

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ имени М.В. ЛОМОНОСОВА  
ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

на правах рукописи

УДК 535.214

Хохлова Мария Дмитриевна

МЕТОД ОПТИЧЕСКОГО ПИНЦЕТА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
СИЛ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И МИКРОМЕХАНИЧЕСКИХ  
ХАРАКТЕРИСТИК КЛЕТОК

**01.04.05** - оптика

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук

А. А. Федянин

Москва - 2014

## Оглавление

Введение	7
Глава I	
<b>Обзор литературы: метод оптического пинцета для исследования упругих и агрегационных свойств эритроцитов</b>	<b>15</b>
1. Принцип работы оптического пинцета	15
1.1. История создания и принцип работы оптического пинцета	15
1.1.1. Рассмотрение принципов работы оптического пинцета в приближении геометрической оптики	16
1.1.2. Рассмотрение работы оптического пинцета в приближении Рэлея	17
1.1.3. Расчет сил оптического захвата для частиц сравнимого с длиной волны размера	20
1.2. Принципиальная экспериментальная схема оптического пинцета	22
1.3. Пределы возможности захвата частиц в оптическую ловушку	24
2. Методы калибровки установки оптического пинцета	26
2.1. Калибровка силы оптического захвата микрообъекта по силе вязкого трения	27
2.2. Калибровка силы оптического захвата микрообъекта по броуновскому движению	27
2.3. Калибровка силы оптического захвата по определению его динамики	31
3. Практические реализации экспериментальных установок оптического пинцета	33
3.1. Многолучевой оптический пинцет	33

---

3.2. Особенности калибровки многолучевого оптического пинцета . . . . .	35
3.3. Оптический пинцет на суперконтинууме. . . . .	37
3.4. Волоконно-оптический пинцет . . . . .	38
4. Применения и задачи, решаемые методом оптического пинцета . .	39
5. Реологические свойства крови. Методы исследования агрегации эритроцитов и их эластичных свойств . . . . .	42
5.1. Эритроциты: функции и строение. . . . .	44
5.2. Агрегация эритроцитов: описание и механизмы . . . . .	47
5.3. Методы изучения агрегации эритроцитов. . . . .	52
5.3.1. Методика измерения скорости оседания эритроцитов	52
5.3.2. Метод втягивания клеток в микропипетку . . . . .	52
5.3.3. Фотометрические методы оценки агрегационных свойств клеток. . . . .	53
5.3.4. Электронная микроскопия для исследования агрегации эритроцитов. . . . .	54
5.3.5. Атомно-силовая микроскопия для исследования агрегации эритроцитов. . . . .	55
5.3.6. Оптическая микроскопия для исследования агрегации эритроцитов. . . . .	56
5.3.7. Метод оптического пинцета для исследования агрегации эритроцитов. . . . .	57
5.4. Деформируемость и эластичные свойства эритроцитов . . .	60
5.4.1. Локальные методы исследования механических свойств эритроцитов. . . . .	63
5.4.2. Методы исследования механических свойств одиночных эритроцитов как цельной клетки . . . . .	63
5.5. Фликкер эритроцитов: описание и методы исследования . .	67

## Глава II

<b>Изучение вязкоупругих свойств одиночных эритроцитов методами активной и пассивной микрореологии в оптическом пинцете</b>	<b>69</b>
1. Материалы и методы для диагностики микромеханических свойств эритроцитов . . . . .	70
1.1. Схема экспериментальной установки двухлучевого оптического пинцета . . . . .	70
1.2. Система регистрации малых смещений микрообъектов, локализованных в оптических ловушках . . . . .	73
2. Калибровка оптического захвата микрочастиц и более сложных микрообъектов — краев эритроцитов . . . . .	75
2.1. Управление полистироловыми частицами, калибровка акустооптического дефлектора. . . . .	75
2.2. Калибровка оптического захвата микросфер: метод пассивной микрореологии для измерения авто- и кросс-корреляций смещений микрочастиц . . . . .	76
2.3. Калибровка оптического захвата краев эритроцитов. . . . .	79
2.3.1. Сравнение сил оптического захвата края эритроцита и микросферы. . . . .	80
2.3.2. Сравнение силы оптического захвата микросферы и силы вязкости. . . . .	81
2.3.3. Определение жесткости ловушки при оптическом захвате края эритроцита и эффективной жесткости клетки для малых деформаций . . . . .	83
3. Диагностика упруго-вязких свойств одиночных эритроцитов. . . . .	84
3.1. Метод пассивной микрореологии для определения упруго-вязких свойств одиночных эритроцитов . . . . .	85

3.2. Метод активной микрореологии для определения упруго-вязких свойств одиночных эритроцитов . . . . .	91
3.2.1. Определение упруго-вязких свойств эритроцитов на частотах 100 Гц – 1 кГц. . . . .	92
3.2.2. Особенности микромеханических свойств эритроцитов на частотах 1 – 250 кГц . . . . .	97

## Глава III

### **Изучение агрегационных свойств эритроцитов в аутологичной плазме** . . . . . **102**

1. Материалы и методы для измерения сил и скоростей агрегации эритроцитов. . . . .	102
1.1. Схема экспериментальной установки двухлучевого оптического пинцета . . . . .	102
1.2. Изготовление образцов для исследования агрегации эритроцитов в оптическом пинцете . . . . .	107
2. Исследование агрегации эритроцитов на уровне одиночных клеток методом двухлучевого оптического пинцета . . . . .	108
2.1. Оптический захват эритроцитов, и наблюдение процесса их агрегации и дезагрегации. . . . .	108
2.2. Калибровка сил оптического захвата эритроцитов в аутологичной плазме. . . . .	109
2.3. Прямое измерение сил агрегации пары эритроцитов методом двухлучевого оптического пинцета . . . . .	110
2.4. Модель взаимодействия эритроцитов в парном агрегате . .	112
2.5. Исследование временной динамики сил агрегации эритроцитов методом оптического пинцета. . . . .	115
2.6. Прямое измерение скорости агрегации одиночных эритроцитов. . . . .	116

- 2.7. Сравнение агрегационных свойств эритроцитов для нормы  
и патологии . . . . . 118

## **Глава IV**

### **Исследование механизмов агрегации эритроцитов в растворах различных белков, а также рецепторного механизма агрегации . . . . . 120**

1. Исследование механизмов агрегации эритроцитов в растворах различных белков плазмы крови . . . . . 121
- 1.1. Материалы и методы для определения сил взаимодействия одиночных эритроцитов в растворах различных белков плазмы крови . . . . . 121
- 1.2. Калибровка силы оптического захвата эритроцита . . . . . 122
- 1.3. Особенности взаимодействия одиночных эритроцитов в растворах различных белков плазмы крови . . . . . 123
2. Исследование рецепторного вклада в механизмы агрегации эритроцитов . . . . . 128
- 2.1. Материалы и методы для измерения сил агрегации эритроцитов, индуцированной специфическим связыванием фибриногена . . . . . 128
- 2.2. Экспериментальные результаты . . . . . 130

### **Выводы . . . . . 133**

### **Список литературы . . . . . 136**

## Введение

Диссертационная работа посвящена развитию методики двухлучевого оптического пинцета для экспериментального изучения микромеханических свойств одиночных эритроцитов в широком диапазоне частот, а также сил и особенностей взаимодействия эритроцитов на уровне одиночных клеток.

Впервые принципы работы оптического пинцета были продемонстрированы в работах Артура Ашкина [1, 2]. При фокусировке лазерного пучка в области перетяжки возникает неоднородное электромагнитное поле, которое является эффективной потенциальной ямой для микрообъектов, находящихся вблизи этой перетяжки. Методом оптического пинцета называют захват исследуемых микрообъектов в перетяжку лазерного пучка, а также управление положением этих микрообъектов в пространстве. Возможность управления захваченными микрообъектами, а также разработка методик по калибровке сил оптического захвата для различных микрообъектов позволяет применять оптический пинцет для задач, связанных с сортировкой, упорядочением или локализацией одиночных микрообъектов, взвешенных в жидкости, и количественным измерением сил взаимодействия фемтоньютонного масштаба между ними. Уникальной особенностью оптического пинцета является возможность изучения свойств одиночных микрообъектов. Достигается это тем, что, как правило, используется суспензия микрочастиц, что позволяет изучать сами микрочастицы без учета их взаимодействия с подложкой, зондом и т.п. Для избежания перегрева и разрушения образцов длину волны лазера выбирают таким образом, чтобы вещество захватываемых объектов и окружающей их среды не поглощало на этой длине волны. Именно поэтому для формирования оптических ловушек обычно используются лазеры с длиной волны, лежащей в инфракрасном диапазоне.

Оптический пинцет в настоящее время используют для исследования широкого круга биохимических и биофизических процессов, начиная от основных механических свойств биологических полимеров и тканей и заканчивая

внутренней динамикой одиночных клеток. В настоящее время активно развиваются методы для локального исследования микромеханических характеристик [3] и сил взаимодействия объектов на микромасштабах [4], что обусловлено как фундаментальным, так и практическим интересом в ряде областей: в медицине [5], клеточной биологии [6, 7], коллоидной химии. Метод оптического пинцета является уникальным для решения круга задач, связанных с количественным описанием свойств объектов на микромасштабах. Он позволяет с большой точностью измерять силы от нескольких фемтоньютон [8] до десятков пиконьютонов [9, 10]. Эти силы сопоставимы с силами межклеточных или молекулярных взаимодействий, тем самым оптический пинцет позволяет изучать биофизику отдельных клеток или молекул, открывая при этом новые горизонты во многих областях биофотоники и биомедицины. Так, например, метод оптического пинцета широко применяется для исследования молекулярных моторов [11, 12], отдельных молекул [12, 13], определения упругих свойств клеточных мембран [9, 10, 14], жгутиков бактерий [15], спиралей отдельных молекул ДНК [16]. Метод оптического пинцета нашел широкое распространение в приложениях клеточной биологии, так как позволяет фиксировать, перемещать и прикладывать требуемые силы к живым клеткам в среде, близкой к естественной для них. В частности, метод используется для изучения свойств эритроцитов.

На сегодняшний день актуальной задачей является изучение микромеханических свойств и сил взаимодействия одиночных эритроцитов, взвешенных в естественной для них среде. Деформационные и агрегационные свойства эритроцитов в основном определяют реологию крови на уровне микрососудов, то есть в значительной степени влияют на микроциркуляцию крови. В связи с этим особый интерес представляет развитие методик, позволяющих определять микромеханические свойства и силы взаимодействия одиночных клеток, локализованных в жидкости вдали от подложки. Эритроцит представляет собой клетку, которую можно рассматривать как систему с различными характерными временами процессов, происходящих в ней. Именно

поэтому большой интерес представляет исследование механического отклика эритроцитов на внешнее воздействие и их вязкоупругих свойств в широком диапазоне частот. Способность эритроцитов к агрегации является одним из важнейших компонентов в микроциркуляции крови, а значит и функционирования организма в целом. На сегодняшний день исследование этого явления актуально из-за неоднозначности в трактовке ее механизмов, а также из-за значимости этого процесса в развитии различных патологий. Известно, что повышенная агрегация является следствием некоторых тяжелых патологий, например, системной красной волчанки (СКВ). СКВ — системное аутоиммунное заболевание, при котором из-за генетической предрасположенности происходит нарушение работы иммунной системы. При этом возможно повреждение или изменение свойств собственных клеток организма, в том числе, и эритроцитов. Агрегация эритроцитов больных СКВ изучены слабо, но имеются свидетельства ее усиления, например, увеличение размера агрегатов эритроцитов у больных СКВ. При заболеваниях, связанных с гемореологическими нарушениями, возрастание степени агрегации и затруднение процесса дезагрегации клеток приводит к тому, что кровоток в венулах затрудняется (“заиливание крови”) [5]. Так, повышенная степень агрегации ведет к ухудшению процесса снабжения тканей кислородом и является одной из причин развития ишемии и тромбоза. Поэтому изучение механизмов и сил агрегации имеет не только фундаментальный интерес, но и медицинское приложение. Агрегация эритроцитов изучалась различными интегральными способами, основанными на усредненном отклике большого числа эритроцитов, такими как, например, метод регистрации обратного светорассеяния [17, 18]. Попытка исследования этого явления на одиночных клетках методом оптического пинцета представлена на сегодняшний момент лишь в единичных работах [19].

*Целями работы является развитие методики оптического пинцета для исследования вязкоупругих и агрегационных свойств клеток на примере эритроцитов в естественной среде, а также применение этих методов для диа-*

гностики вязкоупругих свойств мембран эритроцитов в широком диапазоне частот методами пассивной и активной микрореологии, а также для прямого измерения сил и определения механизмов агрегации эритроцитов на одиночных клетках с помощью двухлучевого оптического пинцета.

*Актуальность* работы обусловлена как фундаментальным интересом к проблемам, связанным с выявлением неизвестных механизмов агрегации эритроцитов, диагностикой их вязкоупругих свойств в широком диапазоне частот, так и практическим интересом к развитию оптических методов диагностики реологических характеристик крови — агрегационных и микромеханических свойств одиночных эритроцитов в потоке.

*Достоверность* полученных в работе результатов подтверждается их согласием с данными экспериментов, проведенных в Научно-исследовательском институте механики МГУ, соответствием результатов теоретическим оценкам, многократным повторением экспериментов, согласием экспериментальных результатов с данными, полученными в работах других авторов. Результаты исследований неоднократно обсуждались на семинарах и докладывались на специализированных научных конференциях по проблемам, связанным с тематикой диссертационной работы. Результаты опубликованы в 4 международных и российских журналах. Представленные результаты являются новыми и получены впервые.

*Научная новизна* результатов диссертационной работы заключается в следующих положениях:

Предложен новый метод диагностики микромеханических свойств одиночных эритроцитов с использованием оптического пинцета. Метод предполагает прямое определение эффективных вязкоупругих характеристик клетки, взвешенной в жидкости вдали от подложки, без использования вспомогательных микрочастиц, в диапазоне частот 1 Гц — 250 кГц. Метод основан на корреляционном анализе случайных смещений краев эритроцита, захваченных одновременно в две оптические ловушки, для низких частот и на анализе фазового сдвига в осцилляциях противоположных краев клетки, захвачен-

ных одновременно в две оптические ловушки, положение одной из которых совершает высокочастотные колебания.

Впервые методом двухлучевого оптического пинцета напрямую измерены силы взаимодействия одиночных эритроцитов в парном агрегате, взвешенном в аутологичной плазме крови. Впервые показано различие в силе сдвиговой дезагрегации нормальных и патологически измененных эритроцитов, измеренной методом двухлучевого оптического пинцета на уровне одиночных клеток.

Впервые экспериментально продемонстрирован вклад различных белков плазмы в агрегацию одиночных эритроцитов и определены концентрационные зависимости сил сдвиговой дезагрегации клеток в растворах фибриногена, иммуноглобулина и альбумина методом двухлучевого оптического пинцета. Впервые показана значимость рецепторного механизма агрегации эритроцитов на уровне одиночных клеток.

*Практическая значимость* работы состоит в возможном использовании полученных результатов для задач, связанных с управлением и характеристикой микрообъектов методом оптического пинцета, развитием методов диагностики заболеваний, связанных с изменением реологических свойств крови.

*Положения, выносимые на защиту:*

- Метод активной и пассивной микрореологии в оптическом пинцете применим для определения эффективных микромеханических характеристик одиночных эритроцитов. Для частот до 100 Гц корреляционный анализ броуновских смещений локализованных в оптические ловушки краев эритроцита позволяет характеризовать вязкоупругие свойства клетки. Механические свойства эритроцитов для частот от 100 Гц до 250 кГц могут быть определены методом оптического пинцета посредством регистрации амплитуд и фаз вынужденных колебаний краев эритроцита.
- На частотах в окрестности 130 кГц эритроцит имеет резонансную особенность, проявляющуюся в диссипации механической энергии, добав-

ляемой в клетку осциллирующей оптической ловушкой, в которой локализован один из краев эритроцита.

- Силы агрегации одиночных эритроцитов могут быть измерены методом двухлучевого оптического пинцета. Силы взаимодействия между эритроцитами увеличиваются при увеличении расстояния между центрами клеток.
- Сила неспецифической агрегации одиночных эритроцитов в растворе фибриногена или иммуноглобулина, измеренная методом оптического пинцета, увеличивается при увеличении концентрации белков. Усиленная агрегация эритроцитов в норме может быть обусловлена специфическим связыванием фибриногена с рецептором на поверхности мембран клеток.
- При агрегации эритроцитов в растворе фибриногена наблюдается равномерно распределенная по всей поверхности клеток связь между мембранами. При агрегации в растворе иммуноглобулина образуются сильные точечные связи между мембранами эритроцитов.

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 разработке метода для определения вязкоупругих свойств одиночных эритроцитов, взвешенных в жидкости, в широком диапазоне частот — от единиц герц до 250 кГц, при этом используются подходы пассивной и активной реологии в двухлучевом оптическом пинцете.
- Глава 3 посвящена развитию метода, позволяющего напрямую измерять силы взаимодействия между одиночными эритроцитами в аутологичной

среде при их дезагрегации с помощью двух оптических ловушек с калиброванными силами оптического захвата, а также определять отличия в силах и скоростях агрегации нормальных и патологически измененных эритроцитов на уровне одиночных клеток.

- Глава 4 посвящена экспериментальному определению механизмов агрегации эритроцитов путем измерения сил взаимодействия между одиночными клетками и исследованию типа их взаимодействия в растворах основных белков плазмы крови, участвующих в агрегации эритроцитов: иммуноглобулина, фибриногена и альбумина, а также определению вклада специфического рецепторного механизма агрегации эритроцитов.

*Апробация работы* проводилась на следующих конференциях:

- Международная конференция “Saratov Fall Meeting 2013” (Саратов, Россия, 2013)
- Международная конференция “21th International Conference on Advanced Laser Technologies 2013” (Будва, Черногория, 2013)
- Международная конференция “ICONO/LAT 2013” (Москва, Россия, 2013)
- Международная конференция “SPIE Photonics Europe 2012” (Броссель, Бельгия, 2012)
- Международная конференция “SPIE Optics + Photonics 2012” (Сан-Диего, США, 2012)
- Всероссийская конференция “Пятая Всероссийская с Международным участием школа-конференция по физиологии кровообращения” (Москва, Россия, 2012)
- Международная конференция “19th International Conference on Advanced Laser Technologies” (Золотые Пески, Болгария, 2011)

- Международная конференция “CLEO, Optical Society of America” (Сан-Хосе, США, 2010)
- Международная конференция “International Conference on Lasers, Applications, and Technologies” (Казань, Россия, 2010)

# Глава I

## Обзор литературы: метод оптического пинцета для исследования упругих и агрегационных свойств эритроцитов

### 1. Принцип работы оптического пинцета

#### 1.1. История создания и принцип работы оптического пинцета

Пионерские работы 1970-х годов в области оптического управления и захвата микрообъектов принадлежат Роберту Ашкину [1, 2]. В этих работах были представлены результаты наблюдения действия сил давления света на различные прозрачные микрочастицы, было продемонстрировано, что положение прозрачных диэлектрических микрочастиц можно изменять и контролировать, прикладывая оптические силы как в воде, так и в воздухе. Была впервые показана экспериментальная возможность оптического захвата микрочастиц в трехмерные оптические ловушки, созданные как на основе двух лазерных пучков, распространяющихся в противоположных направлениях, так и на основе одного жестко сфокусированного лазерного пучка. Именно такой однолучевой подход, позволяющий управлять положением микрообъектов, получил широкое распространение и называется *методом оптического пинцета*.

Соотношение между размерами захватываемых микрочастиц и длиной волны излучения определяет подход, в рамках которого рассматриваются принципы работы оптического пинцета. Существуют два важных предельных случая - приближение рассеяния Рэлея и приближение геометрической оптики.

### 1.1.1 Рассмотрение принципов работы оптического пинцета в приближении геометрической оптики

Для случаев, когда размеры захватываемых частиц велики по сравнению с длиной волны оптического излучения, появление оптических сил описывается явлениями преломления и отражения света. Лазерное излучение имеет высокую степень пространственной когерентности, поэтому лазерный пучок можно сфокусировать в пятно, размеры которого сравнимы с длиной волны используемого лазерного излучения. Неоднородное распределение электромагнитного поля в перетяжке жестко сфокусированного лазерного пучка формирует эффективную потенциальную яму для частиц, находящихся вблизи перетяжки. Микрочастица, показатель преломления которой превышает показатель преломления окружающей среды, при попадании в область перетяжки лазерного пучка преломляет и рассеивает падающее на нее излучение (рисунок 1).

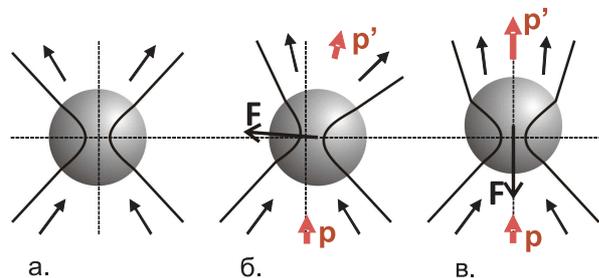


Рис. 1: Иллюстрация принципа работы оптического пинцета (приближение геометрической оптики).  $\mathbf{F}$  — возвращающая сила при смещении частицы перпендикулярно оси падающего оптического пучка (а), параллельно этой оси (б, в),  $\mathbf{p}$ ,  $\mathbf{p}'$  — суммарные импульсы света до и после рассеяния и преломления на микрочастице, соответственно.

Если прозрачная микрочастица находится в центре перетяжки пучка, то направление и величина суммарного импульса света после прохождения светового пучка через частицу не меняется, она находится в положении равновесия (рисунок 1а). Если же в результате броуновского движения микрочастица смещается в любом направлении относительно центра перетяжки (рисунок

1б, в), происходит изменение направления суммарного импульса света после преломления и рассеяния на частице. Вследствие закона сохранения импульса возникают действующие на микрочастицу силы, возвращающие ее в положение равновесия. В равновесном положении, то есть когда микрочастица находится в центре перетяжки лазерного пучка, равнодействующая этих сил равна нулю. Если же микрообъект имеет меньший по сравнению с окружающей средой показатель преломления (например, воздушный пузырь в воде), то под действием лазерного пучка он будет выталкиваться из перетяжки [1]. В данном рассмотрении важно также учитывать, что возможны эффекты отражения и поглощения света в частице. Это приводит к возникновению силы, пропорциональной интенсивности падающего на частицу светового потока и направленной вдоль его распространения. Если исследуемая частица недостаточно прозрачна на длине волны используемого лазерного излучения, она будет выталкиваться из оптической ловушки, эффекта оптического захвата не будет происходить.

### *1.1.2 Рассмотрение работы оптического пинцета в приближении Рэлея*

Под действием внешнего электрического поля в диэлектрических микрообъектах индуцируется дипольный момент. В случаях, когда диаметр захваченной в ловушку частицы значительно меньше, чем длина волны света, удовлетворяются условия рассеяния Рэлея, и частицу можно рассматривать как точечный диполь в неоднородном электромагнитном поле. Сила, действующая на диэлектрическую частицу в приближении точечного диполя, определяется силой Лоренца [2, 20]:

$$\mathbf{F} = (\mathbf{p} \cdot \nabla)\mathbf{E} + \dot{\mathbf{p}} \times \mathbf{B}, \quad (1)$$

где  $\mathbf{E}$  и  $\mathbf{B}$  — вектор электрической и магнитной напряженности поля, соответственно,  $\mathbf{p}$  — индуцированный в частице диполь. Первое слагаемое определяется взаимодействием диполя с неоднородным электромагнитным полем сфокусированного лазерного пучка. Вторым членом можно пренебречь, так

как он представляет собой производную по времени величины, которая линейно связана с вектором Пойнтинга. При этом считается, что мощность лазера не меняется со временем, поэтому среднее значение производной этой величины — ноль.

Важно отметить, что в этом случае полная сила Лоренца, действующая на частицу в среде с показателем преломления  $n_m$ , может быть разделена на две компоненты. Первую традиционно называют градиентной силой. Она пропорциональна градиенту интенсивности лазерного излучения. Градиентная сила определяется взаимодействием диполя с неоднородным электромагнитным полем [2, 20]:

$$F_{grad} = \frac{2\pi\alpha}{cn_m^2} \nabla I_0, \quad (2)$$

$$\alpha = n_m^2 a^3 \left( \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right),$$

где  $\alpha$  — поляризуемость сферы. Видно, что градиентная сила направлена по градиенту электромагнитного поля, то есть в область наибольшей интенсивности света в центре перетяжки пучка, в случае, когда  $m > 1$ . Вторая составляющая силы — сила, связанная с эффектом рассеяния лазерного излучения — пропорциональна интенсивности света и направлена вдоль распространения лазерного пучка. Она определяется поглощением и переизлучением света точечным диполем. Для частицы с радиусом  $a \ll \lambda$  эта сила может быть записана следующим образом [2, 20]:

$$\mathbf{F}_{scatt} = \frac{I_0 \sigma n_m}{c}, \quad (3)$$

$$\sigma = \frac{128\pi^5 a^6}{3\lambda^4} \left( \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2,$$

где  $I_0$  — интенсивность падающего на рассеиватель излучения,  $\sigma$  — поперечное сечение рассеяния сферы,  $n_m$  — показатель преломления среды, — скорость света в вакууме,  $m$  — отношение показателя преломления частицы к показателю преломления среды ( $n_p/n_m$ ),  $\lambda$  — длина волны излучения

лазера, формирующего ловушку.

В результате сложения этих двух сил место равновесного положения захваченного в оптическую ловушку объекта смещается вдоль распространения пучка относительно положения максимума интенсивности (рисунок 2).

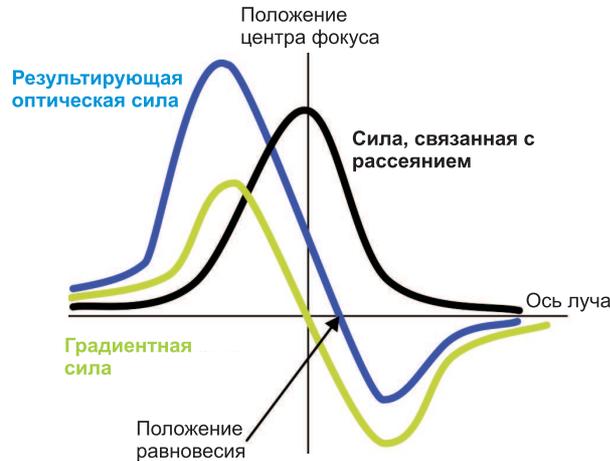


Рис. 2: Сложение силы, связанной с рассеянием излучения, и градиентной силы при оптическом захвате микрообъекта [21]. Черная линия — сила, связанная с рассеянием излучения, в зависимости от смещения захваченного микрообъекта относительно оси лазерного пучка. Зеленая линия — градиентная сила. Синяя линия — результирующая градиентной силы и силы, связанной с рассеянием лазерного излучения.

Стабильный захват микрочастицы в однолучевом оптическом пинцете возможен, когда отношение градиентной силы к силе, связанной с рассеянием, больше единицы для положения с максимальным значением градиента интенсивности. Для гауссовского пучка с размером фокального пятна  $\omega_0$  эти условия достигаются при аксиальном положении объекта  $z = \pi\omega_0^2/\sqrt{3}\lambda$  [2]. То есть условие стабильного оптического захвата можно записать следующим образом:

$$\frac{F_{grad}}{F_{scatt}} = \frac{3\sqrt{3}}{64\pi^5} \frac{n_m^2}{(m^2-1)} \frac{\lambda^5}{a^3\omega_0^2} \geq 1. \quad (4)$$

Оптический захват при указанных условиях был неоднократно продемонстрирован для микрообъектов из различного материала и с размерами от

десятков нанометров до микрометров [2, 22–24].

Важно подчеркнуть, что при смещении захваченного микрообъекта из центра ловушки на него начинает действовать возвращающая сила оптического пинцета. При этом сила оптического захвата линейно изменяется при небольших смещениях объекта относительно центра ловушки и принимает максимальные значения на определенном расстоянии от нее, величина которого определяется параметрами оптической ловушки. В английской литературе значения максимальной силы захвата для фиксированных параметров ловушки получили устоявшееся название — *escape trapping force*. Будем в дальнейшем обозначать эту силу  $F_{esc}$ . Наблюдая за смещениями микрообъекта из оптической ловушки, для которой известна зависимость ее возвращающей силы от смещения объекта, можно определять внешнюю силу, под воздействием которой произошло это смещение. Такой подход получил название фотонно-силовой микроскопии [25–27]. Таким образом, метод оптического пинцета можно применять для прямого измерения сил, действующих на объект исследования.

### *1.1.3 Расчет сил оптического захвата для частиц, сравнимого с длиной волны размера*

На практике часто встречаются объекты исследования, размеры которых строго не подходят под условия рассеяния Рэлея или приближение геометрической оптики — размеры этих объектов сравнимы с длиной волны лазерного излучения. Более того, далеко не всегда исследуемые объекты имеют сферическую форму. Для расчета сил, действующих на такие объекты в оптической ловушке, используют метод, предложенный в работах [28, 29]. В этих работах рассматривается случай, когда размер изучаемых частиц и длина волны лазерного излучения имеют один порядок величины, а сама частица может иметь несферическую форму. Приближение плоских волн при решении задачи рассеяния света на частице в случае, когда она находится в перетяжке лазерного пучка, не верно. Картина рассеяния на захваченной частице зависит

от ее положения внутри пучка. Для точного решения уравнений Максвелла и расчета картины рассеяния используется метод Т-матриц, который заключается в установлении связи между волной, падающей на частицу, и рассеянной волной. Падающую и рассеянную волны можно представить в виде разложения по базису волновых функций  $\psi_n^{(inc)}$  и  $\psi_k^{(scat)}$ , которые являются решениями уравнения Гельмгольца:

$$U_{inc} = \sum_n^{\infty} a_n \psi_n^{(inc)}, U_{scat} = \sum_k^{\infty} p_k \psi_k^{(scat)}, \quad (5)$$

где  $a_n, p_k$  — коэффициенты разложения для падающей и рассеянной волн, соответственно, связь между которыми можно записать следующим образом:

$$p_k = \sum_n^{\infty} T_{kn} a_n, \quad (6)$$

или:

$$\mathbf{P} = \mathbf{T}\mathbf{A}, \quad (7)$$

где  $T_{kn}$  — элементы Т-матрицы. Вид Т-матрицы определяет размер, ориентация в пространстве, форма, состав рассматриваемой частицы и длина волны излучения.

Электрические поля до и после рассеяния на частице ( $\mathbf{E}_{in}$  и  $\mathbf{E}_{out}$ , соответственно) могут быть разложены в ряд по векторным сферическим волновым функциям:

$$\mathbf{E}_{in} = \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=-n}^n a_{nm} \mathbf{M}_{nm}^{(2)}(k\mathbf{r}) + b_{nm} \mathbf{N}_{nm}^{(2)}(k\mathbf{r}), \quad (8)$$

$$\mathbf{E}_{out} = \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=-n}^n p_{nm} \mathbf{M}_{nm}^{(1)}(k\mathbf{r}) + q_{nm} \mathbf{N}_{nm}^{(1)}(k\mathbf{r}),$$

где

$$\mathbf{M}_{nm}^{(1,2)}(k\mathbf{r}) = N_n h_n^{(1,2)}(kr) \mathbf{C}_{nm}(\theta, \phi),$$

$$\mathbf{N}_{nm}^{(1,2)}(k\mathbf{r}) = \frac{h_n^{(1,2)}(kr)}{kr N_n} \mathbf{P}_{nm}(\theta, \phi) + N_n \left( h_{n-1}^{(1,2)}(kr) - \frac{nh_{n-1}^{(1,2)}(kr)}{kr} \right) \mathbf{B}_{nm}(\theta, \phi) \quad (9)$$

— векторные сферические волновые функции,  $h_n^{(1,2)}(kr)$  — сферические функции Ханкеля первого и второго рода,  $N_n = [n(n+1)]^{-\frac{1}{2}}$  — нормировочные константы,  $\mathbf{B}_{nm}(\theta, \phi) = \mathbf{r}\nabla Y_n^m(\theta, \phi)$ ,  $\mathbf{C}_{nm}(\theta, \phi) = \nabla \times (\mathbf{r}Y_n^m(\theta, \phi))$ ,  $\mathbf{P}_{nm}(\theta, \phi) = \hat{\mathbf{r}}Y_n^m(\theta, \phi)$  — векторные сферические гармоники, а  $Y_n^m(\theta, \phi)$  — нормированные скалярные сферические гармоники. После вычисления векторных сферических волновых функций для одного положения начала координат, возможно вычисление изменений векторных сферических волновых функций при вращении системы координат или перемещении начала отсчета по схемам последовательных приближений. Таким образом можно определить поля  $\mathbf{E}_{in}$  и  $\mathbf{E}_{out}$ . Далее можно вычислить оптическую силу, действующую на исследуемую частицу, интегрируя максвелловский тензор напряжений по поверхности, окружающей частицу.

### 1.2. Принципиальная экспериментальная схема оптического пинцета

Типичные экспериментальные установки однолучевого оптического пинцета обычно включают в себя следующие элементы. Для формирования оптической ловушки используются одномодовые лазеры, чаще всего с  $TEM_{00}$  модой, обладающие высокой стабильностью мощности излучения. Диапазон длин волн излучения таких лазеров чаще всего выбирается из ближнего ИК-диапазона, поскольку именно в этом диапазоне большая часть материалов имеет очень невысокое поглощение. Для достижения наибольшей фокусировки лазерного луча используются высокоапертурные объективы. Принципиальная схема такой экспериментальной установки оптического пинцета приведена на рисунке 3.

Свет от лазера (1) проходит через формирователь пучка (2), например, конфокальную систему линз. Таким образом пучок расширяется и поступает на вход объектива с большой числовой апертурой (3). Это необходимо для создания максимально возможного градиента электромагнитного поля в перетяжке лазерного пучка. Предметный столик, на который помещается кювета с образцом (4), должен позволять перемещать образец относительно

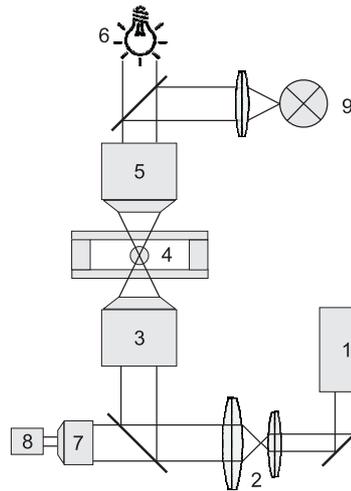


Рис. 3: Принципиальная схема установки оптического пинцета. 1 — лазер, 2 — формирователь пучка, 3 — объектив с высокой числовой апертурой, формирующий оптическую ловушку, 4 — исследуемый образец, 5 — конденсор, 6 — осветитель, 7 — фотоокуляр, 8 — видеокамера, 9 — квадрантный фотодиод

оптической ловушки в трех измерениях. Наблюдение захваченных объектов осуществляется обычно с помощью микроскопа, например, в геометрии “на просвет”: на образец свет поступает через конденсор (5) от осветителя, проходит через исследуемый образец (4) и собирается объективом (3). Затем рассеянный образцом свет отражается от диэлектрического зеркала и с помощью фотоокуляра (7) направляется на цифровую камеру (8).

Для большинства задач, связанных с использованием метода оптического пинцета, требуется возможность измерения малых смещений захваченных в ловушку микрообъектов. Это может быть реализовано различными способами. Распространенным подходом является видеорегистрация смещений микрообъектов [30, 31], при котором можно добиться субпиксельной точности определения положения объекта, вплоть до 10 нм, при использовании специальных алгоритмов обработки изображения [32]. Альтернативным подходом является прямое детектирование положения захваченного объекта с помощью квадрантных фотодиодов (КФД) [33, 34]. Квадрантный фотодиод представляет собой четыре независимых фотодиода, рабочая поверхность которых – есть квадранты одного круга. Обычно для измерения малых смеще-

ний захваченного объекта используется либо дополнительный лазер, который также направляется и фокусируется в область захвата, либо используется лазер, формирующий оптическую ловушку (рисунок 39). Рассеянное излучение от захваченного микрообъекта направляется на квадрантный фотодиод. При смещении объекта в оптической ловушке смещается по поверхности фотодиода и рассеянный объектом лазерный пучок. Независимые измерения сигнала с каждого сектора, а также измерение суммарного сигнала со всех четырех секторов позволяют определить смещения рассеянных захваченными объектами лучей, а значит и смещения самих объектов по трем координатам.

Естественным развитием однолучевой модификации оптического пинцета являются многолучевые установки, которые позволяют создавать одновременно несколько независимых оптических ловушек в плоскости образца. Для этого либо используются схемы с несколькими лазерами для формирования оптических ловушек, либо единственный лазерный пучок пропускают через акусто-оптический дефлектор или пространственный модулятор света (ПМС). С помощью акусто-оптического дефлектора лазерное излучение можно разделить во времени на несколько лучей, а с помощью дифракционных оптических элементов (ПМС) — разбить на несколько лучей в пространстве.

### *1.3. Пределы возможности захвата частиц в оптическую ловушку*

Принципиальная возможность оптического захвата объектов определяется балансом между контрастом показателей преломления объекта и среды, в которую он помещен, размером и массой частицы, длиной волны оптического излучения и поглощения объекта на этой длине волны (4). Обычно метод оптического пинцета применяется для захвата частиц с размерами  $0,5 \div 10$  мкм. При этом оптический захват возможен как для более крупных, так и для частиц меньшего размера.

Можно показать, что на микрочастицу из диоксида кремния  $SiO_2$  с диаметром  $d = 3$  мкм, взвешенную в воде, действуют сила тяжести ( $F_{grav}$ ) и сила Архимеда ( $F_{Arch}$ ). Величина разности этих двух сил равна  $\sim 0,1$  пН. Если та-

кую частицу, взвешенную в воде, поместить в оптическую ловушку, на нее будет действовать сила оптического захвата. Максимальная захватывающая сила  $F_{esc}$  оптической ловушки обычно составляет величину порядка 1 пН на каждые 10 мВт лазерного излучения в области перетяжки для частиц микронного размера [20]. Таким образом, при мощности лазерного излучения в ловушке около 10 мВт сила оптического захвата для рассматриваемой частицы будет на порядок выше разности сил тяжести и силы Архимеда, то есть будет наблюдаться стабильный оптический захват.

Максимальный размер частиц, с которыми можно работать с помощью метода оптического пинцета, определяется конечностью потока импульса в лазерном пучке. При увеличении размера частицы происходит непрерывный рост силы тяжести, действующий на нее. При значительном увеличении интенсивности лазерного излучения захваченные объекты начинают поглощать, их тепловая энергия растет, амплитуда броуновского движения увеличивается. В определенный момент кинетическая энергия объекта становится больше потенциала оптической ловушки. Поэтому метод оптического пинцета становится неприменим для частиц сравнительно большого размера. Для манипулирования крупными частицами можно использовать более грубые методы, например, микропипетки.

Для частиц малого размера градиентные силы захвата пропорциональны объему частицы (см. выражение 2), в то время как силы, связанные с рассеянием лазерного излучения, действующие на частицу вдоль направления лазерного пучка, пропорциональны квадрату объема частицы (см. выражение 3). Поэтому становится возможным захват широкого круга частиц малого размера (10–1000 нм), например отражающих частиц, которые при больших размерах выталкивались бы из ловушки. В одной из первых работ Ашкина [2] экспериментально был продемонстрирован захват частиц с размерами от 25 нм до 10 мкм в воде.

Однако вопрос о возможности оптического захвата частиц зачастую рассматривается с точки зрения удобства эксперимента. Для реальных исследо-

ваний свойств частиц и силовых взаимодействий между ними методом оптического пинцета часто необходима их визуализация, поэтому размер частиц не должен быть существенно меньше длины волны излучения, используемого для освещения образца. По критерию Рэля разрешающая способность объектива:

$$R = \frac{\lambda}{2n \sin \theta}, \quad (10)$$

где  $n \sin \theta$  — его числовая апертура. Поэтому ограничение на минимальный размер частиц, которые может разрешить объектив с числовой апертурой 1,4 при освещении с длиной волны 500 нм без дополнительных методов контрастирования (темное поле, дифференциально интерференционный контраст, поляризованный и фазовый контраст):

$$d \sim R \sim \frac{500}{2 \cdot 1,4} \sim 150 \text{ нм}. \quad (11)$$

## 2. Методы калибровки установки оптического пинцета

Метод оптического пинцета является не только инструментом для управления и манипулирования различными микро- и нанообъектами, но и прибором, который дает возможность проводить количественные измерения сил, действующих на захваченные объекты. Для этого необходима калибровка установки оптического пинцета, то есть определение силы захвата объекта оптическим пинцетом. Для этого обычно применяются методики, суть которых заключается в сравнении силы захвата с какой-либо другой известной силой, значение которой можно определить. Часто процедура калибровки позволяет определить 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.

### *2.1. Калибровка силы оптического захвата микрообъекта по силе вязкого трения*

Этот метод основан на сравнении силы захвата с силой вязкого трения, которая в случае сферической частицы определяется формулой Стокса  $F = -6\pi\eta rv$ , где  $r$  и  $v$  — радиус и скорость сферической частицы соответственно,  $\eta$  — динамическая вязкость жидкости. Процедура калибровки состоит в следующем. Микрочастицу с известным размером и помещенную в жидкость с известной динамической вязкостью захватывают в оптический пинцет. Далее оптическую ловушку начинают перемещать в плоскости захвата с контролируемой постоянной скоростью. При достижении скорости перемещения ловушки определенного значения, микрочастица вылетает из перетяжки лазерного пучка. Для этого значения скорости сила вязкости со стороны окружающей жидкости равна силе максимального оптического захвата объекта. Зная размер частицы, скорость ее перемещения и значение динамической вязкости жидкости, можно вычислить силу вязкости  $F$ , которая, в свою очередь, будет равна максимальной силе оптического захвата частицы для выбранной мощности излучения в перетяжке. Изменяя скорость ловушки, по видеоизображению измеряют значения смещения захваченной частицы из центра перетяжки. Таким образом можно определить жесткость ловушки как отношение известной силы вязкого трения, действующей на частицу, к смещению этой частицы.

### *2.2. Калибровка силы оптического захвата микрообъекта по броуновскому движению*

Калибровка данным способом является наиболее распространенной и подробно описана в обзорной работе [20].

На частицу в ловушке, кроме сил, рассмотренных в пункте 1.1.2, также действует случайная сила, соответствующая броуновскому движению частицы. Калибровку силы оптического захвата сферического микрообъекта можно провести, изучая статистику его движения в ловушке. Для этого необходи-

мо иметь возможность измерять случайные смещения частицы в оптической ловушке. Это может быть реализовано путем регистрации смещений лазерного луча с помощью КФД при рассеянии на захваченной частице. При малых смещениях частицы в ловушке (от единиц до сотен нанометров) по сравнению с размером перетяжки лазерного излучения (обычно около 1 мкм) зависимость между смещением лазерного луча и смещением частицы считают линейной [35]. Проводя статистическую обработку данных о смещении частицы в ловушке, находят коэффициент пропорциональности между смещением луча и смещением частицы в оптической ловушке, а также определяют жесткость ловушки.

Рассмотрим подробнее эту процедуру. Захваченная оптической ловушкой частица локализуется в пространстве благодаря действию эффективного потенциала притяжения, центр которого находится вблизи перетяжки лазерного пучка. Введем систему координат  $Oxyz$ , где точка начала координат совпадает с центром потенциала, а ось  $z$  направлена вдоль оси падающего лазерного луча. При малых отклонениях частицы (в сравнении с размером самой частицы) от центра этого потенциала можно разложить величину возвращающей силы в ряд по степеням этого отклонения. С учетом оговоренной малости смещения ограничимся линейным членом данного разложения:

$$F_{trap,x} = -k_x x, \quad (12)$$

где  $F_{trap,x}$  — сила, действующая в направлении оси  $x$ . Коэффициент  $k$  называется *жесткостью оптической ловушки*. Аналогичные выражения можно записать для  $y$  и  $z$  составляющих возвращающей силы.

При движении частицы в жидкости на нее действует сила вязкого трения, пропорциональная скорости ее движения:

$$F_{visc,x} = -\gamma \dot{x} \quad (13)$$

Коэффициент при скорости безвихревого движения сферической частицы выражается по формуле Стокса  $\gamma = 6\pi R\eta$ ,  $R$  - радиус частицы,  $\eta$  - динамическая вязкость жидкости.

На частицу, кроме сил (13) и (12), действует также случайная сила, соответствующая броуновскому движению частицы. Эту силу можно записать в виде [36]:

$$F(t) = \gamma\sqrt{2D}n(t), \quad (14)$$

где коэффициент диффузии, согласно формуле Эйнштейна, равен  $D = \frac{k_B T}{\gamma}$ , а  $n(t)$  определяет случайный процесс со следующими корреляционными свойствами [36]:

$$\langle n(t) \rangle = 0, \quad (15)$$

$$\langle n(t)n(t') \rangle = \delta(t - t'). \quad (16)$$

Записывая второй закон Ньютона для движения частицы массой  $m$ , получаем:

$$m\ddot{x} + \gamma\dot{x} + kx = F(t). \quad (17)$$

Оценим характерное время затухания колебаний для частицы диоксида кремния диаметром 2,5 мкм. Коэффициент вязкости воды при температуре 20°C равен  $\eta = 1$  мПа·с,  $m = 4/3\pi R^3 \rho = 8,18 \cdot 10^{-15}$  кг,  $\gamma = 2,36 \cdot 10^{-8}$  кг/с. Таким образом, характерное время затухания  $t = m/\gamma \approx 3,47 \cdot 10^{-7}$  с. Обычно это время много меньше временного разрешения измерительного оборудования. Поэтому вкладом первого слагаемого при анализе экспериментальных данных можно пренебречь. Тогда соотношение (17) можно переписать в виде:

$$\dot{x} + \omega_k x = \sqrt{2D}n(t), \quad (18)$$

где  $\omega_k = k/\gamma$ . Тогда  $f_k = k/(2\pi\gamma)$  - частота отсечки. Зависимость спектра мощности от частоты выражается следующим образом:

$$P_X(f) = \frac{D}{2\pi^2(f_k^2 + f^2)}. \quad (19)$$

В экспериментах смещение частицы  $X$  обычно определяется по отклонению луча  $V$ , определяемого с помощью детекторов, линейных по этому отклонению:  $X = S \cdot V$  [20], например с помощью квадрантных фотодиодов.

Поэтому измеряемый детектором спектр мощности сигнала с КФД  $P_V$  и реальный спектр мощности смещений при движении микрообъекта в ловушке  $P_X$  связаны следующим образом:

$$P_V(f) = S^2 P_X(f). \quad (20)$$

Спектр мощности отклонения луча может быть записан в виде:

$$P_V(\omega) = \frac{2DS^2}{\omega_k^2 + \omega^2}. \quad (21)$$

Таким образом, рассчитав спектр мощности отклонения луча и, аппроксимировав спектр соотношением типа (21), можно получить коэффициент пропорциональности  $S$ , а также определить эффективную жесткость ловушки  $k$ .

Для определения этих параметров не обязательно находить спектр мощности. Параметры оптического пинцета можно определить через автокорреляционные функции движения оптически захваченных частиц. Рассмотрим формальное решение уравнения (18), оно запишется в виде [36]:

$$x = x_0 e^{-\omega_k t} + \int_0^t e^{-\omega_k(t-t_1)} \sqrt{2D} n(t_1) dt_1. \quad (22)$$

Введем

$$\Delta x = \int_0^t e^{-\omega_k(t-t_1)} \sqrt{2D} n(t_1) dt_1. \quad (23)$$

Тогда

$$\langle \Delta x(t) \Delta x(t + \Delta t) \rangle = \int_0^t dt_1 \int_0^{t+\Delta t} dt_2 e^{-\omega_k(t-t_1)} e^{-\omega_k(t+\Delta t-t_2)} 2D \langle n(t_1) n(t_2) \rangle. \quad (24)$$

Откуда, учитывая свойство (16), в случае  $\Delta t > 0$  получаем:

$$\langle \Delta x(t) \Delta x(t + \Delta t) \rangle = \frac{D}{\omega_k} e^{-\omega_k \Delta t} (1 - e^{-2\omega_k t}) \quad (25)$$

Заметим, что при  $t \gg 1/(2\omega_k)$ , процесс становится полностью стационарным. Если выбрать начало координат так, чтобы  $\langle x(t) \rangle = 0$ , и при условии, что частица находилась в ловушке достаточно долго, то автокорреляционную функцию движения вдоль координаты  $x$  можно записать следующим образом:

$$\langle x(t) x(0) \rangle = A e^{-t/\tau}, \quad (26)$$

где  $A = \frac{k_B T}{k}$ ,  $\tau = 1/\omega_k = \gamma/k$ . Учитывая линейное соотношение между реальными смещениями частицы в ловушке  $X$  и сигналом, получаемым с КФД  $V$ , для автокорреляционной функции сигнала, получаемого с детектора, имеем

$$\langle V(t)V(0) \rangle = \frac{k_B T}{k S^2} e^{-t/\tau}. \quad (27)$$

Таким образом, измеряя автокорреляционную функцию смещений захваченной в оптическую ловушку частицы и аппроксимируя ее выражением 27, можно определить жесткость оптической ловушки  $k$  и калибровочный коэффициент пропорциональности  $S$ .

Тепловые флуктуации захваченного объекта также могут быть использованы для получения жесткости оптической ловушки через теорему о равнораспределении энергии по степеням свободы. Для гармонического потенциала  $U(x)$  с жесткостью  $k$  она приводит к уравнению

$$\frac{k_B T}{2} = \frac{k}{2} \langle x^2 \rangle, \quad (28)$$

где  $k_B$  — постоянная Больцмана,  $T$  — температура,  $x$  — смещение частицы из положения равновесия в оптической ловушке. Измеряя смещения захваченной микрочастицы, можно определить жесткость ловушки. Вероятность для смещения захваченного в потенциальную яму объекта будет определяться распределением Больцмана

$$P(x) \propto \exp\left(-\frac{U(x)}{k_B T}\right) = \exp\left(-\frac{kx^2}{k_B T}\right). \quad (29)$$

Но для определения жесткости из выражений (28) или (29) необходимо заранее сопоставить шкалу детектора со смещением частицы. То есть параметр  $S$  необходимо определить другим способом.

### 2.3. Калибровка силы оптического захвата по определению его динамики

Другой подход к калибровке жесткости оптического захвата состоит в рассмотрении 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 работе [37], в которой использовалась двухлучевая модификация оптического пинцета. В эксперименте использовались две одинаковые оптические ловушки, расположенные на расстоянии 5 мкм, сравнимым с размером частиц (10 мкм). Частица сначала захватывалась в одну из ловушек. Затем первая ловушка выключалась, одновременно с включением второй ловушки. Процесс смены положения равновесия частицы регистрировался по видео-изображению. Закон движения частицы в таких условиях выражается как  $m\ddot{x} + k\dot{x} + \alpha x = 0$ , где  $x$  — расстояние между центром частицы и фокусов лазерного пучка,  $m$  — масса частицы,  $k\dot{x}$  — сила трения между частицей и окружающей ее жидкостью с вязкостью  $\eta$ ,  $\alpha$  — жесткость оптической ловушки. Решением этого уравнения является затухающее движение частицы  $x(t) = x_0 \exp(-\frac{\alpha}{k}t)$ , где  $x_0$  — расстояние между переключающимися ловушками. Таким образом, зная диаметр частицы и вязкость окружающей ее жидкости, можно получить значение жесткости оптической ловушки. Экспериментальные результаты динамики захвата, приведенные в этой статье, показаны на рисунке 4.

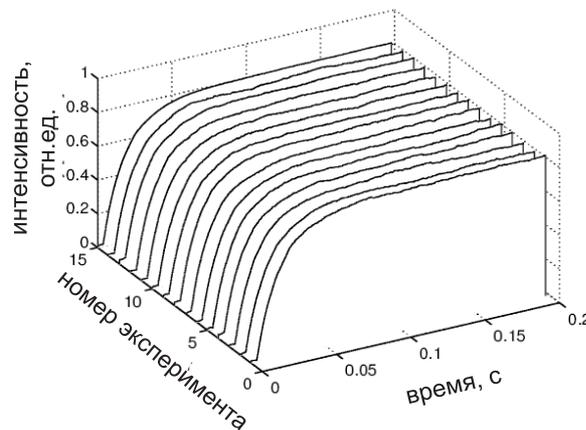


Рис. 4: Калибровка оптической ловушки по динамике оптического захвата. На рисунке приведены результаты измерения интенсивности рассеянного микрочастицей размером 10 мкм света от времени. Каждый “слой” на графике соответствует различным экспериментальным реализациям оптического захвата [37].

### 3. Практические реализации экспериментальных установок оптического пинцета

Значительная часть существующих экспериментальных установок оптического пинцета являются однолучевыми и собраны на базе оптических микроскопов [23, 38, 39] с использованием штатных оптических схем микроскопа для визуализации эксперимента. Однако существуют и другие реализации экспериментальных установок, причем в ряде случаев необходимо создание нескольких независимых оптических ловушек.

#### 3.1. Многолучевой оптический пинцет

Для захвата и управления протяженными микрообъектами, а также для изучения взаимодействия между несколькими микрообъектами с помощью метода оптического пинцета необходимо создание нескольких оптических ловушек, работающих одновременно. Оптические пинцеты, позволяющие работать с несколькими оптическими ловушками, в литературе называются *многолучевыми*.

Существует несколько подходов для создания многолучевых оптических пинцетов. О некоторых из них упоминалось в разделе 1.2. Часто применяется несколько источников лазерного излучения, и реализуются схемы с независимыми лазерными пучками. Так же существуют способы получения нескольких оптических ловушек из одного лазерного пучка. Для осуществления развертки и временной модуляции лазерного луча с частотой (порядка 1 МГц), высокой по сравнению с характерными частотами броуновского движения частиц в ловушке (порядка 100 Гц), используются акустооптические или электрооптические дефлекторы [11]. Акустооптический дефлектор (АОД) представляет собой кристалл, к одному из краев которого прикреплен пьезоэлемент. При подаче напряжения на пьезоэлемент по кристаллу распространяется акустическая волна, которая создает динамическую дифракционную решетку для лазерного пучка, проходящего через кристалл. Изменяя и модулируя напряжение на АОД, первый дифракционный максимум лазерно-

го пучка отклоняется на контролируемые углы. Быстрая модуляция приводит к тому, что оптическая ловушка переключается между различными положениями в пространстве, создавая эффективно несколько одновременно работающих ловушек. В электрооптических дефлекторах показатель преломления кристалла изменяется при приложении внешнего электрического поля. Отклонение лазерного луча в таком кристалле на углы порядка 20 мрад может быть достигнуто за времена порядка 100 нс [20]. Однако электрооптические дефлекторы не получили широкого распространения в системах оптического захвата ввиду своей высокой стоимости и ограниченности углов отклонения лучей. Распространенным способом является использование традиционных гальванических сканирующих зеркал. Существующие коммерческие решения позволяют достигнуть значения частоты изменения положения зеркал около 1 – 2 кГц при точности угла отклонения лазерного пучка около 8 мрад [20]. Другим подходом для создания одновременно большого количества ловушек является метод голографического пинцета [40–43]. Чтобы разбить исходный лазерный луч на несколько для формирования нескольких независимых оптических ловушек с задаваемыми параметрами, используется пространственный модулятор света (ПМС). ПМС позволяет использовать динамическую голограмму для формирования произвольного наперед заданного распределения интенсивности лазерного излучения в области исследуемого образца. Принципиальная схема голографического оптического пинцета с использованием ПМС представлена на рисунке 5а. Такой метод позволяет захватывать заданное количество частиц с заданным размером в заданной конфигурации и независимым образом управлять их положением в трех измерениях [30]. Например, на рисунке 5б приведен характерный вид голограммы, формирующий из лазерного пучка ряд оптических ловушек, в которые можно захватить массив одинаковых микрочастиц, упорядоченных в шестиугольник. Рисунок 5в, г иллюстрирует возможность искусственного упорядочения микрочастиц размером 1 мкм в решетку  $5 \times 5$  и сортировки микрочастиц  $\text{SiO}_2$  по размеру методом голографического оптического пинцета [42].

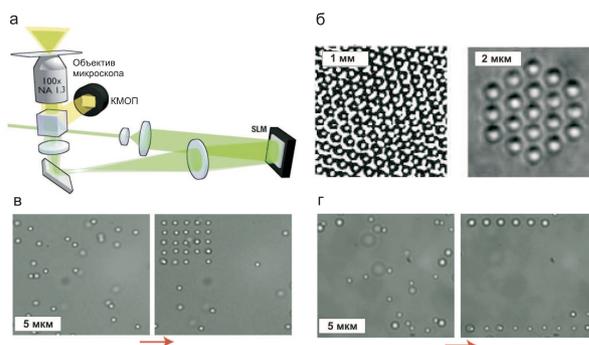


Рис. 5: а. Принципиальная схема установки голографического оптического пинцета. б. Типичный вид голограммы и выстроенного с ее помощью массива микрочастиц. в. Возможность искусственного упорядочения микрочастиц. г. Сортировка микрочастиц по размеру с помощью метода голографического пинцета. [41, 42]

Применение голограмм и других дифракционных оптических элементов дает возможность создавать не только лазерные пучки с гауссовым профилем, но так же и моды более высокого порядка, например, лаггерр-гауссовы моды, позволяющие передавать захваченному объекту крутящий момент и вращать его внутри оптической ловушки [44, 45].

### 3.2. Особенности калибровки многолучевого оптического пинцета

При работе с многолучевыми модификациями оптического пинцета зачастую возникают случаи, когда исследуемые объекты находятся в непосредственной близости друг от друга, будучи взвешенными в жидкости. Поэтому появляется необходимость учитывать гидродинамическое взаимодействие между ними как при калибровке сил оптического захвата этих объектов, так и при измерении сил взаимодействия между ними. В работе [33] проводится теоретический анализ гидродинамического взаимодействия в случае двух захваченных полистироловых частиц размером  $1,000 \pm 0,025$  мкм, взвешенных в воде. Рассматривается движение этих частиц в жидкости во внешнем потенциале оптической ловушки. Уравнение Ланжевена для стохастического движения частиц можно записать следующим образом:

$$\dot{\mathbf{r}}_n = \sum_{m=1}^2 \mathbf{H}_{nm} (\mathbf{r}_n - \mathbf{r}_m) [\mathbf{F}_{trap,m} + \mathbf{F}_m(t)], \quad (30)$$

где  $\mathbf{r}_n$  – радиус вектор  $n$ -ой захваченной частицы,  $\mathbf{F}_{trap,m} = -k(\mathbf{r}_m - \mathbf{r}_{trap,m})$  – возвращающая сила оптического захвата, действующая на частицу в  $m$ -ой ловушке с эффективной жесткостью  $k$  и положением  $\mathbf{r}_{trap,m}$ , а  $\mathbf{F}_n$  – случайная броуновская сила, действующая на эту частицу, которая имеет следующие корреляционные свойства [36]:

$$\begin{aligned} \langle \mathbf{F}_n(t) \rangle &= 0, \\ \langle \mathbf{F}_n(t) \mathbf{F}_n(t') \rangle &= 2\gamma k_B T \delta(t - t'), \\ \langle \mathbf{F}_n(t) \mathbf{F}_m(t') \rangle &= 0 \text{ при } m \neq n. \end{aligned} \quad (31)$$

Тензор  $\mathbf{H}_{nm}$  в уравнении 30 описывает гидродинамическое взаимодействие частиц с окружающей их средой. Его компоненты можно записать следующим образом:

$$\mathbf{H}_{nn} = \frac{\mathbf{I}}{\gamma}; \mathbf{H}_{nm} = \frac{1}{\gamma} \frac{3d}{8r_{nm}} \left[ \mathbf{I} + \frac{\mathbf{r}_{nm} \mathbf{r}_{nm}^T}{r_{nm}^2} \right], \quad (32)$$

где  $\mathbf{I}$  – единичная матрица, а  $\mathbf{r}_{nm} = \mathbf{r}_n - \mathbf{r}_m$ . Учитывая, что обычно броуновские смещения малы по сравнению с расстоянием между захваченными частицами,  $\mathbf{r}_{nm} = R\hat{\mathbf{x}}$ ,  $R$  – расстояние между ловушками,  $\hat{\mathbf{x}}$  единичный вектор в направлении оси  $x$ , взятой в направлении соединяющей частицы линии. Получаем систему дифференциальных уравнений для смещений центров частиц из соответствующих ловушек вдоль оси  $x$  и перпендикулярной ей оси  $y$ :

$$\begin{aligned} \gamma \dot{x}_1 &= -k_x x_1 - \varepsilon_x k_x x_2 + F_1(t) + \varepsilon_x F_2(t), \\ \gamma \dot{x}_2 &= -k_x x_2 - \varepsilon_x k_x x_1 + F_2(t) + \varepsilon_x F_1(t), \\ \gamma \dot{y}_1 &= -k_y y_1 - \varepsilon_y k_y y_2 + F_1(t) + \varepsilon_y F_2(t), \\ \gamma \dot{y}_2 &= -k_y y_2 - \varepsilon_y k_y y_1 + F_2(t) + \varepsilon_y F_1(t), \end{aligned} \quad (33)$$

где  $\varepsilon_x = \frac{3d}{4R}$ ,  $\varepsilon_y = \frac{3d}{8R}$ , а  $k_x, k_y$  – жесткости оптических ловушек в направлении оси  $x$  и  $y$ , соответственно. Заменой  $u = x_1 + x_2, v = x_1 - x_2, w = y_1 + y_2, \nu = y_1 - y_2$  система сводится к независимым уравнениям, решения которых аналогичны

решению (22), описанному в предыдущем пункте. Из этой системы получаются следующие выражения для автокорреляционных функций

$$\langle x_1(t)x_1(0) \rangle = \langle x_2(t)x_2(0) \rangle = \frac{k_B T}{k_x} e^{-t/\tau_x} \text{ch}(\varepsilon_x t/\tau_x), \quad (34)$$

$$\langle y_1(t)y_1(0) \rangle = \langle y_2(t)y_2(0) \rangle = \frac{k_B T}{k_y} e^{-t/\tau_y} \text{ch}(\varepsilon_y t/\tau_y),$$

где  $\tau_i = \gamma/k_i$ .

Интересным оказывается вид кросс-корреляционных функций смещений двух частиц:

$$\langle x_1(t)x_2(0) \rangle = \langle x_2(t)x_1(0) \rangle = -\frac{k_B T}{k_x} e^{-t/\tau_x} \text{sh}(\varepsilon_x t/\tau_x), \quad (35)$$

$$\langle y_1(t)y_2(0) \rangle = \langle y_2(t)y_1(0) \rangle = -\frac{k_B T}{k_y} e^{-t/\tau_y} \text{sh}(\varepsilon_y t/\tau_y),$$

Они неположительны во всем временном диапазоне и имеют минимум при  $t_{min} = \frac{\tau_i}{2\varepsilon_i} \ln \frac{1 + \varepsilon_i}{1 - \varepsilon_i} \approx \tau_i$ . Глубина этих минимумов для выбранных направлений  $x$  и  $y$ , соответственно, равны

$$\langle x_1(\tau_x)x_2(0) \rangle = -\frac{k_B T}{ek_x} \text{sh}(\varepsilon_x), \quad (36)$$

$$\langle y_1(\tau_y)y_2(0) \rangle = -\frac{k_B T}{ek_y} \text{sh}(\varepsilon_y),$$

### 3.3. Оптический пинцет на суперконтинууме

Традиционно для создания оптического пинцета используют монохроматическое лазерное излучение. Однако довольно большой круг задач связан с локальной спектроскопией микрообъектов. В работе [46] предлагается использовать суперконтинуум в качестве источника излучения, формирующего оптическую ловушку. С одной стороны, суперконтинуум имеет очень высокую степень пространственной когерентности, поэтому может быть жестко сфокусирован в малое пятно для формирования эффективной трехмерной ловушки. С другой стороны, характерный для суперконтинуума широкий

спектр позволяет совмещать возможности захвата, управления и спектроскопии единичных частиц в одной установке. Схема предложенной установки приведена на рисунке 6.

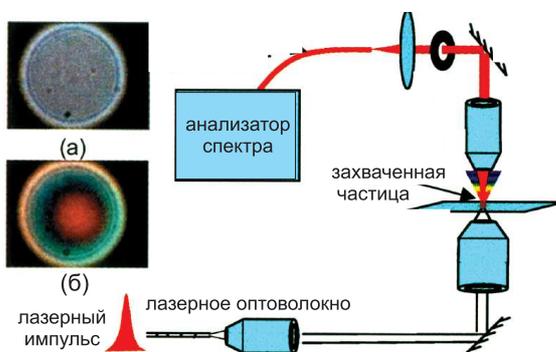


Рис. 6: Схема установки оптического пинцета на суперконтинууме. а — Пустая оптическая ловушка, б — рассеяние света на захваченной частице из латекса диаметром 2 мкм [46].

Фемтосекундный лазерный импульс титан-сапфирового лазера поступает на фотонно-кристаллическое оптоволокно, на выходе из которого излучение уже имеет сплошной спектр в диапазоне длин волн от 500 нм до 1500 нм. Это происходит из-за совокупности нелинейных эффектов в кристаллическом оптоволокне, которые приводят к сверхширокому спектру выходящего излучения. В работе [46] представлены спектры пропускания захваченных частиц диаметрами 1,5, 2, 2,5 мкм.

#### 3.4. Волоконно-оптический пинцет

В такой реализации метода оптического пинцета лазерное излучение подается через оптическое волокно. Волокно подбирается таким образом, чтобы на выходе из него существовал такой градиент интенсивности лазерного излучения, чтобы при установке двух оптических волокон соосно, как показано на рис.7, вблизи центрального положения образовалась оптическая ловушка. Поперечная стабильность захвата микрообъектов в такой ловушке достигается за счет наличия градиентных сил в области наложения излучения от двух волокон. Стабильность захвата вдоль оси распространения излучения дости-

гается за счет равенства сил давления света на объект со стороны противоположных источников. Такая реализация значительно проще по сравнению с

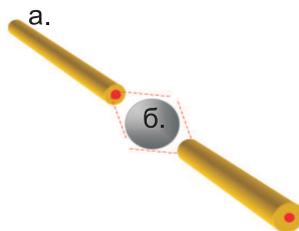


Рис. 7: Схема работы волоконно-оптического пинцета. а — оптическое волокно, б — захваченная частица.

оптическими пинцетами на базе микроскопов, так как не требует дорогостоящих и сложных оптических элементов. Еще одно достоинство данного метода заключается в том, что оптические волокна и захваченный в ловушку объект достаточно далеко разнесены друг от друга в пространстве, что позволяет одновременное использование других оптических или механических методов изучения объекта. Подобный метод позволяет не только захватывать микрообъекты, но и управлять ими, изменяя мощность излучения на выходе одного из волокон [47–49].

#### 4. Применения и задачи, решаемые методом оптического пинцета

С момента изобретения в 80-х годах метод оптического пинцета стал широко применяться в различных научных областях из-за возможности точного бесконтактного позиционирования объектов микронного размера в трех измерениях, а также измерения малых сил взаимодействия между микрообъектами. Например, применение метода голографического пинцета дает возможность не только создавать трехмерную ловушку произвольной формы, но и управлять частицами, находящимися в ней, в режиме реального времени [30]. Поэтому метод широко используют для изготовления двух- и трехмерных микроструктур [50].

Метод оптического пинцета позволяет проводить сортировку частиц или сближать их на заданное расстояние и изучать взаимодействие между ними.

В работе [42] проводилась сортировка частиц  $SiO_2$  размерами 1 мкм и 1,9 мкм. Сначала с помощью голографического оптического пинцета захватывались все частицы, попадающие в поле зрения микроскопа, затем проводилась программная обработка полученного изображения, в результате которой частицы различных размеров разделялись на группы. Финальный результат подобной сортировки микрочастиц по размерам изображен на рисунке 5г. В работе [51] было показано, что метод голографического пинцета позволяет захватывать и осаждать на подложку кремниевые нанотрубки. Далее нанотрубки упорядочивались в различные структуры. В работе исследовались нанотрубки диаметром 1,3 нм, поэтому агрегаты из нескольких нанотрубок регистрировались с помощью метода темного поля.

Широкое распространение получило сочетание метода оптического пинцета и спектроскопии комбинационного рассеяния света. КР-спектроскопия — эффективный метод изучения состава и строения веществ. Сущность явления комбинационного рассеяния состоит в том, что в спектре рассеянного света помимо рэлеевского рассеяния на частоте линий возбуждающего света присутствуют дополнительные линии, расположенные с длинноволновой (стоксовы) и коротковолновой стороны (антистоксовы) от каждой спектральной линии возбуждающего рассеяния света. Эти дополнительные линии характеризуют собственные внутримолекулярные, межмолекулярные и решеточные колебания вещества [52, 53]. Большой интерес представляет спектроскопия живых клеток, помещенных в естественную для них жидкую среду. Однако одной из основных проблем здесь является точное позиционирование клеток или других микрообъектов в пространстве для получения информативных и качественных спектров. Именно поэтому метод оптического пинцета оказался необычайно полезен в этой области, так как он позволяет захватывать требуемое число объектов в нужной конфигурации и ограничивать их броуновское движение. Например, в работе [54] были сняты КР-спектры с захваченных в оптическую ловушку различных живых клеток размером 10–15 мкм. Клетка захватывалась методом голографического пинцета и передвигалась отно-

сительно неподвижного луча, возбуждающего комбинационное рассеяние. В каждом положении снимались спектры, по виду которых можно было определить распределение концентрации различных веществ внутри клетки.

Ввиду уникальной особенности неразрушающего управления положением микрообъектов, метод оптического пинцета получил широкое распространение для исследования биологических микрообъектов. Это происходит в связи с тем, что большинство биологических микрообъектов практически не поглощают в инфракрасном диапазоне длин волн, которые обычно используются для формирования оптических ловушек. Однако, существует ряд работ, направленных на исследование эффекта нагрева биологических объектов, которые находятся в оптической ловушке. Обычно интенсивность излучения в лазерной ловушке при фокусировке в пятно размером около 1 мкм имеет порядок МВт/см<sup>2</sup>. Поэтому оценка нагрева исследуемых объектов является важной для корректной интерпретации экспериментов. В работе [55] эффект нагревания в оптической ловушке был измерен для липосом, имеющих размер порядка 1 мкм. В сфокусированном в пятно размером 0,8 мкм лазерном пучке с длиной волны 1064 нм и интенсивностью излучения  $\sim 10^7$  Вт/см<sup>2</sup> липосома, захваченная в оптическую ловушку, нагревалась на  $\sim 1,45 \pm 0,15$  К/0,1 Вт. Таким образом, для интенсивностей лазерного излучения в оптических ловушках меньше  $\sim 50 - 100$  мВт на инфракрасных длинах волн эффект нагревания биологических объектов мал и может носить разрушающий характер только при длительном пребывании биологического микрообъекта в оптической ловушке. Поэтому для изучения биологических объектов используют инфракрасное лазерное излучение [14, 39, 56].

Количественная характеристика микромеханических свойств различных сред, в частности растворов полимеров, биологических тканей и мембран клеток на сегодняшний день является актуальной задачей. Более того, интересным является вопрос разработки различных методик, позволяющих проводить эту характеристику для широкого диапазона частотных и пространственных масштабов. На сегодняшний день существует устоявшийся термин,

объединяющий все методики, суть которых заключается в использовании частиц микронного размера в качестве зондов при их смещениях внутри исследуемых сред для определения локальных вязкоупругих свойств сред — *микрореология* [57, 58]. При этом различают так называемую *пассивную реологию*, которая предполагает анализ низкочастотных (1 – 100 Гц) случайных тепловых смещений микрозондов, статистика движений которых определяется свойствами окружающей среды, и *активную реологию*, которая предполагает анализ отклика исследуемой среды на частоте внешнего воздействия при вынужденном колебании зонда внутри этой среды. Метод оптического пинцета значительно расширил возможности применения активной и пассивной реологии, позволяя контролируемо позиционировать и смещать оптически захваченные микрочастицы. В частности, в работе [57] использовалось сочетание метода оптического пинцета и метода активной реологии для измерения сдвиговых модулей и вязкости различных жидкостей в диапазоне частот 0,1 Гц – 100 кГц.

Метод оптического пинцета широко используется для определения микро-механических свойств биологических объектов. В ряде работ, например в [55], изучались механические свойства молекул ДНК, измерялись коэффициенты упругости спиралей ДНК. Метод оптического пинцета позволяет изучать механизмы и динамику молекулярных моторов, таких как кинезин, миозин и динеин [59]. Еще одними объектами, исследование которых осуществляют с помощью метода оптического пинцета, являются форменные элементы крови, в частности эритроциты.

## **5. Реологические свойства крови. Методы исследования агрегации эритроцитов и их эластичных свойств**

Кровь состоит из концентрированной взвеси форменных элементов в плазме. Плазма крови, в свою очередь, состоит из воды на 91,5%, солей и мелких органических молекул на 1,5% и высокомолекулярных белков (фибриноген, альбумин, иммуноглобулины) на 7%. Форменными элементами крови явля-

ются эритроциты, лейкоциты и тромбоциты. В количественном соотношении в крови на 1 лейкоцит приходится около 25 тромбоцитов и около 500 эритроцитов [60].

Реология — область механики, изучающая особенности течения и деформации реальных сплошных сред. Изучение текучести крови, соответственно, составляет предмет гемореологии. Реологические свойства крови определяются в основном объемными свойствами эритроцитов, поскольку эти клетки занимают примерно 45% объема всей крови. Решающую роль играет характер их поверхностного межклеточного взаимодействия, а также взаимодействия с плазмой, что способствует образованию и распаду эритроцитарных агрегатов в кровотоке, вращению и деформации клеток, их перераспределению и ориентации в микрососудах.

Кровь по своим реологическим свойствам является *неньютоновской* жидкостью. Ньютоновскими называют однородные жидкости, для которых возникающие при течении касательные напряжения линейно связаны с градиентом скорости, причем коэффициент пропорциональности называется вязкостью. Например, плазма крови в человеческом организме является ньютоновской жидкостью. Неньютоновская жидкость характеризуется неоднородностью, наличием крупных образований. Для нее характерна зависимость вязкости от градиента скорости ее течения. Кровь — плазма и форменные элементы крови — проявляет свойства неньютоновской жидкости. При повышении температуры вязкость крови возрастает, при повышении градиента скорости потока — падает. Также вязкость крови сильно зависит от ориентации эритроцитов в потоке и от гематокрита (объемной доли эритроцитов в плазме). Например, повышенное содержание углекислого газа увеличивает размеры эритроцитов и изменяет их форму. Именно этим обусловлена повышенная вязкость венозной крови по сравнению с вязкостью артериальной. Таким образом, вязкость крови в разных сегментах сосудистой системы является величиной непостоянной. Эта величина в литературе называется *видимой* вязкостью.

Для модельного описания движения крови по кровеносным сосудам часто пользуются уравнением Хагена-Пуазейля:

$$R = \frac{\Delta P}{Q} = \frac{8L\eta}{\pi r^4}, \quad (37)$$

где  $R$  — гидродинамическое сопротивление,  $\Delta P$  — перепад давления,  $Q$  — секундный объёмный расход жидкости,  $L$  — длина трубки,  $\eta$  — динамическая вязкость,  $r$  — радиус трубки. Однако применение этой модели имеет серьезные ограничения. Модель справедлива для ламинарного потока гомогенной жидкости в жестких трубках со смачиваемой поверхностью. Все эти свойства не соответствуют системе кровообращения, в которой кровеносные сосуды являются эластичными структурами с турбулентными пульсирующими потоками неоднородной крови, что усложняет теоретическое описание микроциркуляции.

### 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 узкие сечения 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 мкм<sup>3</sup>.

Содержимое эритроцита — почти насыщенный раствор (32% по массе) гемоглобина, обуславливающего красный цвет крови. Важную роль в эрит-

роците выполняет клеточная мембрана, пропускающая газы, ионы и воду. Мембрана эритроцита состоит из фосфолипидного бислоя и спектринового скелета — двумерная сеть из тетрамеров спектрина, которые объединены в узлах этой сети олигомерами актина (рисунок 8). При этом липидный бислоем пронизан трансмембранными (интегральными) белками, на различной глубине внутри мембраны находятся полуинтегральные белки, а на наружной или внутренней поверхности мембраны — периферические белки. В состав мембраны также входят гликопротеины (олиго-и полисахаридные цепи, связанные с молекулами белка), которые образуют так называемый гликокаликс — надмембранный комплекс толщиной около 10 нм. Именно в нем находятся рецепторы клетки, с его помощью происходит адгезия эритроцитов. Трансмембранные белки контактируют с жидкой средой по обеим сторонам мембраны, образуют каналы, через которые в клетку и из клетки проникают вещества. 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 и его поведение как упругого тела при деформациях [61, 62]. Толщина мембраны составляет около 7–10 нм. Такая общепризнанная модель называется жидкостно-мозаичной. Белки, углеводы и липиды мембраны подвижны и могут перемещаться в плоскости мембраны.

Внешняя поверхность мембраны эритроцитов покрыта сialовыми кислотами (олигосахаридами), заряженными отрицательно [60], поэтому сама мембрана клетки несет отрицательный поверхностный заряд ( $\zeta$ -потенциал). Находясь в электролите, заряженные элементы мембраны эритроцита притягивают к себе ионы, формируя двойной электрический слой (ДЭС) вокруг клетки. Первое теоретическое описание ДЭС было развито Гельмгольцем. ДЭС представлялся в виде сферического конденсатора, внутренняя обкладка которого находился в твердой фазе, а внешняя — в окружающей клетку жидкости на небольшом расстоянии порядка расстояния одного иона. Потенциал

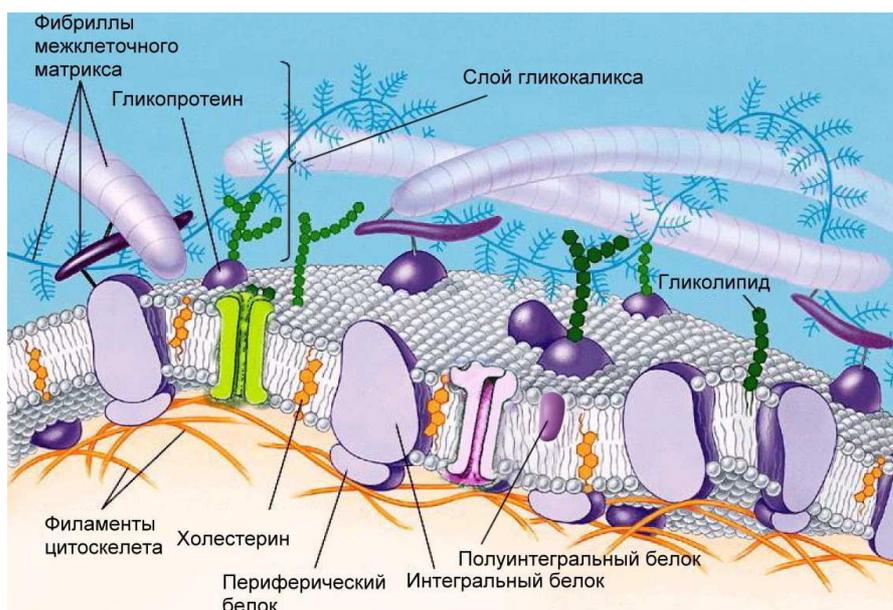


Рис. 8: Строение мембраны эритроцита.

электрического поля  $\varphi$  внутри ДЭС в этом случае линейно уменьшается при увеличении расстояния от поверхности  $r$ . Согласно другой модели (модель Гуи) ионы электролита образуют вблизи поверхности эритроцита диффузную ионную атмосферу в следствие своего теплового движения. Уменьшение потенциала  $\varphi$  с расстоянием в этом случае происходит нелинейно. Общепринятая на данный момент теория Штерна учитывает как адсорбцию ионов электролита, так и их тепловое движение. Часть ионов находится на расстояниях порядка диаметра иона от поверхности мембраны, образуя так называемый слой Гельмгольца (адсорбционный слой), а другая часть ионов образует диффузный слой (слой Гуи). Потенциал диффузной части ДЭС называется электрокинетическим потенциалом или *дзета-потенциалом* ( $\zeta$ -потенциал). По различным литературным данным  $\zeta$ -потенциал составляет  $-13 \div -40$  мВ. Отрицательно заряженная мембрана эритроцита стремится притянуть противоположные по знаку ионы раствора, но диффузия и тепловое движение не позволяет образовываться большим скоплениям ионов вокруг клетки. В то же время вблизи поверхности клетки сила электростатического притяжения преобладает, и ионы окружающего электролита образуют ДЭС [63]. Также известно, что поверхностный заряд рассредоточен по мембране эритроцита

не равномерно, а отдельными очагами [64].

### 5.2. Агрегация эритроцитов: описание и механизмы

Одним из фундаментальных свойств эритроцитов является их склонность к *агрегации*. Агрегация эритроцитов — динамичный и обратимый процесс их взаимодействия площадями с наибольшими поверхностями. Взаимодействуя друг с другом, эритроциты слипаются и образуют так называемые “монетные столбики”. Физиологическая агрегация в микрососудах имеет характер линейных цепочек в виде монетных столбиков состоящих из 5 – 10 клеток (рисунок 9) [65]. Физиологическая агрегация эритроцитов — процесс обра-



Рис. 9: Микро-фотография эритроцитов, образовавших “монетный столбик” [65].

тимый: в здоровом организме непрерывно происходит динамический процесс “агрегация — дезагрегация”. В системе микроциркуляции вязкость крови значительно зависит от агрегации эритроцитов. Считается, что физической основой зависимости видимой вязкости от скорости потока в значительной мере является агрегация эритроцитов [65].

Агрегация эритроцитов была обнаружена в 18 веке Хэвсом [66]. Систематическое исследование механизмов агрегации началось с работы [67]. Было замечено, что при агрегации эритроцитов существенное влияние оказывает окружающая клетки среда – плазма, электростатическое отталкивание между эритроцитами, их поверхностное натяжение и степень гидратации.

Общеизвестно, что для образования агрегатов эритроцитов необходимо наличие в плазме крупных молекул белков, в основном, фибриногена [67]. В

отсутствие таких молекул (например, эритроциты, взвешенные в физрастворе) агрегация не происходит. Тем не менее, до сих пор ведется дискуссия о физических механизмах, вызывающих агрегацию эритроцитов.

Для ее объяснения используют две основные теории. В основу первой, классической “*мостиковой*” теории [68] положено представление о том, эритроциты способны адсорбировать на своей поверхности крупномолекулярные белковые структуры. Сближаясь в кровотоке, эритроциты могут адсорбировать эти крупные структуры, которые становятся своего рода “*мостиками*”, связывающими эритроциты (рисунок 10 а). Известно, что существует корреляция между концентрацией крупномолекулярных белков плазмы, в частности фибриногена, и усилением агрегации эритроцитов. Длина молекулы фибриногена в раскрученном состоянии составляет около 45 нм. Полагают, что взаимодействие фибриногена с эритроцитом носит неспецифический характер и осуществляется за счет слабых ван-дер-ваальсовых и водородных связей [69]. Аргументы в пользу данной теории получены в основном из электронной микроскопии. Была выявлена зависимость расстояния между эритроцитами в агрегате от молекулярного веса добавляемых полимеров, например, декстрана — от 19 нм для декстрана 40 кг/моль до 32 нм для декстрана 2000 кг/моль. Сила, способствующая агрегации может увеличиваться, так как возрастает число зон связывания, а сила электростатического отталкивания уменьшается из-за большего разделения клеточных поверхностей ввиду большого размера связывающих клетки молекул [68, 69].

Согласно второй теории (*теории “истощенного слоя”*), напротив, считается, что вблизи поверхности эритроцитов может образоваться область истощения, в которой концентрация белковых молекул меньше, чем в окружающей плазме крови (рисунок 10 б). Впервые эффект появления областей истощения в коллоидных растворах был объяснен в работе [71]. Было показано, что присутствие в растворе небольших сфер (или макромолекул) вызывает появление эффективных сил взаимодействия между крупными частицами раствора, если расстояние между ними мало. Если крупные частицы приближаются друг

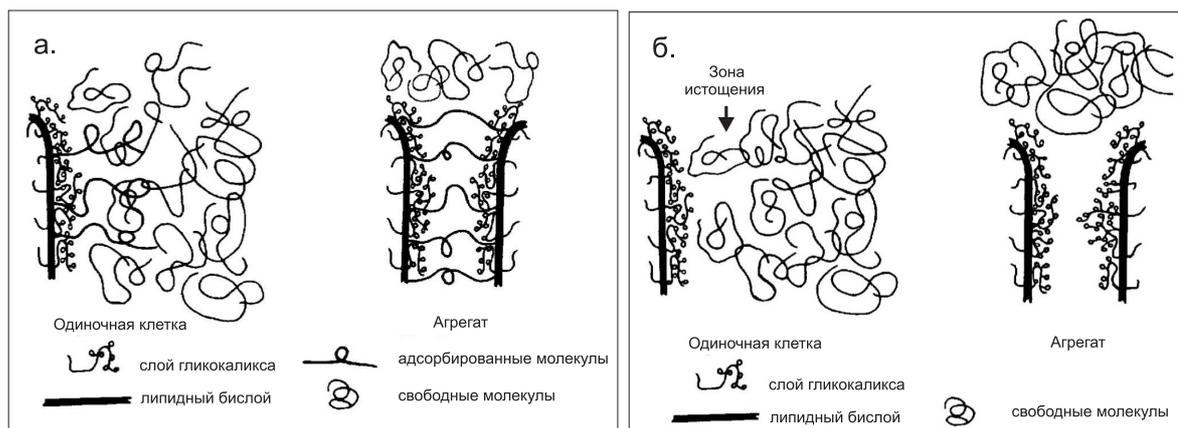


Рис. 10: а. Мостиковая модель агрегации эритроцитов. Адсорбция крупномолекулярных веществ на поверхности одиночных клеток и образование мостиков. б. Модель “истощенного слоя”. Образование обедненной зоны около поверхности мембраны клетки, образование агрегата из-за появления градиента осмотического давления около мембран сблизившихся эритроцитов [70].

к другу на расстояние меньшее, чем размер взвешенных небольших макромолекул, они вытесняются из области между крупными частицами. Соответственно, между частицами образуется область пространства с пониженной концентрацией макромолекул по сравнению с окружающей жидкостью — зона истощения. Возникающий градиент осмотического давления приводит к притяжению крупных частиц. Позже интерпретация этого механизма взаимодействия между частицами в растворе была расширена на эритроциты, взвешенные в плазме крови или растворе декстрана. При сближении эритроцитов в потоке между ними появляется истощенный слой. Возникающий при этом градиент осмотического давления (доля осмотического давления, создаваемая высокомолекулярными компонентами плазмы — белками) приводит к дальнейшему сближению эритроцитов [72]. Экспериментальные подтверждения существования истощенного слоя заключались, например, в наблюдении увеличения электрофоретической подвижности эритроцитов в растворе электролитов при добавлении декстрана (70 кг/моль). Значения электрофоретической подвижности в присутствии декстрана были значительно выше, чем ожидаемые исходя из вязкости раствора. Толщина истощенного слоя оцени-

ввалась в величину от 2,9 нм до 4,4 нм [73]. В работе [72] толщина “истощенного слоя” рассчитывается как функция концентрации высокомолекулярных веществ в растворе и имеет порядок 10–20 нм.

Таким образом, ключевую роль в агрегации эритроцитов играют основные белки плазмы - фибриноген, глобулины и альбумин. Общепринято, что в норме, для здоровых людей на агрегацию эритроцитов значительно влияет фибриноген. Фибриноген — белок с молекулярной массой 340 кД/моль, вырабатываемый в печени. Его содержание в плазме повышается при появлении острых воспалительных заболеваний, отмирании тканей. Физиологическая концентрация этого белка в плазме составляет ~150–300 мг/мл. Увеличение концентрации фибриногена приводит к возрастанию вязкости плазмы и эффективного размера агрегатов эритроцитов в кровотоке. Как уже отмечалось выше, считается, что молекулы фибриногена способны образовывать “мостики” между мембранами эритроцитов, способствуя их агрегации.

Наряду с фибриногеном при различных патологиях вклад в агрегацию эритроцитов способны оказывать и другие белки [74], например, иммуноглобулин G (IgG), составляющий 20% всех белков плазмы. Однако данные о вкладе иммуноглобулина в процесс агрегации эритроцитов на данный момент противоречивы. Существуют данные, указывающие на отсутствие влияния этого белка на агрегацию [75], другие — свидетельствуют о существовании иммуноглобулин-индуцированной агрегации эритроцитов [76]. Введение иммуноглобулина в кровь широко используется в клинической практике для лечения иммунодефицита и некоторых аутоиммунных заболеваний. Однако при этом могут возникать осложнения, связанные с ухудшением микроциркуляции организма, поскольку введение иммуноглобулина может значительно усилить агрегацию эритроцитов в областях с малыми сдвиговыми напряжениями ( $<4$  дин/см<sup>2</sup>), например в бифуркациях артерий. Также отмечались случаи тромбоза [76, 77].

Другим белком плазмы, влияющим на агрегацию эритроцитов, является менее крупномолекулярный альбумин, молекулярная масса которого около

66 кг/моль и который составляет около 55 % от всех белков плазмы крови. Ввиду высокой концентрации и небольших размеров альбумин на 80 % определяет осмотическое давление плазмы крови, и потому рассматривается как основной детерминант механизма агрегации по теории истощенного слоя. Последние исследования показали, что альбумин влияет на агрегацию эритроцитов. Однако характер этого влияния отличается по различным данным. В работе [76] было показано, что альбумин может ингибировать агрегацию эритроцитов, вызванную иммуноглобулином. При этом добавление альбумина усиливало агрегацию, индуцированную увеличением концентрации фибриногена. В работе [77] авторы показали, что при добавлении альбумина усиливается агрегация клеток, вызванная как фибриногеном, так и иммуноглобулином.

В течение длительного времени считалось, что все указанные выше белки в процессе образования эритроцитарных агрегатов взаимодействуют с клеточной мембраной неспецифическим образом. Например, связь с эритроцитом фибриногена, являющегося одним из основных стимуляторов агрегации, в основном, носит неспецифический характер [78]. Однако было показано, что можно уменьшить количество молекул фибриногена, связывающихся с мембранами эритроцитов, и силу этого соединения с помощью ингибиторов специфического связывания фибриногена с гликопротеиновым рецептором  $II_{\beta}/III_{\beta}$ , найденным ранее на тромбоцитах [78, 79]. Уменьшение сил связи проявлялось в наблюдении снижения содержания агрегатов в покоящейся суспензии отмытых эритроцитов, помещенных в фибриноген-содержащий раствор. Полученные результаты позволили рассматривать специфическое связывание фибриногена в качестве одного из детерминантов агрегации эритроцитов, однако до сих пор открыт вопрос о его реальной значимости в кинетике образования агрегатов и в их прочности в условиях цельной крови.

### *5.3. Методы изучения агрегации эритроцитов*

Существует несколько различных методов изучения агрегации красных кровяных телец.

#### *5.3.1 Методика измерения скорости оседания эритроцитов*

Одним из самых широко используемых и доступных методов непрямого измерения агрегационных свойств эритроцитов является определение скорости оседания эритроцитов (СОЭ). Образец исследуемой крови помещается в узкую пробирку на некоторое время. Так как в пробирке кровь уже не находится в потоке, где вследствие появления сдвиговых напряжений одновременно с агрегацией постоянно происходит дезагрегация, эритроциты начинают оседаться под действием силы тяжести и 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 [17]. В норме величина СОЭ у мужчин не превышает 10 мм/час, а у женщин — 15 мм/час. Такой метод характеристики агрегации эритроцитов очень прост с технической точки зрения и потому широко распространен в клинической практике, однако на процесс оседания эритроцитов влияет большое количество факторов, что осложняет выявление различных составляющих в процесс агрегации.

#### *5.3.2 Метод втягивания клеток в микропипетку*

Метод втягивания мембраны эритроцитов в микропипетку является прямым методом измерения деформационных и агрегационных свойств клеток [80]. С помощью стеклянных микропипеток можно прикладывать к клеткам давления в диапазоне 0,1-0,2 пН/мкм<sup>2</sup>. Такой способ является распространенным для работы как с мягкими безъядерными клетками, например, эритроцитами, так и с более жесткими клетками. Однако при этом методика является контактной и достаточно грубой, что сопряжено с риском неконтролируемых клеточных изменений. Имеет место нефизиологический характер сило-

вого воздействия на клетки и условий клеточной реакции. К примеру в работе [81] было обнаружено изменение формы эритроцита после частичного (на 1,5 мкм) вытягивания его в микропипетку с давлением  $\Delta P = -3,9$  кПа. До эксперимента эритроцит имел форму дискоцита, после — форму эхиноцита. Степень искажения нормальной формы эритроцита возрастала при увеличении времени захвата клетки в микропипетку. Восстановление формы эритроцита происходило в течении 10 минут, что говорит о серьезных изменениях мембраны, вызванных влиянием микропипетки.

### *5.3.3 Фотометрические методы оценки агрегационных свойств клеток*

Другим распространенным методом исследования агрегационных свойств эритроцитов является фотометрический метод [17, 18]. С помощью этого метода возможна количественная оценка агрегатного состояния крови — размеров и плотности микроагрегатов эритроцитов. Все фотометрические методы можно классифицировать по типу регистрируемого светового потока: исследование в проходящем и в отраженном световом потоке. Интенсивность света, прошедшего через слой суспензии эритроцитов, которые являются для него рассеивателями, изменяется в соответствии с их агрегатным состоянием, которое характеризуется размерами, плотностью образующихся микроагрегатов и их движением. 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. Изменение интенсивности проходящего через слой крови или отраженного от поверхности слоя крови света было положено в основу фотометрических методов исследования агрегации. Чаще всего используется лазерное излучение, длина волны которого находится в так называемом “диагностическом окне” 600–1300 нм, характеризующимся невысоким коэффициентом поглощения для суспензии эритроцитов. Однако интерпретация экспериментальных данных в значительной мере

осложняется особенностями каждого отдельно эритроцита, зависимостью его оптических характеристик и формы от внешних факторов (температура, состава окружающей среды, и др.). Данный метод позволяет получить интегральную информацию о кинетике спонтанной агрегации и дезагрегации эритроцитов в сдвиговом потоке.

Существуют так же лазерные агрегометры-деформометры эритроцитов, предназначенные для одновременного анализа параметров агрегации, дезагрегации и деформируемости эритроцитов в пробах цельной крови и суспензии красных кровяных телец [60]. Основной измерительной частью прибора являются два соосных прозрачных цилиндрических тонкостенных стакана, между которыми помещается исследуемая проба крови. Внешний цилиндр вращается относительно покоящегося цилиндра, создавая в зазоре течение чистого сдвига со скоростью в диапазоне  $2,5\text{--}3500\text{ с}^{-1}$ . В таком потоке эритроциты ориентируются дисками параллельно стенкам. Агрегационные параметры эритроцитов определяются методом измерения интенсивности обратного светорассеяния от слоя крови в реологическом зазоре прибора. Световой пучок пересекает цилиндры по нормали к поверхности и рассеивается на клетках. На экране, установленном на фокусном расстоянии от входной линзы, формируется дифракционная картина, соответствующая размерам и форме эритроцитов, что позволяет также рассчитать основные параметры деформируемости.

#### *5.3.4 Электронная микроскопия для исследования агрегации эритроцитов*

Для получения изображений эритроцитарных агрегатов, а так же сведений о молекулярной структуре мембраны в ряде работ использовалась электронная микроскопия [68,82] (рисунок 11). В работе [68] измерялись межмембранные расстояния между эритроцитами в двойных агрегатах, образованных в растворах декстрана с различной молекулярной массой. Было показано, что расстояние между мембранами увеличивалось при увеличении молекулярной массы полимера. Данные трактовались как подтверждение мостиковой

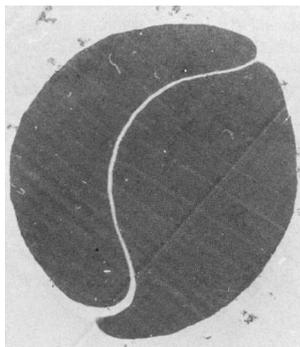


Рис. 11: Изображение эритроцитарного агрегата, полученное методом электронной микроскопии.

теории агрегации эритроцитов, при которой макромолекулы полимера образовывали мостики между мембранами клеток. Причем, чем выше молекулярная масса полимера, тем длиннее образовывались мостики, тем меньше становилось электростатическое отталкивание между мембранами клеток, тем сильнее была агрегация эритроцитов. Электронная микроскопия дает возможность визуализации эритроцитарных агрегатов с хорошим разрешением, однако при таком способе визуализации теряется возможность исследования живых эритроцитов в естественной среде.

#### *5.3.5 Атомно-силовая микроскопия для исследования агрегации эритроцитов*

Недавно был предложен новый подход к исследованию силовых взаимодействий между одиночными эритроцитами с использованием атомно-силового микроскопа [83]. В эксперименте измерялась сила индуцированной декстраном агрегации эритроцитов в зависимости от молекулярной массы (70 кг/моль и 150 кг/моль) и концентрации декстрана в буфере. Для этого зонд атомно-силового микроскопа обрабатывался специальным белковым раствором (Cell-Tak), который способствует адгезии клетки к поверхности зонда. В экспериментах одиночный эритроцит прикреплялся к зонду, после чего помещался сверху на другой эритроцит, осажденный на поверхность чашки Петри. Далее зонд поднимался вверх, и измерялась сила взаимодействия клеток,

вызванная наличием молекул декстрана в растворе. Авторы ставили целью исследовать агрегацию эритроцитов, которая возникает вследствие формирования истощенного слоя. Ранее было показано [19], что время формирования молекулярных мостиков составляет около 1 – 2 секунд. По этой причине в экспериментах [83] время контакта двух клеток составляло меньше 1 секунды, чтобы исключить формирование мостиков между мембранами эритроцитов. Полученные результаты измерения силы декстран-индуцированной агрегации эритроцитов находятся в согласии с теорией истощенного слоя.

### *5.3.6 Оптическая микроскопия для исследования агрегации эритроцитов*

Широко распространенным подходом наблюдения агрегации эритроцитов является оптическая микроскопия в сочетании с проточной кюветой или с использованием стандартных покровных стекол. Например, в работе [84] изучалась кинетика спонтанной агрегации. 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 регистрировалась кинетика взаимодействия эритроцитов с помощью инвертированного оптического микроскопа (рисунок 12а). На 24 парах эритроцитов от 4 различных доноров было показано, что спонтанная агрегация клеток представляет собой трехступенчатый процесс (рисунок 12б). После соприкосновения клетки сближаются 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, которое 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. В работе [77] оптическая микроскопия в сочетании с проточной кюветой использовалась для исследования вкладов различных белков плазмы в

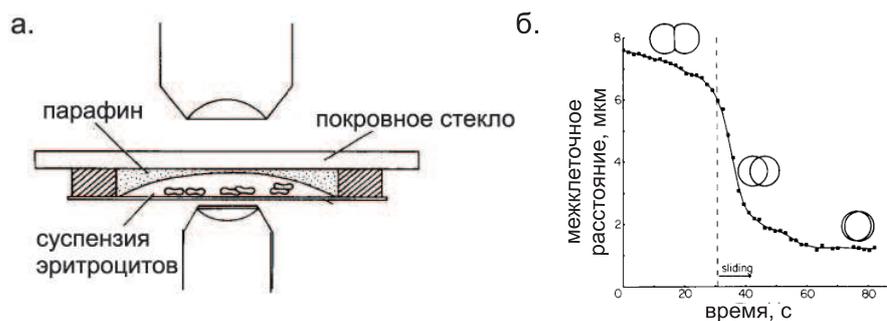


Рис. 12: Измерение скорости спонтанной агрегации. а — схематическое изображение метода измерения, б — временная зависимость расстояния между клетками.

процесс агрегации эритроцитов. Клетки суспендировались в плазме с различной концентрацией альбумина, фибриногена и иммуноглобулина, и пропускались через проточную кювету. По оптическому изображению, получаемому с проточной кюветы, фиксировался эффективный размер образующихся агрегатов эритроцитов для различных сдвиговых напряжений при увеличении скорости потока в проточной кювете. Далее определялась площадь под кривой зависимости эффективного размера агрегата от сдвигового напряжения. Регистрация этого параметра дала результат, заключающийся в наблюдении значительного усиления агрегации эритроцитов только в том случае, когда все три белка растворены в плазме с большой концентрацией. При добавлении высоких концентраций каких-либо двух белков — агрегация эритроцитов практически не изменялась (рисунок 13).

### 5.3.7 Метод оптического пинцета для исследования агрегации эритроцитов

Метод оптического пинцета — принципиально отличный способ определения свойств эритроцитов и их агрегации. Этот метод позволяет одновременно проводить количественные измерения сил агрегации в естественной для клеток среде, фиксировать их положение в жидкости в трех измерениях. При этом система визуализации позволяет контролировать эксперимент в режиме реального времени. Методом оптического пинцета возможно экспериментальное исследование в толще жидкости одиночных эритроцитов, не взаимодействующих с подложкой или зондом, как в случае с оптической микроскопией, АСМ,

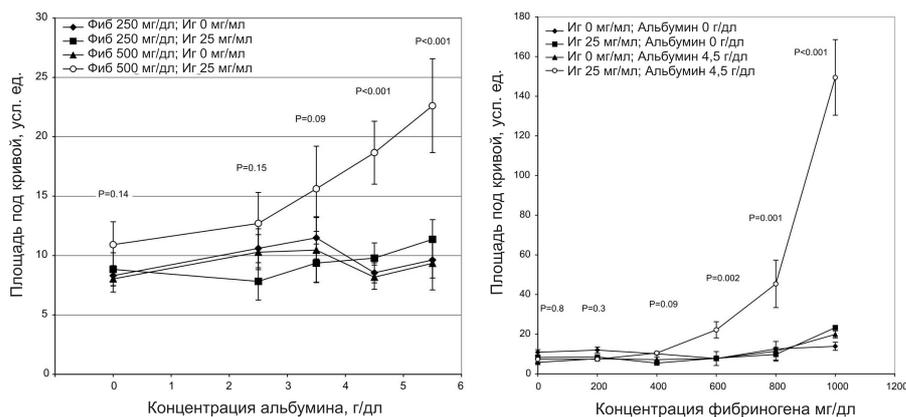


Рис. 13: Степень агрегации эритроцитов (выражена в единицах площади под кривой зависимости эффективного размера агрегата от сдвигового напряжения) как функция концентрации альбумина для четырех растворов с различной концентрацией фибриногена (Фиб) и иммуноглобулина (Иг) [77].

микропинеткой или другими клетками, как для любых интегральных методов. Существуют единичные работы, в которых была продемонстрирована возможность изучения агрегации эритроцитов методом оптического пинцета. В работе [19] использовался двухлучевой оптический пинцет на базе АИГ-Nd лазера (1064 нм). Мощность в каждой из ловушек составляла около 100 мВт. В качестве образцов использовалась кровь четырех здоровых доноров. Изготавливалась суспензия из аутологичной плазмы или различных полимерных растворов с малой концентрацией эритроцитов. Два одиночных эритроцита захватывались в две оптических ловушки. При сближении ловушек добивались образования контакта между клетками. После соприкосновения клеток оптические ловушки выключались, происходило образование двойного агрегата в течение 3 – 5 секунд. Далее край одной клетки захватывался одной ловушкой, край другой – второй ловушкой, после чего агрегат разъединяли, разводя оптические ловушки в противоположные стороны со скоростью около 5 мкм/с. Было показано, что в плазме разрыв агрегата возможен только путем соскальзывания одного эритроцита по другому. Разъединение агрегата в направлении, перпендикулярном линии, соединяющей две оптические ловушки, было невозможно. Кроме того, в большинстве случаев полного разъеди-

нения агрегата эритроцитов при фиксированной мощности излучения в оптических ловушках не наблюдалось. Чаще всего оставались небольшие “связки” между клетками (рисунок 14), характерный размер которых составлял от долей до нескольких микрометров. Эти наблюдения дают еще один аргумент в пользу “мостиковой” теории. Подобные “связки” наблюдались также при разъединении эритроцитарного агрегата методом оптического пинцета в работе [85]. Также было качественно показано, что сила взаимодействия

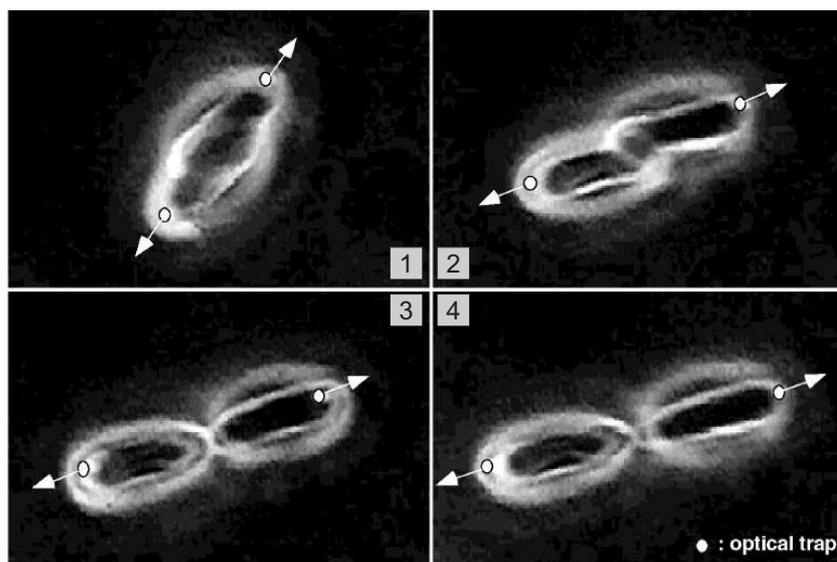


Рис. 14: Дезагрегация эритроцитов методом оптического пинцета [19].

эритроцитов в агрегате при его разрыве зависит от времени его формирования. В большинстве случаев разрыв агрегата происходил только тогда, когда время формирования составляло меньше  $\sim 8$  секунд. В работе [19] проводились эксперименты по дезагрегации одиночных эритроцитов, взвешенных в различных полимерных растворах. Было показано, что поведение агрегата при разрыве оставалось таким же, как и в плазме, за исключением увеличения силы агрегации эритроцитов, например, при увеличении концентрации фибриногена в растворе. Скорость разведения оптических ловушек для разъединения агрегата при этом необходимо было уменьшать.

Таким образом, в работе [19] полагается, что в процессе агрегации эритроцитов возможно возникновение белковых “мостиков” на временных масштабах 1 – 2 секунды. При этом предполагается, что процесс агрегации эритро-

цитов может быть двухступенчатым: сначала механизм “истощенной зоны” способствует сближению клеток на небольшое расстояние, достаточное для образования перекрестных мостиков, после чего происходит формирование этих белковых связей.

Экспериментальная возможность измерения максимальной силы агрегации для двух одиночных эритроцитов была продемонстрирована в работе [85]. Для этого к эритроцитам в двойном агрегате прикреплялись две диэлектрические микросферы и осуществлялся оптический захват этих микрочастиц. Сила оптического захвата подобных частиц при фиксированной мощности излучения в ловушке превышает силу захвата края эритроцита, поэтому такой подход позволяет прикладывать к двойному агрегату большие силы для его разъединения. Среднее значение для силы взаимодействия двух эритроцитов в агрегате вычислялось по смещению диэлектрических частиц из центров оптических ловушек при их передвижении в противоположные стороны. Оно составило  $14 \pm 10$  пН при выборке около 40 различных пар эритроцитов.

Работа [19] является единственной попыткой определения параметров агрегации одиночных эритроцитов в естественной среде методом оптического пинцета без использования химической обработки клеток, зондов или прикрепления к ним диэлектрических микрочастиц. Авторы работы представили результаты экспериментов, усредненных по четырем различным образцам крови. Таки образом, статистика измерений была крайне мала. Также не было проведено количественных оценок сил взаимодействия эритроцитов при их сдвиговой дезагрегации с помощью оптических ловушек.

#### *5.4. Деформируемость и эластичные свойства эритроцитов*

Известно, что красные кровяные тельца способны выдерживать огромные напряжения ( $3 - 5$  Н/м<sup>2</sup>) при деформациях, которые они испытывают при прохождении через мелкие сосуды и капилляры. Именно благодаря тому, что эритроциты могут значительно деформироваться, они способны проходить внутри мелких сосудов и капилляров диаметром  $1 - 2$  мкм. Так как

внутреннее строение эритроцитов представляет собой жидкость, деформируемость в основном определяет мембрана клеток. Поэтому способность эритроцитов проходить сквозь мелкие капилляры напрямую зависит от эластичных свойств мембраны. При определенных патологиях или при воздействии некоторых препаратов эластичные свойства эритроцитов могут претерпевать значительные изменения, что в свою очередь может привести к нарушению микроциркуляции и к другим нежелательным последствиям, вызванных неэффективным снабжением кислородом тканей. Эластичные свойства мембраны можно определить тремя параметрами: коэффициентом растяжения поверхности  $K$ , модулем сдвига  $\mu$  и жесткостью при изгибе  $B$ . Однако за эластичность при деформации в сосудах отвечают лишь  $K$  и  $\mu$ , так как жесткость при изгибе имеет порядок от нескольких  $k_bT$  до нескольких десятков  $k_bT$  и ей можно пренебречь [14].

Эритроцит является достаточно сложной системой, состоящей из композитной мембраны, способной пропускать через себя различные вещества, и внутренней жидкой части, поэтому его можно рассматривать как систему с различными характерными временами процессов, происходящих в нем. Эти характерные времена лежат в широком диапазоне от микросекунд до нескольких сотен часов [86]. Именно поэтому большой интерес представляет исследование эластичных свойств эритроцитов, как определяющих микроциркуляцию и нормальное функционирование организма человека, в широком диапазоне частот. Некоторые существующие методы дают возможность прикладывать к эритроцитам только статические напряжения и исследовать отклик клетки. Другие — позволяют изучать отклик эритроцита на динамическое возмущение с различной частотой.

Все существующие на данный момент методы исследования механических свойств клеток и эритроцитов в частности можно разделить на 3 группы [87]. Первая — это локальные методы с использованием зондов, которые применяются для характеристики эластичных свойств отдельных частей клетки. К таким методам относятся атомно-силовая микроскопия и цитометрия при пе-

ременном магнитном поле (magnetic twisting cytometry). Вторая группа методик характеризует всю клетку в целом, например, метод оптического пинцета или метод втягивания мембраны в микропипетку. И третья группа методик позволяет характеризовать интегральные механические свойства большого числа клеток одновременно. К таким подходам относится использование специальных коаксиальных вискозиметров, позволяющих прикладывать сдвиговые напряжения к суспензии клеток, а так же других приспособлений для деформации клеток. Рассмотрим подробнее первые две группы методик, позволяющие исследовать одиночные клетки.

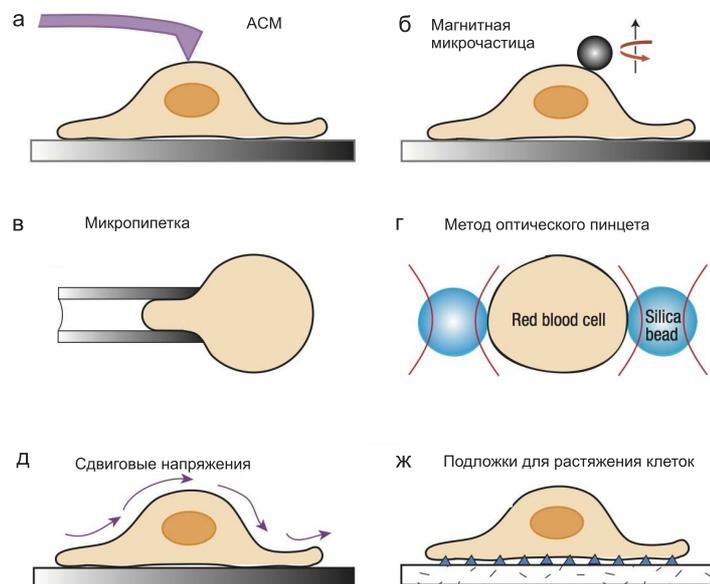


Рис. 15: Схематическое изображение трех групп методик исследования эластичных свойств клеток. а, б — методы локальной характеристики упругости клеток: атомно-силовая микроскопия (а) и цитометрия при переменном магнитном поле (б). в, г — методы характеристики упругости клетки в целом: метод втягивания клетки в микропипетку (в) и метод двухлучевого оптического пинцета (г). д, ж — методы характеристики механических свойств ансамбля большого количества клеток: использование сдвиговых напряжений в потоке (д) и деформаций подложек, на которых выращены клетки (ж). [87].

#### *5.4.1 Локальные методы исследования механических свойств эритроцитов*

Атомно-силовая микроскопия за последние годы стала распространенным инструментом не только для исследования морфологии поверхностей [88], но и для характеристики микро-механических свойств объектов, в частности, клеток [89–91]. В экспериментах по измерению локальных свойств клеток с помощью атомно-силового микроскопа игла гибкого кантилевера деформирует определенные участки клетки (рисунок 15а). После проведения калибровки изгибов кантилевера, можно судить о силах упругости, которые острое зонда испытывает со стороны поверхности клетки при этих деформациях. Таким образом можно определять особенности морфологии и формы клеток [88], модуль Юнга, что, например, широко распространено при исследовании раковых клеток [89–91], силы адгезии клеток к поверхности и друг к другу [83].

Другим методом исследования локальных эластичных свойств микрообъектов является цитометрия при переменном магнитном поле [92]. К объекту исследования, например, к эритроциту, прикрепляется магнитная микрочастица с функционализированной поверхностью, обладающей высокой адгезией к поверхности мембраны клетки. При приложении внешнего периодического магнитного поля микрочастица начинает двигаться и в области соприкосновения с мембраной деформирует клетку (рисунок 15б). Отклик клетки исследовался на частоте внешнего периодического воздействия. Зная силу, прикладываемую к частице и измеряя ее смещения, можно вычислить действительную и мнимую часть модуля упругости тех частей клетки, к которым прикреплена микрочастица, в диапазоне частот внешнего воздействия до 100 Гц.

#### *5.4.2 Методы исследования механических свойств одиночных эритроцитов как цельной клетки*

Метод втягивания клеток в микропипетку позволяет деформировать мембраны, прикладывая к ним силы порядка  $10^{-9}$  Н [80, 81, 87]. Обычно одиночный эритроцит, взвешенный в буфере, частично втягивается в стеклянную микро-

пипетку. Контролируя давление в микропипетке и исследуя движение клетки при втягивании, можно судить о вязкости и эластичности исследуемого объекта.

Распространенным подходом к исследованию деформируемости большого числа эритроцитов одновременно является метод лазерной дифрактометрии [93]. Метод заключается в облучении сильно разбавленной суспензии эритроцитов лазерным излучением в покое и в сдвиговом потоке, получении дифракционной картины от этой суспензии, вид которой зависит от степени деформации большей части клеток и последующем анализе обработанной информации. При изменении сдвигового напряжения измеряются соответствующие значения индекса деформируемости эритроцита в суспензии, который определяется как отношение разности большой и малой полуосей эллипса, аппроксимирующего линии равной интенсивности получаемой дифракционной картины, к их сумме. Например, в работе [94] подобным методом определялись деформационные свойства эритроцитов в суспензии для различной степени оксигенации клеток. Было показано, что деформируемость эритроцитов значительно возрастала при предварительной инкубации клеток в кислороде, по сравнению с обедненными кислородом клетками.

Другим направлением в области определения эластичных свойств эритроцитов является метод оптического пинцета [9, 10, 14], который позволяет прикладывать к эритроцитам силы порядка 1–50 пН. При определенных конфигурациях эксперимента возможно прикладывать и большие силы, однако при этом необходимо контролировать возможные эффекты влияния оптической ловушки на состояние живой клетки, так как увеличение силы захвата связано с увеличением мощности излучения в перетяжке лазерного пучка. Традиционно принято прикреплять к клеткам прозрачные микрочастицы и деформировать клетку, управляя положением микрочастиц. При этом важно отметить, что прикрепление микрочастиц к мембране клеток требует проведения инкубации суспензии клеток с микрочастицами в течение длительного времени (обычно около 1 – 2 часов) при низкой температуре (около 4 °С).

В работе [14] методом оптического пинцета были определены коэффициент растяжения поверхности  $K$  и модуль сдвига  $\mu$  спектринового скелета мембраны эритроцита в гипотоническом и изотоническом растворах. Для этого в исследуемую суспензию эритроцитов в натрий фосфатном буфере добавлялись микрочастицы из диоксида кремния размером 2 мкм. Частицы необратимо прикреплялись к мембранам клеток. Для экспериментов выбирались те клетки, к которым были прикреплены три микрочастицы, каждая из которых захватывалась в оптические ловушки. Далее липидный бислой мембран клеток растворялся с помощью специального вещества, впрыскиваемого в кювету. В образце оставались только “тени эритроцитов” — спектриновые скелеты мембран с прикрепленными диэлектрическими микросферами. Спектриновый скелет растягивался в различных направлениях при приложении к диэлектрическим частицам фиксированных калиброванных сил оптических ловушек. Для буфера с низким осмотическим давлением (гипотонический раствор) коэффициент растяжения поверхности спектринового скелета составил  $K \approx 4,8 \pm 2,7$  мкН/м, а модуль сдвига  $\mu \approx 2,4 \pm 0,7$  мкН/м. Для изотонического раствора значения механических модулей составляют большие значения.

В работе [56] исследовалась динамика восстановления формы эритроцита после снятия механического напряжения, прикладываемого к клетке с помощью оптических ловушек. Эритроцит захватывался одновременно в три оптические ловушки и растягивался, как показано на рисунке 16а. Такой тип деформации схож с деформацией эритроцита в капиллярах. Затем ловушки одновременно выключали и измеряли время восстановления формы клетки (рисунок 16б). Было установлено, что для молодых клеток время релаксации составляет около 100 мс, в то время как для старых — 300 мс. В другой работе [95] экспериментально определенное время релаксации эритроцита после его растяжения с помощью двух оптических ловушек составило около 200 мс (рисунок 16 в, г).

В работе [85] исследовалась вязкость мембран эритроцитов с использова-

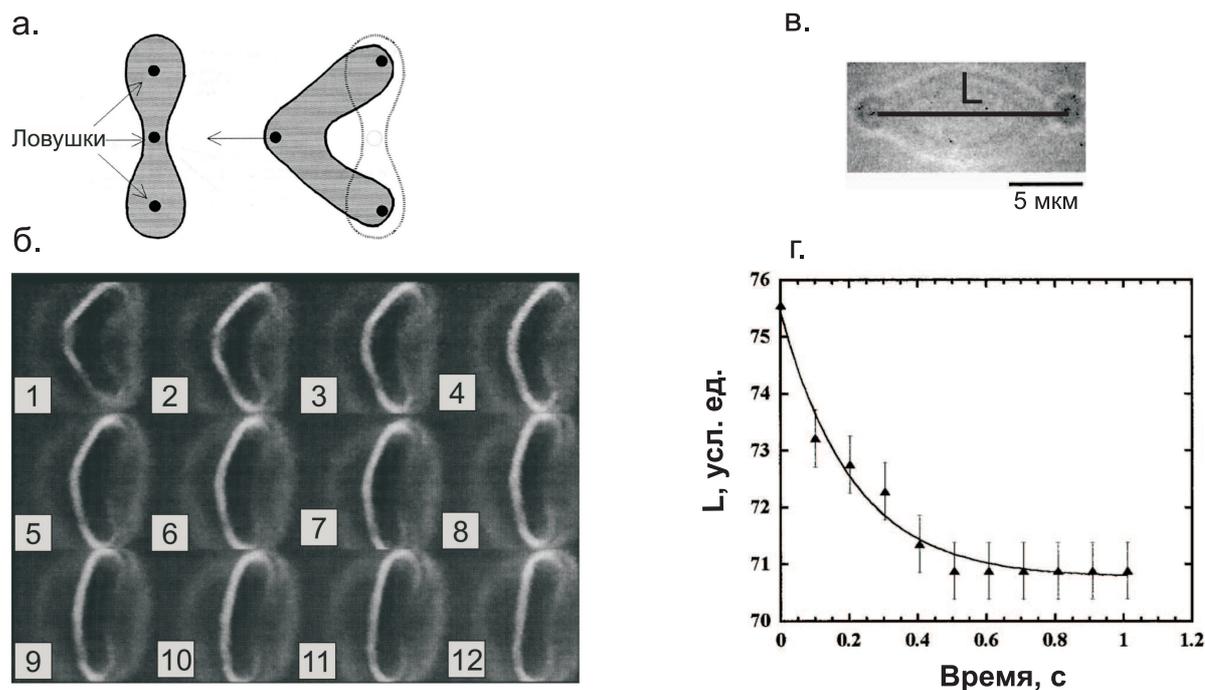


Рис. 16: Измерение времени восстановления формы эритроцита. а. Схема захвата и деформации эритроцита одновременно тремя ловушками для определения времени восстановления формы клетки [56]. б. Процесс восстановления формы эритроцита после выключения всех ловушек [56]. в. Растяжение эритроцита двумя оптически ловушками за прикрепленные к мембране микрочастицы [95]. г. Зависимость расстояния между прикрепленными частицами от времени после выключения оптических ловушек [95].

нием двухлучевого оптического пинцета. Для этого к одному из эритроцитов, формирующих двойной агрегат, прикреплялась сферическая микрочастица, которая захватывалась одной из оптических ловушек. Вторая ловушка захватывала край другого эритроцита в агрегате, после чего осуществлялось смещение одного эритроцита по другому путем перемещения второй ловушки. Измеряя смещение микрочастицы из центра первой ловушки при перемещении второй ловушки, вычислялась сила, необходимая для скольжения одного эритроцита по другому, как функция от скорости передвижения второй ловушки. Так же вычислялась видимая вязкость мембраны эритроцитов, составившая  $9,5 \cdot 10^{-4}$  пз·см. Это значение согласуется со значениями вязкости мембраны эритроцита, полученными другими методиками [96].

### 5.5. Фликкер эритроцитов: описание и методы исследования

Известно, что поверхность эритроцита в плазме или другой жидкости находится в состоянии непрерывных изгибных колебаний. Это явление называется *фликкером* эритроцитарной мембраны, исследование которого продолжается еще с 70-х годов 20-го столетия [97]. Относительно природы этого явления существует две теории. Согласно одной, фликкер появляется из-за преобразования химической энергии клетки в механическую в процессе различных метаболических процессов, происходящих в эритроците. Второе объяснение заключается в том, что колебания мембраны возбуждаются под действием броуновского теплового движения молекул в окружающей клетку жидкости. Таким образом говорят об активном и пассивном методах возбуждения фликкера эритроцитарной мембраны, соответственно [98]. Изгибные колебания поверхности мембран имеют широкое распределение длин волн. Эти моды колебаний имеют собственные частоты и, соответственно, времена затухания, которые определяются модулями упругости и вязкости клеток, а также их размерами и геометрическими параметрами. Характерные для фликкера эритроцитов частоты лежат в диапазоне от 0,1 до 100 Гц [98, 99].

Собственные моды колебаний мембраны эритроцита могут описываться двумя экспериментально измеряемыми величинами: пространственным спектром колебаний  $\langle u(q)^2 \rangle$  и частотным спектром колебаний (спектральной мощностью)  $G(\omega)$ , где  $u$  — смещение элемента мембраны из равновесного положения,  $q = 2\pi/\lambda$  — волновой вектор,  $\lambda$  — длина волны колебаний,  $f$  — частота колебаний,  $\omega = 2\pi f$ , угловые скобки — статистическое усреднение. Измерения и теоретический анализ [98, 99] показывают, что частотный спектр фликкера эритроцитов не содержит резонансных частот, а спектральная амплитуда очень быстро убывает с ростом частоты. Также возможно экспериментальное определение корреляционных функций смещений мембраны эритроцита. Согласно теореме Винера-Хинчина, спектральная мощность и корреляционная функция связаны Фурье-преобразованием.

Впервые экспериментальное измерение частотного спектра фликкера

эритроцита было проведено в работе [97], где было представлено исследование параметров фликкера в диапазоне 0,1 - 30 Гц и предложена первая количественная модель, описывающая это явление. Позже фликкер исследовался в ряде работ, в которых было продемонстрировано, что параметры частотного спектра фликкера значительно зависят, например, от уровня оксигенации клетки концентрации гемоглобина [100], ее формы [100] и области клетки, с которой регистрируются колебания мембраны [97, 101], а также параметров окружающей клетку среды [102].

Интерес к явлению фликкера эритроцитов вызван его значимостью для понимания биомеханики клеточных мембран и связью параметров, описывающих это явление, с вязко-упругими свойствами клеток. Характерные частоты и времена затухания собственных колебаний мембраны определяются механическими параметрами, а именно, модулями упругости и вязкости эритроцита и среды, а также геометрическими параметрами клетки. При этом величины этих модулей для живой клетки зависят от ее физиологического состояния, от условий окружающей среды.

Наиболее распространенными экспериментальными подходами для исследования фликкера клеток на сегодняшний день являются методы отражательного интерференционного контраста и фазового контраста [101, 103]. При этом основным недостатком таких методов исследования является отсутствие точного соотношения между регистрируемыми статистическими характеристиками фликкера, например, спектра колебаний, и истинным спектром колебаний мембраны. В случае применения микроскопии отсутствует возможность локализации клетки в требуемом месте и в требуемой геометрии, а также невозможно исключить влияние подложки, на которую осаждается клетка при подобных исследованиях. Поэтому задача разработки методики для прямой регистрации и анализа фликкера эритроцита вдали от подложки является актуальной и не решенной на данный момент.

## Глава II

### **Изучение вязкоупругих свойств одиночных эритроцитов методами активной и пассивной микрореологии в оптическом пинцете**

В диссертационной работе была разработана методика оптического пинцета для экспериментального исследования вязкоупругих свойств одиночных эритроцитов в широком диапазоне частот. Методическим аспектом этой части работы являлось объединение метода двухлучевого оптического пинцета и подходов, известных в литературе как методы активной и пассивной микрореологии. Для определения чувствительности методики были проведены калибровочные измерения корреляционных характеристик гидродинамического взаимодействия микрочастиц в воде. Для характеристики эластичности клеток в низкочастотном диапазоне до 100 Гц применялся подход, называемый методом пассивной микрореологии в оптическом пинцете, заключающийся в анализе статистических характеристик броуновского движения мембран оптически захваченных в жидкости клеток. Для исследования более высокочастотных особенностей упругих свойств эритроцитов (вплоть до 150 кГц) использовался метод активной микрореологии в оптическом пинцете. Для диапазона частот 100 Гц - 1 кГц была разработана методика измерения эффективного времени релаксации мембраны клетки при внешнем периодическом воздействии и показана чувствительность методики при контролируемом изменении эластичных свойств мембраны. Экспериментально исследовано воздействие излучения в оптических ловушках на эластичные свойства клеток во время эксперимента.

## 1. Материалы и методы для диагностики микромеханических свойств эритроцитов

### 1.1. Схема экспериментальной установки двухлучевого оптического пинцета

Схема экспериментальной установки двухлучевого оптического пинцета приведена на рисунке 17. В установке реализуется двухлучевая модификация оптического пинцета. Для формирования оптических ловушек использовались два непрерывных инфракрасных лазера с длиной волны излучения 980 нм (1, 2). Будем называть ловушку, создаваемую лазером (1), первой, а ловушку, создаваемую лазером (2) второй. Мощность излучения лазеров плавно изменялась в пределах от 0 – 330 мВт. Лазеры имеют поляризационно-сохраняющий волоконный выход, поэтому для получения параксиальных лучей использовались асферические линзы (3, 4) с фокусным расстоянием 4,5 мм. Луч лазера (1) проходили через систему конфокально расположенных линз (5) и объектива (6) с фокусными расстояниями 25,4 мм и 25,7 мм соответственно, причем объектив (6) представлял собой дуплет из двух линз с фокусными расстояниями 50 мм каждая. Эта система линз позволяла управлять положением оптической ловушки внутри образца путем перемещения линзы (5) перпендикулярно оптической оси. Луч лазера (2) направлялся на акустооптический дефлектор (7), с помощью которого изменялось положение второй оптической ловушки. Далее первый и второй лазерные лучи попадали на систему из двух линз (8) ( $f=30$  мм), (10) ( $f=150$  мм) и (9) ( $f=30$  мм), (10), соответственно, которая предназначена для расширения лазерных пучков до полной входной апертуры объектива. При этом линзы (5),(6),(8),(9),(10) были подобраны таким образом, чтобы смещение лазерных пучков не приводило к существенному изменению засветки входной апертуры объектива (12), и, тем самым, не приводило к изменению мощности излучения, формирующего оптическую ловушку. Для одновременного заведения обоих лазерных лучей в объектив использовался широкополосный делительный поляриза-

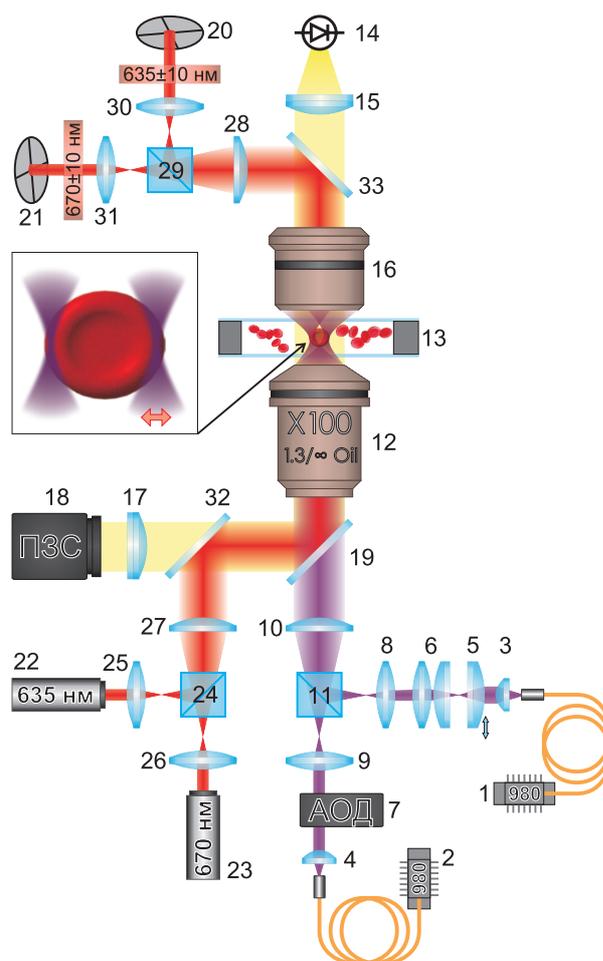


Рис. 17: Схема экспериментальной установки. 1, 2 — диодные лазеры с волоконными выходами; 3, 4 — асферические линзы; 5, 6 — система линз для смещения пучка лазера 1; 7 — акусто-оптический дефлектор; 8, 10 — формирователь пучка лазера 1; 9, 10 — формирователь лазерного пучка 2; 11 — делительный поляризационный куб; 12 — объектив; 13 — образец с исследуемой суспензией; 14 — светодиод; 15 — ахроматический дуплет; 16 — объектив; 17 — линза; 18 — ПЗС-камера; 19 — диэлектрическое зеркало; 20, 21 — квадрантные фотодиоды; 22 — лазер с длиной волны излучения 635 нм; 23 — лазер с длиной волны излучения 670 нм; 24 — делительный поляризационный куб; 25, 27 — формирователь пучка лазера 22; 26, 27 — формирователь пучка лазера 23; 28 — линза; 29 — делительный поляризационный куб; 30, 31 — линзы; 32, 33 — зеркала, на 99% отражающие излучение на длинах волн лазеров 22 и 23 (“red reflectors”).

онный куб (11). Лазерные пучки попадали на план полу-апохроматический масляно-иммерсионный объектив Olympus (12) с фокусным расстоянием 1,8

мм, скорректированным на бесконечность. На длине волны падающего излучения 980 нм пропускная способность этого объектива составляет около 60%. Числовая апертура объектива контролировалась встроенной ирисовой диафрагмой и могла изменяться от 0,6 до 1,3, при этом в работе использовалась числовая апертура 1,3. Рабочее расстояние объектива (12) составляло 0,2 мм при работе с покровными стеклами 0,17 мм. С помощью этого объектива лазерные лучи фокусировались внутри образца (13), расположенного на предметном столике. Образец представлял собой суспензию исследуемых объектов (микрочастиц или эритроцитов). Предметный столик был оборудован моторизованной системой трехкоординатного смещения, которая позволила перемещать ячейку с образцом перпендикулярно оптической оси объектива на 17 мм вдоль каждой оси. Минимальный шаг смещения составлял 39 нм.

Освещение для визуализации образца проводилось в геометрии “на просвет”. Система осветителя состояла из массива белых светодиодов со встроенным коллиматором и ирисовой диафрагмой (14), ахроматического дуплета (15) с фокусным расстоянием 200 мм и объектива (16), который представлял собой полуплан микрофлюар с фокусным расстоянием 4 мм и числовой апертурой 0,85. Свет, проходящий через образец, собирался объективом (12) и линзой (17) ( $f=150$  мм) на матрице ПЗС-камеры (18), подключенной к персональному компьютеру. Для заведения видимого излучения на ПЗС-камеру использовалось дихроичное диэлектрическое зеркало (19). 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  $45^\circ$ . Вторая поверхность зеркала имеет просветляющее покрытие для ближнего ИК диапазона длин волн излучения.

## *1.2. Система регистрации малых смещений микрообъектов, локализованных в оптических ловушках*

Регистрация малых смещений захваченных в оптические ловушки микрочастиц и краев эритроцитов осуществлялась с помощью системы на основе четырехсекционных (квадрантных) фотодиодов (КФД) (20) и (21). Квадрантные фотодиоды представляют собой четыре независимых фотодиода, рабочая поверхность которых — квадранты одного круга. Независимые измерения сигнала с каждого сектора КФД позволяют определить интенсивности и смещения рассеянных захваченными объектами лучей. Определение положения частицы, захваченной ловушкой, формируемой лазером (1), осуществлялось по рассеянному излучению дополнительно установленного лазера (22) с излучением на длине волны 635 нм. На квадрантном фотодиоде (20) объективом (16) собиралось рассеянное излучение от лазера (22). Для определения положения частицы, захваченной оптической ловушкой, формируемой лазером (2), был установлен лазер (23) с длиной волны излучения 670 нм и квадрантный фотодиод (21). Система линз (25), (26) с фокусным расстоянием 60 мм и (27) с фокусным расстоянием 175 мм была установлена для расширения лазерных пучков (22) и (23) до входной апертуры объектива (12). Система линз (28) с фокусным расстоянием 60 мм и (30), (31) с фокусными расстояниями 15 мм были необходимы для того, чтобы точка на обратной фокальной плоскости объектива (16) и соответствующая точка на поверхности квадрантного фотодиода были сопряженными. Тогда малые смещения оптически захваченных объектов внутри образца будут соответствовать таким же смещениям лучей от лазеров (22) и (23) на поверхностях квадрантных фотодиодов. Рассеянное исследуемыми объектами излучение лазеров (22) и (23) заводится на квадрантные фотодиоды (20) и (21) с помощью широкополосных делительных поляризационных кубов (24) и (29), рассчитанных на диапазон длин волн 620 - 900 нм и зеркал (32), (33), которые отражают более 99% излучения на длинах волн лазеров (22), (23) при падении под углом 45°. Для того, чтобы на КФД не попадало переотраженное излучение от светодиода (14), сразу после

него был выставлен фильтр СЗС-11, поглощающий красную часть спектра излучения светодиода. Используемые КФД сопряжены с блоками электроники, которые осуществляют преобразование исходных токов через секции КФД. Каждый блок имеет 3 выхода. Напряжения на этих выходах пропорциональны следующим величинам:

$$\begin{aligned} V_0 &\sim I_1 + I_2 + I_3 + I_4, \\ V_x &\sim I_1 - I_2 - I_3 + I_4, \\ V_y &\sim I_1 + I_2 - I_3 - I_4, \end{aligned} \quad (38)$$

где  $I_i$  – интенсивность света падающего на  $i$ -тый сектор КФД.

Тогда смещения лучей по осям  $x$  и  $y$  пропорциональны, соответственно,  $V_x/V_0$  и  $V_y/V_0$ .

Мощность световых пучков, формирующих оптические ловушки, определялась следующим образом. Вместо верхнего объектива (16) устанавливался объектив Olympus, идентичный объективу (12). Измеритель мощности оптического излучения (ИМО) устанавливался сразу после верхнего объектива так, чтобы все излучение попадало на чувствительную поверхность ИМО. Лучи от первого и второго лазера поочередно перекрывались, позволяя отдельно измерить мощность от каждого ( $P_1^{(1)}$  и  $P_2^{(1)}$  для каждого из лучей, соответственно). После этого ИМО устанавливался перед нижним объективом (12). Измерения мощности проводились для каждого из лучей отдельно ( $P_1^{(2)}$  и  $P_2^{(2)}$ ). Мощность каждой из ловушек внутри образца вычислялась исходя из следующего:

$$P_{1,2}^{(1)} = P_{1,2}^{(2)} t^2, \quad (39)$$

$$P_{1,2}^{trap} = P_{1,2}^{(2)} t, \quad (40)$$

$$P_{1,2}^{trap} = \sqrt{P_{1,2}^{(1)} P_{1,2}^{(2)}}, \quad (41)$$

где  $t$  – коэффициент прохождения лазерного излучения через объектив (12) и одно покрывное стекло.

График зависимости мощности одного из лазерных лучей внутри образца  $P_2^{trap}$  от выходной мощности лазера (2)  $P_2^0$  представлен на рисунке 31.

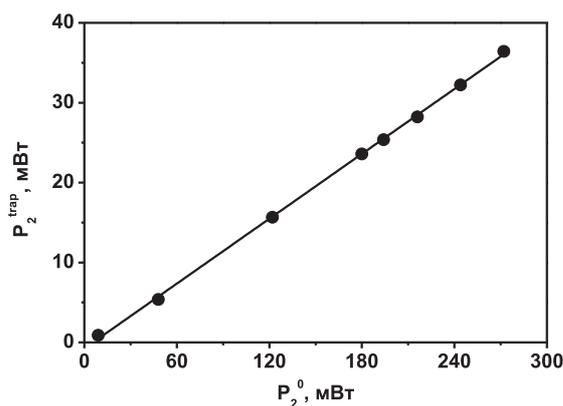


Рис. 18: Градуировка мощности излучения во второй ловушке.

Для первого луча зависимость мощности излучения в ловушке от мощности выходного лазерного излучения аналогична.

## 2. Калибровка оптического захвата микрочастиц и более сложных микробъектов — краев эритроцитов

Для проведения количественных измерений с помощью метода оптического пинцета необходима калибровка сил оптического захвата для заданного объекта исследования. Сила оптического захвата зависит от его размера, формы, от показателя преломления объекта и окружающей среды.

### 2.1. Управление полистироловыми частицами, калибровка акустооптического дефлектора

В используемой установке оптического пинцета реализована двухлучевая схема, позволяющая одновременно производить захват двух микробъектов на контролируемом расстоянии друг от друга. Для проведения количественных измерений сил и малых смещений сложных микробъектов, таких как эритроциты, необходимо предварительно провести ряд тестовых экспериментов по калибровке и проверке чувствительности установки на простых микробъектах. Для этого использовалась суспензия полистироловых сфер диаметром  $2,5 \pm 0,4$  мкм в дистиллированной воде. Концентрация частиц в суспензии составляла 0,05 мг/мл. Изготавливался образец, представляющий собой сус-

пензию, помещенную в зазор между двумя покровными стеклами. Покровные стекла предварительно обрабатывались поверхностно-активным веществом (ПАВ), этиловым спиртом, 3% перекисью водорода и промывались дистиллированной водой.

Далее проводился оптический захват двух микрочастиц. Для этого фокус объектива (12), формирующего ловушки, наводится на образец. Зная положения ловушек на получаемом с камеры изображении, предварительно выбранная на экране монитора частица совмещается с положением одной из ловушек с помощью шаговых двигателей, перемещающих предметный столик. При попадании микрочастицы в область оптической ловушки — происходит захват этой частицы. Аналогично проводится оптический захват другой частицы во вторую ловушку. Ее положением можно управлять в плоскости наблюдения, изменяя напряжение, подаваемое на вход акусто-оптического дефлектора (7). Важным этапом калибровочных измерений является сопоставление расстояния между оптическими ловушками и подаваемым на акусто-оптический дефлектор напряжением. В обе ловушки были захвачены частицы. Затем последовательно изменялось напряжение, подаваемое на акусто-оптический дефлектор, и сопоставлялось с расстояниями между частицами, полученными с помощью ПЗС-камеры. Результаты этого эксперимента показаны на рисунке 19. Сплошная кривая на графике — линейная аппроксимация полученных данных.

Таким образом, для дальнейших экспериментов были получены данные, позволяющие точно управлять расстоянием между оптическими ловушками.

## *2.2. Калибровка оптического захвата микросфер: метод пассивной микро-реологии для измерения авто- и кросс-корреляций смещений микро-частиц*

Оптически захваченный микрообъект, взвешенный в жидкости, совершает броуновские смещения. Если два микрообъекта захвачены друг от друга на расстоянии, сравнимым с их размером, малые броуновские смещения частиц

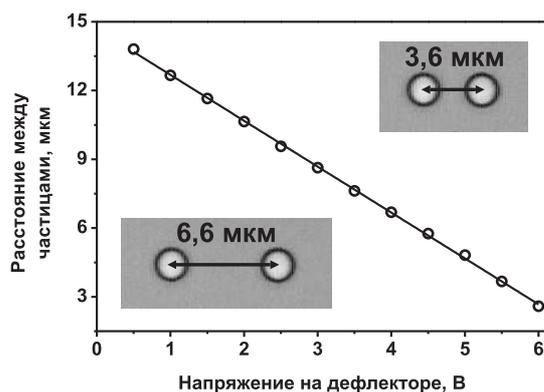


Рис. 19: Градуировка расстояний между захваченными частицами. На вставках показаны фрагменты получаемого с ПЗС-камеры изображения.

становятся зависимы, так как они взаимодействуют друг с другом посредством окружающей их среды. Метод оптического пинцета позволяет напрямую измерять малые смещения захваченных микрочастиц и, применяя метод пассивной микрореологии, исследовать гидродинамическое взаимодействие двух микрочастиц, взвешенных в жидкости [33], а именно, измерять корреляционные функции смещений микрочастиц, что, например, необходимо для калибровки жесткости оптического захвата. В ходе работы были экспериментально получены авто- и кросс-корреляционные функции малых смещений двух захваченных в оптический пинцет частиц на контролируемом расстоянии друг от друга. Для этого две частицы полистирола захватывались на небольшом расстоянии друг от друга (около 4 – 5 мкм) и поднимались на высоту 10 мкм от нижнего покровного стекла, чтобы исключить его гидродинамическое влияние на полученные результаты. Мощность лазерного излучения составляла около 11,6 мВт в первой ловушке и 10,6 мВт во второй. Такая интенсивность выбиралась для того, чтобы броуновское движение частиц в ловушках имело амплитуду порядка 10 нм, достаточную для корреляционного анализа. Далее настраивалось положение верхнего объектива (16) и квадрантных фотодиодов (20), (21) так, чтобы на этих фотодиодах получалась симметричная картина рассеяния частицами лазерных лучей (22) и (23), соответственно. С помощью аналого-цифрового преобразователя запи-

сывался сигнал одновременно со всех каналов двух КФД (20) и (21) в течении  $\sim 100$  с с частотой дискретизации 100 кГц. Получали значения  $V_x^1$  и  $V_x^2$ , соответствующие смещениям лучей по поверхностям КФД вдоль оси  $X$ , то есть оси, выбранной вдоль линии, соединяющей захваченные частицы.

По данным, полученным в эксперименте, строились корреляционные функции смещения лучей. Предполагая, что эти смещения линейным образом связаны с малыми смещениями частиц в ловушках:  $x_1 = SV_x^1$  и  $x_2 = SV_x^2$ , автокорреляционные функции аппроксимировались приведенными в литературном обзоре теоретическими зависимостями 34. Из аппроксимации вычислялись коэффициенты эффективной жесткости оптической ловушки для исследуемых объектов. По оси  $X$  эффективные жесткости составили  $k_{x1} = 12,88 \pm 0,02$  пН/мкм для первой ловушки и  $k_{x2} = 8,67 \pm 0,04$  пН/мкм для второй ловушки. По результатам аппроксимации был найден коэффициент  $S$  для перевода шкалы значений корреляционной функции в абсолютные значения. Таким образом, калибровка установки позволила сопоставить величину сигнала КФД со смещением микросфер. Графики авто- и кросс-корреляционных функций смещений микрочастиц приведены на рисунке 20.

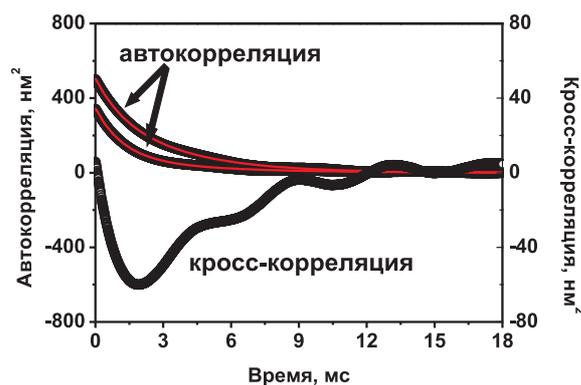


Рис. 20: Корреляционные функции смещения частиц из положения равновесия вдоль оси, соединяющей частицы. Красные линии – аппроксимации автокорреляционных функций для первой (верхняя линия) и второй частицы (нижняя линия) теоретической зависимостью 34. Кросс-корреляционная функция для смещений двух частиц приведена для расстояний между их центрами 4,2 мкм.

Видно, что кросс-корреляционная функция отрицательна во всем временном диапазоне и имеет минимум. Положение минимума близко к среднему значению  $\langle \tau_x \rangle = (\tau_{x1} + \tau_{x2})/2 = 2,3$  мс, как и было предположено в пункте 3.2 Главы I.

Так же при калибровке строились распределения смещений микрочастиц из центров обеих оптических ловушек. На рисунке 21 показаны экспериментально полученные значения распределения смещений микросфер из центров первой и второй ловушек при расстоянии между ними 4,2 мкм и аппроксимация функцией Гаусса (29). Наблюдается хорошее соответствие экспериментальных значений и теоретической аппроксимации, что говорит о верности предположения о линейной связи возвращающей силы со смещением микрочастицы из положения равновесия.

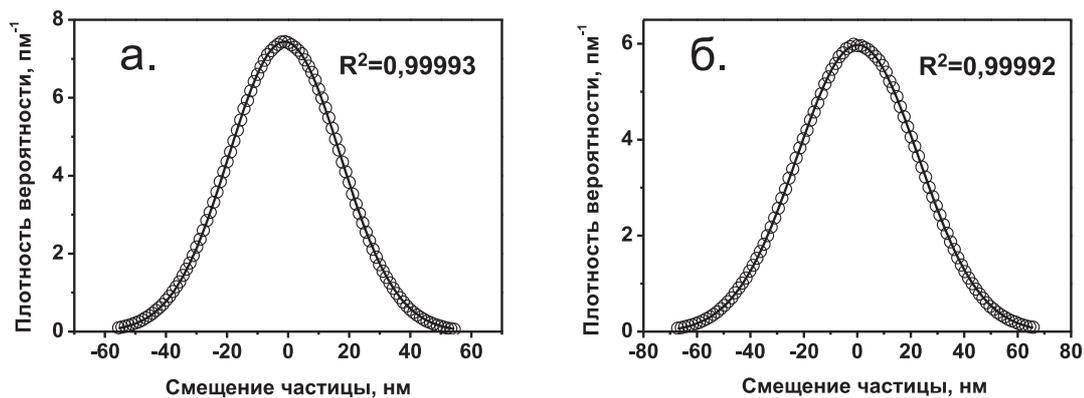


Рис. 21: Функция распределения положения частиц, захваченных в первую (а) и во вторую (б) ловушку при расстоянии между частицами 4,2 мкм. Сплошная линия – аппроксимация функцией Гаусса. Распределение построено по 100 точкам в диапазоне от -3 до 3 стандартных отклонений.

### 2.3. Калибровка оптического захвата краев эритроцитов

Для оценки максимальной силы  $F_{esc}$ , действующей на эритроцит, оптически захваченный в аутологичной плазме при фиксированной мощности в ловушке, был проведен эксперимент, состоящий из двух частей.

### 2.3.1 Сравнение сил оптического захвата края эритроцита и микросферы

Сначала был изготовлен натрий-фосфатный буфер, представляющий собой изотонический водный раствор хлорида натрия (137 ммоль), гидрофосфата натрия (10 ммоль), хлорида калия (2,7 ммоль) и дигидрофосфата калия (1,76 ммоль). Осмотическая концентрация и рН буфера идентична плазме крови, поэтому в таком растворе возможно хранение эритроцитов. Далее 0,5 мл цельной крови суспендировалось в 2 мл натрий-фосфатного буфера. В суспензию добавлялись карбоксилированные полистироловые микрочастицы с диаметром 3 мкм в соотношении 1:1 к количеству эритроцитов. Микрочастицы предварительно отмывались в натрий-фосфатном буфере методом центрифугирования со скоростью вращения ротора центрифуги 3000 об/мин и временем центрифугирования – порядка 5 минут. Поверхностные стекла, используемые для этого эксперимента, обрабатывались раствором человеческого альбумина для уменьшения адгезии микрочастиц к стеклу. Далее изготавливался образец с суспензией микрочастиц и эритроцитов.

Следует отметить, что эритроцит имеет сравнительно большой размер (около 8 мкм) по сравнению с размером перетяжки каждой из ловушек ( $\sim 1$  мкм), поэтому оптический захват обычно происходит не в центре клетки, а с ее края. При этом эритроциты в ловушке всегда ориентируются вдоль направления излучения, как показано на рисунке 22. Это происходит вследствие того, что оптическая ловушка обычно обладает различной жесткостью в плоскости образца и в направлении распространения луча.

Одиночная клетка и микрочастица захватывались в две оптические ловушки, поднимались на высоту 10 мкм над нижним поверхностным стеклом (рисунок 22а). Эта высота соответствовала той, на которой в дальнейшем проводились все эксперименты по измерению сил взаимодействия между клетками. Сближая оптические ловушки, край эритроцита и микрочастица приводили в контакт (рисунок 22б). За 1–2 минуты, частица необратимо прикреплялась к мембране эритроцита. Далее мощность лазерного излучения  $P_1$  в ловушке, соответствующей краю эритроцита, устанавливалась равной 20

мВт, а мощность  $P_2$  в ловушке, соответствующей микрочастице, изменялась. Подбиралось такое значение мощности  $P_2$ , чтобы при увеличении расстояния между оптическими ловушками (рисунок 22в) события вылета микрочастицы или края эритроцита из соответствующих перетяжек были равновероятным (рисунок 22г). В таком случае максимальная сила оптического захвата  $F_{esc}$  края эритроцита и микрочастицы равны. Для  $P_1=20$  мВт соответствующее значение  $P_2$  оказалось равным  $17\pm 1$  мВт по выборке из 5 различных эритроцитов и микрочастиц. На рисунке 22ж изображена характерная микрофотография эритроцита и прикрепленной к нему микрочастицы.

### *2.3.2 Сравнение силы оптического захвата микросферы и силы вязкости*

Вторая часть эксперимента предполагала определение максимальной силы оптического захвата микрочастицы для мощности  $P_2$  в среде, для которой показатель преломления, а значит, и сила оптического захвата, совпадали бы с характеристиками человеческой плазмы, так как все дальнейшие эксперименты по измерению сил агрегации эритроцитов проводились именно в аутологичной для клеток плазме. Был изготовлен 15% водный раствор глицерина. Измеренные с помощью рефрактометра Аббе показатели преломления раствора и человеческой плазмы оказались равны и составляли величину  $n=1,351$  (число Аббе  $V=42$ ). Далее изготавливалась суспензия микрочастиц в растворе глицерина. Одиночная микросфера удерживалась в соответствующей оптической ловушке на высоте  $h=10$  мкм над нижним поверхностным стеклом (рисунок 22е). При этом кювета с образцом была оборудована моторизованным трансляционным столиком. Шаговый двигатель этого транслятора имел возможность смещать ячейку с исследуемой суспензией частиц с точностью 40 нм с программно задаваемой скоростью (рисунок 22ж). Постепенно увеличивая скорость передвижения транслятора (рисунок 22з), определялось значение минимальной скорости, при которой захваченная частица начинала вылетать из оптической ловушки (рисунок 22и). Это значение соответствует максимально возможной скорости движения захваченной части-

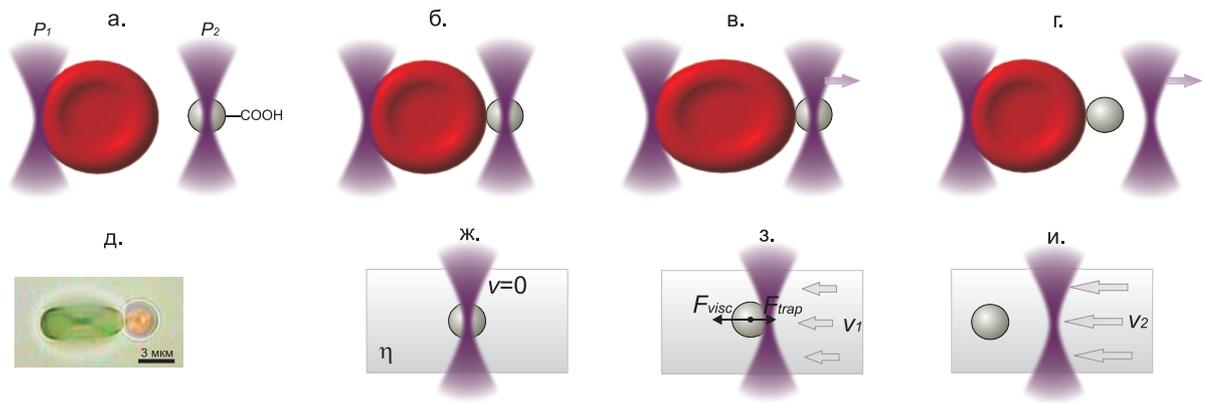


Рис. 22: Калибровка силы оптического захвата края эритроцита в 2 этапа — поиск мощностей лазерных ловушек для одинаковой силы захвата для края эритроцита и сферической микрочастицы с известным диаметром (а. –д.) и определение силы захвата микрочастицы для соответствующей лазерной мощности путем ее сравнения с силой вязкого трения (е. – и.). а. — карбоксилированная микрочастица и край эритроцита захвачены в две оптические ловушки с мощностью лазерного излучения в перетяжке пучка  $P_1$  и  $P_2$ , соответственно. б. — микрочастица и край эритроцита приводятся в контакт друг с другом, микрочастица прикрепляется к мембране эритроцита. в. — оптические ловушки раздвигаются в противоположные стороны. г. — Находятся такие  $P_1$  и  $P_2$ , чтобы события выскакивания края эритроцита и микрочастицы из ловушек были равновероятны. д — микрофотография системы эритроцит+частица, захваченной в двухлучевом оптическом пинцете. е. — Захват одиночной микрочастицы в оптическую ловушку с мощностью излучения в перетяжке  $P_2$ . ж. — Движение среды с известной вязкостью относительно микрочастицы, захваченной в оптическую ловушку. з. — Пошаговое увеличение скорости набегающего потока жидкости. и. — Вылет микрочастицы из ловушки при достижении условия равенства силы оптического захвата и силы вязкого трения.

цы относительно среды, при которой максимальная сила оптического захвата  $F_{trap}$  сравнивается с силой вязкости  $F_{visc}$ , действующей на микрочастицу. Для серии из 6-ти рассмотренных частиц среднее значение данной величины составило  $6 \pm 0,5$  тыс. шагов в секунду, или  $230 \pm 20$  мкм/с. По закону Стокса  $F_{visc} = \gamma v$ , где  $\gamma$  — коэффициент вязкого трения для сферической частицы радиуса  $r$ ,  $v$  — скорость среды относительно микрочастицы. При учете вли-

яния близости поверхности покровного стекла к захваченной микрочастице коэффициент  $\gamma$  выражается как [20]:

$$\gamma = \frac{6\pi\eta r}{1 - \frac{9}{16}\frac{r}{h} + O\left[\left(\frac{r}{h}\right)^3\right]}, \quad (42)$$

где  $\eta$  — динамическая вязкость жидкости,  $r$  — радиус микрочастицы,  $h$  — расстояние от микрочастицы до поверхности кюветы. Коэффициент динамической вязкости для 15% раствора глицерина при температуре 25 °C составляет  $\eta = 1,32 \pm 0,02$  мПа·с [104]. Отсюда следует оценочное значение для силы вязкости  $F_{vis}$ , а значит и для максимальной силы оптического захвата  $F_{trap}$  микрочастицы в ловушке с мощностью  $P_2 = 17 \pm 1$  мВт, которое составило  $29 \pm 2$  пН. Формула Стокса применима при малых числах Рейнольдса  $R = ul\rho/\eta \ll 1$ , где  $u$  — характерная скорость течения жидкости,  $l$  — характерный размер гидродинамической системы. Для погруженной в жидкость сферической частицы такими характерными параметрами могут выступать скорость и диаметр  $d$  этой частицы. В рассмотренном случае  $R \sim 10^{-3}$  ( $\rho = 1036$  кг/м<sup>3</sup> для 15% раствора глицерина).

Зная, что значение максимальной силы оптического захвата микрочастицы для ловушки с мощностью излучения  $P_2 = 17 \pm 1$  мВт соответствует силе оптического захвата края эритроцита с мощностью  $P_1 = 20$  мВт, было получено итоговое значение силы захвата края эритроцита  $29 \pm 3$  пН при мощности излучения в ловушке 20 мВт. Максимальная сила захвата края эритроцита  $F_{esc}$  пропорциональна мощности лазерного излучения  $P$  в ловушке с коэффициентом пропорциональности  $\alpha = 1,45 \pm 0,15$  пН/мВт.

Полученное описанным способом значение максимальной силы захвата можно использовать в качестве независимой от свойств захватываемых объектов калибровки установки.

### 2.3.3 Определение жесткости ловушки при оптическом захвате края эритроцита и эффективной жесткости клетки для малых деформаций

Зная значения сил оптического захвата краев эритроцита для соответствующих мощностей излучения в перетяжках, можно определить жесткость лову-

шек при захвате эритроцитов. Для этого был проведен следующий эксперимент. Одиночный эритроцит захватывался с двух противоположных сторон двумя оптическими ловушками и поднимался на высоту 25 мкм от нижнего покровного стекла. Мощность излучения в первой ловушке составляла 20 мВт, соответственно сила захвата  $F_{trap}$  составляла  $29 \pm 3$  пН, и ее положение фиксировалось. Вторая ловушка равномерно смещалась, растягивая эритроцит, по тех пор, пока клетка не “выскальзывала” из ловушки. Эксперимент повторялся для различных сил захвата второй ловушки  $F_{esc}$ , конфигурация эксперимента показана на вставке рисунка 23. Обработывая изображения эритроцита, полученные с помощью оптической микроскопии, регистрировались максимальные смещения края эритроцита из первой неподвижной ловушки, а также величины удлинения клетки для различных сил захвата второй ловушки. Результаты измерений были усреднены по выборке из 10 различных эритроцитов. На рисунке 23а. представлена зависимость максимально возможного смещения края эритроцита  $dx$  из центра первой ловушки от силы захвата второй двигающейся оптической ловушки  $F_{esc}$ . Для малых смещений края эритроцита зависимость оказалась линейной. Линейная аппроксимация начальной части зависимости дает значение эффективной жесткости оптического захвата края эритроцита  $k \sim 9 \pm 1$  пН/мкм для силы захвата  $29 \pm 3$  пН. Одновременно в эксперименте фиксировалось удлинение клетки при малых деформациях  $dl$  для различных сил захвата второй ловушки. Результаты измерений представлено на рисунке 23б. При силах до 15 пН зависимость является линейной с коэффициентом пропорциональности  $K = 13 \pm 2$  пН/мкм, который соответствует эффективной жесткости клетки. Полученное таким образом значение эффективного модуля упругости эритроцита соответствует значениям из литературы, полученным другими способами [10, 14, 105].

### 3. Диагностика упруго-вязких свойств одиночных эритроцитов

Взаимодействие рассмотренных в предыдущем пункте частиц в основном определяется вязкими характеристиками среды, в которой они захвачены.

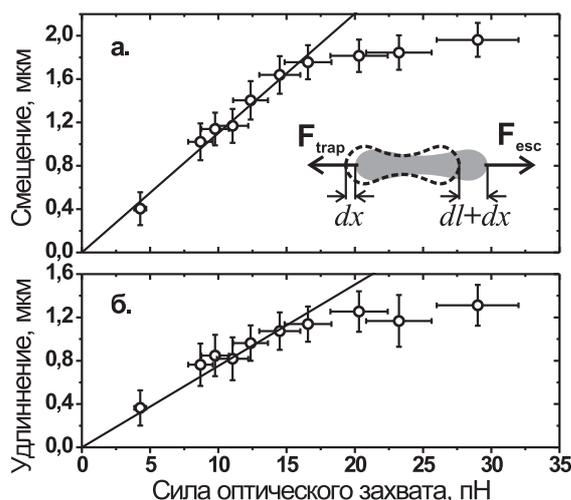


Рис. 23: Определение жесткости оптического захвата края эритроцита и эффективной жесткости клетки при малых деформациях. а. Смещение края эритроцита  $dx$  из неподвижной оптической ловушки с силой захвата  $F_{trap}$  как функция силы оптического захвата двигающейся ловушки  $F_{esc}$ . Сплошная линия — линейная аппроксимация экспериментальных данных для малых смещений и сил до 15 пН. б. Удлинение эритроцита  $dl$  как функция силы оптического захвата двигающейся ловушки  $F_{esc}$ . Сплошная линия — линейная аппроксимация экспериментальных зависимостей до 15 пН, то есть для малых деформаций.

Именно поэтому микрочастицы зачастую используются в качестве зондов для характеристики механических свойств сред. Однако используя подходы активной и пассивной микрореологии, можно исследовать механические свойства произвольных объектов, в частности протяженных клеток и их мембран.

### 3.1. Метод пассивной микрореологии для определения упруго-вязких свойств одиночных эритроцитов

Как было показано в литературном обзоре, мембраны взвешенных в жидкости эритроцитов находятся в постоянном хаотическом колебательном движении, называемом фликкером, спектр которого лежит в диапазоне частот 1 — 100 Гц. Причем статистические характеристики фликкера определяются механическими свойствами клетки. В работе была продемонстрирована воз-

возможность измерения параметров фликкера эритроцитарной мембраны методом пассивной микрореологии в двухлучевом оптическом пинцете, который в отличие от альтернативных методов, описанных в литературном обзоре, позволяет позиционировать клетку вдали от подложки и напрямую измерять малые смещения мембраны. Для изготовления образцов использовалось небольшое количество артериальной донорской крови, объемом около 0,2 мл. Цельная кровь дважды отмывалась в натрий-фосфатном буфере путем ее центрифугирования для того, чтобы в образец не попали отличные от эритроцитов форменные элементы крови, которые могли бы помешать измерениям. Далее отмытые эритроциты суспендировались в 1 мл натрий-фосфатного буфера.

Одиночный эритроцит захватывался одновременно двумя ловушками за противоположные края и поднимался на высоту 10 мкм над нижним покровным стеклом. Сила оптического захвата краев эритроцита составляла около 7 пН. Соответственно, жесткость оптического захвата — около  $2,2 \pm 0,2$  пН/мкм (см. пункт 2.3). Расстояние между ловушками составляло  $\sim 7$  мкм, что соответствует практически недеформированному захваченному эритроциту. Картина рассеяния лазерного излучения (лазеры 22 и 23) на краях эритроцита представляла собой достаточно контрастную интерференционную картину для измерения малых смещений краев эритроцита с помощью КФД в относительных единицах. В течение 100 секунд регистрировались смещения противоположных краев эритроцита. Далее рассчитывались авто- и кросс-корреляционные функции смещений краев клетки.

Вид корреляционных функций смещений краев эритроцита определяется механическими свойствами клетки: вязкостью и упругостью. В работе проводилось сравнение корреляционных функций смещений краев нормальных эритроцитов и клеток, жесткость которых была заранее контролируемо увеличена. Это достигалось путем фиксации эритроцитов с помощью 4% раствора глутарового альдегида — органического вещества, которое обычно используется для фиксации различных биологических тканей. Глутаровый альдегид представляет собой крупномолекулярное вещество, которое форми-

рует ковалентные химические связи между белками ткани, в следствие чего она становится более жесткой. Эксперимент был проведен для 20 различных нормальных эритроцитов и 20 фиксированных жестких клеток. Характерные графики нормированных авто- и кросс-корреляционных функций смещений противоположных краев эритроцита, полученных для нормальных и фиксированных клеток, показаны на рисунке 24а, б, соответственно. Черными и серыми точками обозначены нормированные авто-корреляционные функции смещений первого и второго краев эритроцита, соответственно, синими точками — нормированные кросс-корреляционные функции смещений двух краев захваченной клетки. Видно, что кросс- и авто-корреляционные функции смещений краев клетки спадают на характерных временных масштабах около 0,2 секунд, то есть за время примерно в 40 раз меньшее по сравнению с корреляционными функциями смещений микрочастиц в воде при их гидродинамическом взаимодействии.

Для объяснения полученных корреляционных функций удобно использовать подход, описанный в работах [33, 106, 107]. Рассмотрим взаимодействие двух объектов, в нашем случае двух краев эритроцитов, на каждый из которых действуют случайные броуновские силы  $f_1$  и  $f_2$ , соответственно, силы оптического захвата, силы вязкости и упругости. Запишем для смещений  $x_1$  и  $x_2$  двух краев эритроцита уравнения Ланжевена:

$$\begin{pmatrix} \dot{x}_1 \\ \dot{x}_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A_{11} & A_{12} \\ A_{21} & A_{22} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} f_1(t) - kx_1 + K(x_2 - x_1) \\ f_2(t) - kx_2 + K(x_1 - x_2) \end{pmatrix}, \quad (43)$$

где  $A_{i,j}$  — компоненты тензора подвижности,  $k$  — жесткость оптической ловушки при захвате края эритроцита,  $K$  — коэффициент эффективной жесткости клетки,  $f_1$  и  $f_2$  — случайные броуновские силы, действующие на первый и второй край эритроцита, соответственно, и имеющие следующие моменты:

$$\begin{aligned} \langle f_i(t) \rangle &= 0, \\ \langle f_i(t)f_i(t + \tau) \rangle &= \frac{2A_{11}}{A_{11}^2 - A_{12}^2} k_b T \delta(\tau), \\ \langle f_i(t)f_j(t + \tau) \rangle &= -\frac{2A_{12}}{A_{11}^2 - A_{12}^2} k_b T \delta(\tau), \end{aligned} \quad (44)$$

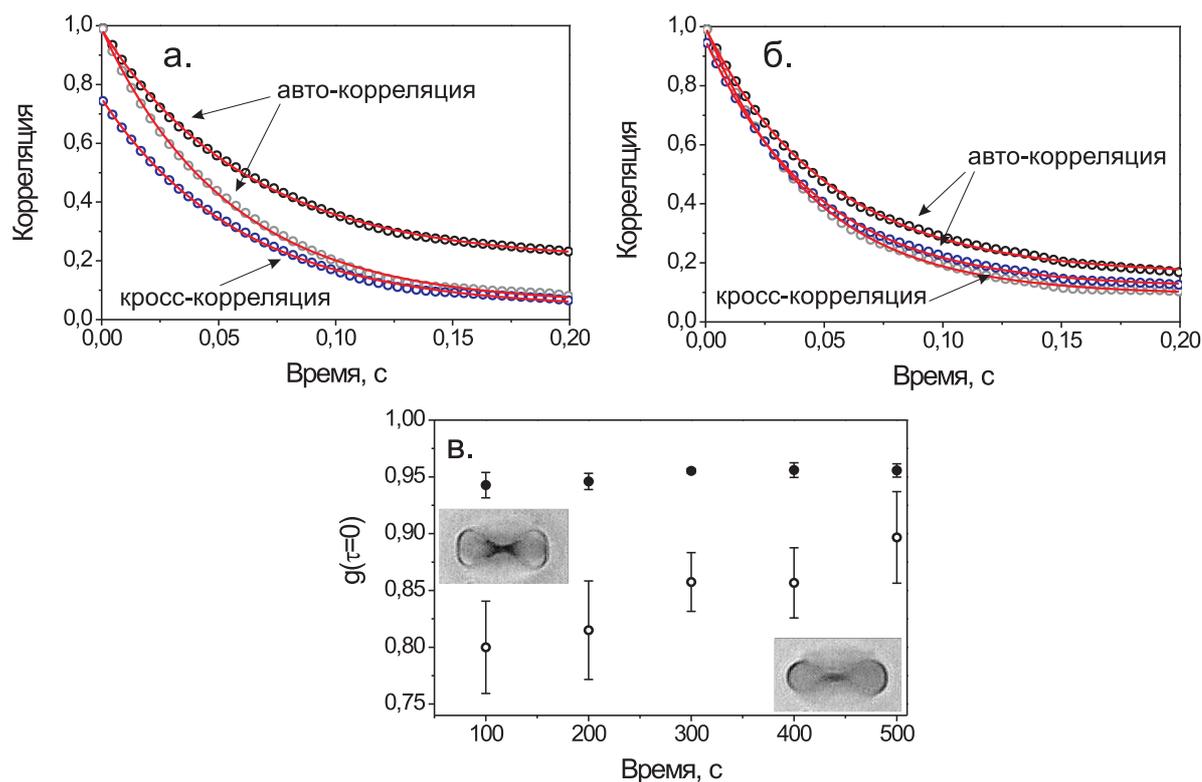


Рис. 24: Корреляционный анализ малых смещений краев эритроцитов. а. Нормированные авто- (черные и серые точки) и кросс-корреляции (синие точки) смещений краев нормального эритроцита. Красные линии соответствуют аппроксимации экспериментальных данных выражениями 47 и 48 для авто- и кросс-корреляционных функций смещений краев эритроцита, соответственно. б. Нормированные авто- (черные и серые точки) и кросс-корреляции (синие точки) смещений краев фиксированного жесткого эритроцита. Красные линии соответствуют аппроксимации экспериментальных данных выражениями 47 и 48 для авто- и кросс-корреляционных функций смещений краев эритроцита, соответственно. в. Зависимость значения кросс-корреляционной функции  $g(\tau = 0)$  от времени пребывания клетки в оптических ловушках. Пустые точки соответствуют нормальным эритроцитам, заполненные — фиксированным клеткам. Нижняя микрофотография на графике — нормальный эритроцит, захваченный двумя оптическими ловушками в противоположных краев. Верхняя микрофотография — фиксированный эритроцит.

где  $i, j = 1, 2; i \neq j$ ,  $\delta(\tau)$  — дельта-функция. Для решения уравнений Ланжевена необходимо перейти к переменным, соответствующим коллективной  $X_1$

и относительной  $X_2$  модам движения клетки:

$$\begin{aligned} X_1 &= \frac{(x_1 + x_2)}{\sqrt{2}}, \\ X_2 &= \frac{(x_1 - x_2)}{\sqrt{2}}. \end{aligned} \quad (45)$$

Тогда уравнения 43 примут вид:

$$\begin{aligned} \dot{X}_1 &= (A_{11} + A_{21})\left(\frac{f_1(t) + f_2(t)}{\sqrt{2}} - kX_1\right), \\ \dot{X}_2 &= (A_{11} - A_{21})\left(\frac{f_1(t) - f_2(t)}{\sqrt{2}} - (k + 2K)X_2\right). \end{aligned} \quad (46)$$

Решая уравнения Ланжевена относительно  $X_1$  и  $X_2$  и выражая  $x_1$  и  $x_2$  через них, можно получить выражение для нормированной авто-корреляционной функций смещений краев эритроцитов:

$$\begin{aligned} G(\tau) &= \frac{\langle x_1(t)x_1(t + \tau) \rangle}{\langle \Delta x_1^2 \rangle} = \\ &= \frac{k + 2K}{2(k + K)} e^{-k(1 + \frac{A_{12}}{A_{11}})A_{11}\tau} + \frac{k}{2(k + K)} e^{-(k+2K)(1 - \frac{A_{12}}{A_{11}})A_{11}\tau}. \end{aligned} \quad (47)$$

Кросс-корреляционная функция будет выражаться следующим образом:

$$\begin{aligned} g(\tau) &= \frac{\langle x_1(t)x_2(t + \tau) \rangle}{\langle \Delta x_1^2 \rangle \langle \Delta x_2^2 \rangle} = \\ &= \frac{k + 2K}{2(k + K)} e^{-k(1 + \frac{A_{12}}{A_{11}})A_{11}\tau} - \frac{k}{2(k + K)} e^{-(k+2K)(1 - \frac{A_{12}}{A_{11}})A_{11}\tau}, \end{aligned} \quad (48)$$

где

$$\langle \Delta x_{1,2}^2 \rangle = \frac{k_b T (k + K)}{k(k + 2K)} \quad (49)$$

— дисперсия смещений частиц. На рисунке 24 красными линиями показана аппроксимация авто- и кросс-корреляционных функций смещений краев клетки выражениями 47 и 48, соответственно. Важно отметить, что значение кросс-корреляционной функции  $g$  при  $\tau = 0$  значительно отличается для нормальных и фиксированных клеток. Среднее значение  $g(\tau = 0)$  для нормальных эритроцитов, полученное при усреднении данных в течение 100 секунд для каждой клетки и для выборки из 10 различных клеток внутри одного образца крови, составило  $0,80 \pm 0,04$ . Для фиксированных клеток это значение составило  $0,94 \pm 0,01$  для такой же выборки из 10 эритроцитов внутри одного образца крови. Это означает, что упругие свойства клеток определяют вид кросс-корреляционных функций малых смещений противоположных

краев эритроцита. Рассмотрим вид выражения 48 для кросс-корреляционной функции смещений краев эритроцита в случае  $\tau = 0$ :

$$g(\tau = 0) = \frac{k + 2K}{2(k + K)} - \frac{k}{2(k + K)} = \frac{K}{K + k}. \quad (50)$$

Таким образом, измеряя  $g(\tau = 0)$  и зная жесткость захвата края эритроцита  $k$ , можно определять эффективную жесткость эритроцита:

$$K = \frac{kg(\tau = 0)}{1 - g(\tau = 0)}. \quad (51)$$

То есть предполагается, что чем больше значение  $K$ , тем больше должно быть значение  $g(\tau = 0)$ . На рисунке 24в. представлены значения  $g(\tau = 0)$ , измеренные для нормальных клеток (незаполненные точки) и для эритроцитов, зафиксированных глутаровым альдегидом (заполненные точки). По оси  $X$  отложено время, в течение которого клетки пребывали в оптических ловушках. В эксперименте захватывался одиночный эритроцит, регистрировались малые смещения его противоположных краев в течение 100 секунд, после чего рассчитывалось значение  $g(\tau = 0)$ . Далее для того же оптически захваченного эритроцита процедура повторялась еще 4 раза, то есть каждый эритроцит пребывал в оптических ловушках в течение 500 секунд. Каждая экспериментальная точка на графике соответствует усреднению по 10 нормальным клеткам и 10 фиксированным, соответственно. Видно, что значения  $g(\tau = 0)$  для жестких фиксированных эритроцитов больше тех же значений для нормальных эритроцитов, что соответствует выражению 51. Эффективная жесткость нормальных клеток составила  $K_{norm} = 9,6 \pm 3,2$  пН/мкм, что согласуется с независимыми измерениями эластичных свойств клетки, рассмотренными в пункте 2.3.3, а также данными из литературы [10,14,105]. Значение эффективной жесткости для фиксированных клеток составило  $K_{fixed} = 45 \pm 9$  пН/мкм. Важно отметить, что значения  $g(\tau = 0)$  для фиксированных клеток практически не изменялись во времени. Для нормальных эритроцитов наблюдается рост значений  $g(\tau = 0)$  при возрастании времени пребывания клетки в оптических ловушках. Это может быть связано с тем, что со временем эластичная клетка может изменять свою форму, находясь в потенциале двух ловушек,

что влияет на вид интерференционной картины, регистрируемой на поверхности КФД. Вследствие изменения формы локальная эффективная жесткость мембраны может расти.

Таким образом, метод оптического пинцета совместно с подходом пассивной микрореологии позволяет исследовать механические характеристики и особенности клетки в диапазоне низких частот от 1 до 100 Гц.

### *3.2. Метод активной микрореологии для определения упруго-вязких свойств одиночных эритроцитов*

Как уже отмечалось в литературном обзоре, интерес представляет исследование механических свойств одиночных клеток в широком диапазоне частот. Метод пассивной микрореологии ограничен сверху частотами около 100 Гц, так как он позволяет исследовать только низкочастотный фликкер эритроцитов. Для выявления более высокочастотных особенностей в механических свойствах клеток в работе использовался метод активной микрореологии, заключающийся в том, что к исследуемой системе прикладывалось слабое периодическое возмущение, а отклик клетки анализировался на частоте внешнего воздействия. Для этого одиночный эритроцит захватывался двумя оптическими ловушками с противоположных краев. При этом положение одной из ловушек осциллировало с задаваемой амплитудой и частотой. Увлекаемый за ловушкой край эритроцита начинал колебаться, колебания передавались по клетке, и фиксировался отклик противоположного края эритроцита на это воздействие. Такой подход в работе был применим для частот внешнего воздействия от 100 Гц до 250 кГц. Нижняя граница применимости определялась тем, что на частотах до 100 Гц наблюдаются амплитудные (доли микрометров) самопроизвольные колебания мембраны эритроцита — фликкер. Отклик клетки на внешнее воздействие оказывается меньше по амплитуде или имеет тот же порядок величины, поэтому соотношение “сигнал/шум” на исследуемой частоте превышает единицу только для частот выше соответствующих фликкеру эритроцитов. Верхняя граница применимости определяется тем,

что при высоких частотах внешнего воздействия клетка, находящаяся в жидкой среде и обладающая определенной вязкостью, не успевает следовать за быстрыми перемещениями оптической ловушки. Таким образом, соотношение “сигнал/шум” снова становится меньше единицы.

### *3.2.1 Определение упруго-вязких свойств эритроцитов на частотах 100 Гц – 1 кГц*

Для изготовления образцов использовалось небольшое количество артериальной донорской крови, объемом около 0,2 мкл. Эта кровь разводилась до объема 1 мл аутологичной плазмой. Плазму получали предварительным центрифугированием венозной крови со скоростью вращения ротора центрифуги 3000 об/мин и временем центрифугирования – порядка 7 минут. Естественная аутологичная плазма как среда для суспендирования была выбрана для сохранения естественных неизменных механических свойств эритроцитов в течение наиболее длительного времени.

Эксперимент состоял в следующем. Одиночный эритроцит захватывался одновременно двумя оптическими ловушками за противоположные края и поднимался на высоту 25 мкм от нижнего покровного стекла. Положение одной ловушки фиксировалось, положение второй – совершало колебания с задаваемой частотой и амплитудой. Для этого на управляющий вход акусто-оптического дефлектора с генератора подавалось переменное синусоидальное напряжение с амплитудой 0,02 В и постоянное смещение, величина которого соответствовала расстоянию между ловушками 7 мкм. Периодическая составляющая напряжения приводила к колебаниям положения второй ловушки (лазер (2) на рисунке 17) с амплитудой 500 нм вдоль линии, соединяющей положения ловушек. С помощью КФД в течение 1–5 секунд, в зависимости от частоты воздействия, непрерывно регистрировались и записывались в файл сигналы с КФД, соответствующие смещениям обоих краев эритроцита. Важно отметить, что генерация переменного напряжения, подаваемого на вход АОД и съем данных с КФД проводились на одинаковой частоте дискретиза-

ции одного и того же устройства. Поэтому эти два процесса начинались одновременно, с начальной фазой подаваемого на вход АОД напряжения равной нулю. Амплитуды Фурье-гармоник сигналов  $f(t)$  с каждого из КФД, полученных за время  $t$ , на частоте внешнего периодического воздействия  $\omega_0$  можно представить следующим образом:

$$A_n = \frac{1}{t} \int f_n(t) \sin \omega_0 t dt, B_n = \frac{1}{t} \int f_n(t) \cos \omega_0 t dt, \quad (52)$$

а фазу колебаний краев эритроцита относительно колебаний положения оптической ловушки:

$$\varphi_n = -\operatorname{arctg} \frac{B_n}{A_n}, \quad (53)$$

где  $n = 1, 2$  — номер края эритроцита. Таким образом с помощью Фурье-преобразования можно определить амплитуды  $A_n$ ,  $B_n$  и относительную фазу  $\varphi_n$  колебаний каждого из краев клетки.

В эксперименте измерялись фазы колебаний края эритроцита, захваченного в неподвижную ловушку ( $\varphi_1$ ), относительно колебаний этой ловушки, фазы колебаний края эритроцита, захваченного в осциллирующую с ловушкой ( $\varphi_2$ ), определялась их разность  $\varphi_1 - \varphi_2$  и рассчитывался тангенс разности фаз колебаний противоположных краев эритроцита  $\operatorname{tg}(\varphi_1 - \varphi_2)$ . Мощность захватывающих лазеров выставлялась относительно небольшой (около 11,6 мВт внутри образца для первой ловушки и 16 мВт внутри образца для второй), чтобы минимизировать возможный эффект воздействия оптической ловушки на клетку. Выбирались эритроциты, размер которых составлял около 8 мкм, чтобы будучи захваченными в две ловушки, расстояние между которыми составляло 7 мкм, клетки не были деформированы или растянуты. Амплитуда колебаний подвижной ловушки составляла 100 нм, частоты колебаний изменялись в диапазоне от 100 Гц до 1 кГц. Общее время одной серии эксперимента составляло около 20 секунд и включало в себя измерения в обоих направлениях увеличения и уменьшения частот внешнего воздействия. Это было сделано для того, чтобы убедиться в отсутствии изменения свойств клетки во время самого эксперимента. Так как зависимости оказались идентичными для обоих направлений изменения частот колебаний ловушки, по-

лученные значения были усреднены. На рисунке 25 а. приведены частотные зависимости величины тангенса разности фаз  $\Delta\varphi = \varphi_1 - \varphi_2$  между колебаниями противоположных краев эритроцита, захваченного в оптическую ловушку. Видно, что в диапазоне частот от 100 Гц до 1 кГц зависимость с хорошей точностью является пропорциональной. Более того, коэффициент пропорциональности зависит от упругих свойств исследуемых эритроцитов. Незаполненные точки соответствуют нормальным эластичным эритроцитам, заполненные точки — клеткам, которые были предварительно фиксированы глутаровым альдегидом. Коэффициент пропорциональности для нормальных эритроцитов составил  $(-6.4 \pm 0.1) \cdot 10^{-4}$  с, в то время как для фиксированных клеток —  $(-2.7 \pm 0.2) \cdot 10^{-4}$  с. Для объяснения полученных результа-

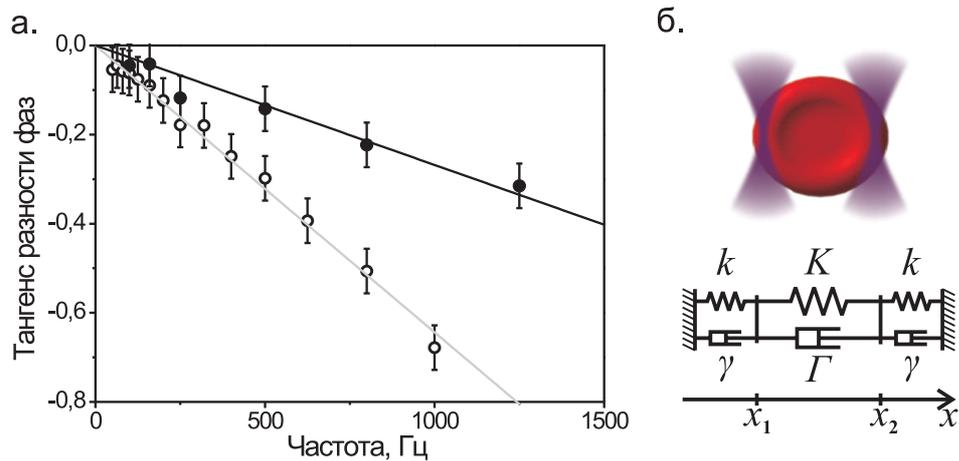


Рис. 25: а. Тангенс разности фаз между колебаниями противоположных краев эритроцита как функция частоты колебаний оптической ловушки. Незаполненные точки соответствуют нормальным эритроцитам. Черные точки соответствуют эритроцитам, которые были предварительно фиксированы глутаровым альдегидом. б. Схематичное изображение модели, описывающей систему оптически захваченного эритроцита.  $K$  — коэффициент эффективной жесткости эритроцита,  $k$  — эффективная жесткость оптических ловушек,  $\gamma$  — эффективный коэффициент вязкости при движении края эритроцита в плазме,  $\Gamma$  — эффективный коэффициент вязкости клетки.

тов рассмотрим следующую феноменологическую модель (рисунок 25б.). Систему эритроцита, захваченного с двух сторон в две оптические ловушки в

жидкости можно описать с помощью эффективных параметров:  $K$  — коэффициент эффективной жесткости эритроцита,  $k$  — эффективной жесткость оптических ловушек,  $\gamma$  — эффективного коэффициента вязкости при движении края эритроцита в плазме,  $\Gamma$  — эффективного коэффициента вязкости клетки. Рассмотрим уравнение движения края эритроцита, находящегося в неподвижной ловушке:

$$\gamma \dot{x}_2 = -k(x_2 - x_2^{trap}) + \Gamma(\dot{x}_1 - \dot{x}_2) - K(x_2 - x_1 - L), \quad (54)$$

где  $L$  — длина недеформированной пружины  $K$ , которая соответствует диаметру эритроцита,  $x_2^{trap}$  — положение второй ловушки,  $x_1$  и  $x_2$  — смещения краев эритроцита из центров оптических ловушек. В эксперименте фиксировались смещения краев эритроцитов из положений их равновесия —  $y_1 = x_1 - x_1^0$ ,  $y_2 = x_2 - x_2^0$ , где  $x_{1,2}^0$  — положения равновесия противоположных краев клетки. Тогда движение второго края эритроцита описывается следующим образом:

$$(\gamma + \Gamma)\dot{y}_2 = \Gamma\dot{y}_1 - (k + K)y_2 + Ky_1. \quad (55)$$

Допустим, что смещения краев клетки из положений равновесия имеют следующий вид:  $y_1 = \hat{y}_1 \exp^{i\omega t}$ ,  $y_2 = \hat{y}_2 \exp^{i\omega t}$ . Подставляя эти решения в уравнение 55, получим:

$$(k + K + i\omega(\gamma + \Gamma))\hat{y}_2 = (K + i\omega\Gamma)\hat{y}_1. \quad (56)$$

В приближении, что система рассматривается в диапазоне частот, удовлетворяющих условию  $\omega^2 \ll k(k + K)/\Gamma(\Gamma + \gamma)$ , то есть для частот до 1 кГц, тангенс разности фаз колебаний краев эритроцита выражается следующим образом:

$$\tan \varphi = -\frac{\Gamma k - \gamma K}{k(k + K)}\omega = -\omega\tau_c. \quad (57)$$

Коэффициент пропорциональности  $\tau_c$  определяется эффективными вязкоупругими свойствами всей клетки, захваченной в оптическом пинцете. Так как  $\tau_c$  имеет размерность времени, его можно рассматривать как некое эффективное время отклика клетки, характеризующее время распространения

механических колебаний по эритроциту. Заметное уменьшение экспериментально измеренного  $\tau_c$  для жестких фиксированных клеток до 270 мкс по сравнению с  $\tau_c = 640$  мкс для нормальных эритроцитов указывает на существенные изменения состояния клетки. Это дает возможность использовать эффективный параметр  $\tau_c$  для контроля состояния и вязко-упругих свойств клеток.

Важно отметить, что уравнение движения края эритроцита 54 рассматривалось с условием пренебрежимо малой массы в условиях эксперимента, то есть при  $m\omega^2 \ll k + K$ . Как отмечалось в пункте 2.3.3, жесткость оптической ловушки при захвате края эритроцита  $k$  составляет около 9 пН/мкм, жесткость самого эритроцита имеет тот же порядок величины  $K \sim 10$  пН/мкм. Масса эритроцита составляет около  $10^{-13}$  кг [108]. Таким образом, в диапазоне частот 100 Гц – 1 кГц данное приближение и рассмотрение уравнения движения края эритроцита в виде 54 применимо.

Так же оценивался эффект воздействия лазерного излучения в ловушках на свойства клеток. Одиночный эритроцит был захвачен за противоположные края в две оптические ловушки. Как и в предыдущем эксперименте, положение одной из ловушек осциллировало с частотой 1 кГц и амплитудой 100 нм. Измерялась разность фаз колебаний противоположных краев эритроцита как функция времени. Результаты представлены на рисунке 26. Было показано, что при временах эксперимента до 160 с разность фаз колебаний краев эритроцита остается постоянной. Это указывает на то, что в процессе такого эксперимента практически отсутствуют существенные изменения вязко-упругих характеристик эритроцита, а также его формы. Важно отметить, что характерные времена эксперимента для определения вязко-упругих свойств клеток, описанного выше, составляли около 20 секунд. Таким образом влияние лазерного излучения оптических ловушек на вязко-упругие свойства эритроцитов при использовании предлагаемой методики можно не учитывать.

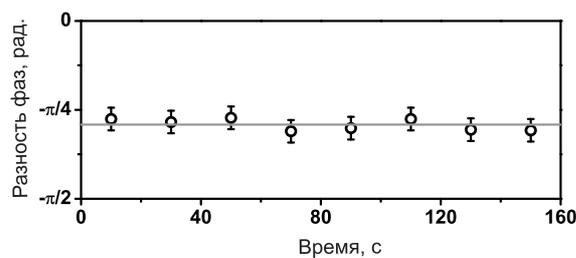


Рис. 26: Зависимость разности фаз между колебаниями краев эритроцита от времени пребывания в неподвижной и осциллирующей с частотой 1 кГц и амплитудой 100 нм ловушках. Сплошная линия — среднее значение разности фаз.

### 3.2.2 Особенности микромеханических свойств эритроцитов на частотах 1 – 250 кГц

Рассмотренная выше методика определения вязко-упругих свойств эритроцитов ограничена сверху частотами около 1 кГц. Однако интерес представляет исследование особенностей микромеханических свойств эритроцитов и на более высоких частотах. Экспериментальная установка, описанная в пункте 1.1 позволяет задавать частоту колебаний одной из оптических ловушек, а значит и частоту внешнего воздействия на клетку, до 250 кГц.

Эксперимент был аналогичен описанному в предыдущем пункте. Одиночный эритроцит размером 8 мкм захватывался в две оптические ловушки с противоположных краев. Расстояние между ловушками составляло 7 мкм. Одна из ловушек была неподвижна, положение другой осциллировало с амплитудой 500 нм и частотами от 1 до 250 кГц. Большая амплитуда колебаний была выбрана с целью увеличения силы, действующей на клетку, на высоких частотах внешнего воздействия. Важно отметить, что реальные смещения краев эритроцитов при описанном внешнем воздействии со стороны оптических ловушек не превышали единиц нанометров. В эксперименте регистрировались показания с обоих КФД  $f_1(t)$  и  $f_2(t)$ , соответствующие смещениям противоположных краев эритроцитов для каждой из частот внешнего воздействия 52. Время накопления данных для каждой частоты составляло около 1 секунды. После этого рассчитывались амплитуды колебаний двух краев

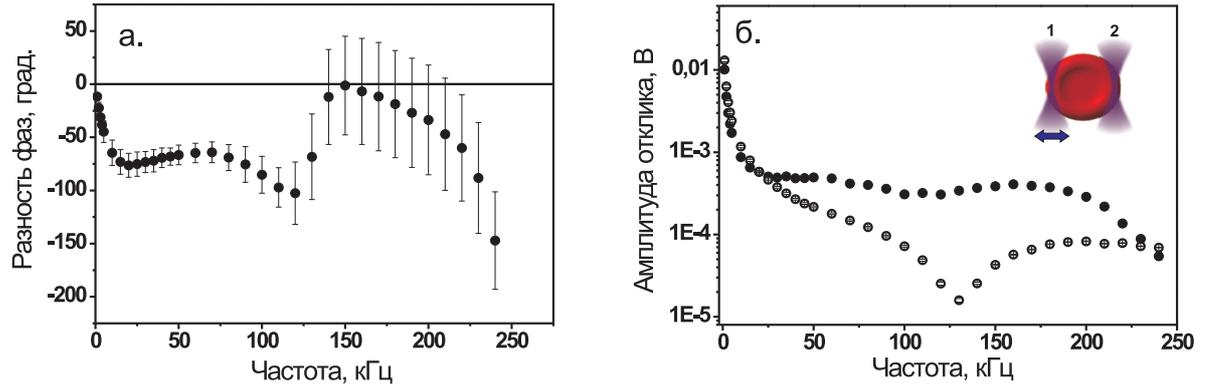


Рис. 27: Отклик эритроцита на внешнее воздействие со стороны оптической ловушки. а. Зависимость разности фаз между колебаниями противоположных краев эритроцита от частоты колебания положения одной из ловушек. б. Амплитуды колебаний противоположных краев эритроцита  $C_1$  и  $C_2$ , соответственно, на частоте внешнего воздействия как функция этой частоты. Заполненные черные точки соответствуют колебаниям первого края клетки, захваченного в подвижную ловушку, незаполненные точки — колебаниям второго края, захваченного в неподвижную ловушку. Нумерация краев эритроцита отображена на вставке.

клетки на частоте  $\omega_0$  внешнего воздействия  $C_1$  и  $C_2$ , соответственно:

$$\begin{aligned}
 C_{1,2} &= \sqrt{A_{1,2}^2 + B_{1,2}^2}, \\
 A_{1,2} &= \frac{1}{t} \int f_{1,2}(t) \sin \omega_0 t dt, \\
 B_{1,2} &= \frac{1}{t} \int f_{1,2}(t) \cos \omega_0 t dt,
 \end{aligned} \tag{58}$$

и разность фаз колебаний противоположных краев эритроцита  $\varphi_1 - \varphi_2$ . Мощность захватывающих лазеров, как и в предыдущем эксперименте, составляла 11,6 мВт внутри образца для первой ловушки и 16 мВт для второй. При этом уровень шумов составлял менее 5 % от значений измеряемых амплитуд фурье-гармоник до 150 кГц. Для каждого эритроцита непрерывно проводилось по 4 серии измерений на каждой из частот воздействия для проверки воспроизводимости результатов. На рисунке 27 представлены результаты, усредненные по 4 сериям измерений для каждого эритроцита и выборке из 7-ми различных эритроцитов одинакового размера внутри одной пробы крови. Интересным оказывается вид кривой зависимости разности фаз от частоты

колебаний оптической ловушки. Было показано, что количество и тип особенностей этой зависимости (рисунок 27а.) не меняется от клетки к клетке. Ошибка среднего значения разности фаз, однако, возрастает для частот выше 150 кГц, что связано с увеличением уровня шумов на высоких частотах. Разность фаз колебаний отрицательна и плавно изменяется вплоть до частот порядка 130 кГц, а потом происходит резкий “скачок” разности фаз в сторону положительных значений, после чего изменение опять становится плавным. Это указывает на тот факт, что на частотах около 130 кГц система имеет резонансную особенность. Для проверки этого предположения были измерены зависимости амплитуд отклика первого и второго краев клетки от частоты осцилляций подвижной оптической ловушки, приведенные на рисунке 27б. Заполненными точками отмечены амплитуды колебаний первого края, захваченного в подвижную ловушку. Незаполненными точками указаны амплитуды колебаний второго края клетки, захваченного в неподвижную оптическую ловушку. Видно, что на частотах около 130 кГц происходит резкое уменьшение отклика клетки на внешнее механическое воздействие по стороны оптической ловушки. Первый край эритроцита совершает вынужденные колебания, добавляя в систему энергию, при этом второй край эритроцита перестает откликаться на это внешнее воздействие. То есть наблюдается диссипация энергии на частотах около 130 кГц.

Вид кривой зависимости разности фаз от частоты (рисунок 27а.) и амплитуд колебаний противоположных краев клетки (рисунок 27б.) должен зависеть от микромеханических свойств эритроцита. Для исследования этого утверждения были проведены измерения тех же величин в тех же экспериментальных условиях, однако с заведомо измененными механическими свойствами эритроцитов. Сравнивались измеряемые величины (разность фаз и амплитуды колебаний краев эритроцита в зависимости от частоты колебания положение оптической ловушки) для нормальных недеформированных клеток с размером 8 мкм и для эритроцитов, которые были изначально растянуты на 800 нм посредством увеличения расстояния между оптическими

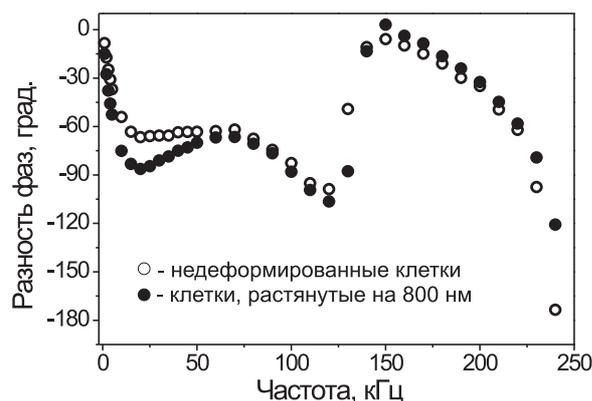


Рис. 28: Сравнение отклика нормального и деформированного в одном измерении эритроцита на внешнее воздействие со стороны оптической ловушки. Зависимость разности фаз между колебаниями противоположных краев эритроцита от частоты колебания положения одной из ловушек. Незаполненные точки соответствуют нормальным эритроцитам. Заполненные — клеткам, растянутым на 800 нм.

ловушками. То есть в мембрану клетки вносилось постоянное механическое напряжение, которое должно было изменить вязко-упругие свойства клетки в целом. На рисунке 28 представлены результаты измерений. Видно, что кривые, соответствующие нормальным и деформированным клеткам, отличаются на частотах от 100 Гц до 50 кГц, причем глубина первого минимума кривой составляет  $-86^\circ$  для растянутых клеток и  $-66^\circ$  для нормальных клеток. На более высоких частотах кривые практически совпадают.

Также определялось влияние эффективной жесткости мембраны эритроцита на измеряемые величины. Для этого проводилось сравнение с клетками, фиксированными 0,2 % раствором глутарового альдегида, то есть с эритроцитами, обладающими высокой жесткостью по сравнению с нормальными клетками. Результаты сравнения представлены на рисунке 29. Видно, что кривые зависимостей для нормальных и фиксированных клеток отличаются для высоких частот, начиная от 50 °. Скачок разности фаз для фиксированных клеток не смещается по частотам и так же происходит на частотах около 130 кГц, однако этот скачок более явный от  $-200^\circ$  до  $+50^\circ$  (рисунок 29а.). В зависимости амплитуд фурье-гармоник от частоты внешнего воздействия (рисунок 29б.) для фиксированных эритроцитов также наблюдается усиление

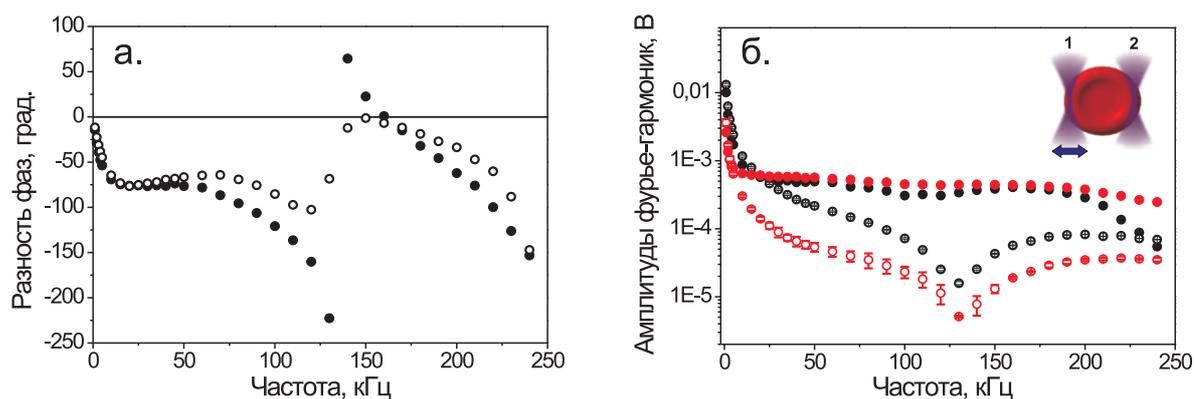


Рис. 29: Сравнение отклика нормального и фиксированного эритроцита на внешнее воздействие со стороны оптической ловушки. а. Зависимость разности фаз между колебаниями противоположных краев эритроцита от частоты колебания положения одной из ловушек. Незаполненные точки соответствуют нормальным эритроцитам. Заполненные — фиксированным. б. Амплитуды колебаний противоположных краев эритроцита  $C_1$  и  $C_2$  на частоте внешнего воздействия как функция этой частоты. Заполненные черные точки соответствуют амплитудам колебаний первого края нормальных клеток  $C_1$ , незаполненные черные точки — колебаниям второго края нормальной клетки  $C_2$ . Заполненные красные точки соответствуют  $C_1$  для фиксированных клеток. Незаполненные красные точки соответствуют  $C_2$  для фиксированных клеток. Нумерация краев эритроцита отображена на вставке.

особенностей отклика клетки по сравнению с откликом нормальных эритроцитов. Резонансная особенность на частотах около 130 кГц усиливается при увеличении жесткости клетки.

## Глава III

### Изучение агрегационных свойств эритроцитов в аутологичной плазме

Вторая часть диссертационной работы посвящена развитию методики оптического пинцета для экспериментального исследования сил агрегации эритроцитов, ее временной динамики и особенностей для нормы и патологии. Была разработана экспериментальная методика, позволяющая напрямую измерять силовое взаимодействие между одиночными эритроцитами в аутологичной плазме. Разработана феноменологическая модель взаимодействия эритроцитов, предполагающая кольцевидную форму соприкасающихся поверхностей клеток. Модель базируется на результатах, полученных при измерениях зависимости силы агрегации от расстояния между центрами клеток. Показано, что агрегация эритроцитов имеет временную динамику – чем больше время соприкосновения клеток, тем выше сила их агрегации. Проведено сравнение агрегационных свойств нормальных клеток и патологически измененных эритроцитов (на примере системной красной волчанки). Установлена корреляция сценариев дезагрегации с типом крови (норма или кровь больных системной красной волчанкой), показывающая, что в среднем патологические эритроциты более склонны к агрегации, чем нормальные. Обнаружено, что скорость агрегации патологически измененных эритроцитов примерно в два раза выше скорости агрегации нормальных эритроцитов.

#### 1. Материалы и методы для измерения сил и скоростей агрегации эритроцитов

##### *1.1. Схема экспериментальной установки двухлучевого оптического пинцета*

Экспериментальная установка двухлучевого оптического пинцета для исследования агрегационных свойств эритроцитов была собрана на базе металло-

графического инвертированного микроскопа МИМ-7. Схема экспериментальной установки приведена на рисунке 30.

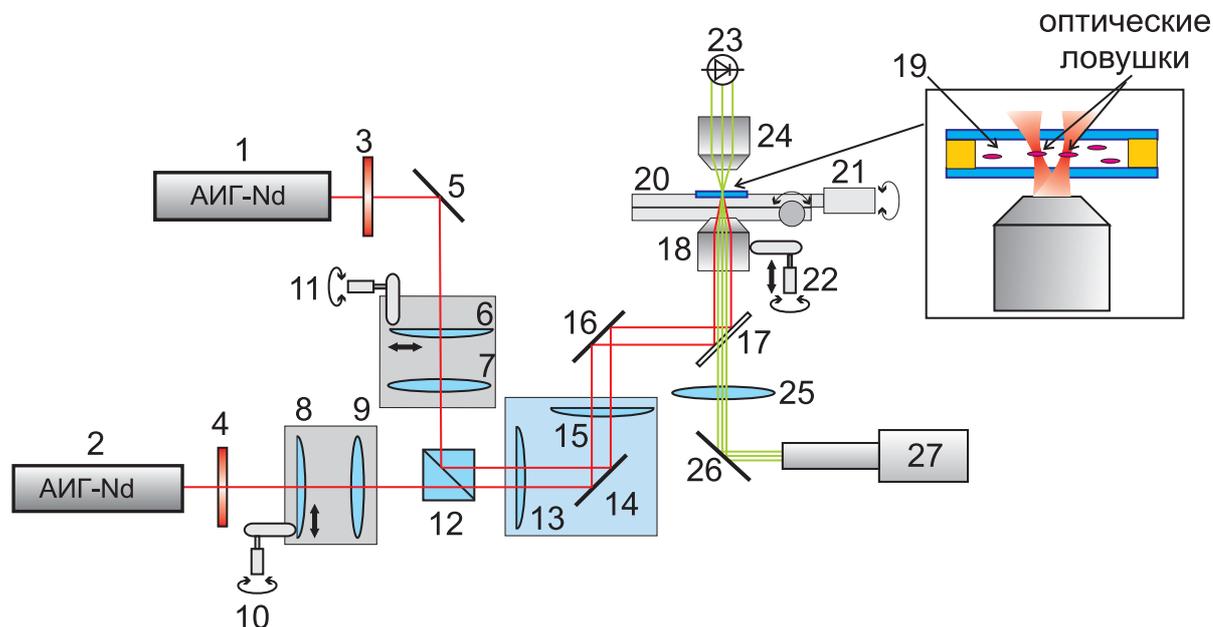


Рис. 30: Схема экспериментальной установки. 1, 2 — АИГ-Nd лазеры, 3, 4 — фильтры, 5 — зеркало, 6, 7 — формирователь первого пучка, 8, 9 — формирователь второго пучка, 10, 11 — микровинты, 12 — призма Глана, 13, 15 — линзы, 14, 16 — зеркала, 17 — диэлектрическое зеркало, 18 — объектив, 19 — исследуемая суспензия, 20 — предметный столик микроскопа, 21 — двухкоординатная подача, 22 — микровинты для настройки фокусного расстояния объектива 18, 23 — светодиод, 24 — объектив, 25 — штатная тубусная линза микроскопа, 26 — зеркало, 27 — ПЗС-камера

Для формирования двух независимых оптических ловушек использовались два непрерывных инфракрасных АИГ-Nd лазера с мощностью 100 мВт и длиной волны излучения 1,064 мкм (1), (2). Мощность излучения лазеров контролировалась встроенным датчиком, осуществляющим стабилизацию мощности. Диаметр луча обоих лазеров составлял 1 мм, излучение имело одномодовый состав  $TEM_{00}$  и дифракционную расходимость 1 мрад. Лазеры устанавливались так, чтобы их лучи были поляризованы ортогонально по отношению друг к другу. Разделение лучей по поляризациям помогает избежать интерференции между ними.

Лучи лазеров попадали на фильтры (3), (4), дававшие возможность изменять мощность излучения. Проходя через систему линз (6), (7) и (8), (9), соответственно, лучи попадали на поляризационную лазерную призму Глана (12), после которой распространялись в одном направлении. Далее лучи обоих лазеров, проходя через систему линз и зеркал (13)–(16), заводились на диэлектрическое зеркало (17). На одну из поверхностей этого зеркала нанесено интерференционное покрытие, имеющее высокий коэффициент отражения на длине волны 1064 нм и хорошее пропускание для видимого диапазона при угле падения  $45^\circ$ . На другую сторону зеркала нанесено оптическое просветление под видимый диапазон излучения. Такое зеркало отражает более 99,9% света на длине волны 1064 нм и пропускает 85–95% в диапазоне 450–700 нм. Это позволило вести наблюдение захваченных микрообъектов в геометрии “на просвет”, существенно не ослабляя излучение лазера. С помощью план полу-апохроматического объектива Olympus (18) лазерные лучи фокусировались внутри образца, расположенного на предметном столике (20).

Образец представлял собой суспензию микрочастиц (19), находящуюся между двумя покровными стеклами. Зазор между стеклами обеспечивался слоем вакуумной смазки и составлял около  $d = 0,15$  мм. Объектив (18) имеет фокусное расстояние 1,8 мм, скорректирован на бесконечность. При длине волны падающего излучения 1,064 мкм пропускающая способность этого объектива составляет около 60%. Числовая апертура объектива равна 1,3. Рабочее расстояние объектива (18) составляет 0,2 мм при работе с покровными стеклами 0,17 мм. Это гарантированно позволяет работать с объектами на всей толще образца. В работе использовались покровные стекла толщиной  $0,08 \div 0,12$  мм.

Предметный столик был оборудован микрометрическими винтами (21), позволяющими перемещать образец перпендикулярно оптической оси объектива с точностью не хуже 2 мкм. Система линз и зеркал (13)–(16) осуществляла увеличение диаметра лазерного пучка до входной апертуры объектива (18) для создания максимального градиента электромагнитного поля в

области перетяжки и, соответственно, наиболее эффективного захвата микрообъектов. Данная система также позволяла изменять положение ловушек внутри образца, существенно не меняя засветки входной апертуры объектива. Для этого линзы (6) и (8) были установлены на трансляционных столиках, оборудованных микрометрическими винтами (11), (10) соответственно, с точностью установки  $\sim 2$  мкм. Смещения ловушек в фокальной плоскости объектива при этом не изменяли мощность излучения в области лазерных перетяжек. Для вертикального перемещения ловушек внутри образца объектив (18) был установлен на механизм микрометрической фокусировки (22) металлографического инвертированного микроскопа МИМ-7 с ценой деления шкалы 3 мкм.

Золотые зеркала (5), (14), (16) имеют коэффициент отражения  $>98\%$  при длине волны излучения 1,064 мкм.

Освещение образца проводилось в геометрии “на просвет” с помощью светодиода (23) через объектив (24), такой же, как и объектив (18). Одинаковая числовая апертура нижнего и верхнего объектива обуславливают качественное изображение образца при визуализации. Видимое излучение от светодиода проходило через образец, прозрачное для него зеркало (17), собиралось штатной тубусной линзой микроскопа МИМ-7 (25) с фокусным расстоянием 200 мм и, отражаясь от золотого зеркала (26), попадало на ПЗС-камеру. Линза (25) представляла собой ахроматический дуплет, просветленный под видимый диапазон излучения.

Мощность световых пучков, формирующих оптические ловушки, определялась следующим образом. Вместо верхнего объектива (16) устанавливался объектив Olympus, идентичный объективу (12). Измеритель мощности оптического излучения (ИМО) устанавливался сразу после верхнего объектива так, чтобы все излучение попадало на чувствительную поверхность ИМО. Лучи от первого и второго лазера поочередно перекрывались, позволяя отдельно измерить мощность от каждого ( $P_1^{(1)}$  и  $P_2^{(1)}$  для каждого из лучей, соответственно). После этого ИМО устанавливался перед нижним объекти-

вом (12). Измерения мощности проводились для каждого из лучей отдельно ( $P_1^{(2)}$  и  $P_2^{(2)}$ ). Мощность каждой из ловушек внутри образца вычислялась исходя из следующего:

$$P_{1,2}^{(1)} = P_{1,2}^{(2)} t^2, \quad (59)$$

$$P_{1,2}^{trap} = P_{1,2}^{(2)} t, \quad (60)$$

$$P_{1,2}^{trap} = \sqrt{P_{1,2}^{(1)} P_{1,2}^{(2)}}, \quad (61)$$

где  $t$  — коэффициент прохождения лазерного излучения через объектив (12) и одно покровное стекло.

Мощность световых пучков, формирующих оптические ловушки составила 25,4 мВт для первого луча и 21,5 мВт для второго луча при выходных мощностях обоих лазеров 100 мВт. График зависимости мощности второго луча внутри образца  $P_2^{trap}$  от выходной мощности лазера (2)  $P_2^0$  представлен на рисунке 31.

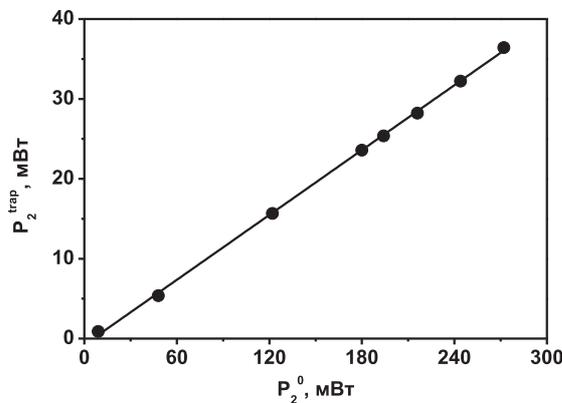


Рис. 31: Градуировка мощности излучения во второй ловушке.

Система регистрации и одновременной визуализации захваченных микрообъектов осуществлялась с помощью цифровой ПЗС-камеры (27), подключенной к персональному компьютеру. ПЗС-камера выдает цветное видеоизображение с разрешением 768x576 пикселей и частотой 25 кадров в секунду. Для оптимизации обработки видеозаписей была написана специальная программа по обработке изображения. Эта программа позволяет загружать изображения, полученные с помощью ПЗС-камеры при проведении экспериментов по

агрегации и дезагрегации, и измерять расстояние между двумя заданными точками на изображении с точностью в 1 пиксель. Это позволяет увеличить скорость и точность обработки видео-материалов.

### *1.2. Изготовление образцов для исследования агрегации эритроцитов в оптическом пинцете*

Для исследования агрегации эритроцитов использовалась венозная кровь 39 здоровых доноров и 6 пациентов, больных системной красной волчанкой (СКВ), наблюдавшихся в клинике им. Е.М. Тареева. СКВ является аутоимунным заболеванием, характеризуемым нарушением иммунорегуляторных механизмов. Одним из сопутствующих проявлений заболевания является нарушение реологических свойств крови, выражающееся, в частности, в усиленной агрегации эритроцитов [109]. При заборе крови добавлялись антикоагулянты — вещества, препятствующие свертыванию. Для всех случаев антикоагулянтом являлся EDTA (0,002 г/мл). Через 1–2 часа после взятия анализов проводилось центрифугирование крови. Скорость вращения ротора центрифуги составляла 2500 об/мин (1150g), время центрифугирования — порядка 5 минут. Таким образом происходило разделение плазмы крови и ее форменных элементов.

Центрифугирование следует проводить для того, чтобы потом изготовить суспензию, состоящую из плазмы и эритроцитов, но с уменьшенной концентрацией красных кровяных телец ( $\sim 5 \cdot 10^3$ /мкл) по сравнению с физиологической концентрацией эритроцитов в цельной крови ( $\sim 5 \cdot 10^6$ /мкл). Такая концентрация необходима для упрощения процесса захвата и управления одиночными эритроцитами без влияния остальных клеток. Покровные стекла, используемые для изготовления ячейки с исследуемой суспензией, обрабатывались последовательно поверхностно активным веществом (ПАВ), этиловым спиртом и 3% перекисью водорода и дистиллированной водой.

## 2. Исследование агрегации эритроцитов на уровне одиночных клеток методом двухлучевого оптического пинцета

### 2.1. Оптический захват эритроцитов, и наблюдение процесса их агрегации и дезагрегации

В используемой установке оптического пинцета реализована двухлучевая схема, позволяющая одновременно осуществлять захват двух микрообъектов на определенном расстоянии друг от друга. В работе проводились измерения с суспензией, состоящей из аутологичной плазмы и форменных элементов крови, преимущественно эритроцитов. После захвата двух эритроцитов в две независимые оптические ловушки положение каждого из них относительно другого можно изменять в плоскости наблюдения, используя юстировочные винты (10) и (11). Для наблюдения процесса агрегации проводился следующий эксперимент. Два произвольных одиночных эритроцита захватывались в две оптические ловушки, разведенные на такое расстояние, чтобы исключить взаимодействие между клетками. Затем с помощью ловушек эритроциты сближались до касания, после чего лазерные пучки выключались. Клетки агрегировали, образуя двойной “монетный столбик”. Процесс агрегации фиксировался на видео. На рисунке 32а изображен искусственно собранный с помощью оптической ловушки эритроцитарный агрегат.

Для реализации процесса дезагрегации ловушки подводились к краям агрегата и плавно раздвигались в противоположные стороны, разъединяя “монетный столбик” на два свободных эритроцита. В процессе проведения экспериментов были выявлены четыре принципиально различных сценария дезагрегации эритроцитов. Первый сценарий заключался в удачном разрыве эритроцитарного агрегата (рисунок 32б). Второй — в разрыве агрегата лишь до состояния, когда эритроциты скреплены очень малыми площадями перекрытия, переходящими в точку. Для дальнейшей дезагрегации сил оптических ловушек не хватало, эритроциты “высказывали” из них и агрегировали. Такой сценарий для простоты в дальнейшем будем называть дезагрегацией

“до точки” (рисунок 32в). В третьем сценарии удавалось развести эритроциты до конечных площадей перекрытия. Такой сценарий будем называть в дальнейшем дезагрегацией “до критической площади перекрытия” (рисунок 32г). Четвертый сценарий заключался в неудачном разрыве агрегата (рисунок 32д). Сил ловушек не хватало для того, чтобы сместить эритроциты на сколь угодно малое расстояние друг относительно друга, поскольку силы взаимодействия между клетками были выше максимальных сил оптического захвата  $F_{esc}$ .

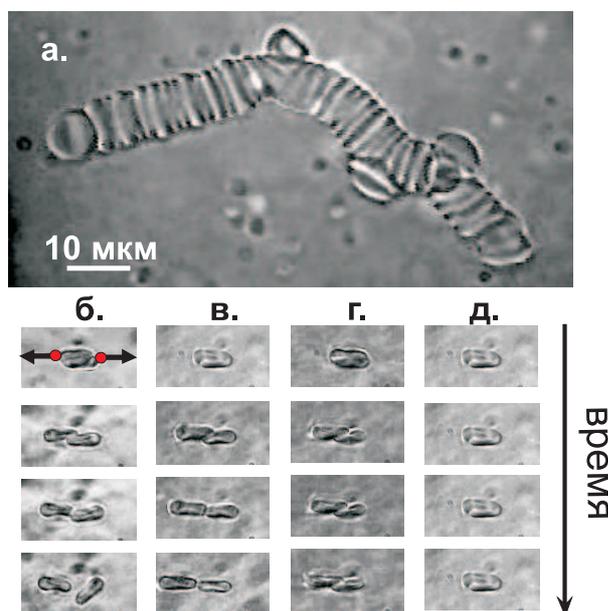


Рис. 32: Микрофотографии экспериментов по искусственной агрегации и дезагрегации эритроцитов. а. — эритроцитарный агрегат, искусственно собранный методом оптического пинцета. б, в, г, д — демонстрация четырех различных сценариев искусственной дезагрегации (полная дезагрегация, дезагрегация до “точки”, до “критической площади перекрытия” и неудавшийся разрыв агрегата, соответственно).

## 2.2. Калибровка сил оптического захвата эритроцитов в аутологичной плазме

Калибровка сил оптического захвата  $F_{esc}$  края эритроцита, оптически захваченного в аутологичной плазме при фиксированной мощности в ловушке, подробно описана в пунктах 2.3.2 и 2.3.1 предыдущей главы. Итоговое значение

силы захвата края эритроцита составило  $29 \pm 3$  пН при мощности излучения в ловушке 20 мВт. При этом максимальная сила захвата края эритроцита  $F_{esc}$  пропорциональна мощности лазерного излучения  $P$  в ловушке с коэффициентом пропорциональности  $\alpha = 1,45 \pm 0,15$  пН/мВт.

### 2.3. Прямое измерение сил агрегации пары эритроцитов методом двухлучевого оптического пинцета

Зная количественные характеристики оптической ловушки, можно непосредственно измерять силовое взаимодействие одиночных эритроцитов при их дезагрегации. Агрегат из двух эритроцитов разъединялся с помощью оптических ловушек, сила которых последовательно изменялась с помощью набора фильтров. Скорость смещения оптических ловушек контролировалась и составляла 0,3 мкм/с. Для каждого значения силы захвата измерялась критическая площадь перекрытия клеток, которая могла быть достигнута до вылета клеток из ловушек в каждом случае (рисунок 33). Для 77 пар эритро-

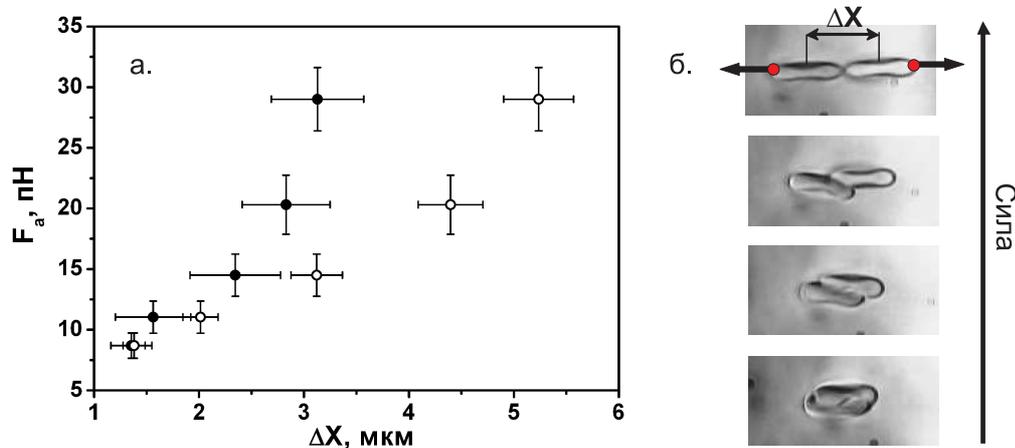


Рис. 33: Измерение силового взаимодействия между эритроцитами. а. — Экспериментальная зависимость силы взаимодействия одиночных эритроцитов (сила агрегации  $F_a$ ) от расстояния между их центрами  $\Delta X$  при искусственной дезагрегации. Белые точки — усреднение по всем измерениям силы агрегации здоровых эритроцитов, черные точки — усреднение по измерениям силы агрегации эритроцитов больных СКВ. б. — микрофотографии эритроцитарного агрегата, полученные последовательно при увеличении силы оптических ловушек.

цитов (39 образцов здоровой крови) и 17 пар эритроцитов (6 образцов крови больных СКВ) были проведены измерения силы с использованием 4 фильтров, пропускающих 30%, 38%, 50% и 70% излучения с длиной волны 1064 нм. Первоначально захватывались два эритроцита в две независимые ловушки, проводилась их искусственная агрегация на высоте 10 мкм от поверхности нижнего стекла кюветы с контролируемым временем формирования агрегата  $\sim 3$  секунд. После этого устанавливался 30% фильтр, проводилась искусственная дезагрегация. Ловушки разводили в противоположные стороны, разъединяя агрегат до тех пор, пока одна из клеток не вылетала из оптической ловушки. В этот момент сила агрегации эритроцитов была равна максимальной силе их оптического захвата  $F_{esc}$ . Измерялась соответствующая критическая площадь перекрытия клеток. Далее сменялся фильтр, сила ловушек увеличивалась, и измерение повторялось. В процессе эксперимента не наблюдалось каких-либо морфологических изменений формы или структуры клеток, вызванных их нагревом. Поглощение гемоглобина на длине волны лазерного излучения 1064 нм пренебрежимо мало, а для липидного бислоя мембраны клетки известно, что нагрев составляет  $1,45 \pm 0,15^\circ\text{C}/100$  мВт при фокусировке излучения в область около 0,8 мкм [110], что дает возможность пренебречь учетом нагрева клетки, захваченной в оптическую ловушку при используемых мощностях 10–20 мВт и общем временем эксперимента для каждого агрегата около 20–30 секунд. Таким образом для каждого агрегата было получено по 5 экспериментальных точек на графике зависимости силы взаимодействия эритроцитов от расстояния между их центрами. Все измерения, проведенные для образцов здоровой крови и для крови больных СКВ, были усреднены и указаны на рисунке 33 белыми и черными точками, соответственно. Важным наблюдением является качественный рост силы агрегации клеток от  $\sim 8$  пН до  $\sim 30$  пН при увеличении расстояния между их центрами, а так же пороговый характер этой зависимости.

2.4. Модель взаимодействия эритроцитов в парном агрегате

Для объяснения полученных результатов о характере взаимодействия эритроцитов была предложена следующая феноменологическая модель. В предположении, что сила агрегации эритроцитов является поверхностной силой, потенциал взаимодействия двух клеток  $W$  можно описать выражением

$$W = -\sigma S, \quad (62)$$

где  $S$  — площадь перекрытия эритроцитов в агрегате,  $\sigma$  — коэффициент пропорциональности. Сила агрегации  $F_a$  выражается как

$$F_a = -\frac{\partial W}{\partial X} = \sigma \frac{\partial S}{\partial X}, \quad (63)$$

где  $\partial X$  — малые смещения центров клеток. Изменение площади перекрытия эритроцитов при смещении центров клеток  $\frac{\partial S}{\partial X}$ , очевидно, зависит от формы этих площадей. Традиционно считается, что эритроциты в агрегате соприкасаются плоскостями [82], однако недавно были представлены расчеты, показавшие, что при небольших силах взаимодействия эритроциты могут удерживать двояковогнутую форму в агрегате [111]. Поэтому было рассмотрено две феноменологических модели взаимодействия эритроцитов в агрегате. Первая предполагает дисковидную форму взаимодействующих поверхностей эритроцитов (рисунок 34а). Вторая модель учитывает двояковогнутость эритроцитов и предполагает кольцевидную форму взаимодействующих площадей перекрытия (рисунок 34б). Причем предполагается, что области, выделенные темно-серым цветом, соприкасаются при взаимодействии эритроцитов, а светло-серые области не перекрываются. Так, для первой модели изменение площади перекрытия дисков будет выражаться как:

$$\delta S = 2\sqrt{1 - \frac{\Delta X^2}{4R^2}} \delta X, \quad (64)$$

Для второй модели изменение площади перекрытия колец выражается следующим образом:

$$\delta S = \begin{cases} 2\sqrt{1 - \frac{\Delta X^2}{4R^2}} - 2\sqrt{\frac{r^2}{R^2} - \frac{\Delta X^2}{4R^2}} \delta X, & \Delta X < 2r, \\ \delta S = 2\sqrt{1 - \frac{\Delta X^2}{4R^2}} \delta X, & \Delta X > 2r. \end{cases} \quad (65)$$

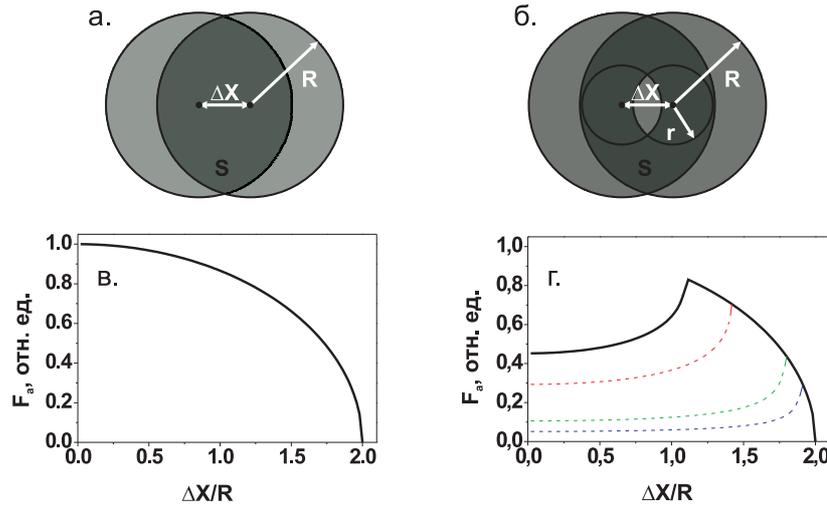


Рис. 34: Модели взаимодействия двух одиночных эритроцитов. а — модель дисков. б — модель колец. в — зависимость силы взаимодействия эритроцитов (в нормированных единицах) от расстояния между центрами эритроцитов (в нормированных на радиус эритроцита единицах) для модели дисков, г — для модели колец (различные кривые соответствуют различным соотношениям внутреннего и внешнего радиуса колец  $r/R$ :  $r/R=0,3$  — сплошная черная линия,  $r/R=0,5$  — штриховая красная линия,  $r/R=0,8$  — штриховая зеленая линия,  $r/R=0,9$  — штриховая синяя линия).

Сила взаимодействия между эритроцитами будет выражаться следующим образом:

$$F_a(\Delta X) = \frac{\sigma}{R}(\sqrt{4R^2 - \Delta X^2} - \sqrt{4r^2 - \Delta X^2}), \Delta X < 2r, \quad (66)$$

$$F_a(\Delta X) = \frac{\sigma}{R}\sqrt{4R^2 - \Delta X^2}, \Delta X > 2r.$$

Таким образом, по первой модели, при смещении эритроцитов одного по другому в противоположные стороны сила агрегации монотонно уменьшается (рисунок 34в), что противоречит представленным выше экспериментальным результатам (рисунок 33а), согласно которым сила взаимодействия при разъединении эритроцитов возрастает. На рисунке 33 видно, что экспериментальные кривые качественно повторяют теоретические зависимости, полученные для модели колец (рисунок 34г). Причем наблюдения соответствуют не только возрастающей части теоретической кривой, но и ниспадающему участку кривой. При реализации полного разъединения агрегата сила взаимодействия при смещении клеток сначала возрастала, но при достижении определенной

площади перекрытия резко спадала. Это выражалось в том, что при достижении этого критического перекрытия клеток и приложении пренебрежимо малой силы со стороны оптических ловушек эритроциты дезагрегировали самостоятельно. Измерение зависимости силы агрегации клеток от расстояния между их центрами для спадающего участка рассматриваемой кривой предложенным методом невозможно. Однако то, что после некоторого порогового значения площади перекрытия эритроциты дезагрегируют без увеличения внешней силы со стороны оптических ловушек, указывает на наличие спадающего участка зависимости силы агрегации от расстояния между центрами клеток.

Еще один аргумент в пользу справедливости кольцевидной площади взаимодействия эритроцитов в агрегате заключается в следующем. Как уже отмечалось в анализе литературы, агрегация эритроцитов представляет собой трехступенчатый процесс [84]. Причем первая и последняя ступени проходят с меньшей скоростью, чем процесс скольжения одной клетки по другой при агрегации. Рассмотрим модельную кривую зависимости силы агрегации от расстояния между клетками в случае кольцевидной площади взаимодействия (рисунок 34г). Процесс агрегации соответствует движению эритроцитов от  $\Delta X/R=2$  в сторону нуля. Изначально взаимодействие клеток растет, но из-за деформации краев эритроцитов расстояние между клетками в начале процесса изменяется не сильно. Затем в процессе скольжения клеток одной по другой сила агрегации увеличивается очень быстро, достигая своего максимума примерно на половине перекрытия клеток. После этого сила, а значит и скорость агрегации, начинает спадать.

На основе предложенной модели о кольцевидной форме соприкасающихся поверхностей эритроцитов в агрегате возможно следующее объяснение механизма агрегации. Обычно для объяснения этого процесса используют либо теорию “мостиков”, либо теорию “истощенного слоя”. Обе теории подтверждаются различными экспериментальными и теоретическими данными (см. раздел 5.2 и 5.3 литературного обзора). Однако их совместному сосущество-

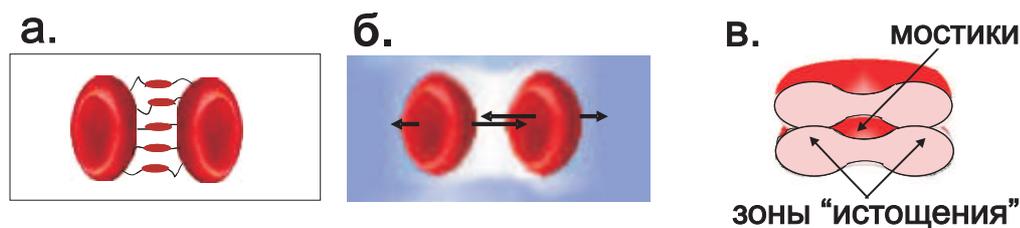


Рис. 35: Модель сосуществования двух механизмов агрегации эритроцитов исходя из предположения о кольцевидной площади соприкосновения. а — мостиковая теория, б — теория истощенного слоя, в — совмещение двух механизмов.

ванию мешает то, что концентрация макромолекул между соседними клетками, согласно мостиковой теории, должна быть повышенной, а согласно теории “истощенного слоя”, напротив, уменьшенной. Если же учесть возможность сохранения двояковогнутой формы клеток в агрегате, не исключено, что по краям, в сближенных участках клеток сказывается действие истощенного слоя, однако, его наличие непосредственно у поверхности не мешает присутствию макромолекул в центральной области эритроцитов, что может приводить к образованию мостиков (рисунок 35). Ранее уже предполагалась возможность сосуществования этих двух процессов во времени [19], при котором осмотические силы способствуют активному сближению клеток в потоке, после чего возможно формирование белковых мостиков между мембранами клеток. Проведенные эксперименты и их соотнесение с феноменологической моделью взаимодействия эритроцитов дает основания предполагать, что оба механизма агрегации могут сосуществовать и в пространстве.

### 2.5. Исследование временной динамики сил агрегации эритроцитов методом оптического пинцета

При изучении характера дезагрегации эритроцитов была обнаружена временная динамика силы агрегации. Проводились эксперименты по дезагрегации эритроцитов, описанные в пункте 2.1, с различным временем формирования агрегатов  $t_a$ . Было показано, что при увеличении этого времени сила взаимодействия между клетками росла. Это проявлялось в увеличении минимально

возможного перекрытия эритроцитов  $dX$  во время дезагрегации при увеличении  $t_a$  в условиях фиксированной мощности в оптических ловушках — 25,4 мВт для первого луча и 21,5 мВт для второго, соответственно. Измерения были проведены для 12 различных пар эритроцитов внутри одного образца крови. Характерные зависимости  $dX$  от  $t_a$  и их линейные аппроксимации представлены на рисунке 36.

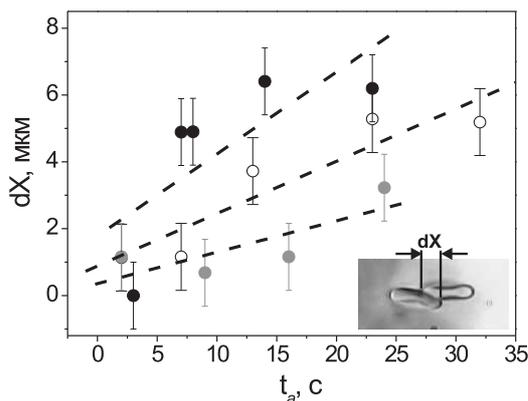


Рис. 36: Временная зависимость минимально возможного перекрытия эритроцитов, характеризующего силу агрегации клеток.

Для 12 различных пар эритроцитов тангенс угла наклона  $\psi$ , соответствующий линейной аппроксимации, составил  $tg\psi = 0,14 \div 0,72$ . Ошибка линейной аппроксимации в среднем составляла 0,07. Разброс значений тангенсов наклона указывает на значительные различия в агрегационных свойствах эритроцитов даже внутри одного образца крови. Полученная временная зависимость свидетельствует в пользу мостикового механизма агрегации. Чем больше времени эритроциты пробыли на близком расстоянии друг от друга, тем больше крупномолекулярных соединений способно сформировать мостики между мембранами клеток, и, соответственно, тем прочнее эритроцитарный агрегат.

### 2.6. Прямое измерение скорости агрегации одиночных эритроцитов

Уникальной возможностью метода оптического пинцета является возможность прямого измерения скорости спонтанной агрегации эритроцитов без учета влияния микропотоков окружающей жидкости и начальных скоростей

клеток, с чем обычно приходится сталкиваться при измерении скорости агрегации методом обычной микроскопии. В каждом опыте два свободных эритроцита захватывались с помощью двух оптических ловушек, подводились друг к другу до соприкосновения, после чего принудительно останавливались. Далее оптические ловушки выключались, и процесс агрегации эритроцитов фиксировался с использованием ПЗС-камеры. Как отмечалось ранее (пункт 5.3.6 литературного обзора), процесс спонтанной агрегации эритроцитов является трехступенчатым, причем каждая стадия агрегации характеризуется собственными скоростями. При обработке видеозаписи определялась зависимость перекрытия агрегирующих эритроцитов  $dX$  от времени для второй и третьей стадии, так как добиться одинаковых начальных условий и геометрии контакта для различных пар эритроцитов и измерять первую стадию агрегации представляло определенные технические сложности. На рисунке 37 представлена усредненная для всех образцов крови здоровых доноров зависимость величины перекрытия клеток  $dX$  от времени. Видно, что вторая

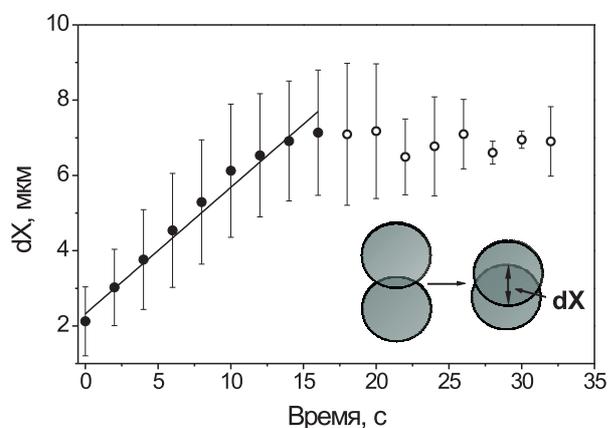


Рис. 37: Зависимость изменения перекрытия агрегирующих эритроцитов от времени. Усреднение проведено по 39 образцам крови здоровых доноров. Сплошная линия – линейная аппроксимация второй стадии агрегации эритроцитов – стадии скольжения одной клетки по другой.

стадия агрегации происходит значительно быстрее, чем третья, причем вторая стадия скольжения походила с примерно постоянной скоростью — данные хорошо аппроксимируются линейной зависимостью. Значение скорости вто-

Тип дезагрегации	Вероятность реализации в норме (%)	Вероятность реализации при СКВ (%)
1	9	1,4
2	30,3	13,3
3	48,7	56,4
4	12,4	29

Таблица 1: Статистическое распределение вероятности различных сценариев дезагрегации для нормы и патологии — СКВ.

рой стадии агрегации в среднем составило  $0,30 \pm 0,08$  мкм/с с достоверностью 0,99 для 39 исследуемых образцов крови здоровых доноров.

### 2.7. Сравнение агрегационных свойств эритроцитов для нормы и патологии

Как показывает анализ литературы, агрегационные свойства нормальных и патологически измененных эритроцитов могут сильно отличаться. В работе было проведено экспериментальное сравнение некоторых параметров агрегации эритроцитов для нормальной и патологической крови на уровне одиночных клеток методом двухлучевого оптического пинцета.

Для экспериментального выявления различий в характере агрегации нормальных и патологических эритроцитов проводились многократные опыты по искусственной дезагрегации парных агрегатов, как описано в пункте 2.1 настоящей главы. Измерения проводились на 39 здоровых донорах и 6 пациентах, больных СКВ. Для каждого образца было проведено от 10 до 20 попыток разъединения различных эритроцитарных агрегатов при времени формирования агрегатов 5 секунд и с силами оптического захвата краев эритроцитов 29 пН. Наблюдения сценариев дезагрегации фиксировались. Набранная статистика представлена в таблице 1.

Видно, что в среднем сила агрегации патологически измененных эритроцитов повышена по сравнению с силой агрегации здоровых эритроцитов. Для патологии СКВ наблюдалось в 2,5 раза большее количество неудавшихся раз-

рывов агрегата (сценарий 4), чем для нормы, в то время как для нормы полных разрывов агрегатов (сценарий 1) было зарегистрировано в 6 раз больше, чем для эритроцитов больных СКВ.

Для определения количественного различия агрегационных свойств нормальных и патологически измененных эритроцитов был проведен эксперимент по измерению скорости агрегации для одиночных пар клеток доноров, больных СКВ. Значения скоростей агрегации были усреднены, и среднее значение составило  $0,53 \pm 0,06$  мкм/с с достоверностью 0,99 для 6 образцов патологически измененной крови. Таким образом, скорость агрегации эритроцитов пациентов, больных СКВ, примерно в два раза больше скорости агрегации нормальных эритроцитов, что указывает на различия в силе агрегации для нормы и для патологии, фиксируемые на уровне одиночных клеток.

## Глава IV

### **Исследование механизмов агрегации эритроцитов в растворах различных белков, а также рецепторного механизма агрегации**

Третья часть диссертационной работы посвящена исследованию механизмов и особенностей агрегации эритроцитов на одиночных клетках методом двухлучевого оптического пинцета. Процесс обратимой агрегации эритроцитов является фундаментальным процессом, который определяет вязкость крови при низких сдвиговых скоростях в системе микроциркуляции человека. Наряду с гематокритом крови и деформируемостью эритроцитов их агрегация определяет реологию крови. Именно поэтому исследование механизмов агрегации эритроцитов, которые до сегодняшнего дня остаются еще не до конца изученными, является одной из важных задач реологии крови.

В работе двухлучевой оптический пинцет с калиброванными силами захвата эритроцитов использовался для прямого измерения сил взаимодействия между одиночными эритроцитами в растворах основных белков плазмы крови, участвующих в агрегации эритроцитов: иммуноглобулина, фибриногена и альбумина. Получены зависимости сил агрегации эритроцитов от белкового состава раствора и концентрации белков. Результаты измерения сил взаимодействия показывают хорошую корреляцию увеличения силы агрегации эритроцитов с увеличением концентрации белков плазмы. Полученные данные позволяют определить вклад каждого из белков, влияющих на агрегацию эритроцитов, во взаимодействие между ними.

Также исследовался вклад специфического рецепторного механизма агрегации в норме и при патологиях, связанных с нарушениями реологических свойств крови человека. Согласно общепринятым представлениям агрегация эритроцитов происходит благодаря исключительно неспецифическим процессам связывания фибриногена и трансмембранных белков на мембра-

нах эритроцитов. Однако результаты недавних исследований предполагают наличие добавочного, специфического механизма, заключающегося во взаимодействии фибриногена с определенным рецептором на поверхности мембраны эритроцита. Целью данного исследования явилось изучение влияния ингибиторов специфического связывания фибриногена (ИССФ) на кинетику эритроцитарной агрегации и дезагрегации. Было показано, что в нормальной крови в 70%-100% случаев ИССФ замедляли агрегацию эритроцитов на 20% – 60%. Кроме того, ИССФ уменьшали прочность эритроцитарных агрегатов, но лишь в тех пробах, где она была исходно сильно увеличена.

## **1. Исследование механизмов агрегации эритроцитов в растворах различных белков плазмы крови**

### *1.1. Материалы и методы для определения сил взаимодействия одиночных эритроцитов в растворах различных белков плазмы крови*

Экспериментальная установка для исследования механизмов агрегации совпадала с описанной в Главе II (пункт 1.1). Основными ее структурными частями являлись два диодных лазера с длиной волны излучения 980 нм, излучение которых фокусировалось в образец с исследуемой суспензией эритроцитов с помощью высокоапертурного объектива с масляной иммерсией и стократным увеличением ( $NA = 1,3$ ). Положением оптических ловушек внутри образца можно было управлять с точностью 50 нм. Мощность излучения лазеров, соответствующих каждой из оптических ловушек, плавно изменялась в диапазоне 0 – 300 мВт. Визуализация образца проводилась в геометрии “на просвет”.

Подготовка образца проходила следующим образом. Небольшое количество артериальной крови ( $\sim 0,4$  мкл) суспендировалось в 1 мл натрий-фосфатного буферного раствора и отмывалось методом центрифугирования 2 раза, чтобы гарантировать отсутствие аутологических белков плазмы, влияющих на агрегацию эритроцитов, в изготавливаемой суспензии. Далее в суспензию клеток поочередно добавлялись белки плазмы крови с различной

концентрацией для выявления влияния каждого из них, а также их синергетического эффекта на силы и характер взаимодействия эритроцитов. Для уменьшения адгезии эритроцитов ко дну стеклянной кюветы ее внутренняя поверхность обрабатывалась небольшим количеством раствора человеческого сывороточного альбумина. При такой обработке предположительная концентрация альбумина в каждом экспериментальном образце не превышала 1 – 4 мг/мл.

Для определения зависимости сил взаимодействия эритроцитов в парных агрегатах от концентрации каждого из белков, влияющих на агрегацию клеток, использовались буферные растворы с концентрациями белков, значения которых указаны в Таблице 2.

Фибриноген	4 мг/мл	5 мг/мл	6 мг/мл	8 мг/мл
Иммуноглобулин	10 мг/мл	15 мг/мл	20 мг/мл	25 мг/мл
Альбумин	35 мг/мл	70 мг/мл		

Таблица 2: Используемые для определения сил агрегации эритроцитов концентрации белков плазмы крови.

При изучении синергетического действия двух белков использовались следующие комбинации концентраций: фибриноген 2,5 мг/мл с альбумином 35 и 75 мг/мл, иммуноглобулин 12,5 мг/мл с альбумином 35 мг/мл и 70 мг/мл. Раствор, содержащий совместно фибриноген и иммуноглобулин, приготовить не удалось, так как эти белки быстро агрегировали с образованием крупных частиц и не растворялись.

### *1.2. Калибровка силы оптического захвата эритроцита*

Калибровка лазерного пинцета проводилась методом сравнения силы оптического захвата краев эритроцитов с силой вязкого трения. Методика калибровки подробно описана в Главе II (пункт 2.3). В первой части процедуры калибровки оптически захватывалась система из одиночного эритроцита и микрочастицы размером 2 мкм, прикрепленной к краю эритроцита, и опре-

делялись пары таких мощностей выходного лазерного излучения для первой и второй ловушек, чтобы уравновесить силы оптического захвата микрочастицы (первая ловушка) и края эритроцита (вторая ловушка). Далее проводилась калибровка силы оптического захвата микрочастицы методом сравнения ее с силой вязкого трения при движении микрочастицы в жидкости. Таким образом была получена зависимость силы оптического захвата края эритроцита от мощности лазерного излучения во второй ловушке (рисунок 38). Сила захвата пропорциональна мощности лазерного излучения в ловушке с коэффициентом пропорциональности  $1,35 \pm 0,04$  пН/мВт.

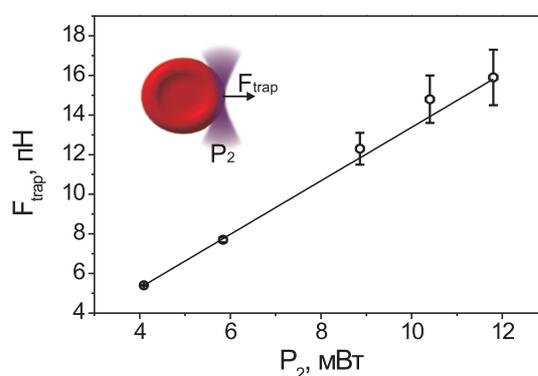


Рис. 38: Зависимость силы оптического захвата края эритроцита от выходной мощности лазерного излучения. Точки соответствуют экспериментально полученным значениям силы оптического захвата, сплошная линия — линейная аппроксимация экспериментальных данных.

### 1.3. Особенности взаимодействия одиночных эритроцитов в растворах различных белков плазмы крови

Для определения зависимости сил агрегации эритроцитов от концентрации фибриногена и выявления вклада этого белка в характер агрегации одиночных клеток в натрий-фосфатный буфер поочередно добавлялся фибриноген в различном количестве для получения концентраций белка в растворе согласно Таблице 2. После этого из суспензии эритроцитов в растворе фибриногена изготавливался экспериментальный образец. Важно отметить, что

покровные стекла для экспериментальных образцов были предварительно обработаны альбумином, поэтому этот белок также присутствовал в суспензии, однако его концентрация была пренебрежимо малой ( $\sim 1$  мг/мл). Два свободных эритроцита поднимались двумя оптическими ловушками с калиброванными силами захвата на высоту 25 мкм над нижней поверхностью кюветы. С помощью ловушек клетки перекрывались друг с другом на  $\frac{1}{4}$  часть своих поверхностей. Через 10 секунд после этого путем смещения одной из оптических ловушек с постоянной скоростью около 0,2 мкм/с эритроцитарный агрегат разъединялся. Измерялась сила, необходимая для того, чтобы полностью разделить агрегат на две клетки. Такая же процедура повторялась для эритроцитов в растворе иммуноглобулина с различной концентрацией белка. На рисунке 39 представлены зависимости сил, необходимых для полного разрыва двойного агрегата эритроцитов, от концентрации белков в растворе, усредненные по 15 парам эритроцитов внутри каждой пробы. Красной чертой на рисунке обозначено значение сил, ниже которых было невозможно прямое измерение сил агрегации клеток методом оптического пинцета. Для сил оптического захвата  $\sim 1,9$  пН случайная сила Броуновских смещений и сила тяжести эритроцита начинали доминировать, и стабильный оптический захват клетки в жидкости становился невозможен. Видно, что в растворах, где из белков плазмы, влияющих на агрегацию клеток, присутствуют только фибриноген или только иммуноглобулин, увеличение концентрации обоих белков приводит к увеличению силы связи между эритроцитами, причем эффект наблюдается и для значений концентраций белков, соответствующих физиологической норме, чего не было замечено ранее другими методами измерения сил агрегации. Важно отметить, что в растворе фибриногена (рисунок 39а) измерение сил агрегации эритроцитов было возможно только для концентраций белка равных или превосходящих физиологически нормальные значения. Силы агрегации, индуцированной молекулами фибриногена, при концентрациях меньше 4 мг/мл оказывались ниже порога чувствительности предлагаемой методики. Для раствора иммуноглобулина (рисунок 39б)

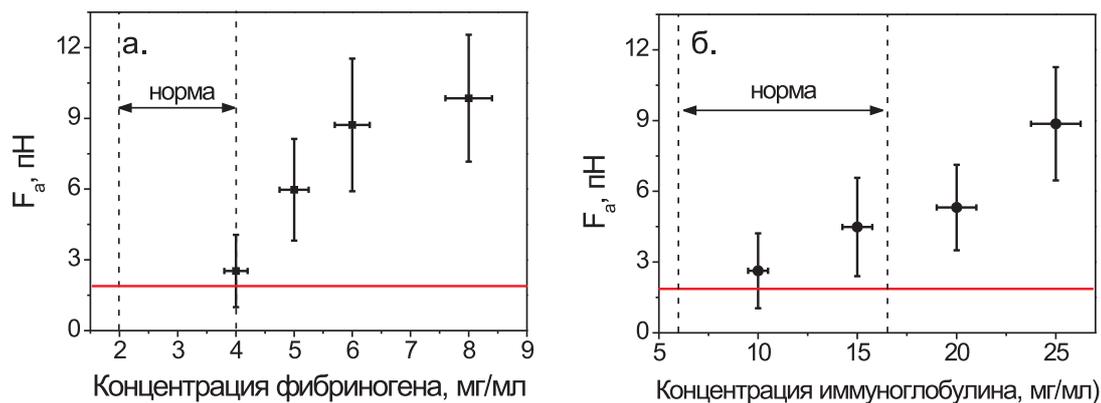


Рис. 39: Зависимость силы агрегации двух одиночных эритроцитов от концентрации белков плазмы. а. Зависимость от концентрации фибриногена. б. Зависимость от концентрации иммуноглобулина. Пунктирной линией указан диапазон значений концентраций, соответствующих физиологической норме. Красной линией обозначено значение силы агрегации, меньше которого невозможно измерение методом потического пинцета.

были измерены силы агрегации как для нормальных значений концентраций белка, так и для увеличенных. Видно, что иммуноглобулин даже при нормальных физиологических значениях концентрации индуцирует агрегацию эритроцитов, сила которой примерно в 2 раза больше силы агрегации, индуцированной фибриногеном с концентрацией 4 мг/мл, то есть с максимально допустимым значением концентрации фибриногена для нормы.

Методом оптической микроскопии процесса дезагрегации одиночных эритроцитов с помощью двухлучевого лазерного пинцета было обнаружено, что характер агрегации эритроцитов, индуцированной фибриногеном и иммуноглобулином, значительно отличается. При дезагрегации двойного агрегата эритроцитов в растворе фибриногена наблюдалась равномерно распределенная по всей поверхности клеток связь между мембранами, в то время как для дезагрегации в растворе иммуноглобулина наблюдались сильные точечные связи в случайных местах мембран клеток и отсутствие взаимодействия в других частях, как показано на рисунке 40б, в. В Главе III (пункт 2.1) было показано, что при дезагрегации двойного агрегата в аутологичной

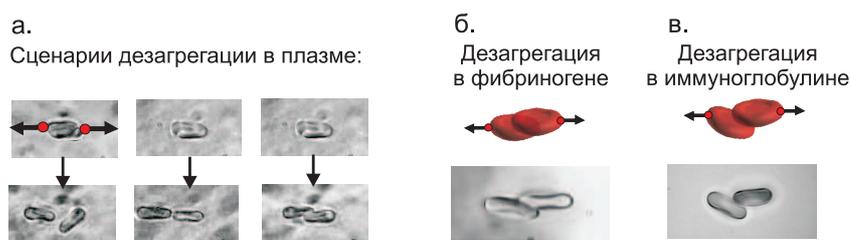


Рис. 40: а. Характер дезагрегации эритроцитов в аутологичной плазме. б. Характер дезагрегации эритроцитов в растворе фибриногена — равномерное по поверхности взаимодействие клеток. в. Характер взаимодействия эритроцитов в растворе иммуноглобулина — точечные связи на поверхностях клеток.

плазме, где присутствуют как фибриноген, так и иммуноглобулин, наблюдаются принципиально различные сценарии дезагрегации при приложении фиксированных сил со стороны оптических ловушек — полная дезагрегация, дезагрегация до связи клеток в одной “точке” или дезагрегация до конечной площади перекрытия (рисунок 40а). То есть в аутологичной плазме наблюдается “суперпозиция” точечных сильных и равномерно распределенных связей между клетками. Таким образом, был выявлен вклад иммуноглобулина и фибриногена в тип взаимодействия между мембранами одиночных клеток при их дезагрегации — сильные точечные и равномерно распределенные по мембране связи, соответственно.

В работе также определялось влияние альбумина на фибриноген-индуцированную и иммуноглобулин-индуцированную агрегацию эритроцитов. Для этого пары клеток перекрывались с помощью оптических ловушек на  $\frac{1}{4}$  их поверхностей, после чего агрегат разъединялся с постоянной скоростью около 0,2 мкм/с и измерялась сила, необходимая для того, чтобы полностью разделить его на две клетки. Эксперимент повторялся при фиксированных концентрациях фибриногена (2,5 мг/мл) и иммуноглобулина (12,5 мг/мл) и трех различных концентрациях альбумина - 1 мг/мл, 35 мг/мл и 70 мг/мл. Результаты усреднения по 15 эритроцитам для каждой из концентраций белков представлены на рисунке 41. Видно, что как для раствора фибриногена, так и для раствора иммуноглобулина увеличение концентрации альбумина

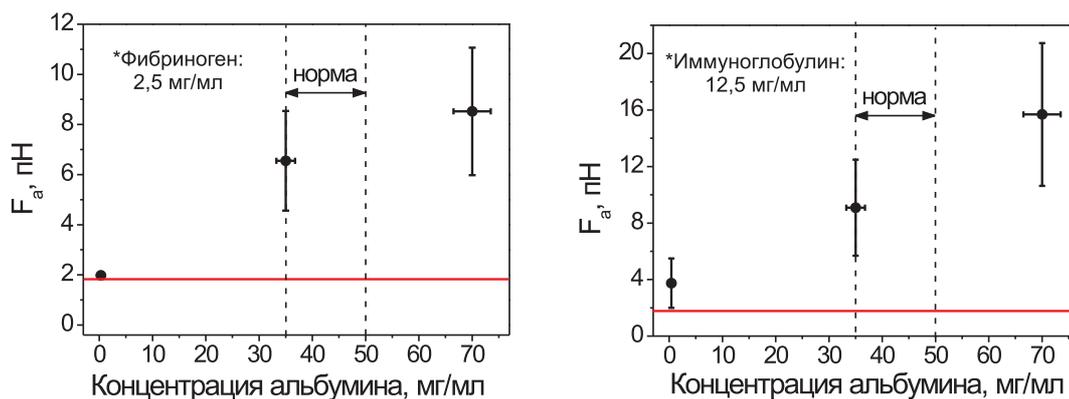


Рис. 41: Зависимость силы агрегации двух одиночных эритроцитов от концентрации альбумина: а. — при фиксированной концентрации фибриногена 2,5 мг/мл. б. — при фиксированной концентрации иммуноглобулина 12,5 мг/мл. Пунктирной линией указан диапазон значений концентраций белков, соответствующих физиологической норме. Красной линией обозначено значение силы агрегации, меньше которого невозможно измерение сил методом оптического пинцета.

в значительной степени увеличивает силу, необходимую для полной дезагрегации клеток. То есть сосуществование альбумина с любым из двух других белков, влияющих на агрегацию эритроцитов, приводит к синергетическому эффекту, который выражается в увеличении силы агрегации клеток. При фиксированной концентрации фибриногена 2,5 мг/мл, которая соответствует физиологической норме, и увеличении концентрации альбумина в 2 раза с 35 до 70 мг/мл — сила агрегации увеличивается в 1,35 раз. При фиксированной концентрации иммуноглобулина 12,5 мг/мл, которая соответствует физиологической норме, и увеличении концентрации альбумина в 2 раза с 35 до 70 мг/мл — сила агрегации эритроцитов увеличивается в 1,7 раз.

Таким образом, результаты измерения сил взаимодействия эритроцитов в растворах основных белков плазмы показывают, что в среднем сила агрегации, индуцируемой иммуноглобулином, имеет большие значения по сравнению с фибриноген-индуцированной агрегацией. Однако взаимодействие между клетками, связанное с влиянием обоих белков, может значительно усиливаться при увеличении в плазме концентрации альбумина.

## 2. Исследование рецепторного вклада в механизмы агрегации эритроцитов

Согласно общепринятым представлениям фибриноген стимулирует взаимодействие эритроцитов исключительно благодаря неспецифическим процессам. Однако по результатам недавних исследований предполагают наличие добавочного механизма специфического взаимодействия фибриногена с  $II_{\beta}/III_{\alpha}$  рецептором на мембране эритроцита. Целью исследования было изучение влияния блокаторов специфического связывания фибриногена на кинетику эритроцитарной агрегации и дезагрегации и на прочность агрегатов. Исследовались пробы крови здоровых добровольцев и суспензии их эритроцитов в аутологичной плазме. Модификацию свойств проб осуществляли с помощью ингибитора связывания фибриногена — моноклонального антитела CRC64, который является антагонистом комплекса гликопротеинов  $II_{\beta}/III_{\alpha}$ .

### *2.1. Материалы и методы для измерения сил агрегации эритроцитов, индуцированной специфическим связыванием фибриногена*

Работа проводилась совместно с лабораторией биомеханики, Научно-исследовательский институт механики МГУ им. М. В. Ломоносова [6]. Агрегацию-деагрегацию эритроцитов в суспензии с гематокритом  $Ht = 40\%$  исследовали методом регистрации лазерного обратного светорассеяния, дезагрегацию отдельных парных агрегатов — методом оптического пинцета. Результаты, полученные двумя методиками, сравнивались.

Исследовались пробы крови 73 здоровых волонтеров (средний возраст  $29 \pm 13$  лет). Забор проб крови проводили в условиях клиники нефрологии, внутренних и профессиональных болезней им. Е.М. Тареева, где проводился общий, биохимический и иммунологический анализ крови. Образцы крови стабилизировались антикоагулянтом EDTA (2 мг/мл) или цитратом натрия (11 мМ). В качестве ингибиторов связывания фибриногена были использованы моноклональные антитела, обладающие иммуноглобулиновым фрагмен-

том — антагонистом комплекса гликопротеинов  $II_{\beta}/III_{\alpha}$  (CRС64). Исследование влияния ИССФ на процесс агрегации-деагрегации эритроцитов осуществляли не позднее, чем через 1 – 2 часа после забора крови. Каждую пробу крови делили на 2 – 3 порции. Одну порцию оставляли в нативном состоянии, другие инкубировали с ИССФ в течение 30 минут. Далее параллельно проводились измерения параметров агрегации эритроцитов интегральным методом обратного лазерного светорассеяния и сил агрегации одиночных клеток методом оптического пинцета.

Исследование агрегации в эритроцитарной суспензии проводилось методом регистрации обратного светорассеяния с помощью коаксиально-цилиндрического автоматического лазерного агрегометра-деформометра эритроцитов LADE с реологическим зазором 0,9 мм, длиной волны лазерного излучения  $\lambda = 650$  нм и мощностью излучения 1 мВт (RheoMedLab, Москва). Методика измерений подробно описана в [60]. В зазор помещалась исследуемая суспензия эритроцитов. Коаксиальные цилиндры раскручивались друг относительно друга, создавая сдвиговые силы, действующие на агрегаты эритроцитов. После разъединения большей части агрегатов цилиндры останавливались. На суспензию направлялось лазерное излучение, и регистрировалась интенсивность отраженного сигнала. После остановки цилиндров наблюдалось экспоненциальное уменьшение интенсивности обратного светорассеяния  $I_a$  со временем  $t$ . Зависимость  $I_a(t)$  спрямляли в полулогарифмических координатах двумя прямыми с двумя различными наклонами. Показатели  $T_1$  и  $T_2$ , рассчитанные для каждой из прямых как  $t/\ln I_a$ , характеризуют времена образования в процессе агрегации двумерных цепочек клеток — “монетных столбиков” и трехмерных агрегатов, соответственно. Разность между исходным значением  $I_a$ , соответствующим отсутствию агрегатов эритроцитов, и конечным значением  $I_a$ , полученным через 2 минуты после начала спонтанной агрегации, является мерой характерного размера агрегатов эритроцитов в крови. Гидродинамическая прочность агрегатов оценивалась при регистрации изменения интенсивности обратного светорассеяния  $I_a$  при увеличении

скорости вращения цилиндров от  $\zeta$  2 с<sup>-1</sup> до 130 с<sup>-1</sup>. Экспоненциальная зависимость  $I_d(\zeta)$  спрямлялась в полулогарифмических координатах. Показателем прочности основной массы агрегатов эритроцитов являлся параметр  $\beta = \zeta/\ln(I_d)$ . Прочность самых крупных агрегатов оценивалась по параметру  $I_{2,5}$ , который характеризовал процент агрегатов, распадающихся при  $\zeta = 2,5$  с<sup>-1</sup>.  $I_{2,5}$  брался с обратным знаком для превращения его из показателя легкости распада агрегатов в показатель их прочности [112].

Исследование взаимодействия одиночных эритроцитов в агрегате проводилось методом двухлучевого оптического пинцета. Экспериментальная установка совпадала с описанной в Главе III (пункт 1.1). Образец представлял собой кровь, разведенную аутологичной плазмой так, чтобы концентрация эритроцитов составляла около  $5 \cdot 10^{-3}$  мкл<sup>-1</sup>. После оптического захвата двух одиночных эритроцитов в две ловушки, подведения клеток друг к другу до соприкосновения и выключения оптических ловушек наблюдалась спонтанная агрегация двух эритроцитов. Через 1 — 3 секунды после завершения агрегации пара эритроцитов поднималась на высоту 25 мкм с помощью оптических ловушек и разъединялась с пошагово возрастающей силой оптического захвата. Параметром, регистрируемым в эксперименте, являлось изменение расстояния между центрами эритроцитов при увеличении силы сдвиговой дезагрегации с  $\sim 6$  пН до  $\sim 8$  пН. Также регистрировались вероятности реализации различных сценариев сдвиговой дезагрегации эритроцитов — полная дезагрегация пары клеток, неудавшийся разрыв агрегата, промежуточные случаи — при силах оптического захвата  $\sim 20 \pm 3$  пН. Сценарии дезагрегации эритроцитов подробнее описаны в пункте 2.1 Главы III.

## 2.2. Экспериментальные результаты

На основании серии опытов по измерению  $I_{2,5}$  методом обратного светорассеяния все пробы крови здоровых доноров были поделены на две группы — пробы со среднестатистически нормальной агрегацией эритроцитов и пробы с исходно повышенной агрегацией. Границей, разделяющей эти подгруппы,

явились верхние пределы 95% доверительного интервала для средних значений  $I_{2,5}$ , который заключался в границах от -25.1% до -21.6%. При  $I_{2,5} > -21.6\%$  проба крови относилась к подгруппе с повышенной агрегацией в норме. В серии экспериментов по измерению времени спонтанной агрегации эритроцитов методом обратного светорассеяния было показано, что инкубация проб крови с ингибиторами специфического связывания фибриногена (CRC64) приводила к замедлению процесса агрегации эритроцитов на этапе формирования трехмерных агрегатов клеток. Параметр  $T_2$  составил  $32,9 \pm 4,2$  с для контрольной пробы крови (интактные клетки) и  $47,1 \pm 39,5$  с для пробы, предварительно инкубированной с ИССФ. Усреднение проводилось по 21 различным пробам крови, уровень значимости 0,05. При этом отличия в прочности агрегатов эритроцитов проявились только для проб крови с исходно повышенной агрегацией, где проявилось уменьшение прочности агрегатов под действием антител CRC64. Гидродинамическая прочность наиболее крупных агрегатов  $I_{2,5}$  в интактных пробах крови с исходно усиленной агрегацией составила  $-16,4 \pm 2,1\%$ , в то время как для проб крови с CRC64 —  $-19,9 \pm 2,7\%$ . Гидродинамическая прочность основной массы агрегатов  $\beta$  составила  $47,7 \pm 13,9$  с<sup>-1</sup> для интактных проб крови и  $40,3 \pm 9,0$  с<sup>-1</sup> для проб крови с ИССФ. Усреднение проводилось по 14 различным пробам крови, уровень значимости 0,05.

Уменьшение силы взаимодействия эритроцитов на фоне действия ИССФ в подгруппе здоровых лиц с исходно усиленной агрегацией было выявлено и на уровне одиночных клеток в парных агрегатах методом двухлучевого оптического пинцета. При увеличении силы оптического захвата эритроцитов в процессе сдвиговой дезагрегации пары клеток с  $\sim 6$  пН до  $\sim 8$  пН, расстояние между центрами двух эритроцитов увеличивалось в случаях интактной крови на  $1,14 \pm 1,78$  мкм, а в случае крови с ИССФ — на  $2,05 \pm 1,50$  мкм (рисунок 42б). Усреднение проводилось по 14 различным пробам крови, уровень значимости 0,05.

При регистрации различных сценариев дезагрегации пар эритроцитов оп-

тическими ловушками было обнаружено, что на фоне действия ИССФ вероятность полного разъединения парного агрегата увеличивалась более чем в 2 раза, в то время как вероятность неудавшегося разрыва агрегата фиксированными силами ловушек уменьшалась в  $\sim 4$  раза (рисунок 42а).

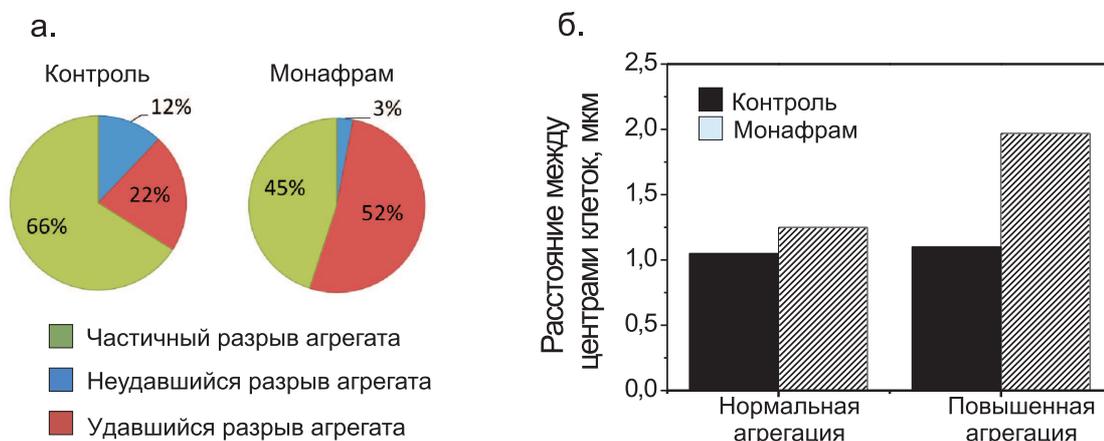


Рис. 42: Влияние ингибирования специфического связывания фибриногена на агрегацию эритроцитов. а. Статистическое распределение сценариев дезагрегации одиночных эритроцитов для образцов с изначально усиленной агрегацией — для контрольной группы и при добавлении ИССФ. б. Изменение расстояния между центрами клеток во время дезагрегации при увеличении силы оптического захвата с 6 до 8 пН для контрольной группы образцов и при добавлении ИССФ в случае изначально нормальной и повышенной агрегации крови.

Таким образом было показано воздействие ИССФ на агрегацию эритроцитов, проявляющееся в уменьшении сил взаимодействия клеток как в цельной крови, так и на уровне одиночных клеток. Однако эффект проявлялся только в случае исходно повышенной агрегации эритроцитов в пробах крови, то есть в случаях исходных нарушений реологических характеристик. Избирательность действия ИССФ на дезагрегацию эритроцитов не позволяет рассматривать специфическое связывание фибриногена в качестве существенного детерминанта этого процесса в норме. Тем не менее, при активации процессов, изменяющих свойства эритроцитов, аномальное повышение прочности их агрегатов может во многом определяться специфическим связыванием фибриногена.

## Выводы

Основные результаты диссертационной работы могут быть сформулированы следующим образом.

- Разработан метод активной и пассивной реологии в оптическом пинцете для определения эффективных микромеханических характеристик одиночных эритроцитов.
- Разработан метод пассивной микрореологии в оптическом пинцете для диагностики микромеханических характеристик одиночных эритроцитов. Измерены корреляционные функции броуновских смещений двух противоположных краев эритроцита, локализованного в две оптические ловушки. Развита методика для определения эффективных упругих свойств одиночных эритроцитов по корреляционному анализу фликера краев клетки на частотах 1–100 Гц.
- Предложена новая методика, основанная на совмещении оптического пинцета и метода активной микрореологии, для определения упругих характеристик эритроцитов с помощью анализа частотного отклика оптически захваченного эритроцита при осцилляции одной из оптических ловушек в диапазоне частот от 0,1 кГц до 1 кГц. Исследованы особенности высокочастотного (1 кГц - 250 кГц) отклика клетки на внешнее механическое воздействие. Экспериментально полученные зависимости амплитуд и фаз колебаний краев эритроцита от частоты вынуждающей силы со стороны оптической ловушки указывают на наличие резонансного поглощения механической энергии эритроцитом в области 130 кГц.
- Разработан метод калибровки силы захвата краев эритроцитов и прямого измерения сил агрегации эритроцитов. Показано, что силы взаимодействия между эритроцитами увеличиваются при увеличении расстояния между центрами клеток. Выявлены четыре принципиально различных сценария дезагрегации эритроцитов в аутологичной плазме. Обна-

ружена зависимость силы агрегации одиночных эритроцитов от времени формирования агрегата.

- С помощью двухлучевого оптического пинцета выявлены различия в силе и скорости агрегации здоровой и патологически измененной крови на уровне одиночных клеток. Показано, что сила агрегации эритроцитов больных системной красной волчанкой, расстояние между центрами которых составляет 3 мкм, равна  $29 \pm 3$  пН, что более чем в 2 раза больше сил агрегации нормальных эритроцитов, для которых это значение составило  $14 \pm 3$  пН. Измерена скорость агрегации нормальных эритроцитов, составившая  $0,30 \pm 0,08$  мкм/с, и скорость агрегации патологически измененных эритроцитов, составившая  $0,53 \pm 0,06$  мкм/с.
- Экспериментально показано, что увеличение концентрации фибриногена и иммуноглобулина в буферном растворе приводит к увеличению силы связи эритроцитов. При этом фибриноген способствует формированию непрерывной по всей поверхности связи между клетками, в то время как иммуноглобулин ведет к возникновению сильных точечных связей
- Установлено наличие добавочного механизма агрегации эритроцитов, заключающегося в специфическом связывании фибриногена с рецептором на поверхности мембран клеток. Обнаружено, что в нормальной крови блокаторы специфического связывания фибриногена уменьшали прочность эритроцитарных агрегатов в тех пробах, где она была исходно увеличена.

Результаты диссертационной работы опубликованы в работах [3–6]

В заключение с большим удовольствием выражаю свою глубочайшую благодарность моему научному руководителю Андрею Анатольевичу Федяину за уникальную возможность работать над столь интересными и рискованными задачами на стыке оптики и биофизики, за доверие, заботу и поддержку

на протяжении всей аспирантуры. Хотелось бы высказать огромную признательность Ирине Анатольевне Соколовой за бесценную помощь в постановке задач и за возможность принимать участие в совместном эксперименте. Огромное спасибо Евгению Любину за неоценимую помощь на протяжении всей работы в лаборатории и его терпение, Александру Жданову, который был моим научным руководителем и работал со мной в студенчестве. Также хочется выразить благодарность Ирине Соболевой и Маргарите Шариповой за помощь в проверке текста диссертационной работы и всему коллективу лаборатории за их дружеское внимание, моральную поддержку и создание неповторимой творческой атмосферы.

Хочу сказать спасибо моим родителям за их поддержку при работе над диссертацией. Без их участия и внимания выполнение работы было бы невозможным.

## Список литературы

- [1] Ashkin A.. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure // Physical Review Letters. 1970. Т. 24, С. 156–159.
- [2] Ashkin A., Dziedzic J. M., Bjorkholm J. E., Chu S.. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles // Optics Letters. 1986. Т. 11, С. 288.
- [3] Lyubin E. V., Khokhlova M. D., Skryabina M. N., Fedyanin A. A.. Cellular viscoelasticity probed by active rheology in optical tweezers // Journal of Biomedical Optics. 2012. Т. 17, С. 101510.
- [4] 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 // Journal of Biomedical Optics. 2012. Т. 17, С. 025001.
- [5] Соколова И. А., Кошелев В. Б.. Синдром повышенной вязкости крови // Технологии живых систем. 2011. Т. 8, С. 78–81.
- [6] Sokolova I. A., Muravyov A. V., Khokhlova M. D., Rikova S. Y., Lyubin E. V., Gafarova M. A., Skryabina M. N., Fedyanin A. A., Kryukova D. V., Shahnazarov A. A.. An effect of glycoprotein iib/iiia inhibitors on the kinetics of red blood cells aggregation // Clinical Hemorheology and Microcirculation. . Т. In press, .
- [7] Ракитянский М. М., Агранат М. Б., Ашитков С. И., Карагяур М. Н., Мухамеджанова Д. М., Домогатский С. П., Овчинников А. В., Ситников Д. С., Стамбольский Д. В., Шевелев И. Н.. Исследования биологических объектов на клеточном и субклеточном уровне с помощью фемтосекундного лазерного оптического пинцета-скальпеля // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2009. Т. 11, С. 107–113.

- [8] Скрябина 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.
- [9] 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. Т. 1, С. 169–180.
- [10] Dao M., Lim C. T., Suresh S.. Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers // Journal of the Mechanics and Physics of Solids. 2003. Т. 51, С. 2259 – 2280.
- [11] Capitanio M., Cicchi R., Pavone F. S.. Continuous and time-shared multiple optical tweezers for the study of single motor proteins // Optics and Lasers in Engineering. 2007. Т. 45, С. 450–457.
- [12] Mehta A. D., Rief M., Spudich J. A., Smith D. A., Simmons R. M.. Single-molecule biomechanics with optical methods // Science. 1999. Т. 283, С. 1689–1695.
- [13] Cecconi C., Shank E. A., Marqusee S., Bustamante C.. Dna molecular handles for single-molecule protein-folding studies by optical tweezers // Methods in Molecular Biology. 2011. Т. 749, С. 255–271.
- [14] Lenormand G., Henon S., Richert A., Simeon J., Gallet F.. Direct measurement of the area expansion and shear moduli of the human red blood cell membrane skeleton // Biophysical Journal. 2001. Т. 81, С. 43–56.
- [15] Pilizota T., Bilyard T., Bai F., Futai M., Hosokawa H., Berry R. M.. A programmable optical angle clamp for rotary molecular motors // Biophysical Journal. 2007. Т. 93, С. 264–275.
- [16] Rao S., Raj S., Cossins B., Marro M., Guallar V., Petrov D.. Direct observation of single dna structural alternations at low forces with surface-enhanced raman scattering // Biophysical Journal. 2013. Т. 104, С. 156–162.

- [17] Бердников А. В., Семко М. В., Широкова Ю. А.. *Медицинские приборы, аппараты, системы и комплексы*// Изд-во Казан. гос. техн. ун-та, 2004.
- [18] Priezzhev A. V. Ryaboshapka O. M., Firsov N. N., Sirko I. V.. Aggregation and disaggregation of erythrocytes in whole blood: study by backscattering technique// *Journal of Biomedical Optics*. 1999. Т. 4, С. 76–84.
- [19] Bronkhorst P. J., Grimbergen J., Brakenhoff J., Heethaar G. J., Sixma J. J.. The mechanism of red cell (dis)aggregation investigated by means of direct cell manipulation using multiple optical trapping// *British Journal of Haematology*. 1997. Т. 96, С. 256–258.
- [20] Neuman K. C., Block S. M.. Optical trapping // *Review of Scientific Instruments*. 2004. Т. 75, С. 2787–2809.
- [21] Cizmar T., Davila Romero L. C., Dholakia K., Andrews D. L.. Multiple optical trapping and binding: new routes to self-assembly // *Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics*. 2010. Т. 43, С. 102001.
- [22] Hansen P. M., Bhatia V. K., Harrit N., Oddershede L.. Expanding the optical trapping range of gold nanoparticles// *Nano Letters*. 2005. Т. 5, С. 1937–1942.
- [23] Romano G., Sacconi L., Capitanio M., Pavone F. S.. Force and torque measurements using magnetic micro beads for single molecule biophysics // *Optics Communications*. 2002. Т. 215, С. 323–331.
- [24] Helseth L. E.. Paramagnetic particles in an optical trap // *Optics Communications*. 2007. Т. 276, С. 277–282.
- [25] Ghislain L. P., Webb W. W.. Scanning-force microscope based on an optical trap// *Optics Letters*. 1993. Т. 18, С. 1678–1680.
- [26] Tonin M., Balint S., Mestres P., Martinez I. A., Petrov D.. Electrophoretic mobility of a growing cell studied by photonic force microscope// *Applied Physics Letters*. 2010. Т. 97, С. 203704.

- [27] Heo S., Kim K., Christophe R., Yoon T.-Y., Cho Y.-H.. Simultaneous detection of biomolecular interactions and surface topography using photonic force microscopy // *Biosensors and Bioelectronics*. 2013. T. 42, C. 106–111.
- [28] Nieminen T. A., Loke V. L. Y., Knoner G., Branczyk M.. Toolbox for calculation of optical forces and torques // *PIERS Online*. 2007. T. 3, C. 338.
- [29] Nieminen T. A., Rubinsztein-Dunlop H., Heckenberg N. R.. Calculation and optical measurement of laser trapping forces on non-spherical particles // *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. 2001. T. 70, C. 627–637.
- [30] Reicherter M., Liesener J., Haist T., Tiziani H. J.. Advantages of holographic optical tweezers // *Conference Paper : European Conference on Biomedical Optics (ECBO)*. 2003. T. , C. 5143.
- [31] Greely C. M., Singh G. P., Petrov D.. Dual wavelength optical tweezers for confocal raman spectroscopy // *Optics Communications*. 2005. T. 245, C. 465–470.
- [32] Cheezum M. K., Walker W. F., Guilford W. H.. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles // *Biophysical Journal*. 2001. T. 81, C. 2378–2388.
- [33] J.-C. Meiners, S. R. Quake. Direct measurement of hydrodynamic cross correlations between two particles in an external potential // *Physical Review Letters*. Mar 1999. T. 82, C. 2211–2214.
- [34] Henderson S., Mitchell S., Bartlett P.. Position correlation microscopy: probing single particle dynamics in colloidal suspensions // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2001. T. 190, C. 81–88.

- [35] Belloni F., Monneret S., Monduc F., Scordia M.. Multiple holographic optical tweezers parallel calibration with optical potential well characterization// Optics Express. 2008. Т. 16, С. 9011–9020.
- [36] Квасников И. А.. *Термодинамика и статистическая физика: теория неравновесных систем*// УРСС, 2003.
- [37] Singer W., Bernet S., Hecker N., Ritsch-Marte M.. Three-dimensional force calibration of optical tweezers// Journal of Modern Optics. 2000. Т. 47, С. 2921–2931.
- [38] Chi-Kuang Sun, Yin-Chieh Huang, Ping Chin Cheng, Hung-Chi Liu, Bai-Ling Lin. Cell manipulation by use of diamond microparticles as handles of optical tweezers// Journal of the Optical Society of America B. 2001. Т. 18, С. 1483.
- [39] Lee W. G., Bang H., Yun H., Lee J., Park J., Kim J. K., Chung S., Cho K., Chung C., Dong-Chul Han, Jun Keun Chang. On-chip erythrocyte deformability test under optical pressure// Lab Chip. 2007. Т. 7, С. 516–519.
- [40] Marsa F., Farre A., Martin-Badosa E., Montes-Usategui M.. Holographic optical tweezers combined with back-focal-plane displacement detection// Optics Express. 2013. Т. 21, С. 30282–30294.
- [41] Padgett M., Di Leonardo R.. Holographic optical tweezers and their relevance to lab on chip devices// Lab Chip. 2011. Т. 11, С. 1196–1205.
- [42] Chapin S. C., Germain V., Dufresne E. R.. Automated trapping, assembly, and sorting with holographic optical tweezers// Optics Express. 2004. Т. 14, С. 13095–13100.
- [43] Jesacher A., Fuhapter S., Maurer C., Bernet S., Ritsch-Marte M.. Holographic optical tweezers for object manipulations at an air-liquid surface// Optics Express. 2006. Т. 14, С. 6342–6352.

- [44] Parkin S., Knoner G., Nieminen T. A., Heckenberg N. R., Rubinsztein-Dunlop H.. Measurement of the total optical momentum transfer in optical tweezers // *Optics Express*. 2006. T. 14, C. 6963.
- [45] M. E. J. Friese, J. Enger, H. Rubinsztein-Dunlop, N. R. Heckenberg. Optical angular-momentum transfer to trapped absorbing particles // *Physical Review A*. Aug 1996. T. 54, C. 1593–1596.
- [46] Peng Li, Kebin Shi, Zhiwen Liu. Manipulation and spectroscopy of a single particle by use of white-light optical tweezers // *Optics Letters*. 2005. T. 30, C. 156.
- [47] Constable A., Kim J., Mervis J., Zarinetchi F., Prentiss M.. Demonstration of a fiber-optical light-force trap // *Optics Letters*. 1993. T. 18, C. 1867–1869.
- [48] Cabrini S., Liberale C., Cojoc D., Carpentiero A., Prasciolu M., Mora S., Degiorgio V., De Angelis F., Di Fabrizio E.. Axicon lens on optical fiber forming optical tweezers, made by focused ion beam milling // *Microelectronic Engineering*. 2006. T. 83, C. 804–807.
- [49] Guck J., Ananthakrishnan R., Moon T. J., Cunningham C. C., Kas J.. Optical deformability of soft biological dielectrics // *Physical Review Letters*. 2000. T. 84, C. 5451–5454.
- [50] Kenneth Castelino, Srinath Satyanarayana, Metin Sitti. Manufacturing of two and three-dimensional micro-, nanostructures by integrating optical tweezers with chemical assembly // *Robotica*. 2005. T. 23, C. 435–439.
- [51] Plewa J., Tanner E., Mueth D. M., Grier D. G.. Processing carbon nanotubes with holographic optical tweezers // *Optics Express*. 2004. T. 12, C. 1978–1981.
- [52] АХМАНОВ С. А., НИКИТИН С. Ю.. *Физическая оптика* // Наука, 2004.
- [53] Шен И. Р.. *Принципы нелинейной оптики* // Москва: Наука, 1989.

- [54] Creely C., Volpe G., Singh G., Soler M., Petrov D.. Raman imaging of floating cells// *Optics Express*. 2005. Т. 13, С. 6105–6110.
- [55] Wang M. D., Yin H., Landick R., Gelles J., Block S. M.. Stretching dna with optical tweezers// *Biophysical Journal*. 1997. Т. 72, С. 1335–1346.
- [56] Bronkhorst P. J. H., 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// *Biophysical Journal*. 1999. Т. 69, С. 1145–1151.
- [57] Mizuno D., Head D. A., MacKintosh F. C., Schmidt C. F.. Active and passive microrheology in equilibrium and nonequilibrium systems // *Macromolecules*. 2008. Т. 41, С. 7194–7202.
- [58] Brau R. R., Ferrer J. M., Lee H., Castro C. E., Tam B. K., Tarsa P. B., Matsudaira P., Boyce M. C., Kamm R. D., Lang M. J.. Passive and active microrheology with optical tweezers// *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*. 2007. Т. 9, С. S103–S112.
- [59] Block S.M.. Kinesin motor mechanics: Binding, stepping, tracking, gating, and limping// *Biophysical Journal*. 1997. Т. 92, С. 2986–2995.
- [60] Фирсов Н. Н., Джанашия П. Х.. *Введение в экспериментальную и клиническую гемореологию*// Москва, 2008.
- [61] Пимеонова И., Пимеонов А.. *Лекции по общей биологии*// Лицей, 2003.
- [62] Герман Ирвинг П.. *Физика организма человека*// Интеллект, 2011.
- [63] Ошевенский Л. В., Преснухина Н. Г., Лобкаева Е. П., Елисеева Т. И.. *Электрофоретическая подвижность эритроцитов (методы и схема устройства): Методическое пособие*// Нижегородский Государственный Университет им. Н. И. Лобачевского, 2005.

- [64] Marikovsky V., Danon D.. Electron microscope analysis of young and old red blood cells stained with colloidal iron for surface charge evaluation // The Journal of Cell Biology. 1969. T. 43, C. 1–7.
- [65] Perelsonand A. S., Wiege F. W.. The equilibrium size distribution of rouleaux // Biophysical Journal. 1982. T. 37, C. 515–522.
- [66] Hewson W. A.. *A descripton of the red particles of the blood* // The works of William Hewson, 1773.
- [67] Perelsonand A. S., Wiege F. W.. The suspension stability of blood // Physiological Reviews. 1929. T. 9, C. 241–247.
- [68] Chien S., Jan K.. Red cell aggregation by macromolecules: Roles of surface adsorption and electrostatic repulsion // Journal of Supramolecular Structure. 1973. T. 1, C. 385–409.
- [69] Merrill E. W., Gilliland E. R., Lee T. S., Salzman E. W.. Blood rheology: Effect of fibrinogen deduced by addition // Circulation Research. 1966. T. 18, C. 437–446.
- [70] Bäumlner H., Neu B., Donath E., Kiesewetter H.. Basic phenomena of red blood cell rouleaux formation // Biorheology. 1999. T. 36, C. 439–442.
- [71] Asakura S., Oosawa F.. Interaction between particles suspended in solutions of macromolecules // Journal of Polymer Science. 1958. T. 33, C. 183–192.
- [72] Bjorn N., Meiselman H. J.. Depletion-mediated red blood cell aggregation in polymer solutions // Biophysical Journal. 2002. T. 83, C. 2482–2490.
- [73] Bäumlner H., Donath E., Krabi A., Knippel W., Budde A., Kiesewetter H.. Electrophoresis of human red blood cells and platelets. evidence for depletion of dextran // Biorheology. 1996. T. 33, C. 333–351.
- [74] Meiselman H. J., Neu B., Baskurt O.. *Red Blood Cell Aggregation* // CRC PRESS, 2011.

- [75] Madl C., Koppensteiner R., Wendelin B., Lenz K., Kramer L., Grimm G., Kranz A., Schneeweiss B., Ehringer H.. Effect of immunoglobulin administration on blood rheology in patients with septic shock// *Circulatory shock*. 1993. T. 40, C. 264–267.
- [76] Maeda N., Shiga T.. Opposite effect of albumin on the erythrocyte aggregation induced by immunoglobulin g and fibrinogen // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1986. T. 855, C. 127–135.
- [77] Ben-Ami R., Barshtein G., Mardi T., Deutch V., Elkayam O., Yedgar S., Berliner S.. A synergistic effect of albumin and fibrinogen on immunoglobulin-induced red blood cell aggregation // *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2003. T. 285, C. H2663–H2669.
- [78] Lominadze D., Dean W. L.. Involvement of fibrinogen specific binding in erythrocyte aggregation // *FEBS Letters*. 2002. T. 517, C. 41–44.
- [79] Carvalho F. A., Connell S., Miltenberger-Miltenyi G., Pereira S. V., Tavares A., Ariens R. A., Santos N. C.. Atomic force microscopy-based molecular recognition of a fibrinogen receptor on human erythrocytes // *ACS Nano*. 2010. T. 4, C. 4609–4620.
- [80] Hochmuth R. M.. Micropipette aspiration of living cells // *Journal of Biomechanics*. 2003. T. 33, C. 15–22.
- [81] Artmann G. M., Sung K-L. P., Horn T., Whittemore D., Norwich G., Chien S.. Micropipette aspiration of human erythrocytes induces echinocytes via membrane phospholipid translocation // *Biophysical Journal*. 1997. T. 72, C. 1434–1441.
- [82] Skalak R., Zarda P. R., Jan K. M., Chien S.. Mechanics of rouleau formation // *Biophysical Journal*. 1981. T. 35, C. 771–781.
- [83] Steffen P., Verdier C., Wagner C.. Quantification of depletion-induced adhesion of red blood cells // *Phys. Rev. Lett.*. Jan 2013. T. 110, C. 018102.

- [84] Dunlop M. J., Lee M. M., Canham P. B., Taylor C. P. S.. Kinetics of adhesive interaction in vitro of human erythrocytes in plasma // *Microvascular Research*. 1984. Т. 28, С. 62–74.
- [85] Fontes A., Fernandes H.P., Thomaz A. A., Barbosa L.C., Barjas-Castro M. L., Cesar C. L.. Measuring electrical and mechanical properties of red blood cells with double optical tweezers // *Journal of Biomedical Optics*. 2008. Т. 13, С. 014001.
- [86] Kauffman K. J., Pajerowski J. D., Jamshidi N., Palsson B. O., Edwards J. S.. Description and analysis of metabolic connectivity and dynamics in the human red blood cell // *Biophysical Journal*. 2002. Т. 83, С. 646–662.
- [87] Bao G., Suresh S.. Cell and molecular mechanics of biological materials // *Nature Materials*. 2003. Т. 2, С. 715–725.
- [88] O'Reilly M., McDonnell L., O'Mullane J.. Quantification of red blood cells using atomic force microscopy // *Ultramicroscopy*. 2001. Т. 86, С. 107 – 112.
- [89] Iyer S., Gaikwad R. M., Subba-Rao V., Woodworth C. D., Sokolov I.. Atomic force microscopy detects differences in the surface brush of normal and cancerous cells // *Nature Nanotechnology*. 2009. Т. 4, С. 389 – 393.
- [90] Cross S. E., Jin Y., Rao J., Gimzewski J. K.. Atomic force microscopy probing of cell elasticity // *Nature Nanotechnology*. 2007. Т. 2, С. 780 – 783.
- [91] Kuznetsova T. G., Starodubtseva M. N., Yegorenkov N. I., Chizhik S. A., Zhdanov R. I.. Atomic force microscopy probing of cell elasticity // *Micron*. 2007. Т. 38, С. 824 — 833.
- [92] Puig Morales-Marinkovic M., Turner K. T., Butler J. P., Fredberg J. J., Suresh S.. Viscoelasticity of the human red blood cell // *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2007. Т. 293, С. C597–C605.
- [93] Ладеман Ю., Приезжев А. В., Фирсов Н. Н.. *Оптическая биомедицинская диагностика* // М.: Физматлит, 2007.

- [94] Uyuklu M., Meiselman H. J., Baskurt O. K.. Effect of hemoglobin oxygenation level on red blood cell deformability and aggregation parameters // *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2009. Т. 41, С. 179–188.
- [95] Henon S., Lenormand G., Richert A., Gallet F.. A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers // *Biophysical Journal*. 1995. Т. 76, С. 1666–1673.
- [96] Hochmuth R. M., Worthy P. R., Evans E. A.. Red cell extensional recovery and the determination of membrane viscosity // *Biophysical Journal*. 1979. Т. 76, С. 101–114.
- [97] Brochard F., Lennon J. F.. Frequency spectrum of the flicker phenomenon in erythrocytes // *J. Phys. France*. 1975. Т. 36, С. 1035–1047.
- [98] Кононенко В. Л.. Фликкер эритроцитов. 1. Теоретические модели и методы регистрации // *Биологические мембраны*. 2009. Т. 26, С. 352–369.
- [99] Кононенко В. Л.. Фликкер эритроцитов. 2. Результаты экспериментальных исследований // *Биологические мембраны*. 2009. Т. 26, С. 451–467.
- [100] Yoon Y. Z., Hong H., Brown A., Kim D. C., Kang D. J., Lew V. L., Cicuta P.. Flickering analysis of erythrocyte mechanical properties: Dependence on oxygenation level, cell shape, and hydration level // *Biophysical Journal*. 2009. Т. 97, С. 1606–1615.
- [101] Peterson M. A., Strey H., Sackmann E.. Theoretical and phase contrast microscopic eigenmode analysis of erythrocyte flicker amplitudes // *J. Phys. France*. 1992. Т. 2, С. 1273–1285.
- [102] Evans J., Gratzner W., Mohandas N., Parker K., Sleep J.. Fluctuations of the red blood cell membrane: Relation to mechanical properties and lack of atp dependence // *Biophysical Journal*. 2008. Т. 94, С. 4134–4144.

- 
- [103] Zilker A., Engelhardt H., Sackmann E.. Frequency spectrum of the flicker phenomenon in erythrocytes// *J. Phys. France*. 1987. T. 48, C. 2139–2151.
- [104] Segur J. B., Oberstar H. E.. Viscosity of glycerol and its aqueous solutions// *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 1951. T. 83, C. 2117–2120.
- [105] Evans E. A.. Bending elastic modulus of red-blood-cell membrane derived from buckling instability in micropipet aspiration tests // *Biophysical Journal*. 1983. T. 43, C. 27–30.
- [106] Bartlett P., Henderson S. I., Mitchell S. J.. Measurement of the hydrodynamic forces between two polymer-coated spheres // *Philosophical Transactions of the Royal Society A Math. Phys. Eng. Sci.*. 2001. T. 359, C. 883–895.
- [107] N. K. Metzger, 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// *Physical Review Letters*. 2007. T. 98, C. 068102.
- [108] Hashimoto Y., Nakayama T., Futamura A., Omura M., Nakahara K.. Erythrocyte mean cell volume and genetic polymorphism of aldehyde dehydrogenase 2 in alcohol drinkers// *Blood*. 2002. T. 99, C. 3487–3488.
- [109] Reidand H. L., De Ceulaer K.. Abnormal plasma and serum viscosity in systemic lupus erythematosus (sle): a jamaican study // *Clinical hemorheology and microcirculation*. 1999. T. 20, C. 175–180.
- [110] Liu Y., Cheng D. K., Sonek G. J., Berns M. W., Chapman C. F., Tromberg B. J.. Evidence for localized cell heating induced by infrared optical tweezers// *Biophysical Journal*. 1995. T. 68, C. 2137–2144.
- [111] Zhang J., Johnson P. C., Popel A. S.. Red blood cell aggregation and dissociation in shear flows simulated by lattice boltzmann method// *Journal of Biomechanics*. 2008. T. 41, C. 47–55.

- 
- [112] Korotaeva T. V., Firsov N. N., Bjelle A., Vishlova M. A.. Erythrocytes aggregation in healthy donors at native and standard hematocrit: the influence of sex, age, immunoglobulins and fibrinogen concentrations. standardization of parameters// Clinical Hemorheology and Microcirculation. 2007. T. 36, C. 335–343.