

ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ НА КЛЕТОЧНОМ И СУБКЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ С ПОМОЩЬЮ ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРНОГО ОПТИЧЕСКОГО ПИНЦЕТА-СКАЛЬПЕЛЯ

Ракитянский М.М.^{1,2}, Агранат М.Б.¹, Ашитков С.И.¹, Карагяур М.Н.³, Мухамеджанова Д.М.⁴, Домогатский С.П.⁵, Овчинников А.В.¹, Ситников Д.С.¹, Стамбольский Д.В.³, Шевелев И.Н.²

¹ Объединенный институт высоких температур РАН, Москва

² НИИ нейрохирургии им. Бурденко РАМН, Москва

³ МГУ, факультет фундаментальной медицины

⁴ Московский государственный медико-стоматологический университет, Москва

⁵ Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗиСР РФ, Москва

Целью данной работы является разработка элементов технологии прецизионного трехмерного позиционирования одного или нескольких биологических объектов микронного и субмикронного размеров. Для этого в Объединенном институте высоких температур РАН разработан и изготовлен лабораторный образец программно-аппаратного комплекса оптического фемтосекундного лазерного пинцета-скальпеля на основе приборной базы, производимой в России. Получены экспериментальные результаты о максимальной скорости манипулирования СНО и клетками культуры, полученной из спинального ганглия млекопитающего (по протоколам получения очищенных культур шванновских клеток), а также о взаимодействии излучения с внутриклеточными структурами, которое приводит к изменению предполагаемого поведения клетки в области оптической ловушки и максимальной скорости манипулирования последней.

Ключевые слова: оптическое манипулирование, СНО-клетки, шванновские клетки, фемтосекундный лазер, тканевая инженерия

CELLULAR AND SUBCELLULAR LEVEL INVESTIGATION OF BIOLOGICAL OBJECTS BY MEANS OF FEMTOSECOND LASER OPTICAL TWEEZERS-SCALPEL

Rakityansky M.M.^{1,2}, Agranat M.B.¹, Ashitkov S.I.¹, Karagyaour M.N.³, Muhamedzhanova D.M.⁴, Domogatsky S.P.⁵, Ovchinnikov A.V.¹, Sitnikov D.S.¹, Stambolsky D.V.⁵, Shevelev I.N.²

¹ Joint Institute for high Temperatures RAS, Moscow

² Burdenko Neurosurgery Institute, Moscow

³ Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine

⁴ Moscow State Medical Stomatological University, Moscow

⁵ Cardiology Research Center, Moscow

The aim of this work was developing of elements of the precise three-dimensional positioning technology of one or several micron and submicron size biological objects. Thereto a laboratory unit of hardware-software complex of optical femtosecond laser tweezers-scalpel was developed and constructed in the Joint institute for high temperatures RAS using material resources of Russia. Experimental data concerning a maximal manipulation speed of CHO and cells, produced from mammalian spinal ganglia (using protocols for producing pure culture of Schwann cells) was received. Besides facts of interaction of laser radiation with intracellular structures that lead to unexpected behavior of cell in the zone of optical trap and change of maximal speed of cell manipulation were determined.

Key words: optical manipulation, Chinese hamster ovary cells, Schwann cells, femtosecond laser, tissue engineering

Статья поступила в редакцию 23.04.09 г.

Контакты: Ракитянский Михаил Михайлович, аспирант НИИ нейрохирургии им. Бурденко РАМН, Москва.

Тел. 916-719-68-02, e-mail: cellsurgery@mail.ru.

В 1986 году Артур Ашкин и его группа ученых открыли явление, состоящее в том, что остро сфокусированное лазерное излучение, направленное на прозрачный объект микроскопического размера, способно удерживать его в трехмерном пространстве у точки фокуса [3].

Это явление получило название «оптическая ловушка». Осуществляя перемещение оптического поля в пространстве или перемещая среду, в которой находится удерживаемый микрообъект, можно перемещать этот объект в трехмерном пространстве. Эта технология оптического манипулирования микро- и наноскопическими объектами получила название «оптический пинцет». Работы, которые последовали позднее, показали, что захватывать и перемещать можно любые биологические клеточные и неклеточные прозрачные объекты. Ими могут быть вирусы, бактерии, клетки растительного и животного происхождения. Совершенствование этой техники позволило даже манипулировать положением структур внутри клеток, например ядром, хромосомами и другими органоидами и включениями [4–6]. Технология оптического пинцета позволяет устанавливать заданное взаимоотношение между отдельными клетками, их органеллами и производными [4, 11]. Проводимые в последнее время работы показали, что излучение с высокой интенсивностью ($\sim 10^6$ Вт/см²), направляемое на клетку при реализации технологии «оптического пинцета», может быть безопасным для ее физиологии и ДНК [17–19, 22]. Из этого следует, что такая технология открывает удивительные перспективы для развития хирургии на клеточном и субклеточном уровне, а также тканевой инженерии. Для этого необходимо изучать механизмы и параметры манипулирования разнообразными биологическими объектами с помощью оптического пинцета.

Принцип действия оптического пинцета описан в ряде работ [7, 12, 23]. В зависимости от размера захваченной частицы разработаны две основные модели, описывающие это явление: лучевая оптическая модель Ашкина [7] и дипольная модель Харада и Асакуры [12]. Лучевая оптическая модель правомерна, когда радиус захваченной частицы в десять и более раз превосходит длину волны лазерного излучения, в то время как дипольная модель является правомерной для частиц, радиус которых значительно меньше, чем длина волны. Как правило, размеры эукариотических клеток значительно превышают длину волны лазера, используемого для формирования оптической ловушки, поэтому, поскольку в дальнейшем речь пойдет об оптическом манипулировании эукариотическими клетками, следует придерживаться оптической лучевой модели Ашкина.

Если рассматривать эксперимент, в котором мы перемещаем кювету относительно захваченного объекта, то, наблюдая процесс перемещения со стороны

последнего, это будет выглядеть так, что мы перемещаем с заданной постоянной скоростью объект. При движении частицы в растворе на нее действует сила вязкого трения, пропорциональная скорости движения частицы и ее радиусу и описываемая законом Стокса:

$$6\pi\eta Rv = F \quad (1),$$

где η – вязкость раствора, R – радиус сферического объекта и v – скорость частицы.

Если при заданной интенсивности излучения и размере объекта начинать увеличивать скорость перемещения последнего, то будет расти и эта сила, что можно наглядно наблюдать по изменению положения равновесия частицы относительно оптической перетяжки, которое постепенно сместится в пограничную, наиболее удаленную от геометрического центра зону. Но если продолжить увеличивать скорость среды или частицы, то сила вязкого трения станет выше максимальной оптической силы и объект выйдет из области действия оптической ловушки. Для биотехнологических целей представляет интерес значение максимальной скорости перемещения разных клеток при заданных значениях интенсивности. Под максимальной скоростью понимается предельная скорость, при которой клетка все еще остается в зоне действия оптической ловушки при данной интенсивности излучения. Зная максимальное время воздействия лазерного излучения, которое не приводит к нарушению функций клеток, можно установить максимальные расстояния, на которых последними можно манипулировать без повреждающего действия излучения [23]. Важно также понимать факторы, которые влияют на скорость и прецизионность манипулирования биообъектами, а значит, имеют большое значение для клеточно-хирургического применения оптических пинцетов.

Для решения поставленных задач был создан лабораторный образец программно-аппаратного комплекса для манипулирования и импульсного лазерного воздействия на различные биологические объекты. Его принципиальная оптическая схема приведена на рис. 1.

Отличительной особенностью данного комплекса является наличие наряду с непрерывным итербиевым волоконным лазером двух современных фемтосекундных лазерных систем ИК-диапазона спектра с возможностью преобразования длины волны излучения в видимый и ближний УФ-диапазон для решения широкого круга задач, таких как прецизионная деструкция внутриклеточных элементов, перфорация мембраны клеток для селективного слияния последних, их трансфекции, инъекции в клетки объектов наноразмерной величины и т. д. Фемтосекундные лазерные импульсы позволяют минимизировать негативные влияния излучения на физиологию и структуру клеток, изучению чего посвящены ранние исследования [8, 13, 15, 16, 20]. О возможностях

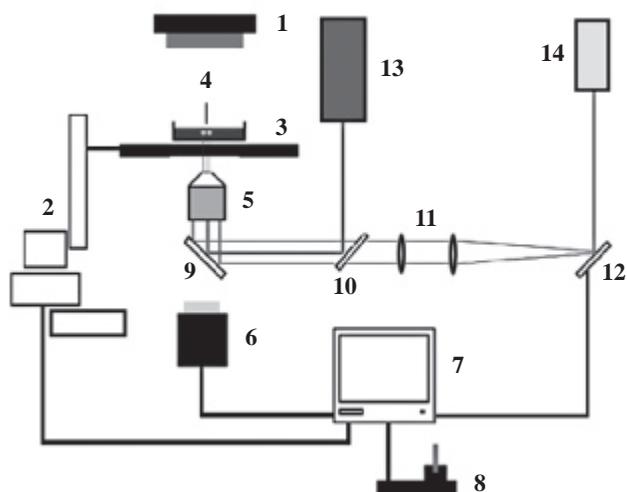


Рис. 1. Аппаратно-программный комплекс, использованный в экспериментах: 1 – осветительная система микроскопа; 2 – шаговые двигатели, перемещающие препаратодержатель по X-, Y-, Z-осям; 3 – экспериментальный резервуар на препаратодержателе; 4 – пара захваченных в оптическую ловушку микроскопических объектов, находящихся в экспериментальном резервуаре; 5 – рабочий объектив микроскопа; 6 – CCD-камера; 7 – компьютер, управляющий шаговыми двигателями, фазовым модулятором и CCD-камерой; 8 – джойстик; 9, 10 – зеркала; 11 – телескоп; 12 – оптический пространственный фазовый модулятор; 13 – фемтосекундный лазер (частота повторения импульсов 1 кГц – оптический скальпель); 14 – непрерывный иттербиевый волоконный лазер или фемтосекундный лазер (частота повторения 80 МГц – оптический пинцет)

таких систем упоминали и мы [1], а также другие отечественные исследователи [2]. Для реализации оптического захвата и манипулирования биообъектами использовалось как непрерывное излучение иттербиевого волоконного лазера (PYL-10-P, IPG Laser GmbH), так и излучение фемтосекундного импульсно-периодического лазера с активной средой хром-форстерита, генерирующего импульсы длительностью 100 фс на длине волны 1240 нм с частотой повторения 80 МГц и средней мощностью 200 мВт (CrF-65P, ООО «Авеста проект»).

В качестве оптического лазерного скальпеля используется отечественная фемтосекундная волоконная лазерная система (ТЕТА-10/100 ООО «Авеста-Проект») с излучением на длине волны 1,028 мкм, частотой повторения 10 кГц, длительностью импульсов менее 300 фс и энергией более 100 мкДж. Также в лазерной системе существует возможность перестройки частоты излучения в видимый и УФ-диапазоны спектра путем генерации оптических гармоник. Достоинством данной системы является простота в эксплуатации, высокая надежность, меньшая критичность к изменению температурного режима по сравнению с традиционными фемтосекундными лазерами с керровской нелинейностью.

Оптический захват биообъектов осуществлялся с использованием инвертированного биологическо-

го микроскопа (МИБ-Р, ЛОМО). Для фокусировки излучения использовались объективы с различной числовой апертурой: М-ФЛЮАР 40×/0,85 Л, ЛОМО М-ФЛЮАР 100×/1,2 Л МИ, М-ФЛЮАР 100×/1,3 Л МИ (ЛОМО). Разработанная система позволяла формировать как одну, так и несколько (до 4 в описываемом эксперименте) оптических ловушек.

Для формирования множества оптических ловушек имеется оптический пространственный фазовый модулятор (НЕС 1080Р II, Holoeye Photonics AG). Благодаря специальному программному обеспечению, управляющему модулятором, ловушки могут интерактивно перемещаться по трем координатам в растворе независимо друг от друга. Таким способом можно прецизионно перемещать и ориентировать объекты друг относительно друга в одном поле зрения микрообъектива. При этом также можно было синхронно перемещать все множество захваченных объектов на значительные расстояния (более 1 мм) из одного поля зрения в другое благодаря смещению среды (кюветы), в которой находятся объекты. Для перемещения кюветы со средой во всех экспериментах использовался трехкоординатный манипулятор с шаговыми двигателями и минимальным шагом перемещения 1,25 мкм. Скорость перемещения можно контролировать специальным компьютерным обеспечением, управляющим манипулятором, в диапазоне от 2,5 до 700 мкм/с. Удержание объекта в оптической ловушке можно визуаль-но контролировать с помощью CCD-камеры.

В данной работе представлены результаты измерений максимальной скорости перемещения биологического объекта в зависимости от интенсивности лазерного излучения. В качестве биологического объекта в работе использовалась известная клеточная линия Chinese hamster ovary (СНО) [23]. Результаты эксперимента представлены на рис. 2.

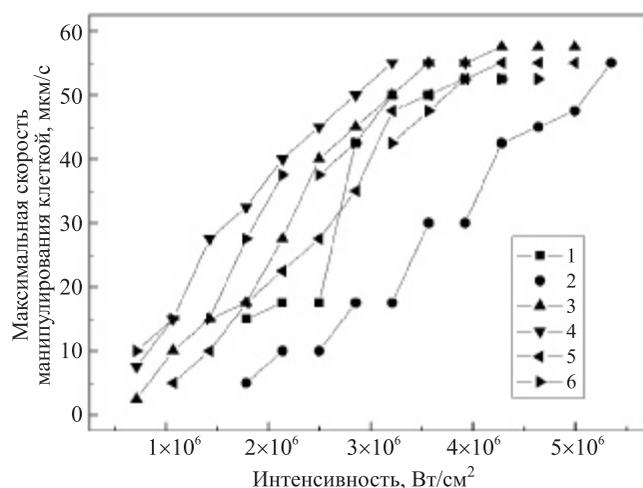


Рис. 2. Зависимость максимальной скорости манипулирования клетками с разным диаметром (1 – 18 мкм, 2 – 16,1 мкм, 3 – 15,6 мкм, 4 – 13,8 мкм, 5 – 13,9 мкм, 6 – 8,9 мкм) от плотности мощности излучения в оптической ловушке

На графике видно, что все кривые (для клеток разного диаметра) можно условно разбить на два участка. На первом скорость линейно зависит от интенсивности лазерного излучения, а на втором – увеличение интенсивности не приводит к увеличению скорости движения объектов. Одной из причин ограничения скорости манипулирования, возможно, является наличие у мембраны предела прочности. То есть при достижении определенного порогового значения интенсивности оптическая ловушка в процессе увеличения скорости движения клетки (когда происходит рост силы вязкого сопротивления) может создать на ограниченной площади ее мембраны (диаметром менее 2 мкм) давление, превышающее прочность мембраны.

В соответствии с выражением (1) при увеличении диаметра клетки возрастает сила вязкого трения, и следовательно, необходимо увеличивать силу оптического захвата путем увеличения интенсивности лазерного излучения для сохранения максимальной скорости перемещения. График отражает тенденцию, подтверждающую этот тезис. Кроме того, несмотря на незначительную разницу размеров некоторых клеток, например кривые 4 и 5, значения максимальной скорости их манипулирования значительно отличаются (почти в 2 раза). Дальней-

шее исследование подтвердило наличие значительного варьирования максимальной скорости манипулирования от клетки к клетке при близких размерах последних. В работах [5, 6] показана возможность манипулирования внутриклеточными структурами. В случае преломления света на этих структурах происходит изменение суммарной оптической силы, действующей на клетку. При этом изменяется величина максимальной скорости перемещения клетки. Исследуемые клетки СНО характеризуются высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением [9]. Поэтому большого вклада в вариации скорости манипулирования клетками ядро, вероятно, давать не будет. Однако при рассмотрении цитоплазмы большинства клеток СНО в проходящем свете обращает на себя внимание наличие множества грануловидных внутриклеточных структур, которые от клетки к клетке отличаются размерами, количеством, положением и связью с цитоскелетом. Серию клеток, на которых производили измерение максимальной скорости манипулирования, подвергли оптической томографии. Сделано 20 срезов каждой клетки с использованием оптики, формирующей фазово-контрастное изображение среза (толщиной 1–2 мкм) (рис. 3). На фотографиях *a* и *б* изображены два среза одной клетки, где на *a* в срезе наиболее

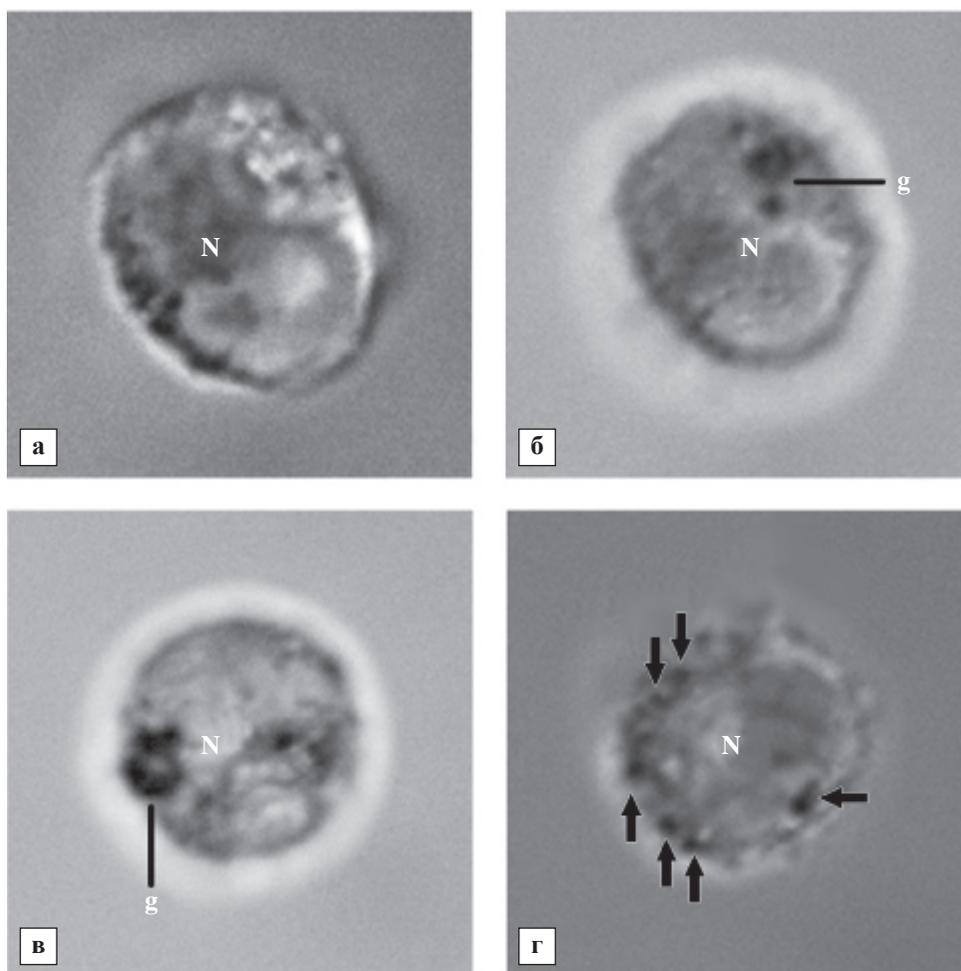


Рис. 3. Наиболее яркие вариации во внутриклеточной морфологической и оптической организации клеток СНО

четко в фокусе находится ядро (N), а на b – одиночное скопление мелких грануловидных структур (g), создающих оптическую неоднородность в цитоплазме клетки правее и выше ядра. На фотографии b виден срез другой клетки, в котором можно видеть одиночную крупную грануловидную структуру (g), ядро – правее, ниже и вне плоскости фокуса; c – фотография среза одной из исследованных клеток, в которой грануловидные внутриклеточные структуры расположены гирляндой (черные стрелки), опоясывающей ядро.

Рассмотрим поведение клетки и внутриклеточных грануловидных структур при воздействии оптической ловушки. Когда клетка была прикреплена ко дну, при направлении пучка лазера оптического пинцета на эти структуры перемещать их не удавалось в большинстве случаев. Это свидетельствует о том, что чаще всего они привязаны цитоскелетом к определенному месту в клетке. Однако если клетка свободна, то гранулы стремились занять определенное место относительно оптической перетяжки, разворачивая клетку необходимым образом. Клетка при этом уравнивается относительно оптической перетяжки несимметрично, чего бы не было при абсолютной ее оптической однородности. Значит при взаимодействии пучка света, проходящего через клетку с грануловидными структурами, возникают дополнительные оптические силы. Внутриклеточные структуры отличались чрезвычайным разнообразием размеров, количества, места положения и связью с цитоскелетом, что может влиять на их вклад в конечную оптическую силу, действующую на клетку. Для дополнительного испытания последнего был проведен эксперимент на клетках, характеризующихся схожим высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, но менее выраженной внутриклеточной оптической неоднородностью, отмеченной в клетках СНО. Примером таких клеток являются шванновские клетки млекопитающего. Была приготовлена органотипическая культура спинального сенсорного ганглия млекопитающего, техника и методы работы с клетками которой, а также методы очистки были разработаны для шванновских клеток млекопитающих ранее [10, 14, 21]. Пример типичной кривой зависимости максимальной скорости манипулирования шванновскими клетками от их диаметра, полученной в ходе экспериментов при постоянной интенсивности излучения в оптической перетяжке $2,3 \cdot 10^6$ Вт/см², приведен на рис. 4. Для сравнения на этом же рисунке приведена аналогичным образом полученная кривая для клеток СНО, характеризующихся схожими размерами.

Разброс значений максимальной скорости манипулирования для шванновских клеток в диапазоне диаметров 13,4–16,6 мкм не превышал 10 мкм/с. Эти

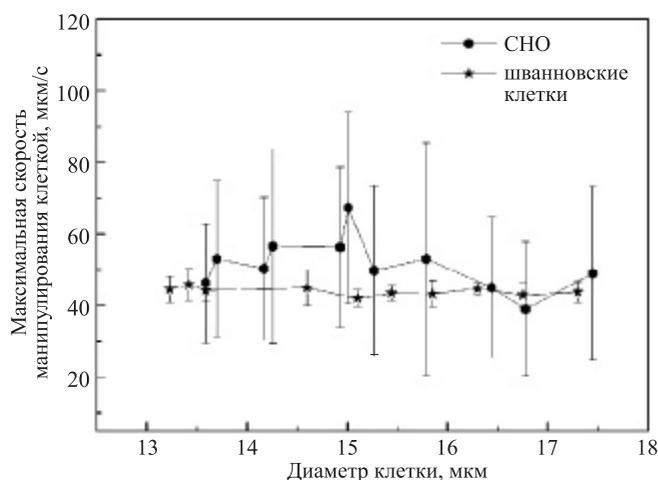


Рис. 4. Кривые зависимости максимальной скорости манипулирования шванновскими и СНО-клетками от их диаметра при плотности мощности излучения $2,3 \cdot 10^6$ Вт/см². Каждому значению диаметра соответствует 10 значений максимальной скорости манипулирования различных клеток (отражено в величине стандартных ошибок на графике)

данные в корне отличались от результатов, полученных для клеток СНО такого же размера, в которых, очевидно, имело место попадание в область прохождения пучка света внутриклеточных оптических неоднородностей. Если проходящий внутри клетки свет попадает на эти структуры, то в целом угол преломления, направленного на клетку пучка света, изменяется, а следовательно, изменяется и сила, действующая на клетку. Предсказать расположение этих элементов в клетке, их морфологические и оптические характеристики в процессе эксперимента не представляется возможным, поэтому получаемые значения максимальной скорости манипулирования сильно различаются, и это находит отражение в пилообразном характере полученной кривой. Кривая, полученная для клеток ганглия, позволяет сделать и другой важный вывод. Наличие выраженных оптических неоднородностей, по-видимому, является свойством опухолевой линии СНО, поскольку в клетках, приготовленных по протоколу шванновской клетки, такой выраженной гранулярности не наблюдалось. В связи с последним, как мы увидели на графике, имеет место минимальное варьирование значений максимальной скорости перемещения клеток (по крайней мере, для клеток, размер которых лежит в диапазоне 13,4–16,6 мкм). То есть для шванновских клеток значение максимальной скорости манипулирования при данной плотности мощности излучения в оптической ловушке – величина, близкая к постоянной. Соответственно, можно сделать предположение, что типичные клетки млекопитающих, характеризующиеся узким диапазоном варьирования размеров клеток, высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, не имеющие

ярких оптических неоднородностей (наблюдаемых, например, у клеток СНО), будут обладать схожим постоянством значений максимальной скорости манипулирования от клетки к клетке для данного вида клеток. Если это оправдается и максимальная скорость манипулирования будет типичной для заданной интенсивности для данного вида клеток, то, устанавливая параметры и условия оптимального манипулирования клетками разных видов, мы сможем создавать рекомендации для дальнейших работ в сфере тканевой инженерии. Данная работа, в частности, показала, что при плотности мощности излучения $I \approx 9,7 \cdot 10^5$ Вт/см² максимальная скорость манипулирования шванновскими клетками составляла $v_{\max} \approx 10 \pm 1,5$ мкм/с, при $I \approx 1,6 \cdot 10^6$ Вт/см² – $v_{\max} \approx 19 \pm 4$ мкм/с, при $I \approx 2,3 \cdot 10^6$ Вт/см² – $v_{\max} \approx 46 \pm 6$ мкм/с. Необходимо отметить, что эти значения были получены для клеток, диаметры которых отличались не более чем на 20%. Для клеток СНО в данном диапазоне размеров значения максимальной скорости манипулирования варьировались от 15 до 85 мкм/с (измеренные значения). Измерения для обоих видов клеток проводились с использованием объектива М-ФЛЮАР 40×/0,85 Л.

Результаты экспериментов показали, что при проведении прецизионного ориентирования клеток в пространстве и относительно друг друга при решении тех или иных клеточно-хирургических задач требуется учитывать, что на пути прохождения пучка света, формирующего оптическую ловушку, могут попадаться разнообразные внутриклеточные структуры. Последнее может приводить к изменению манипулируемости клеткой и нарушению предполагаемого поведения клетки в области оптической ловушки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы создан программно-аппаратный комплекс оптического фемтосекундного лазерного пинцета-скальпеля, позволяющий осуществлять лазерное воздействие и трехмерное оптическое манипулирование биологическими объектами в диапазоне размеров от нескольких сотен нанометров до нескольких десятков микрометров. С помощью оптического пространственного фазового модулятора и специального программного обеспечения система позволяет интерактивно перемещать независимо друг от друга и прецизионно ориентировать в одном поле зрения множество биологических объектов (на протяжении десятков микрометров). Также существует возможность синхронно перемещать все захваченные объекты из одного поля зрения в другое на значительные расстояния (более 1 мм) путем смещения среды, в которой они находятся. Используя специ-

альное программное обеспечение, можно контролировать скорость перемещения среды относительно объектов или самих объектов, а также наблюдать и регистрировать взаимодействие оптической ловушки с биологическим объектом. Это позволяет изучать механизм и параметры оптического манипулирования биологическими объектами.

Проведено исследование оптического манипулирования СНО-клеток. Установлено, что при увеличении интенсивности излучения лазера в определенном диапазоне наблюдается линейное увеличение максимальной скорости манипулирования клеткой. При достижении определенного значения интенсивности дальнейший ее рост не приводит к увеличению максимальной скорости движения. Обнаружен значительный разброс максимальной скорости манипулирования клетками СНО от клетки к клетке при близких размерах последних. Это, вероятно, связано с наличием во многих клетках этого вида оптических неоднородностей – грануловидных внутриклеточных структур, которые от клетки к клетке отличаются размерами, количеством, положением и связью с цитоскелетом.

Проведено измерение максимальной скорости манипулирования одного из видов глиальных клеток нервной ткани млекопитающего – шванновской клетки (клетки были получены из сенсорного ганглия млекопитающего и очищены по протоколам, ранее разработанным для шванновских клеток млекопитающих). Варьирование максимальной скорости манипулирования от клетки к клетке при близких размерах последних, равно как и разбросы значений этой скорости шванновских клеток в диапазоне диаметров 27–33 мкм не превышали 10 мкм/с. Таким образом, клетки спинального ганглия характеризуются большей оптической однородностью по сравнению с клетками СНО. Измерены значения максимальной скорости манипулирования шванновскими клетками при различных интенсивностях лазерного излучения оптического пинцета.

Выполненные эксперименты показали, что при проведении прецизионного ориентирования клеток в пространстве и относительно друг друга при решении тех или иных задач клеточной хирургии требуется учитывать, что внутриклеточные оптические неоднородности могут попадать в область оптической ловушки. В результате этого изменяется максимальная скорость манипулирования клеткой и ориентация клетки относительно оптической ловушки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ракитянский М.М., Агранат М.Б., Ашитков С.И. и др.* Фемтосекундный лазерный «пинцет-скальпель» для захвата и манипулирования нанообъектами, оптичес-

- кой микро-нанохирургии и тканевой инженерии // Тезисы международного форума по нанотехнологиям Rusnanotech. М. 2008.
2. *Саркисов О.М.* Перспективы применения голографического пинцета и скальпеля как наноинструмента биомедицинских технологий // Тезисы международного форума по нанотехнологиям Rusnanotech. М. 2008.
 3. *Ashkin A., Dziedzic J.M., Bjorkholm et al.* Observation of a single beam gradient trap for dielectric particles // *Opt. Lett.* 1986. № 11. P. 288–290.
 4. *Ashkin A., Dziedzic J.M.* Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria // *Science.* 1987. Vol. 235 (4795). P. 1517–1520.
 5. *Ashkin A., Dziedzic J.M.* Internal cell manipulation using infrared laser traps // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. Vol. 86 (20). P. 7914–7918.
 6. *Ashkin A., Schutze K., Dziedzic J.M. et al.* Force generation of organelle transport measured *in vivo* by an infrared laser trap // *Nature.* 1990. Vol. 348 (6299). P. 346–348.
 7. *Ashkin A.* Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime // *Biophys. J.* 1992. Vol. 61. P. 569–582.
 8. *Oraevsky A.A., Luiz B. et al.* Plasma Mediated Ablation of Biological Tissues with Nanosecond-to-Femtosecond Laser Pulses: Relative Role of Linear and Nonlinear Absorption // *IEEE J. of selected topics in quantum electronics.* 1996. Vol. 2. № 4.
 9. *Brunsting A. and Mullaney P.F.* Differential light scattering from spherical mammalian cells // *Biophys. J.* 1974. Vol. 14. P. 439–453.
 10. *Breckes J.P., Fields K.L. and Raft M.C.* Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve // *Brain Res.* 1979. Vol. 165. P. 105–118.
 11. *Curtis J.E., Koss B.A. & Grier D.G.* Dynamic holographic optical tweezers // *Opt. Commun.* 2002. Vol. 207. P. 169–175.
 12. *Harada Y. and Asakura T.* Radiation forces on a dielectric sphere in the Rayleigh scattering regime // *Opt. Commun.* 1996. Vol. 124. P. 529–541.
 13. *Hammer D.X., Thomas R.J., Noojin G.D. et al.* Experimental investigation of ultrashort pulse laser-induced breakdown thresholds in aqueous media // *IEEE J. Quantum Electron.* 1996. Vol. 32. P. 670–678.
 14. *Haastert K., Mauritz C., Chaturvedi S. et al.* Human and rat adult Schwann cell cultures: fast and efficient enrichment and highly effective non-viral transfection protocol // *Nature Protocols.* 2007. Vol. 2. № 1. P. 99–104.
 15. *Juhasz T., Kastis G.A., Suarez C. et al.* Time resolved observations of shock waves and cavitation bubbles generated by femtosecond laser pulses in corneal tissue and water // *Lasers Surg. Med.* 1996. Vol. 19. P. 23–31.
 16. *Kennedy P.K., Boppart S.A., Hammer D.X. et al.* A first-order model for computation of laser-induced breakdown thresholds in ocular and aqueous media: Part I – Theory and part II – Comparison to experiment // *IEEE J. Quantum Electron.* 1995. Vol. 31. P. 2241–2257.
 17. *Konig K., Tadir Y., Patrizio P. et al.* Effects of ultraviolet exposure and near infrared laser tweezers on human spermatozoa // *Human Reproduction* 1996. Vol. 11. № 10. P. 2162–2164.
 18. *Liang H., Vu K.T., Krishnan P. et al.* Wavelength Dependence of Cell Cloning Efficiency after Optical Trapping // *Biophysical J.* 1996. Vol. 70. P. 1529–1533.
 19. *Liu Y., Sonek G.J., Berns M.W. et al.* Physiological monitoring of optically trapped cells: assessing the effects of confinement by 1064-nm laser tweezers using microfluorometry // *Biophys. J.* 1996. № 71. P. 2158–2167.
 20. *Loesel F.H., Niemz M.H., Bille J.F. et al.* Laser-induced optical breakdown on hard and soft tissues and its dependence on the pulse duration: Experiment and model // *IEEE J. Quantum Electron.* 1996. Vol. 32. P. 1717–1722.
 21. *Porter S., Clark M.B., Glaser L. et al.* Schwann cells stimulated to proliferate in the absence of neurons retain full functional capability // *J. Neurosci.* 1986. № 6. P. 3070–3078.
 22. *Schneckenburger H., Hendinger A., Sailer R. et al.* Cell viability in optical tweezers: high power red laser diode versus Nd:YAG-laser // *J. of Biomedical Optics.* 2000. Vol. 5 (1). P. 40–44.
 23. *Uchida M., Sato-maeda M., Tashiro M.* Whole-cell manipulation by optical trapping // *Current Biology.* 1995. Vol. 5. № 4. P. 380–382.