

Динамическая ультрамикроскопия лазерно-индуцированных течений в коллоидных растворах плазмонно-резонансных частиц

И.В.Федосов, И.С.Нефедов, Б.Н.Хлебцов, В.В.Тучин

Предложен метод визуализации полей скоростей коллоидных плазмонно-резонансных наночастиц, движущихся в пучке лазерного излучения, основанный на использовании техники анемометрии по изображениям частиц для обработки ультрамикроскопических изображений. Для освещения частиц в толстом слое коллоидного раствора применен лазерный щелевой ультрамикроскопический осветитель с большой числовой апертурой, обеспечивающий высокий контраст изображения частиц и позволяющий визуализировать поперечное распределение скоростей в лазерно-индуцированных потоках с высоким пространственным разрешением.

Ключевые слова: ультрамикроскоп, анемометрия по изображениям частиц, коллоидные частицы.

1. Введение

В современную биотехнологию и медицину все шире внедряются молекулярные сенсоры, оптические контрастирующие агенты и средства терапевтического воздействия на основе коллоидных частиц благородных металлов [1–3]. Благодаря поверхностному плазмонному резонансу на оптических частотах эти частицы рассеивают и поглощают свет значительно сильнее других объектов аналогичных размеров. Резонансная частота, на которой поглощение и рассеяние света коллоидными частицами резко возрастает, определяется формой и размерами частиц. Синтезируя частицы в форме сфер, сферических оболочек или стержней и варьируя их размеры, можно легко настроить плазмонный резонанс на любую длину волны в видимой или ИК области спектра [2, 3]. Плазмонно-резонансные частицы, настроенные на заданные длины волн и функционализированные присоединенными к ним антителами, могут служить удобными оптическими маркерами для контрастирования специфических тканей и клеток в микроскопии, оптической томографии и фототермической терапии онкологических заболеваний [3, 4].

Микроскопические исследования механизмов взаимодействия таких маркеров с отдельными клетками требуют разработки новых методов визуализации коллоидных частиц, а также оптической манипуляции ими. Так как размеры плазмонно-резонансных частиц на порядок меньше длины волны, то наблюдение отдельных частиц возможно только методом ультрамикроскопии [5], не позволяющим, однако, непосредственно определять их

форму и размеры [2]. Методы оптической манипуляции, уже два десятилетия успешно применяющиеся в биологических исследованиях для захвата, удержания и перемещения микроскопических объектов [6, 7], также оказываются неэффективными при работе с металлическим коллоидными частицами. Сила захвата частиц градиентными оптическими ловушками ослабевает при уменьшении размеров частиц, а сами плазмонно-резонансные частицы перегреваются в остросфокусированных лазерных пучках [8]. Для решения этих проблем необходимо детальное изучение взаимодействия коллоидных частиц с полями оптического излучения.

Ранее нами была продемонстрирована возможность визуализации методами анемометрии по изображениям частиц (АИЧ) поля скоростей коллоидных наночастиц, ускоряемых в пучке лазерного излучения [9, 10]. Для визуализации наночастиц использовалось излучение ускоряющего их лазера, что, во-первых, делало невозможным наблюдение динамики частиц, находящихся вне лазерного пучка, а во-вторых, не позволяло исследовать трехмерное распределение скоростей в лазерном пучке.

В настоящее время для исследования трехмерного распределения скоростей в микроскопических потоках с высоким пространственным разрешением применяют методы АИЧ. При этом пространственное разрешение по глубине определяется глубиной резкости объектива микроскопа с большой числовой апертурой. Информация о третьей координате частицы в потоке получается методами обращения свертки изображения [11, 12]. Оба этих подхода требуют использования объективов с высокой числовой апертурой, а значит, и с очень малым рабочим отрезком, что затрудняет ввод лазерного пучка в среду при исследовании лазерно-индуцированных течений.

В данной работе описан метод визуализации лазерно-индуцированных течений, основанный на применении лазерного щелевого ультрамикроскопического осветителя для визуализации коллоидных частиц, обеспечивающего высокое разрешение по глубине даже при использовании объективов со сравнительно небольшой числовой апертурой.

И.В.Федосов, В.В.Тучин. Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, кафедра оптики и биомедицинской физики, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; e-mail: fedosov_optics@mail.ru

И.С.Нефедов. SMARAD Department of Radio Science and Engineering, Helsinki University of Technology (TKK) P.O. 3000, FI-02015 TKK, Finland

Б.Н.Хлебцов. Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, 410049 Саратов, просп. Энтузиастов, 13

Поступила в редакцию 10 января 2008 г., после доработки – 13 марта 2008 г.

2. Материалы и методы

2.1. Ультрамикроскопическая визуализация плазмонно-резонансных частиц

Метод наблюдения частиц, размеры которых меньше длины волны излучения видимого диапазона, был предложен более ста лет тому назад и получил название ультрамикроскопии [5]. Он основан на освещении исследуемого объема узким пучком света перпендикулярно направлению наблюдения. Излучение, рассеянное находящимися в этом объеме наночастицами, формирует в поле зрения микроскопа их изображения в виде ярких точечных источников на темном фоне, что позволяет обнаруживать частицы размерами до нескольких нанометров и определять их концентрацию. В настоящее время метод ультрамикроскопии широко применяется при исследовании различных дисперсных и коллоидных систем [13, 14] и даже в новых методах оптической томографии биологических тканей [15].

Для визуализации плазмонно-резонансных коллоидных частиц, в том числе биологических маркеров, применяются также другие методы микроскопии темного поля, основанные на использовании специализированных конденсоров, эпиобъективов или эффекта нарушенного полного внутреннего отражения [2]. Однако эти методы позволяют исследовать только монослой коллоидных частиц, осажденных на стеклянную поверхность. Увеличение толщины исследуемого слоя коллоидного раствора приводит к резкому снижению контраста изображения, вызванному рассеянием света на частицах, находящихся вне предметной плоскости объектива микроскопа, и переотражением света в исследуемом объеме и конденсоре. Поэтому наиболее удобным методом наблюдения этих частиц, взвешенных в значительном объеме жидкости, является классический метод щелевой ультрамикроскопии, основанный на освещении исследуемого объема плоским пучком света перпендикулярно направлению наблюдения.

Пространственная разрешающая способность ультрамикроскопа определяется размерами изображений частиц, которые можно считать точечными источниками. Изображение точечного источника, полученное с помощью дифракционно-ограниченного объектива микроскопа с круглой апертурной диафрагмой, будет иметь вид кружка Эйри с диаметром первого дифракционного максимума [16]

$$d = 2.44\lambda(M + 1)\tilde{f}, \quad (1)$$

где M – увеличение объектива; λ – длина волны света; \tilde{f} – относительное отверстие объектива микроскопа. Для объектива, дающего изображение предмета на бесконечности, относительное отверстие определяется соотношением

$$\tilde{f} \approx \frac{1}{2} \left[\left(\frac{n}{NA} \right)^2 - 1 \right]^{1/2}, \quad (2)$$

где n – показатель преломления среды в пространстве предметов, а NA – числовая апертура объектива микроскопа.

2.2. Анемометрия по изображениям частиц

Метод АИЧ позволяет с высокой точностью визуализировать двумерные поля скоростей частиц, движущихся

в потоке жидкости или газа [17]. Он основан на регистрации двух последовательных изображений частиц, движущихся в исследуемом потоке. Поле зрения разделяется на множество одинаковых областей (окон). Наиболее вероятное локальное смещение частиц Δr в пределах каждого окна находят, оценивая взаимную корреляцию соответствующих этому окну фрагментов первого и второго изображений. Если моменты регистрации первого и второго изображений разделены интервалом времени Δt , то в первом приближении локальная скорость потока u определяется как отношение измеренного смещения к указанному интервалу времени:

$$u = \frac{\Delta r}{\Delta t}. \quad (3)$$

Повторяя эту процедуру для всех окон, получают двумерное поле локальных скоростей частиц. Оценка взаимной корреляционной функции интенсивностей фрагментов двух последовательно зарегистрированных изображений обычно строится следующим образом [17]:

$$\Phi_k(m, n) = \sum_{j=1}^q \sum_{i=1}^p f_k(i, j) g_k(i + m, j + n), \quad (4)$$

где $f_k(i, j)$ и $g_k(i, j)$ – интенсивности k -х фрагментов первого и второго изображений соответственно. Оба фрагмента соответствуют одной и той же анализируемой области (окну) размером $p \times q$ пикселей. Функция $\Phi_k(m, n)$ будет иметь максимум при m и n , соответствующих наиболее вероятному смещению изображений частиц в пределах анализируемого окна. Дисперсия оценки $\Phi_k(m, n)$ зависит от шумов в исходных изображениях, смещения частиц вследствие броуновского движения и среднего числа частиц в пределах анализируемого окна.

Для снижения дисперсии оценки корреляционной функции при исследовании стационарных микроскопических течений последовательно регистрируют большое число пар изображений. Оценка корреляционной функции для каждого окна строится как среднее оценок корреляционных функций, полученных для каждой пары изображений. Положение максимума оценки, построенной таким образом, будет соответствовать среднему за время наблюдения смещению частиц. Этот метод был впервые предложен и продемонстрирован в работе [17].

При визуализации коллоидных частиц наиболее значительным источником ошибок является хаотическое тепловое движение, вызванное столкновениями частиц с молекулами жидкости и называемое броуновским движением [18]. Динамика этого процесса для интервалов времени Δt , превышающих время инерционного отклика частиц, не зависит от плотностей жидкости и взвешенных в ней частиц. Среднеквадратичное смещение частицы, обусловленное броуновским движением, пропорционально $D\Delta t$, где D – коэффициент диффузии частицы. Для сферической частицы коэффициент диффузии определяется соотношением [19]

$$D = \frac{kT}{3\pi\mu d_p}, \quad (5)$$

где d_p – диаметр частицы; k – постоянная Больцмана; T – абсолютная температура жидкости; μ – динамическая вязкость жидкости. Как показано в [20], случайное сме-

вление частиц в результате броуновского движения приводит к относительным ошибкам в определении скорости частицы

$$\varepsilon_x = \frac{1}{u_x} \left(\frac{2D}{\Delta t} \right)^{1/2}, \quad \varepsilon_y = \frac{1}{u_y} \left(\frac{2D}{\Delta t} \right)^{1/2}, \quad (6)$$

где u_x и u_y – соответственно x - и y -компоненты скорости частицы \mathbf{u} ; Δt – интервал времени между моментами регистрации первого и второго изображений частицы. Соотношения (6) позволяют оценить минимальный интервал времени Δt , при котором ошибки в определении скорости частицы, обусловленные броуновским движением, не превышают заданных значений.

2.3. Экспериментальная установка

Для исследования лазерно-индуцированных течений коллоидный раствор плазмонно-резонансных частиц помещался в микрокювету специальной конструкции (рис. 1).

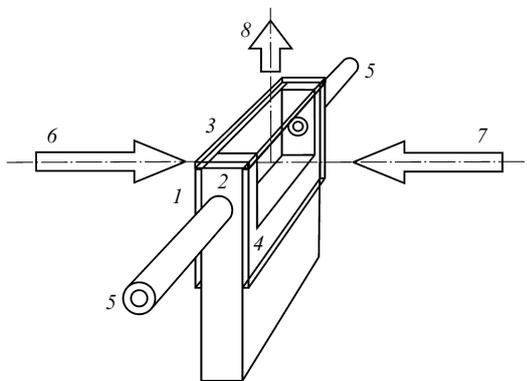


Рис. 1. Схема микрокюветы:

1 – переднее окно; 2 – основание; 3 – верхнее окно; 4 – заднее окно; 5 – капиллярные трубки; 6 – направление силового лазерного пучка; 7 – направление освещающего лазерного пучка; 8 – направление рассеянного излучения, формирующего изображения частиц.

Основание кюветы 2 изготовлено из пластинки алюминиевого сплава толщиной 1 мм, в которой сделан вырез, закрытый с трех сторон окнами 1, 3, 4 из покровных стекол толщиной 170 мкм, приклеенных к основанию эпоксидным компаундом. Заполнение, опустошение и промывка кюветы осуществляется через два металлических капилляра 5 с внутренним диаметром 300 мкм, вклеенных в боковые стенки микрокюветы. Через переднее окно 1 вводится излучение силового лазера, перемещающее коллоидные частицы. Через заднее окно 4 осуществляется ультрамикроскопическое освещение исследуемого объема плоским лазерным пучком. Через верхнее окно 3 ведется наблюдение за частицами, изображения которых формируются излучением, рассеянным в направлении 8. Конструкция кюветы исключает возможность формирования капиллярных течений, вызванных испарением, а металлическое основание снижает градиент температуры внутри кюветы, вызывающий конвекционные течения.

Ультрамикроскопическая система для исследования лазерно-индуцированной динамики коллоидных частиц разработана на основе люминесцентного микроскопа «Биолам-М» (ЛОМО, Россия) (рис. 2). Коллимированный пучок излучения силового лазера 1 расширяется телескопической системой 2 и фокусируется объективом 3 внутри микрокюветы 4, проходя через ее переднее окно. В качестве силового лазера использовался полупроводниковый лазерный модуль с длиной волны излучения 660 нм и мощностью 65 мВт (KLM 650-50, «ФТИ-Оptronик», Россия). Исследуемый объем освещается через заднее окно кюветы излучением лазера 19, пучок которого формируется цилиндрической линзой 17 и микрообъективом 16 и направляется на раздвижную шелевую диафрагму 15 шириной 10 мкм. Изображение диафрагмы проецируется внутрь кюветы объективом 11. Чтобы исключить повреждение лазера 19, в оптическую схему введен светофильтр 18 из стекла марки СЗС 22, блокирующий излучение силового лазера. Для освещения использовался твердотельный лазер с диодной накачкой, из-

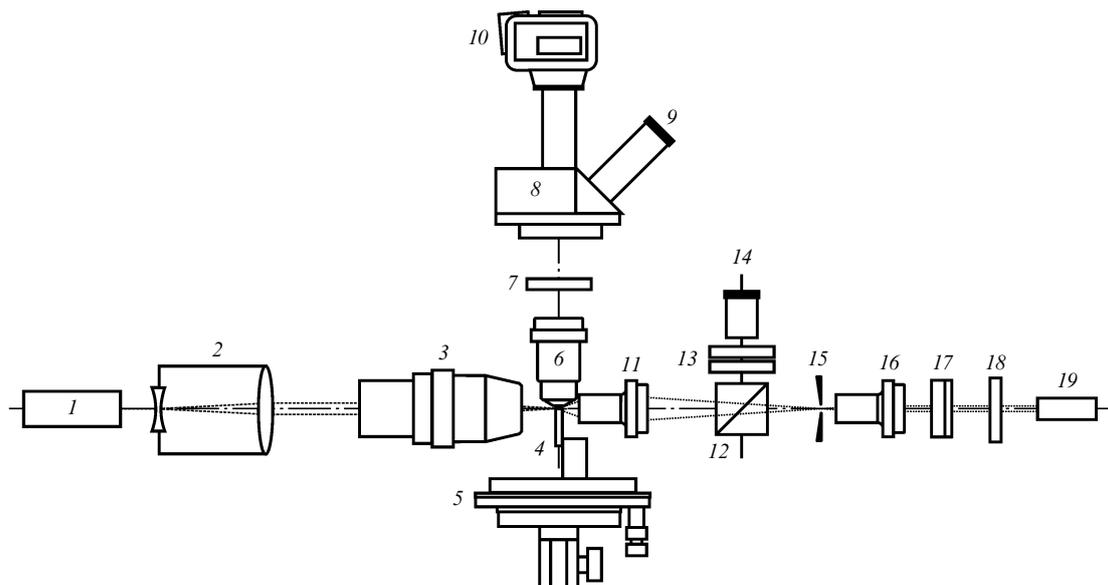


Рис. 2. Схема лазерного ультрамикроскопа:

1 – силовой лазер; 2 – расширитель пучка; 3 – объектив (10 \times , NA = 0.3); 4 – микрокювета; 5 – столик микроскопа; 6 – объектив микроскопа (40 \times , NA = 0.65); 7 – светофильтр, блокирующий излучение силового лазера; 8 – микрофотонасадка; 9 – окуляр; 10 – цифровая фотокамера; 11 – объектив (10 \times , NA = 0.3); 12 – делитель пучка; 13 – защитные светофильтры; 14 – вспомогательный окуляр; 15 – регулируемая шелевая диафрагма; 16 – объектив (8 \times , NA = 0.2); 17 – цилиндрическая линза; 18 – светофильтр; 19 – освещающий лазер.

лучающий на длине волны 532 нм и имеющий выходную мощность 3 мВт (LCS-T-11, «Лазер-Компакт», Россия). В схему осветителя также введены делитель пучка 12, защитные светофильтры 13 и вспомогательный окуляр 14, которые используются для юстировки системы формирования силовых лазерных пучков. Мощность подводимого в микрокювету излучения освещающего лазера составляла 0.5–1 мВт.

Наблюдение частиц осуществляется с помощью объектива 6 ($40\times$, NA = 0.65), установленного в турель микроскопа, и микрофотонасадки 8 (МФН-11, ЛОМО, Россия), позволяющей наблюдать изображение визуально через окуляры 9 или регистрировать его с помощью цифровой фотокамеры 10 (Coolpix 4300, Nikon Corp., Japan). В оптическую систему микроскопа введен светофильтр 7 (стекло СЗС 22), блокирующий излучение силового лазера.

Механическая часть системы обеспечивает независимое перемещение силового лазерного пучка, осветительной системы и микрокюветы относительно объектива микроскопа 6. Для этого объектив 3 установлен на горизонтальном двухкоординатном столике, который смонтирован на прецизионном подъемном устройстве с разрешением по вертикали 1 мкм. Кювета закреплена на предметном столике микроскопа 5, который обеспечивает ее линейное перемещение по трем осям. Осветительная система целиком перемещается по трем осям на юстируемом основании.

2.4. Регистрация и обработка изображений

Изображения движущихся частиц регистрировались цифровой фотокамерой, работающей в режиме трансляции видеоизображения, и оцифровывались платой захвата изображений (AverMedia, Россия), установленной в персональном компьютере. Частота кадров была равна 27 кадр./с, размер изображения составлял 720×576 пикселей (стандарт PAL). При максимальном увеличении микрофотонасадки линейное поле зрения системы составляло 102×82 мкм, при минимальном – 231×186 мкм. Управление захватом изображений, а также последующий анализ методом АИЧ осуществлялись с помощью пакета программ для анализа изображений, разработанного нами в среде Matlab 7.0 (The Mathworks Inc., USA). Объем реализации, используемой для построения поля скоростей частиц, составлял обычно 500 кадров видеосигнала, которые сохранялись на жестком диске в формате JPEG с минимальной компрессией. При необходимости из каждого из этих изображений вырезался определенный фрагмент, который анализировался с высоким разрешением.

Анализ поля скоростей по сохраненным изображениям осуществлялся методом АИЧ с усреднением корреляционных функций. Поскольку изображения регистрировались через равные промежутки времени, то в общей сложности для оценки корреляционной функции использовалось 499 пар кадров (первый и второй кадры, второй и третий кадры и т. д.). Полученное в результате анализа поле скоростей частиц сохраняется в виде таблицы данных в текстовом формате.

3. Результаты и обсуждение

Результаты, представленные в этой работе, были получены с использованием частиц коллоидного золота ди-

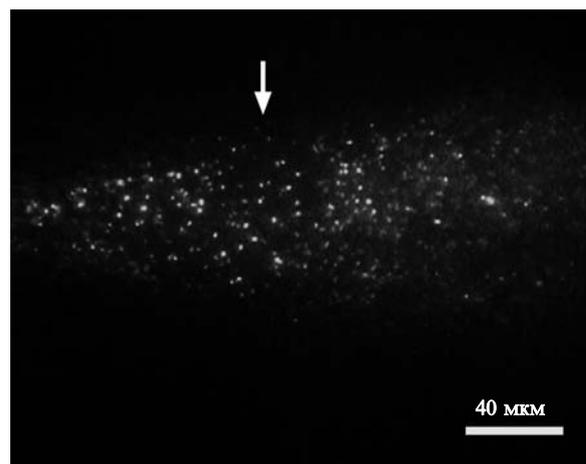


Рис.3. Изображения частиц коллоидного золота диаметром 40 нм в пучке лазерного ультрамикроскопического осветителя. Стрелкой отмечена плоскость, оптически сопряженная с раздвижной щелью системы осветителя.

аметром 40 нм, взвешенных в воде. Максимум экстинкции таких частиц находится на длине волны 550 нм, при этом поглощение света в полосе плазмонного резонанса преобладает над рассеянием [2]. Это обеспечивает наибольшее воздействие на частицы излучения силового лазера с длиной волны 532 нм, в то время как длина волны излучения освещающего лазера 660 нм находится вне полосы резонансного поглощения. На рис.3 показаны изображения этих частиц, освещенных с помощью лазерного ультрамикроскопического осветителя. Стрелкой отмечена плоскость, оптически сопряженная с раздвижной щелью системы осветителя. Благодаря использованию в оптической схеме осветителя объектива с числовой апертурой 0.3, при ширине щели 10 мкм сечение лазерного пучка имеет вид вытянутого эллипса с большой осью длиной ~ 40 мкм, лежащей в плоскости рисунка, и малой осью длиной ~ 2 мкм. Для измерений поперечного сечения пучка осветителя он направлялся в объектив микроскопа 6 после отражения от гипотенузной грани треугольной стеклянной призмы, помещенной на столик микроскопа вместо кюветы. На рис.3 заметно уменьшение по мере увеличения толщины пучка контраста изображения частиц влево и вправо от плоскости изображения щели, обусловленное рассеянием света на частицах, находящихся за пределами предметной плоскости микроскопа. Астигматизм, вносимый цилиндрической линзой, приводит к сужению лазерного пучка, наблюдаемому вблизи левого края рисунка, где его сечение имеет вид вытянутого эллипса с большой осью, перпендикулярной плоскости рисунка.

Для наблюдения частиц использовался объектив с увеличением $40\times$, числовой апертурой 0.65 и рабочим отрезком 0.61 мм. Большой рабочий отрезок необходим при исследовании течений, формирующихся в закрытой кювете на достаточном удалении от ее стенок. Поперечный размер изображений точечных источников, получаемый с помощью этого объектива, составляет 1.1 мкм в пересчете на предметную плоскость, а глубина резкости – приблизительно 4 мкм [11]. Применение сфокусированного астигматического пучка для подсветки частиц позволяет в небольшой области вблизи плоскости изображения щели увеличить разрешение по глубине до 2 мкм, а также повысить контраст изображения.

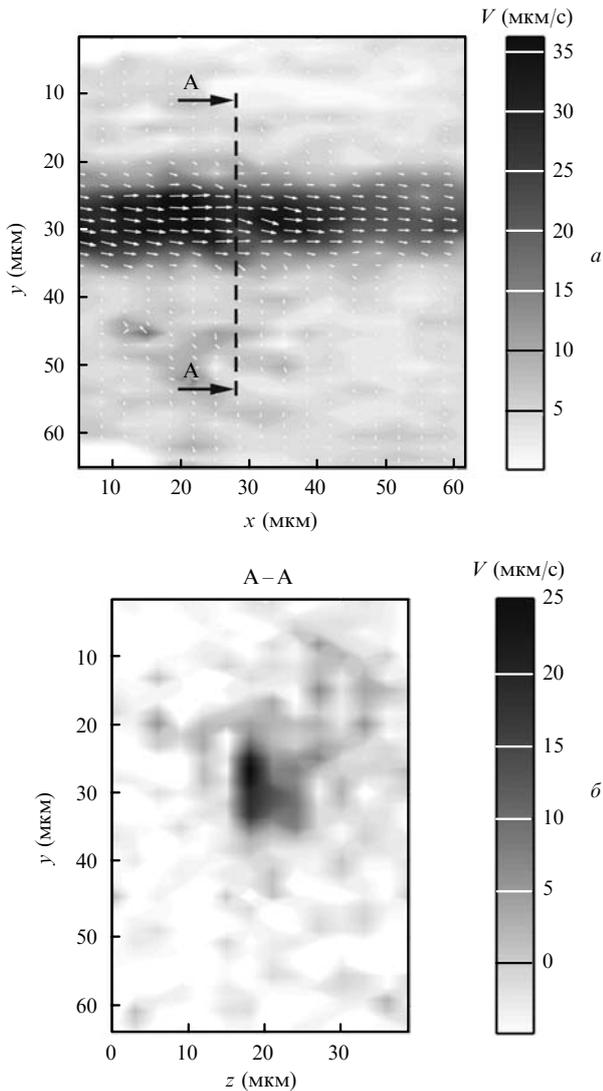


Рис.4. Поле скоростей наночастиц, движущихся вдоль оси лазерного пучка (а), и поперечное распределение скоростей в сечении А–А (б). Стрелками показано направление движения частиц, длина стрелок и градации серого цвета соответствуют средней скорости частиц.

Поле скоростей частиц, движущихся в одиночном лазерном пучке излучения мощностью 55 мВт, полученное методом АИЧ, представлено на рис.4,а. Диаметр перетяжки сфокусированного пучка составлял 10 мкм. Стрелками показано направление движения частиц, длина стрелок соответствует средней скорости частиц. Для построения этого поля использовался фрагмент изображения размером 200×200 пикселей, полученного с разрешением 0,33 мкм/пиксель. Корреляционный анализ выполнялся по 702 перекрывающимся окнам размером 30×10 пикселей (по осям x и y соответственно). Окна перекрывались на 20 пикселей по оси x и на 5 пикселей по оси y . Пространственное разрешение без учета перекрытия окон составляло 10 мкм по оси x и 3 мкм по оси y . Координаты начала каждого вектора скорости на рис.4,а отвечают положению центра соответствующего окна на исходном кадре.

В плоскости, сопряженной с изображением щели (она отмечена штриховой линией на рис.4,а), поперечное сечение освещающего пучка имеет толщину 2 мкм, что позволяет исследовать поперечное распределение скоростей частиц в лазерном пучке с высоким пространствен-

ным разрешением. На рис.4,б представлено поперечное распределение скоростей частиц в этой плоскости, полученное путем сканирования силового лазерного пучка по вертикали. Сканирование осуществлялось перемещением объектива 3 (рис.2) с шагом 3 мкм.

Для построения этого распределения было зарегистрировано всего 14 реализаций, отвечающих различным положениям силового лазерного пучка. На рис.4,а показано поле скоростей частиц, рассчитанное по реализации, соответствующей $z = 18$ мкм. Поперечное распределение скоростей частиц соответствует распределению интенсивности лазерного пучка, которое повторяет прямоугольную форму тела светимости лазерного диода, использовавшегося в качестве силового лазера.

В рассмотренной схеме исследуемые частицы облучаются одновременно двумя лазерными пучками, распространяющимися навстречу друг другу. Излучение каждого из этих пучков оказывает давление на частицы в кювете. Давление на частицу в пучке непрерывного лазерного излучения прямо пропорционально отношению мощности излучения к площади поперечного сечения пучка. Мы исследовали зависимость скорости частиц на оси лазерного пучка от мощности излучения, подводимого к кювете. Мощность излучения силового лазера регулировалась с помощью вращающегося поляризационного фильтра и контролировалась измерителем мощности лазерного излучения (Power Meter Model 1815, Newport Corp., USA) на входе в объектив, фокусирующий излучение в кювету. Лазерный пучок был сфокусирован в перетяжку диаметром 10 мкм. Ось пучка освещающего лазера юстировалась точно по оси пучка силового лазера. Поле скоростей рассчитывалось по кадрам размером 200×200 пикселей. В полученном поле вычислялось среднее значение x -компонент векторов скоростей, лежащих на оси лазерного пучка. Зависимость скорости движения частиц V от мощности лазерного излучения P представлена на рис.5. Видно, что скорость частиц прямо пропорциональна мощности лазерного излучения.

Мощность излучения освещающего лазерного пучка в наших экспериментах не превышала 1 мВт. Площадь сечения пучка лазерного излучения в перетяжке диаметром 10 мкм была равна 8×10^{-7} мм², а площадь сечения пучка освещающего лазера в виде эллипса с осями 2 и 40 мкм – 6×10^{-7} мм². Так как эти величины одного порядка, то световое давление, оказываемое пучком излучения освещающего лазера мощностью 1 мВт в его на-

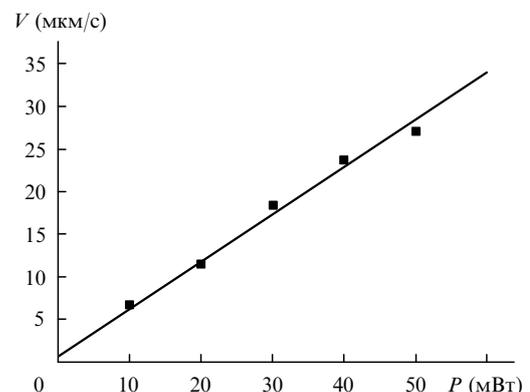


Рис.5. Зависимость средней скорости движения частиц на оси пучка от мощности лазерного излучения. Точки – экспериментальные результаты, сплошная прямая – линейная регрессия.

меньшем сечении, составляет 2% – 10% от давления, оказываемого излучением силового лазера, что при малых скоростях движения частиц значительно меньше ошибки, вносимой броуновским движением.

4. Заключение

Максимальная пространственная разрешающая способность большинства оптических методов визуализации ограничена длиной световой волны, которая значительно превышает размеры коллоидных частиц. Несмотря на это ограничение, применение оптических методов визуализации коллоидных систем наиболее перспективно в биологических и медицинских исследованиях, т.к. только при использовании оптических методов, обладающих достаточной разрешающей способностью для работы в масштабах отдельных клеток, воздействие на живые организмы оказывается минимальным, что позволяет выполнять прижизненные исследования в реальном масштабе времени.

В данной работе представлен оптический метод исследования коллоидных систем, сочетающий в себе силовое воздействие на коллоидные частицы и визуализацию их динамики. Этот метод предназначен для исследования взаимодействия коллоидных частиц с оптическим излучением и окружающей их средой. Благодаря минимальной инвазивности он может применяться в микроскопических исследованиях фундаментальных механизмов взаимодействия контрастирующих и терапевтических агентов на основе коллоидных частиц с отдельными клетками, при изучении механизмов трансмембранного переноса коллоидных частиц, процессов фототермического воздействия на отдельную клетку и формирования кластеров коллоидных частиц в поле лазерного излучения.

Работа поддержана грантами CRDF REC-006/SA-006-00 и BRHE RUXO-006-SR-06/BP1M06, грантом Фе-

дерального агентства по образованию РФ № 1.4.06, а также грантом RNP.2.1.1.4473.

1. Loo C., Lin A., Hirsch L., Lee M.-H., Barton J., Halas N., West J., Drezek W. *Technol. Cancer Res. Treat.*, **3** (1), 33 (2004).
2. Oldenburg S.J., Schultz D.A., in *Topics in Fluorescence Spectroscopy. Vol. 8: Radiative Decay Engineering* (New York: Springer Science, Business Media Inc., 2005).
3. Khlebtsov B.N., Zharov V.P., Melnikov A.G., Tuchin V.V., Khlebtsov N.G. *Nanotechnology*, **17** (20), 5167 (2006).
4. Kalele S., Gosavi S.W., Urban J., Kulkarni S.K. *Current Science*, **91** (8), 1038 (2006).
5. Siedentopf H., Zsigmondy R. *Annalen der Physik*, **10**, 1 (1903).
6. Molloy J.E., Dholakia K., Padgett M.J. *J. Mod. Opt.*, **50**, 1501 (2003).
7. Neuman K.C., Block S.M. *Rev. Sci. Instr.*, **75** (9), 2787 (2004).
8. Seol Y., Carpenter A.E., Perkins T.T. *Opt. Lett.*, **31** (16), 2429 (2006).
9. Fedosov I.V., Nefedov I.S., Khlebtsov B.N., Tuchin V.V. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **6536**, DOI: 10.1117/12.753444 (2007).
10. Fedosov I.V., Nefedov I.S., Khlebtsov B.N., Tuchin V.V. *SPIE Newsroom*, <http://spie.org/x14817.xml?highlight=x2400>, DOI: 10.1117/2.1200706.0803 (2007).
11. Wereley S.T., Meinhart C.D., in *Microscale Diagnostic Techniques* (Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2005, p. 51).
12. Park J.S., Kihm K.D. *Exp. Fluids*, **40**, 491 (2006).
13. Крылов В.А., Лазукина О.П., Кеткова Л.А., Буланов А.Д., Адамчик С.А., Кобыща Д.Г. *Журн. аналитической химии*, **55** (3), 326 (2000).
14. Чернобережский Ю.М., Рудакова И.С., Лорентссон А.В. *Коллоидный журн.*, **69** (2), 261 (2007).
15. Dodt H.-U., Leischner U., Schierloh A., Jahrling N., Mauch C.P., Deiningner K., Deussing J.M., Eder M., Zieglsberger W., Becker K. *Nature Methods*, **4** (4), 331 (2007).
16. Adrian R.J. *Ann. Rev. Fluid Mechanics*, **23**, 261 (1991).
17. Meinhart C.D., Wereley S.T., Santiago J.G. *J. Fluids Eng.*, **122**, 285 (2000).
18. Probst R.F. *Physicochemical Hydrodynamics: An Introduction* (New York: John Wiley & Sons, 1994).
19. Einstein A., in *Theory of Brownian Movement* (New York: Dover Publ. Inc., 1905, p. 1).
20. Devasenathipathy S., Santiago J.G., Wereley S.T., Meinhart C.D., Takehara K. *Exp. Fluids*, **34**, 504 (2003).