая кривая — в присутствии излучения данного лазера.

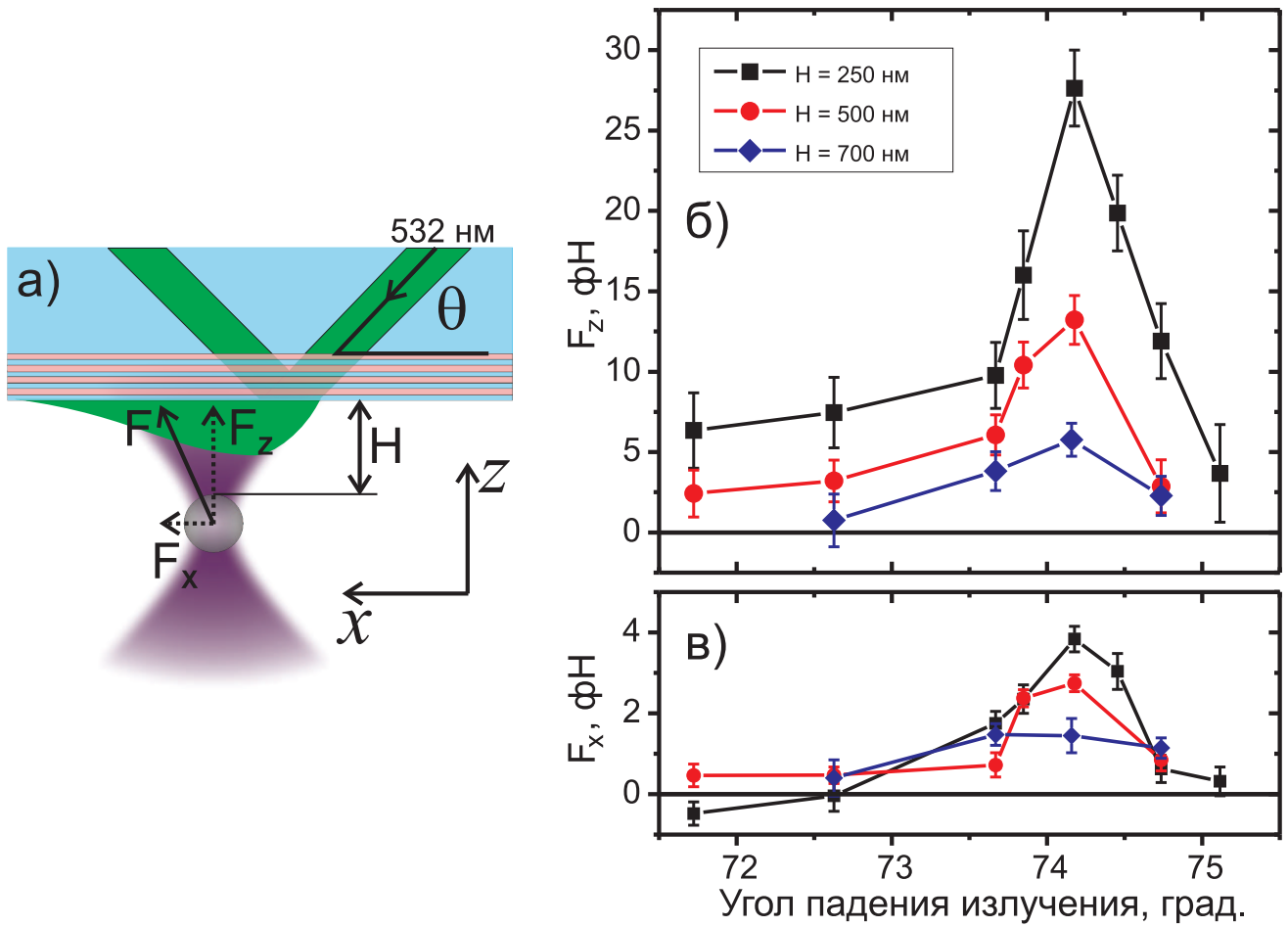


Рис. 48: Результаты измерения силы, действующей на частицу со стороны электромагнитного поля волноводной моды фотонного кристалла: а) иллюстрация эксперимента; б) зависимость нормальной составляющей силы (проекции на ось Oz); в) зависимость проекции силы на ось Ox .

волноводной моды, также увеличивается, и в случае расположения частицы на расстоянии 0,25 мкм от фотонного кристалла достигает величины около 0,03 пН. Таким образом, обнаружено силовое воздействие электромагнитного поля волноводной моды фотонного кристалла на пробную диэлектрическую частицу, расположенную вблизи поверхности этого кристалла.

Заклучение

Основные результаты диссертационной работы могут быть сформулированы следующим образом.

- Создан экспериментальный комплекс оптического пинцета с двумя независимыми ловушками и возможностью создания магнитного поля в области оптических ловушек для исследования взаимодействия магнитных микрочастиц. Установка позволяет создавать внешнее магнитное поле напряженностью 0–62 Э в области образца и осуществлять регистрацию малых смещений частиц с нанометровой точностью. Расстояние между ловушками можно устанавливать в диапазоне от 0 до 50 мкм.
- Экспериментально, численно и теоретически получена корреляционная функция броуновских смещений двух магнитных микрочастиц, расположенных на расстоянии друг от друга в двух оптических ловушках. Вид корреляционной функции зависит от силы магнитного взаимодействия между частицами. При наличии сил притяжения между частицами значения корреляционной функции увеличиваются, а при отталкивании – уменьшается. С помощью аппроксимации функции кросс-корреляций теоретическими выражениями была получена зависимость градиента силы магнитного взаимодействия.
- Предложен метод определения величины и градиента силы взаимодействия между магнитными микрочастицами на основе корреляционного анализа смещений этих частиц из оптических ловушек. Измерена сила магнитного притяжения двух частиц диаметром 3 мкм из полистирола с вкрапления наночастиц магнетита (2% по массе), расположенных на расстоянии от 4 до 9 мкм друг от друга, во внешнем магнитном поле напряженностью до 62 Э. Сила взаимодействия имеет разные знаки для параллельной и перпендикулярной ориентаций магнитного поля относительно линии, соединяющей центры частиц. Величина этой силы монотонно растет при увеличении напряженности внешнего поля и сближении микрочастиц и имеет порядок 0,1 пН, что подтверждено результатами, полученными с помощью вибрационного магнитометра.
- Проведены экспериментальные исследования магнитного взаимодействия с применением метода активной микрореологии в присутствии магнитного поля на-

пряженностью 62 Э, в параллельной и перпендикулярной ориентации поля относительно линии, соединяющей центры частиц. Внешнее механическое воздействие осуществлялось изменением по гармоническому закону с амплитудой 200 нм и частотой 1 Гц координаты одной из ловушек. Измерены спектральные амплитуды смещений частиц на частоте внешнего воздействия. Получено выражение для зависимости градиента силы магнитного взаимодействия от отношения спектральных амплитуд смещений частиц на частоте внешнего механического воздействия.

- Измерен модуль эластичности эритроцита человека в аутологичной плазме крови, захваченного в за противоположные края в две оптические ловушки. Для растягивающих сил менее 15 пН этот модуль равен 13 ± 3 пН/мкм. Измерена средняя сила, необходимая для сдвига эритроцитов на заданное расстояние друг относительно друга в парном агрегате. Сила сдвиговой дезагрегации увеличивается с увеличением расстояния между центрами клеток, что говорит о пороговом характере процесса дезагрегации эритроцитов.
- Предложен метод для диагностики вязко-упругих свойств эритроцитов, основанный на анализе фазового сдвига в осцилляциях краев клетки, захваченных одновременно в две оптические ловушки, положение одной из которых периодически меняется со временем. Тангенс угла фазовой задержки колебаний края клетки в неподвижной ловушке относительно колебаний края в осциллирующей ловушке пропорционален частоте в диапазоне от 0,1 до 1 кГц.
- Создан экспериментальный комплекс для одновременного проведения угловой спектроскопии фотонного кристалла и фотонно-силовой микроскопии вблизи границы раздела фотонного кристалла с жидкостью. Проведена спектроскопия коэффициента отражения, фотонного кристалла, состоящего из 11 пар слоев диоксида кремния и диоксида циркония на стеклянной подложке, при контакте кристалла с водой. Средняя оптическая толщина каждого слоя составляла около 750/4 нм. В зависимости коэффициента отражения образца от частоты падающего на него излучения наблюдался минимум на длине волны 532 нм и угле падения 74° на фотонный кристалл из подложки, соответствующий возбуждению волноводной моды.

- Методом фотонно-силовой микроскопии обнаружено силовое воздействие на пробную диэлектрическую микрочастицу, расположенную в воде вблизи границы раздела с одномерным фотонным кристаллом, в котором присутствует электромагнитное поле, соответствующее первой волноводной моде с существенной локализацией электромагнитного излучения вблизи рассматриваемой границы раздела. Максимальное силовое воздействие на частицу наблюдается вблизи резонанса возбуждения волноводной моды фотонного кристалла в схеме Кречманна с интенсивностью падающего на фотонный кристалл излучения порядка 1 кВт/см^2 . С уменьшением расстояния между пробной частицей и фотонным кристаллом наблюдается рост силового воздействия. Сила, действующая на частицу диаметром 1 мкм , расположенную на расстоянии около $0,25 \text{ мкм}$ от фотонного кристалла, достигает величины порядка $0,03 \text{ пН}$.

В заключение хочется выразить огромную благодарность моему научному руководителю Андрею Анатольевичу Федянину за постановку интересных, актуальных научных задач и возможность решать их, работая на современном научном оборудовании, за поддержку и помощь. Также хочется выразить благодарность Александру Григорьевичу Жданову, который являлся моим научным руководителем в студенческие годы и помог освоить экспериментальную методику оптического пинцета, и Дмитрию Васильевичу Петрову, в лаборатории которого я стажировался и получил навыки, необходимые для выполнения исследований, описанных в диссертационной работе. Огромное спасибо Хохловой Марии, Скрыбиной Марии, Соболевой Ирине и Шилкину Даниилу, работавшим вместе со мной и оказавшим мне неоценимую помощь, Татьяне Долговой за помощь в преодолении технических трудностей, возникших при написании текста, и моральную поддержку, Маргарите Шариповой за проверку работы на предмет грамматических ошибок, а также всему коллективу лаборатории за создание неповторимой дружественной и творческой обстановки. Спасибо Виталию Ивановичу Соустину за изготовление большого количества деталей экспериментальных установок. Отдельное спасибо я хочу сказать своей маме за поддержку и ободрение. Хочется также поблагодарить Татьяну и Виктора Гунбиных за оказанную нашей семье помощь.

Список литературы

- [1] *Ashkin A., Dziedzic J. M., Bjorkholm J. E., Chu S.* Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles // *Opt. Lett.* — 1986. — v. 11, no. 5. — pp. 288–290.
- [2] *Neuman K. C., Block S. M.* Optical trapping. // *Rev. Sci. Instrum.* — 2004. — v. 75, no. 9. — pp. 2787–2809.
- [3] *Zhdanov A., Kreuzer M. P., Rao S., Fedyanin A., Ghenuche P., Quidant R., Petrov D.* Detection of plasmon-enhanced luminescence fields from an optically manipulated pair of partially metal covered dielectric spheres // *Opt. Lett.* — 2008. — v. 33, no. 23. — pp. 2749–2751.
- [4] *Vidal X., Fedyanin A. A., Molinos-Gómez A., Rao S., Martorell J., Petrov D.* Non-linear optical response from single spheres coated by a nonlinear monolayer // *Opt. Lett.* — 2008. — v. 33, no. 7. — pp. 699–701.
- [5] *Romano G., Sacconi L., Capitanio M., Pavone F. S.* Force and torque measurements using magnetic micro beads for single molecule biophysics // *Opt. Commun.* — 2003. — v. 215, no. 4-6. — pp. 323–331.
- [6] *Khokhlova M. D., Lyubin E. V., Zhdanov A. G., Rykova S. Y., Sokolova I. A., Fedyanin A. A.* Normal and system lupus erythematosus red blood cell interactions studied by double trap optical tweezers: direct measurements of aggregation forces. // *J. Biomed. Opt.* — 2012. — v. 17, no. 2. — p. 025001.
- [7] *Lyubin E. V., Khokhlova M. D., Skryabina M. N., Fedyanin A. A.* Cellular viscoelasticity probed by active rheology in optical tweezers. // *J. Biomed. Opt.* — 2012. — v. 17, no. 10. — p. 101510.
- [8] *Cecconi C., Shank E. A., Marqusee S., Bustamante C.* DNA molecular handles for single-molecule protein-folding studies by optical tweezers. // *Methods Mol. Biol.* — 2011. — v. 749. — pp. 255–271.

- [9] Скрыбина М. Н., Любин Е. В., Хохлова М. Д., Федянин А. А. Диагностика парного взаимодействия магнитных микрочастиц методом оптического пинцета // *Письма в ЖЭТФ*. — 2012. — т. 95. — с. 638–642.
- [10] Helseth L. E. Paramagnetic particles in an optical trap // *Opt. Commun.* — 2007. — v. 276, no. 2. — pp. 277–282.
- [11] Florin E.-L., Pralle A., Heinrich Hörber J., Stelzer E. H. Photonic Force Microscope Based on Optical Tweezers and Two-Photon Excitation for Biological Applications // *J. Struct. Biol.* — 1997. — v. 119, no. 2. — pp. 202–211.
- [12] Pralle A., Florin E.-L., Stelzer E. H., Hörber J. H. Photonic Force Microscopy: A New Tool Providing New Methods to Study Membranes at the Molecular Level // *Single Mol.* — 2000. — v. 1, no. 2. — pp. 129–133.
- [13] Laurent V. M., Hénon S., Planus E., Fodil R., Balland M., Isabey D., Gallet F. Assessment of Mechanical Properties of Adherent Living Cells by Bead Micromanipulation: Comparison of Magnetic Twisting Cytometry vs Optical Tweezers // *J. Biomech. Eng.* — 2002. — v. 124, no. 4. — pp. 408–421.
- [14] McNaughton B. H., Kehbein K. A., Anker J. N., Kopelman R. Sudden breakdown in linear response of a rotationally driven magnetic microparticle and application to physical and chemical microsensing. // *J. Phys. Chem. B.* — 2006. — v. 110, no. 38. — pp. 18958–18964.
- [15] Helseth L. E. Paramagnetic particles as sensitive force detectors in liquids // *J. Phys. D. Appl. Phys.* — 2007. — v. 40, no. 10. — pp. 3030–3037.
- [16] Neuman K. C., Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy // *Nature Methods*. — 2008. — v. 5, no. 6. — pp. 491–506.
- [17] Ashkin A. Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure // *Phys. Rev. Lett.* — 1970. — v. 24, no. 4. — pp. 156–159.
- [18] Ashkin A. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime // *Biophys. J.* — 1992. — v. 61, no. 2. — pp. 569–582.

- [19] *Ахманов С. А., Никитин С. Ю.* Физическая оптика. — Москва: Наука, 2004.
- [20] *Capitanio M., Cicchi R., Saverio Pavone F.* Continuous and time-shared multiple optical tweezers for the study of single motor proteins // *Opt. Lasers Eng.* — 2007. — v. 45, no. 4. — pp. 450–457.
- [21] *Chapin S. C., Germain V., Dufresne E. R.* Automated trapping, assembly, and sorting with holographic optical tweezers. // *Opt. Express.* — 2006. — v. 14, no. 26. — pp. 13095–13100.
- [22] *Reicherter M., Liesener J., Haist T., Tiziani H. J.* Advantages of holographic optical tweezers // *Novel Optical Instrumentation for Biomedical Applications* / Ed. by A.-C. Boccara. — v. 5143. — 2003. — pp. 76–83.
- [23] *Belloni F., Monneret S., Monduc F., Scordia M.* Multiple holographic optical tweezers parallel calibration with optical potential well characterization // *Optics Express.* — 2008. — v. 16, no. 12. — pp. 9011–9020.
- [24] *Chu S., Bjorkholm J., Ashkin A., Cable A.* Experimental Observation of Optically Trapped Atoms // *Phys. Rev. Lett.* — 1986. — v. 57, no. 3. — pp. 314–317.
- [25] *Svoboda K., Block S. M.* Optical trapping of metallic Rayleigh particles // *Opt. Lett.* — 1994. — v. 19, no. 13. — pp. 930–932.
- [26] *Plewa J., Tanner E., Mueth D. M., Grier D. G.* Processing carbon nanotubes with holographic optical tweezers // *Opt. Express.* — 2004. — v. 12, no. 9. — pp. 1978–1981.
- [27] *Hansen P. M., Bhatia V. K., Harrit N., Oddershede L.* Expanding the optical trapping range of gold nanoparticles // *Nano Lett.* — 2005. — v. 5, no. 10. — pp. 1937–1942.
- [28] *Nieminen T., Loke V. L. Y., Knoner G., Branczyk M.* Toolbox for calculation of optical forces and torques // *PIERS Online.* — 2007. — v. 3. — p. 338.
- [29] *Nieminen T., Rubinsztein-Dunlop H., Heckenberg N.* Calculation and optical measurement of laser trapping forces on non-spherical particles // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* — 2001. — v. 70, no. 4-6. — pp. 627–637.

- [30] *Singer W., Bernet S., Hecker N., Ritsch-Marte M.* Three-dimensional force calibration of optical tweezers // *J. Mod. Opt.* — 2000. — v. 47, no. 14-15. — pp. 2921–2931.
- [31] *Simmons R. M., Finer J. T., Chu S., Spudich J. A.* Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap. // *Biophys. J.* — 1996. — v. 70, no. 4. — pp. 1813–1822.
- [32] *Berg-Sørensen K., Flyvbjerg H.* Power spectrum analysis for optical tweezers // *Rev. Sci. Instrum.* — 2004. — v. 75, no. 3. — pp. 594–612.
- [33] *Brau R. R., Ferrer J. M., Lee H., Castro C. E., Tam B. K., Tarsa P. B., Matsu-daira P., Boyce M. C., Kamm R. D., Lang M. J.* Passive and active microrheology with optical tweezers // *J. Opt. A Pure Appl. Opt.* — 2007. — v. 9, no. 8. — pp. S103–S112.
- [34] *Mizuno D., Head D. A., MacKintosh F. C., Schmidt C. F.* Active and Passive Microrheology in Equilibrium and Nonequilibrium Systems // *Macromolecules.* — 2008. — v. 41, no. 19. — pp. 7194–7202.
- [35] *Fischer M., Berg-Sørensen K.* Calibration of trapping force and response function of optical tweezers in viscoelastic media // *J. Opt. A.* — 2007. — v. 9. — pp. 239–250.
- [36] *Квасников И. А.* Термодинамика и статистическая физика: теория неравновесных систем. — Москва: УРСС, 2003.
- [37] *Bartlett P., Henderson S. I., Mitchell S. J.* Measurement of the hydrodynamic forces between two polymer-coated spheres // *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* — 2001. — v. 359, no. 1782. — pp. 883–895.
- [38] *Batchelor G. K.* Brownian diffusion of particles with hydrodynamic interaction // *J. Fluid Mech.* — 1976. — v. 74, no. 1. — pp. 1–29.
- [39] *Jeffrey D. J., Onishi Y.* Calculation of the resistance and mobility functions for two unequal rigid spheres in low-Reynolds-number flow // *J. Fluid Mech.* — 2006. — v. 139. — p. 261.
- [40] *Felderhof B. U.* Hydrodynamic interaction between two spheres // *Phys. A Stat. Mech. its Appl.* — 1977. — v. 89, no. 2. — pp. 373–384.

- [41] *Felderhof B. U.* Diffusion of interacting Brownian particles // *J. Phys. A. Math. Gen.* — 1978. — v. 11, no. 5. — pp. 929–937.
- [42] *Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М.* Теоретическая физика, т 6. Гидродинамика. — Москва: Наука, 1986.
- [43] *Протодьяконов И., Люблинская И., Рыжков А.* Гидродинамика и массообмен в дисперсных системах. Жидкость — твердое тело. — Москва: УРСС, 1987.
- [44] *Dong-Hui H., Tao Y., Wei-Hua L., Qing-Lan Z., Hong-Ru M.* Brownian dynamics simulation of two confined colloidal particles // *Chinese Phys.* — 2007. — v. 16, no. 10. — pp. 3138–3145.
- [45] *Doi M., Edwards S. F.* The Theory of Polymer Dynamics. — Oxford: Oxford Press, 1994.
- [46] *Wang M., Uhlenbeck G.* On the Theory of the Brownian Motion II // *Rev. Mod. Phys.* — 1945. — v. 17, no. 2-3. — pp. 323–342.
- [47] *Meiners J.-C., Quake S. R.* Direct measurement of hydrodynamic cross correlations between two particles in an external potential // *Phys. Rev. Lett.* — 1999. — v. 82, no. 10. — pp. 2211–2214.
- [48] *Mohanty S. K., Uppal A., Gupta P. K.* Self-rotation of red blood cells in optical tweezers: prospects for high throughput malaria diagnosis. // *Biotechnol. Lett.* — 2004. — v. 26, no. 12. — pp. 971–974.
- [49] *Parkin S., Knöner G., Nieminen T. a., Heckenberg N. R., Rubinsztein-Dunlop H.* Measurement of the total optical angular momentum transfer in optical tweezers // *Opt. Express.* — 2006. — v. 14, no. 15. — pp. 6963–6970.
- [50] *Volpe G., Petrov D.* Torque Detection using Brownian Fluctuations // *Phys. Rev. Lett.* — 2006. — v. 97, no. 21. — p. 210603.
- [51] *Bacri J.-C., Cebers A., Bourdon A., Demouchy G., Heegaard B., Kashevsky B., Perzynski R.* Transient grating in a ferrofluid under magnetic field: Effect of magnetic interactions on the diffusion coefficient of translation // *Phys. Rev. E.* — 1995. — v. 52, no. 4. — pp. 3936–3942.

- [52] *Melle S., Calderón O. G., Rubio M. A., Fuller G. G.* Rotational dynamics in dipolar colloidal suspensions: video microscopy experiments and simulations results // *J. Nonnewton. Fluid Mech.* — 2002. — v. 102, no. 2. — pp. 135–148.
- [53] *Sacconi L., Romano G., Ballerini R., Capitanio M., De Pas M., Giuntini M., Dunlap D., Finzi L., Pavone F. S.* Three-dimensional magneto-optic trap for micro-object manipulation // *Opt. Lett.* — 2001. — v. 26, no. 17. — pp. 1359–1361.
- [54] *Денисов В. И.* Лекции по электродинамике. — Москва: УНЦ ДО, 1990.
- [55] *Wang M. D., Yin H., Landick R., Gelles J., Block S. M.* Stretching DNA with optical tweezers. // *Biophys. J.* — 1997. — v. 72, no. 3. — pp. 1335–1346.
- [56] *Block S. M.* Kinesin motor mechanics: binding, stepping, tracking, gating, and limping. // *Biophys. J.* — 2007. — v. 92, no. 9. — pp. 2986–2995.
- [57] *Creely C., Volpe G., Singh G., Soler M., Petrov D.* Raman imaging of floating cells // *Opt. Express.* — 2005. — v. 13, no. 16. — pp. 6105–6110.
- [58] *Фирсов Н. Н., Джанашия П. Х.* Введение в экспериментальную и клиническую гемореологию. — Москва: Изд-во ГОУ ВПО РГМУ, 2008.
- [59] *Bronkhorst P. J., Streekstra G. J., Grimbergen J., Nijhof E. J., Sixma J. J., Brakenhoff G. J.* A new method to study shape recovery of red blood cells using multiple optical trapping. // *Biophys. J.* — 1995. — v. 69, no. 5. — pp. 1666–1673.
- [60] *Hénon S., Lenormand G., Richert A., Gallet F.* A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers // *Biophys. J.* — 1999. — v. 76, no. 2. — pp. 1145–1151.
- [61] *Lenormand G., Hénon S., Richert A., Siméon J., Gallet F.* Direct measurement of the area expansion and shear moduli of the human red blood cell membrane skeleton. // *Biophys. J.* — 2001. — v. 81, no. 1. — pp. 43–56.
- [62] *Lee W. G., Bang H., Yun H., Lee J., Park J., Kim J. K., Chung S., Cho K., Chung C., Han D.-C., Chang J. K.* On-chip erythrocyte deformability test under optical pressure. // *Lab Chip.* — 2007. — v. 7, no. 4. — pp. 516–519.

- [63] *Li Y., Wen C., Xie H., Ye A., Yin Y.* Mechanical property analysis of stored red blood cell using optical tweezers. // *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. — 2009. — v. 70, no. 2. — pp. 169–173.
- [64] *Sleep J., Wilson D., Simmons R., Gratzer W.* Elasticity of the red cell membrane and its relation to hemolytic disorders: an optical tweezers study // *Biophys. J.* — 1999. — v. 77, no. 6. — pp. 3085–3095.
- [65] *Ramser K., Logg K., Goksor M., Enger J., Kall M., Hanstorp D.* Resonance raman spectroscopy of optically trapped functional erythrocytes // *J. Biomed. Opt.* — 2004. — v. 9, no. 3. — pp. 593–600.
- [66] *Zhou M., Yang H., Di J., Zhao E.* Manipulation on human red blood cells with femtosecond optical tweezers // *Chinese Opt. Lett.* — 2008. — v. 6, no. 12. — pp. 919–921.
- [67] *Marikovsky Y., Danon D.* Electron microscope analysis of young and old red blood cells stained with colloidal iron for surface charge evaluation // *J. Cell Biol.* — 1969. — v. 43, no. 1. — pp. 1–7.
- [68] *Suresh S., Spatz J., Mills J. P., Micoulet A., Dao M., Lim C. T., Beil M., Seufferlein T.* Connections between single-cell biomechanics and human disease states: gastrointestinal cancer and malaria // *Acta Biomater.* — 2005. — v. 1, no. 1. — pp. 15–30.
- [69] *Brandao M. M., Fontes A., Barjas-Castro M. L., Barbosa L. C., Costa F. F., Cesar C. L., Saad S. T. O.* Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: application to the study of drug response in sickle cell disease // *Eur. J. Haematol.* — 2003. — v. 70, no. 4. — pp. 207–211.
- [70] *Barjas-Castro M. L., Brandão M. M., Fontes A., Costa F. F., Cesar C. L., Saad S. T. O.* Elastic properties of irradiated rbcs measured by optical tweezers // *Transfusion*. — 2002. — v. 42, no. 9. — pp. 1196–1199.
- [71] *Dao M., Lim C. T., Suresh S.* Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers // *J. Mech. Phys. Solids*. — 2003. — v. 51, no. 11-12. — pp. 2259–2280.

- [72] Bareil P. B., Sheng Y., Chen Y.-Q., Chiou A. Calculation of spherical red blood cell deformation in a dual-beam optical stretcher // *Opt. Express*. — 2007. — v. 15, no. 24. — pp. 16029–16034.
- [73] Li J., Dao M., Lim C. T., Suresh S. Spectrin-level modeling of the cytoskeleton and optical tweezers stretching of the erythrocyte // *Biophys. J.* — 2005. — v. 88, no. 5. — pp. 3707–3719.
- [74] Mills J. P., Qie L., Dao M., Lim C. T., Suresh S. Nonlinear elastic and viscoelastic deformation of the human red blood cell with optical tweezers // *Molecular and Cellular Biomechanics*. — 2004. — v. 1, no. 3. — pp. 169–180.
- [75] Li C., Liu K. K. Nanomechanical characterization of red blood cells using optical tweezers // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* — 2008. — v. 19, no. 4. — pp. 1529–1535.
- [76] Yoon Y.-Z., Kotar J., Yoon G., Cicuta P. The nonlinear mechanical response of the red blood cell. // *Phys. Biol.* — 2008. — v. 5, no. 3. — p. 036007.
- [77] Fontes A., Fernandes H. P., de Thomaz A. A., Barjas-Castro M. L., Cesar C. L., Barbosa L. C. Measuring electrical and mechanical properties of red blood cells with double optical tweezers // *J. Biomed. Opt.* — 2008. — v. 13, no. 1. — p. 014001.
- [78] Hochmuth R. M., Worthy P. R., Evans E. A. Red cell extensional recovery and the determination of membrane viscosity. // *Biophys. J.* — 1979. — v. 26, no. 1. — pp. 101–114.
- [79] Raj S., Wojdyla M., Petrov D. Studying single red blood cells under a tunable external force by combining passive microrheology with Raman spectroscopy // *Cell Biochem. Biophys.* — 2013. — v. 65, no. 3. — pp. 347–361.
- [80] De Luca A. C., Rusciano G., Ciancia R., Martinelli V., Pesce G., Rotoli B., Selvaggi L., Sasso A. Spectroscopical and mechanical characterization of normal and thalassemic red blood cells by Raman Tweezers // *Opt. Express*. — 2008. — v. 16, no. 11. — pp. 7943–7957.
- [81] Perelsonand A. S., Wiege F. W. The equilibrium size distribution of rouleaux // *Biophys. J.* — 1982. — v. 37, no. 2. — pp. 515–522.

- [82] *Hewson W., Falconar M.* Experimental inquiries: Part the third. Containing a description of the red particles of the blood in the human subject and in other animals; with an account of the structure and offices of the lymphatic glands, of the thymus gland, and of the spleen: being the remaining part of the observations and experiments of the late Mr. William Hewson. — London: T. Longman, 1777.
- [83] *Fåhræus R.* The suspension stability of the blood // *Physiol. Rev.* — 1929. — v. 9, no. 2. — pp. 241–274.
- [84] *Chien S., Jan K. M.* Red cell aggregation by macromolecules: roles of surface adsorption and electrostatic repulsion. // *J. Supramol. Struct.* — 1973. — v. 1, no. 4. — pp. 385–409.
- [85] *Neu B., Meiselman H. J.* Depletion-mediated red blood cell aggregation in polymer solutions. // *Biophys. J.* — 2002. — v. 83, no. 5. — pp. 2482–2490.
- [86] *Бердников А., Семко М., Широкова Ю.* Медицинские приборы, аппараты, системы и комплексы. — Казань: Изд-во Казан. гос. техн. ун-та, 2004.
- [87] *Artmann G. M., Sung K. L., Horn T., Whittemore D., Norwich G., Chien S.* Micropipette aspiration of human erythrocytes induces echinocytes via membrane phospholipid translocation. // *Biophys. J.* — 1997. — v. 72, no. 3. — pp. 1434–1441.
- [88] *Skalak R., Zarda P. R., Jan K. M., Chien S.* Mechanics of Rouleau formation. // *Biophys. J.* — 1981. — v. 35, no. 3. — pp. 771–81.
- [89] *Dunlop M. J., Lee M. M., Canham P. B., Taylor C. P. S.* Kinetics of adhesive interaction in vitro of human erythrocytes in plasma // *Microvasc. Res.* — 1984. — v. 28, no. 1. — pp. 62–74.
- [90] *Bronkhorst P. J. H., Grimbergen J., Brakenhoff G. J., Heethaar R. M., Sixma J. J.* The mechanism of red cell (dis)aggregation investigated by means of direct cell manipulation using multiple optical trapping // *Br. J. Haematol.* — 1997. — v. 96, no. 2. — pp. 256–258.

- [91] Wada K.-i., Sasaki K., Masuhara H. Optical measurement of interaction potentials between a single microparticle and an evanescent field // *Appl. Phys. Lett.* — 2000. — v. 76, no. 20. — pp. 2815–2817.
- [92] Kawata S., Sugiura T. Movement of micrometer-sized particles in the evanescent field of a laser beam // *Opt. Lett.* — 1992. — v. 17, no. 11. — pp. 772–774.
- [93] Mellor C. D., Bain C. D. Array formation in evanescent waves // *ChemPhysChem.* — 2006. — v. 7, no. 2. — pp. 329–332.
- [94] Либенсон М. Н. Поверхностные электромагнитные волны оптического диапазона // *Соросовский образовательный журнал.* — 1996. — № 10. — с. 92–98.
- [95] Шен И. Р. Принципы нелинейной оптики: Пер. с англ. — Москва: Наука. Гл. ред. физ.-мат. лит., 1989.
- [96] Homola J. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. // *Chem. Rev.* — 2008. — v. 108, no. 2. — pp. 462–493.
- [97] Брандт Н. Б., Кульбачинский В. А. Квазичастицы в физике конденсированного состояния. — Москва: Физматлит, 2005.
- [98] Yeh P., Yariv A., Cho A. Y. Optical surface waves in periodic layered media // *Appl. Phys. Lett.* — 1978. — v. 32, no. 2. — pp. 104–105.
- [99] Ярив А., Юх П. Оптические волны в кристаллах. — Москва: Мир, 1987.
- [100] Raether H. Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings. — Berlin: Springer-Verlag, 1988.
- [101] Либенсон М. Н. Поверхностные электромагнитные волны в оптике // *Соросовский образовательный журнал.* — 1996. — № 11. — с. 103–110.
- [102] Wang K., Schonbrun E., Crozier K. B. Propulsion of gold nanoparticles with surface plasmon polaritons: evidence of enhanced optical force from near-field coupling between gold particle and gold film. // *Nano Lett.* — 2009. — v. 9, no. 7. — pp. 2623–2629.

- [103] Volpe G., Quidant R., Badenes G., Petrov D. Surface plasmon radiation forces // *Phys. Rev. Lett.* — 2006. — v. 96, no. 23. — p. 238101.
- [104] Righini M., Volpe G., Girard C., Petrov D., Quidant R. Surface plasmon optical tweezers: Tunable optical manipulation in the femtonewton range // *Phys. Rev. Lett.* — 2008. — v. 100, no. 18. — p. 186804.
- [105] Robertson W. M., May M. S. Surface electromagnetic wave excitation on one-dimensional photonic band-gap arrays // *Appl. Phys. Lett.* — 1999. — v. 74, no. 13. — pp. 1800–1802.
- [106] Descrovi E., Frascella F., Sciacca B., Geobaldo F., Dominici L., Michelotti F. Coupling of surface waves in highly defined one-dimensional porous silicon photonic crystals for gas sensing applications // *Appl. Phys. Lett.* — 2007. — v. 91, no. 24. — p. 241109.
- [107] Villa F., Regalado L. E., Ramos-Mendieta F., Gaspar-Armenta J., Lopez-Ríos T. Photonic crystal sensor based on surface waves for thin-film characterization // *Opt. Lett.* — 2002. — v. 27, no. 8. — pp. 646–648.
- [108] Ziehl A., Bammert J., Holzer L., Wagner C., Zimmermann W. Direct measurement of shear-induced cross-correlations of brownian motion // *Phys. Rev. Lett.* — 2009. — v. 103, no. 23. — p. 230602.
- [109] Henderson S., Mitchell S., Bartlett P. Direct measurements of colloidal friction coefficients // *Phys. Rev. E* — 2001. — v. 64, no. 6. — p. 061403.
- [110] Metzger N. K., Marchington R. F., Mazilu M., Smith R. L., Dholakia K., Wright E. M. Measurement of the Restoring Forces Acting on Two Optically Bound Particles from Normal Mode Correlations // *Phys. Rev. Lett.* — 2007. — v. 98, no. 6. — p. 068102.
- [111] Keaveny E. E., Maxey M. R. Modeling the magnetic interactions between paramagnetic beads in magnetorheological fluids // *J. Comput. Phys.* — 2008. — v. 227, no. 22. — pp. 9554–9571.

- [112] *Box G. E. P., Muller M. E.* A Note on the Generation of Random Normal Deviates // *Ann. Math. Stat.* — 1958. — v. 29, no. 2. — pp. 610–611.
- [113] *Bell J. R.* Algorithm 334: Normal random deviates // *Commun. ACM.* — 1968. — v. 11, no. 7. — p. 498.
- [114] *Knop R. E.* Remark on algorithm 334 [g5]: Normal random deviates // *Commun. ACM.* — 1969. — v. 12, no. 5. — p. 281.
- [115] *Liverpool T. B., MacKintosh F. C.* Inertial effects in the response of viscous and viscoelastic fluids // *Phys. Rev. Lett.* — 2005. — v. 95, no. 20. — p. 208303.
- [116] *Svoboda K., Block S. M.* Biological applications of optical forces // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* — 1994. — v. 23. — pp. 247–285.
- [117] *Leach J., Mushfique H., Keen S., Di Leonardo R., Ruocco G., Cooper J., Padgett M.* Comparison of Faxén’s correction for a microsphere translating or rotating near a surface // *Phys. Rev. E.* — 2009. — v. 79, no. 2. — p. 026301.
- [118] *Lauga E., Squires T. M.* Brownian motion near a partial-slip boundary: A local probe of the no-slip condition // *Phys. Fluids.* — 2005. — v. 17, no. 10. — p. 103102.
- [119] *Goldman A. J., Cox R. G., Brenner H.* Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall—I Motion through a quiescent fluid // *Chem. Eng. Sci.* — 1967. — v. 22, no. 4. — pp. 637–651.
- [120] *Segur J. B., Oberstar H. E.* Viscosity of Glycerol and Its Aqueous Solutions // *Ind. Eng. Chem.* — 1951. — v. 43, no. 9. — pp. 2117–2120.
- [121] *Peterman E. J. G., Gittes F., Schmidt C. F.* Laser-induced heating in optical traps. // *Biophys. J.* — 2003. — v. 84, no. 2 Pt 1. — pp. 1308–16.
- [122] *Соколова И. А., Рыкова С. Ю., Шахназаров А. А., Гафарова М. Э., Краснова Т. Н., Хохлова М. Д., Любин Е. В., Скрыбина М. Н., Жданов А. Г., Федянин А. А.* Агрегация эритроцитов: некоторые вопросы и гипотезы // *Российский журнал биомеханики.* — 2011. — т. 11, № 1. — с. 7–22.

- [123] *Bethune D. S.* Optical harmonic generation and mixing in multilayer media: analysis using optical transfer matrix techniques // *J. Opt. Soc. Am. B.* — 1989. — v. 6, no. 5. — pp. 910–916.
- [124] *Thusty T., Meller A., Bar-Ziv R.* Optical gradient forces of strongly localized fields // *Phys. Rev. Lett.* — 1998. — v. 81, no. 8. — pp. 1738–1741.
- [125] *Mu W., Li Z., Luan L., Spalding G. C., Wang G., Ketterson J. B.* Force measurement on microspheres in an optical standing wave // *J. Opt. Soc. Am. B.* — 2008. — v. 25, no. 5. — pp. 763–767.
- [126] *Fällman E., Axner O.* Influence of a Glass-Water Interface on the On-Axis Trapping of Micrometer-Sized Spherical Objects by Optical Tweezers // *Appl. Opt.* — 2003. — v. 42, no. 19. — pp. 3915–3926.
- [127] *Vermeulen K. C., Wuite G. J. L., Stienen G. J. M., Schmidt C. F.* Optical trap stiffness in the presence and absence of spherical aberrations // *Appl. Opt.* — 2006. — v. 45, no. 8. — pp. 1812–1819.
- [128] *Reihani S. N. S., Oddershede L. B.* Optimizing immersion media refractive index improves optical trapping by compensating spherical aberrations // *Opt. Lett.* — 2007. — v. 32, no. 14. — pp. 1998–2000.
- [129] *Mahmoudi A., Reihani S. N. S.* The effect of immersion oil in optical tweezers // *Opt. Express.* — 2011. — v. 19, no. 16. — pp. 14794–14800.
- [130] *Čižmár T., Šiler M., Šerý M., Zemánek P., Garcés-Chávez V., Dholakia K.* Optical sorting and detection of submicrometer objects in a motional standing wave // *Phys. Rev. B.* — 2006. — v. 74, no. 3. — p. 035105.
- [131] *Lang M. J., Asbury C. L., Shaevitz J. W., Block S. M.* An automated two-dimensional optical force clamp for single molecule studies // *Biophys. J.* — 2002. — v. 83, no. 1. — pp. 491–501.
- [132] *Шилкин Д. А., Любин Е. В., Соболева И. В., Федянин А. А.* Управление положением ловушки вблизи отражающих поверхностей в оптическом пинцете // *Письма в ЖЭТФ.* — 2013. — т. 98, № 10. — с. 720–724.

-
- [133] *Bevan M. A., Prieve D. C.* Hindered diffusion of colloidal particles very near to a wall: Revisited // *J. Chem. Phys.* — 2000. — v. 113, no. 3. — p. 1228.