

УДК 535.361.1

ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ДИНАМИКИ И ДЕФОРМАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ПОТОКА *

К. Ли¹, М. Киннунен², А. Е. Луговцов¹, А. В. Приезжев¹,
А. В. Карменян³

¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
119991, Россия, Москва, Ленинские горы, 1
E-mail: leekisung1991@bmr.ilc.edu.ru

²Университет Оулу, Финляндия,
P.O. Box 4500, FIN-90014, Оулу, ErkkiKoiso-Kanttilankatu, 3
E-mail: matti.kinnunen@ee.oulu.fi

³Национальный университет Янг-Минг, Тайвань,
000247-5, Тайбэй, N 155, Sec. 2, Linong Street 112-21
E-mail: akarmenyan@gmail.com

Оптическое исследование динамики и деформации эритроцитов в потоке выполнялось двумя методами. Захват и манипулирование клетками осуществлялись лазерным пинцетом. Лазерный пинцет позволяет наблюдать за деформацией одиночной клетки или агрегата клеток в различных экспериментальных условиях, например в покое или потоке, а также исследовать агрегацию эритроцитов — важный процесс, влияющий на реологию крови. Другой метод — эктацитометрия — основан на получении информации о микрореологических параметрах эритроцитов из картин дифракции лазерного излучения на разбавленной суспензии клеток в потоке и покое. Этот метод позволяет определять среднюю сдвиговую деформацию сразу целого ансамбля, включающего много тысяч частиц, по изменению дифракционной картины в зависимости от приложенного к клеткам сдвигового напряжения. Выполнены измерения силы взаимодействия двух эритроцитов в агрегате и определены параметры деформации клеток. Данные по деформации эритроцитов, полученные двумя методами, хорошо согласуются между собой.

Ключевые слова: эритроцит, эктацитометрия, оптический пинцет, деформация клетки, поток, сдвиговое напряжение, агрегация.

Введение. Одним из основных преимуществ оптических методов является возможность неинвазивного и бесконтактного исследования биологических объектов. Применительно к биологическим клеткам это достоинство особенно важно, так как позволяет минимизировать возмущающее воздействие на исследуемую клетку в ходе эксперимента. В последнее время большое внимание уделяется реологическим свойствам крови, которые на уровне клеток определяются в основном деформируемостью и агрегацией эритроцитов. Метод оптического захвата, используемый в данной работе, широко применяется в области биофотоники [1, 2]. Основываясь на явлении светового давления жёстко фокусированного лазерного пучка на диэлектрические объекты, лазерный пинцет даёт возможность захватывать микроразмерные частицы, действуя на них силами от долей до сотен пико-

*Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 12-02-92008-ННС_а и № 13-02-01373_а).

ньютонов. Главное достоинство метода оптического захвата заключается в том, что он позволяет с высокой точностью бесконтактно измерять силы взаимодействия между клетками, что делает его перспективным для применения в области биофизики [3, 4]. В данной работе оптический захват использован для удержания одиночных живых клеток крови, манипулирования ими и наблюдения за их деформацией и взаимодействием в различных условиях потока. Другой метод, предложенный в [5], — эктацитометрия (лазерная дифрактометрия эритроцитов) на сегодняшний день наиболее эффективно применяется для исследования деформируемости ансамблей эритроцитов. В этом методе параметры эритроцитов измеряют, анализируя изменения формы дифракционной картины, получаемой от разбавленной суспензии клеток, в зависимости от степени деформированности клеток в сдвиговом потоке [6].

Предлагаемая работа вызвана необходимостью исследования возможности комплексного применения обоих методов в задаче исследования динамики и деформации эритроцитов в условиях потока и сравнения измеряемых параметров. Длины волн лазерного излучения подбираются в дальней красной или ближней инфракрасной области спектра. Это позволяет минимизировать нагрев клеток, что важно при работе с биологическими клетками. Согласно нашим расчётам нагрев эритроцита в оптической ловушке не превышает одного градуса на каждые 10 мВт мощности сфокусированного на клетку лазерного излучения [2]. В экспериментах с эритроцитами мощность излучения лазера составляла не более 40 мВт. Таким образом, при комнатной температуре эффектом нагрева эритроцитов можно пренебречь.

Деформация эритроцитов. Измерение параметра деформируемости важно в силу того, что оно позволяет судить о возможности прохождения эритроцитов через сосуды малого диаметра, особенно через терминальные капилляры диаметром порядка нескольких микрометров, т. е. имеющие поперечный размер, меньший, чем размер эритроцитов (6–8 мкм). Именно в этих капиллярах и происходит передача кислорода тканям. В качестве параметра, количественно характеризующего деформацию эритроцитов при данном напряжении сдвига, используется индекс деформируемости (DI). В эктацитометрии этот параметр определяется отношением разности продольного (A) и поперечного (B) размеров вытянутой дифракционной картины от ансамбля эритроцитов к их сумме:

$$DI = \frac{A - B}{A + B}. \quad (1)$$

Соответствующие дифракционные картины представлены на рис. 1, a, b . В методе оптического захвата параметр DI определяется отношением продольного и поперечного размеров

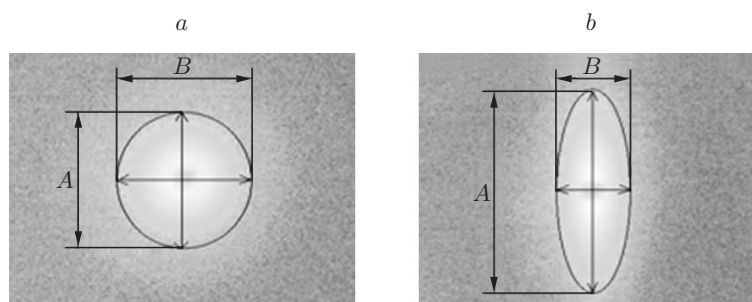


Рис. 1. Дифракционные картины: от недеформированных (a) и деформированных (b) эритроцитов

изображения эритроцита, регистрируемого фото- или видеокамерой. Как показывают исследования, DI уменьшается при большинстве заболеваний, в частности диабете, сепсисе, малярии [6]. Последствием этого является ухудшение микроциркуляции крови и повреждение эпителиальных клеток стенок кровеносных сосудов.

Агрегация эритроцитов — это обратимый процесс, непрерывно проходящий в кровотоке живого организма. В норме эритроциты агрегируют в основном в крупных кровеносных сосудах. Их агрегация способствует снижению гидродинамического сопротивления в сосудистой системе. В маленьких сосудах агрегаты разрушаются под действием сдвиговых напряжений и кровь течёт в виде последовательности одиночных клеток. В этом случае также большую роль играет деформируемость эритроцитов. Свойства и процессы агрегации и деформации эритроцитов являются взаимозависимыми. Вне организма (в пробирке) процесс агрегации происходит в аутологической (собственной) плазме, а также при наличии больших макромолекул плазмы крови или других искусственных макромолекул. Состав крови и функциональные свойства макромолекул, в частности белков плазмы крови, отражаются на агрегации эритроцитов, что проявляется при большинстве социально значимых заболеваний. Нарушение агрегации эритроцитов естественным образом приводит к ухудшению микроциркуляции крови. Важной задачей является исследование кинетики взаимодействия между эритроцитами.

Цель данной работы — исследование деформируемости и агрегации эритроцитов, помещённых в буферные растворы с различным составом макромолекул, методами оптического захвата и эктацитометрии.

Измерение деформации эритроцитов методом эктацитометрии. В этом случае формируется сдвиговый поток с использованием двух коаксиальных цилиндрических стаканов радиусами R_1 и R_2 . Между цилиндрическими стенками стаканов имеется зазор толщиной порядка 1 мм, в который помещается сильно разбавленная суспензия эритроцитов. Вращением внешнего цилиндра относительно внутреннего сдвиговый поток создаётся как течение Куэтта с линейным распределением скорости и соответствующим постоянным сдвиговым напряжением (рис. 2). Это позволяет считать деформацию эритроцитов одинаковой по всему объёму раствора. Сдвиговая скорость $\dot{\gamma}$ и напряжение τ могут быть

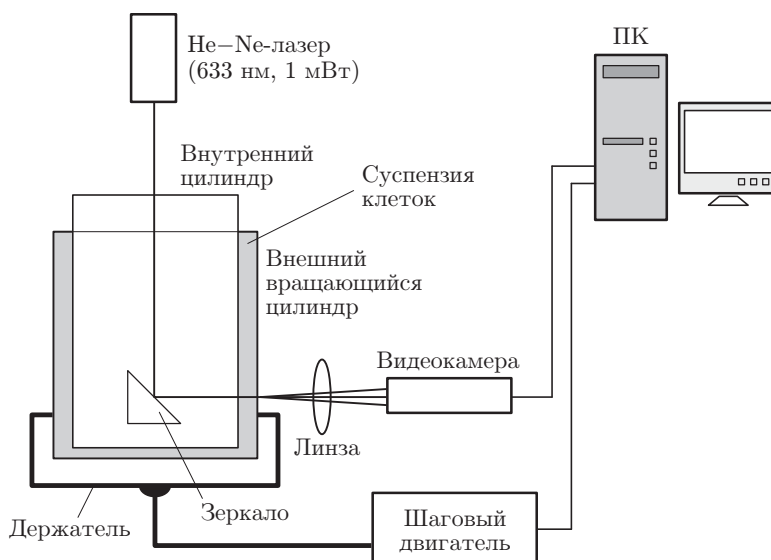


Рис. 2. Схема экспериментальной установки эктацитометра

вычислены с использованием соотношений [6]

$$\dot{\gamma} = (2\pi RN)/d, \quad (2)$$

$$\tau = \dot{\gamma}\eta, \quad (3)$$

где $R = (R_1 + R_2)/2$; N — угловая скорость вращения внешнего цилиндра (оборот/с); d — расстояние между внутренней и внешней поверхностями, ограничивающими сдвиговый поток; η — вязкость жидкости.

Сдвиговая деформация эритроцитов отражается в дифракционной картине, которая получается при малоугловом рассеянии лазерного пучка, проходящего через суспензию эритроцитов. Сильное разбавление цельной крови позволяет устранить возможность многократного рассеяния, в результате чего получается чистая дифракция на ансамбле случайно расположенных клеток. Для проведения измерений образец крови объёмом порядка 1 мл забирался из локтевой вены донора в специализированной клинике и разводился в растворе полиэтиленоксида, обеспечивающего высокую вязкость суспензии и высокие сдвиговые напряжения при сравнительно низких значениях сдвиговой скорости. Разбавленная суспензия эритроцитов помещалась в зазор между цилиндрами. Значения DI при различных сдвиговых напряжениях (сдвиговых скоростях) находились по наблюдениям за изменением дифракционной картины, соответствующим деформации клеток в потоке. Типичная зависимость DI от сдвигового напряжения, иллюстрирующая методику эктацитометрии, приведена на рис. 3.

Измерение силы взаимодействия и деформируемости эритроцитов методом лазерного пинцета. Основное требование для оптического захвата — жёсткая фокусировка лазерного пучка, для которой необходимо наличие гауссовского профиля его интенсивности и объектива с высокой числовой апертурой. Захват диэлектрической частицы в общем случае может быть описан через отражение и преломление пучка на частице и передачу ей импульса. «Рассеивающая» и «градиентная» составляющие силы отталкивают и притягивают частицу к малой пространственной области с максимальной плотностью энергии лазерного пучка. Обычно эта область локализуется вблизи фокуса объектива. В общем случае сила захвата зависит от коэффициентов преломления среды и частицы, мощности лазера и эффективности захвата Q , которая определяется экспериментально и

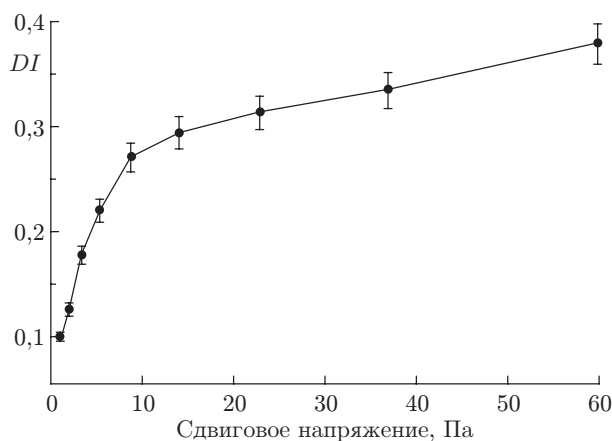


Рис. 3. Типичная зависимость индекса деформируемости эритроцитов здорового человека от сдвигового напряжения, измеренная эктацитометром

обусловлена параметрами фокусировки лазерного излучения. Калибровка лазерного пинцета может быть выполнена различными способами: пассивным (по наблюдению за броуновским движением захваченной частицы) или активным (по наблюдению за вязкостным откликом захваченной частицы при периодическом относительном перемещении оптической ловушки и предметного стола). Сила захвата может быть вычислена по формуле [2]

$$F_{\text{trap}} = \frac{Q n_m P}{c}. \quad (4)$$

Здесь n_m — показатель преломления окружающей частицу среды; P — мощность лазерного пучка; c — скорость света в вакууме.

В наших экспериментах кювета, содержащая исследуемую разбавленную суспензию эритроцитов, состояла из предметного и покровного стёкол, разделённых тонкой плёнкой толщиной 100 мкм. Размер кюветы составлял 15 мм в диаметре. Поверхность кюветы обрабатывалась 1 %-ным раствором бычьего сывороточного альбумина для предотвращения адгезии эритроцитов к поверхности стекла при калибровке оптической ловушки. Эритроциты, использованные в наших экспериментах, были получены из пальца единственного донора. Это делалось для устранения возможных разбросов между свойствами эритроцитов разных доноров. Образец свежезятой крови объёмом 1 мкл для работы над одиночными клетками разбавлялся физиологическим раствором (рН = 7,4) в соотношении 1 : 1000 с добавлением 10, 20, 30 мг декстрана с молекулярной массой 500 кДа на 1 мл раствора. Декстран является нейтральной макромолекулой, способной индуцировать агрегацию эритроцитов. На данный момент для исследования агрегации эритроцитов в ансамбле он используется наиболее широко [7]. Схема экспериментальной установки показана на рис. 4. Оптический захват осуществлялся фокусировкой лазерного излучения объективом с высокой числовой апертурой (водоиммерсионный объектив "Olympus", $\times 100$, $NA = 1,00$). Для получения наиболее эффективного захвата частицы диаметр лазерного пучка расширялся, слегка переполняя заднюю апертуру объектива. Регулировка мощности и силы захвата производилась поворотом полуволновых пластин, а управление положением пучка — по-

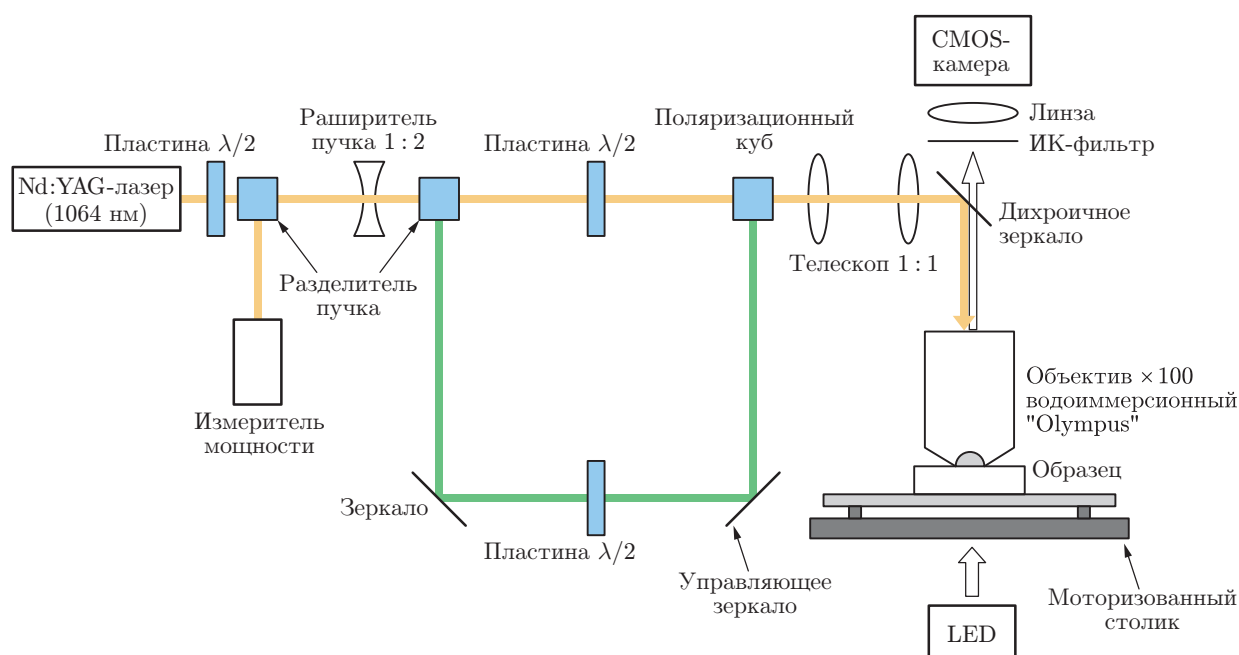


Рис. 4. Схема экспериментальной установки двухлучевого лазерного пинцета

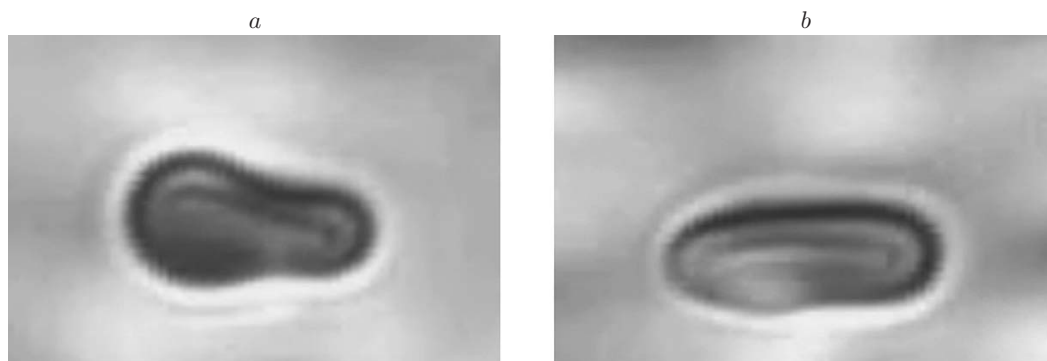


Рис. 5. Экспериментальная процедура измерения индекса деформируемости: *a* — захваченного эритроцита в покое; *b* — захваченного эритроцита в потоке

воротом зеркала. Калибровка оптической ловушки проводилась по методу вязкого трения. Сила вязкого трения рассчитывалась по формуле

$$F_{\text{vis}} = 6\pi\eta vr, \quad (5)$$

где r — радиус частицы; v — скорость потока.

При калибровке скорость потока суспендирующей жидкости относительно захваченной частицы постепенно увеличивается до тех пор, пока сила вязкого трения, рассчитанная по формуле (5), не превысит силу захвата. Сопоставление этих сил позволяет определить силу захвата эритроцитов, считая их сферами с эквивалентным по объёму радиусом $r = 2,7$ мкм.

К эритроцитам прилагалось сдвиговое напряжение с использованием этого метода. Деформация эритроцитов исследовалась при различных скоростях потока от 6 до 12 мм/с. Сначала эритроцит захватывался и удерживался оптической ловушкой в отсутствие потока (рис. 5, *a*), затем создавался поток. Изменяя скорость потока, можно наблюдать растяжение эритроцита (рис. 5, *b*). Индекс деформируемости DI рассчитывался согласно формуле (3) и составлял в наших экспериментах $0,44 \pm 0,04$, что сопоставимо с результатами, полученными на эктацитометре при больших сдвиговых скоростях. Сила захвата части-

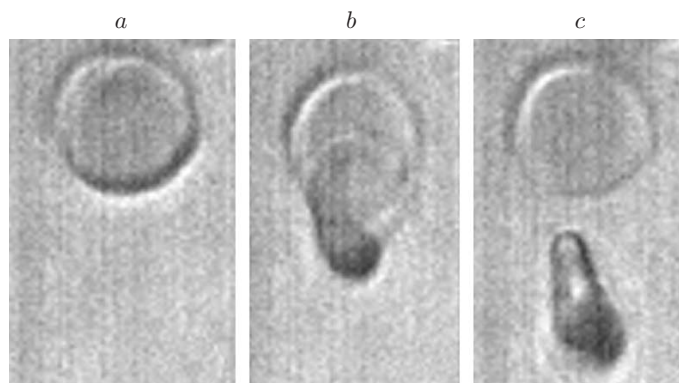


Рис. 6. Экспериментальная процедура измерения силы, необходимой для разделения двух эритроцитов в агрегате: *a* — два эритроцита в агрегате; *b* — захваченный верхний эритроцит отделяется ловушкой от нижнего; *c* — эритроциты полностью дезагрегируют

пы была порядка 50 пН во всех случаях при использовании пучка лазерного излучения с максимальной мощностью 36 мВт.

Измерение сил взаимодействия клеток между собой проводилось на примере двух эритроцитов в агрегате. Эритроциты в растворе декстрана естественным образом адгезировали к поверхности стекла. Подбирались агрегаты из двух эритроцитов, как показано на рис. 6, *a*, и измерялась минимальная сила, которую необходимо было приложить для отделения эритроцитов друг от друга (рис. 6, *b, c*). Выявлена зависимость силы от концентрации декстрана. Вследствие значительного разброса измеренных значений силы, связанного с различиями в свойствах клеток, удалось фиксировать только нижнюю границу силы на 20 парах эритроцитов для каждой концентрации. Значение силы взаимосвязи составило 15 пН для концентрации декстрана 10 мг/мл и 20 пН при концентрации декстрана 20 и 30 мг/мл. Полученные данные согласуются с результатами измерения силы, которую необходимо приложить для разделения эритроцитов в плазме [8].

Заключение. Измерение деформируемости и агрегации эритроцитов является важной задачей, которая играет ключевую роль в исследованиях реологии крови, поскольку эти параметры сильно изменяются при патологии и различных внешних влияниях [9, 10], например при диабете индекс деформируемости уменьшается примерно на 10 %, что вызвано уменьшением деформируемости эритроцитов у пациентов [9]. Методы, представленные в данной работе, экспериментально опробованы на здоровом человеке, для которого индекс деформируемости эритроцитов, регистрируемый на нашем приборе, составляет около 0,40. Они позволяют оперативно определять параметры деформируемости клеток с приемлемой точностью, при этом получаемые результаты хорошо сопоставимы друг с другом.

Измерение максимальной силы взаимодействия эритроцитов, необходимой для их разделения (на примере двух эритроцитов в агрегате в растворе декстрана), показывает, что сила зависит от концентрации макромолекул. Нижняя граница измеренной величины этой силы составила от 15 до 20 пН при концентрации декстрана 500 кДа от 10 до 30 мг/мл. Полученные значения находятся в том же диапазоне, что и силы, требующиеся для разделения эритроцитов в аутологической плазме.

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. **11**, N 5. P. 288–290.
2. **Neuman K. C., Block S. M.** Optical trapping // *Rev. Sci. Instrum.* 2004. **75**, N 9. P. 2787–2809.
3. **Zhang H., Liu K.-K.** Optical tweezers for single cells // *Journ. Royal Soc. Interface.* 2008. **5**, N 24. P. 671–690.
4. **Маклыгин А. Ю., Приезжев А. В., Карменян А. В. и др.** Измерение силы взаимодействия между эритроцитами в агрегате с помощью лазерного пинцета // *Квантовая электроника.* 2012. **42**, № 6. С. 500–504.
5. **Bessis M., Mohandas N.** A diffractometric method for the measurement of cellular deformability // *Blood Cells.* 1975. N 1. P. 307–313.
6. **Nikitin S. Yu., Priezzhev A. V., Lugovtsov A. E.** Laser diffraction by the erythrocytes and deformability measurements // *Advanced Optical Flow Cytometry: Methods and Disease Diagnoses* /Ed. V. V. Tuchin. Wiley-VCH, 2011. Ch. 6. P. 133–154.
7. **Baskurt O. K., Meiselman H. J.** Erythrocyte aggregation: basic aspects and clinical importance // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2013. **53**, N 1–2. P. 23–37.

8. **Khokhlova M. D., Lyubin E. V., Zhdanov A. G. et al.** Normal and system lupus erythematosus red blood cell interactions studied by double trap optical tweezers: direct measurements of aggregation forces // Journ. Biomed. Opt. 2012. **17**, N 2. 025001.
9. **Shin S.** Erythrocyte deformability and its variation in diabetes mellitus // Indian Journ. Exp. Biol. 2007. **45**, N 1. P. 121–128.
10. **Фадюкова О. Е., Тюрина А. Ю., Луговцов А. Е. и др.** Семакс увеличивает деформируемость эритроцитов в сдвиговом потоке у интактных крыс и у крыс с ишемией головного мозга // ДАН. 2011. **439**, № 5. С. 700–703.

Поступила в редакцию 13 января 2014 г.
