

На правах рукописи

Хохлова Мария Дмитриевна

МЕТОД ОПТИЧЕСКОГО ПИНЦЕТА
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИЛ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
И МИКРОМЕХАНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК
КЛЕТОК

01.04.05 – Оптика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2014

Работа выполнена на кафедре квантовой электроники физического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”.

Научный руководитель:

д. ф.-м. н., проф. Федянин Андрей Анатольевич

Официальные оппоненты:

д. ф.-м. н., проф. Баграташвили Виктор Николаевич,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
“Институт проблем лазерных и информационных технологий”
Российской академии наук, Шатура

к. ф.-м. н., с. н. с. Власов Игорь Иванович,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
“Институт общей физики имени А.М. Прохорова”
Российской академии наук, Москва

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
“Объединенный институт высоких температур”
Российской академии наук, Москва

Защита состоится 12 ноября 2014 г. в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д501.001.45 на базе Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, МГУ, дом 1, строение 5 (19-й корпус НИИ ядерной физики имени Д. В. Скобельцына МГУ имени М. В. Ломоносова), аудитория 2-15.

С диссертацией можно ознакомиться в Отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова и на сайте <http://www.sinp.msu.ru/ru/dissertation/19758>.

Автореферат разослан 8 октября 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета Д501.001.45, к. ф.-м. н.

О.М. Вохник

Общая характеристика работы

Актуальность работы

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

Изучение проблем, связанных с оптическим управлением одиночными микрообъектами с помощью пространственно неоднородного лазерного излучения (оптических ловушек) и с развитием оптических методов диагностики микромеханических и силовых характеристик одиночных биологических клеток, является одним из активно развивающихся современных направлений оптики и лазерной физики. Впервые принципы работы оптического пинцета были продемонстрированы в работах Артура Ашкина. В настоящее время метод оптического пинцета используют для исследования широкого круга биохимических и биофизических процессов. Активно развиваются методики для исследования локальных микромеханических характеристик и сил взаимодействия объектов на микромасштабах, что обусловлено как фундаментальным, так и практическим интересом в ряде областей: в медицине, клеточной биологии, коллоидной химии.

При фокусировке лазерного пучка в области его перетяжки возникает неоднородное электромагнитное поле, которое является потенциальной ямой для микрообъектов, находящихся вблизи этой перетяжки. Оптический пинцет позволяет осуществить захват исследуемых микрообъектов, а также управлять положением этих микрообъектов в пространстве. Возможность управления захваченными микрообъектами, а также разработка методик калибровки сил оптического захвата различных микрообъектов позволяет применять оптический пинцет для задач, связанных с сортировкой, упорядочением и локализацией одиночных микрообъектов, взвешенных в жидкости, и количественным измерением сил их взаимодействия вплоть до фемтоньютонных значений. Уникальной особенностью этого оптического метода является возможность изучения свойств одиночных микрообъектов. Достигается это тем, что, как правило, используются микрообъекты, взвешенные в жидкости, что позволяет изучать сами микрообъекты без учета 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 излучение этой длины волны. Именно поэтому для формирования оптических ловушек обычно используются лазеры с длиной волны, лежащей в инфракрасном диапазоне.

Метод оптического пинцета позволяет фиксировать и перемещать живые клетки в среде, близкой к естественной для них, с большой точностью измерять силы от нескольких фемтоньютон до десятков пиконьютонов. Эти силы сопоставимы с силами межклеточных или молекулярных взаимодействий, тем самым оптический пинцет позволяет изучать биофизические процессы, происходящие в отдельных клетках, открывая при этом новые горизонты во многих областях био-

фотоники и биомедицины. В частности, метод используется для изучения свойств эритроцитов.

На сегодняшний день актуальной задачей является развитие методик, позволяющих определять микромеханические свойства и силы взаимодействия одиночных эритроцитов, локализованных в естественной для них среде. Деформационные и агрегационные свойства эритроцитов во многом определяют реологию крови на уровне микрососудов, то есть в значительной степени влияют на микроциркуляцию крови. 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 от единиц до тысяч Гц. Способность эритроцитов к агрегации также 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 заболеваний. Известно, что повышенная агрегация эритроцитов является следствием некоторых тяжелых заболеваний, сопровождающихся гемореологическими нарушениями, например, системной красной волчанки (СКВ). 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. Попытка исследования этого явления на одиночных клетках методом оптического пинцета представлена на сегодняшний момент лишь в единичных работах, в которых не было проведено количественного анализа сил и особенностей агрегации одиночных эритроцитов.

В диссертационной работе разработан метод, основанный на применении подходов пассивной и активной микрореологии в двухлучевом оптическом пинцете, для определения вязкоупругих свойств одиночных эритроцитов, взвешенных в жидкости, в широком диапазоне частот — от 1 Гц до 250 кГц. Разработан метод, позволяющий напрямую измерять силы взаимодействия между одиночными эритроцитами в аутологичной среде при их сдвиговой 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. Последняя часть работы посвящена экспериментальному определению механизмов агрегации эритроцитов путем измерения сил взаимодействия между одиночными клетками и исследованию особенностей 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.

Целями работы является развитие метода оптического пинцета для исследова-

ния вязкоупругих и агрегационных свойств клеток в естественной для них среде на примере эритроцитов, и применение этого метода для диагностики вязкоупругих свойств мембран эритроцитов в сочетании с подходами пассивной и активной микрореологии, а также для прямого измерения сил и определения механизмов агрегации эритроцитов на одиночных клетках с помощью двухлучевого оптического пинцета.

Достоверность полученных в работе результатов подтверждается их согласием с данными экспериментов, проведенных в Научно-исследовательском институте механики МГУ другими методами, соответствием результатов теоретическим оценкам, приведенным как в диссертационной работе, так и в литературе, 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 рецензируемых международных и российских журналах. Представленные результаты являются новыми и получены впервые.

Научная новизна результатов диссертации заключается в следующих положениях:

- Предложен новый оптический метод диагностики микромеханических свойств одиночных эритроцитов с использованием оптического пинцета. Метод предполагает прямое определение эффективных вязкоупругих характеристик микрообъекта, взвешенного в жидкости и оптически захваченного в перетяжку лазерного пучка вдали от подложки, без использования вспомогательных микрочастиц, в диапазоне частот от 1 Гц до 250 кГц. Метод основан на корреляционном анализе измеряемых с помощью регистрации рассеянного на краях клетки сфокусированного лазерного излучения случайных смещений краев эритроцита, захваченных одновременно в две оптические ловушки, для низких частот колебаний мембраны клетки и на анализе фазового сдвига в осцилляциях противоположных краев клетки, захваченных одновременно в две оптические ловушки, положение одной из которых совершает вынужденные 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 при визуальном контроле эксперимента посредством оптической мик-

роскопии. Впервые показана значимость рецепторного механизма агрегации эритроцитов на уровне одиночных клеток.

Практическая значимость работы состоит в возможности использования полученных результатов для задач, связанных с управлением и характеристикой микрообъектов методом оптического пинцета. Практическое значение имеет развитие методов диагностики заболеваний, связанных с изменением реологических свойств крови, а именно с изменением агрегационных и микромеханических свойств эритроцитов.

На защиту выносятся следующие основные положения:

- Метод активной и пассивной микрореологии в оптическом пинцете с прецизионным измерением смещений оптически захваченных микрообъектов 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 колебаний мембраны эритроцита в окрестности 130 кГц клетка имеет резонансную особенность, проявляющуюся в диссипации механической энергии, добавляемой 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 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.

Апробация работы проводилась на следующих международных конференциях: “Saratov Fall Meeting 2013” (Саратов, Россия, 2013), “21th International Conference on Advanced Laser Technologies 2013” (Будва, Черногория, 2013), “ICONO/LAT 2013” (Москва, Россия, 2013), “SPIE Photonics Europe 2012” (Брюссель, Бельгия, 2012), “SPIE Optics + Photonics 2012” (Сан-Диего, США, 2012),

“Пятая Всероссийская с Международным участием школа-конференция по физиологии кровообращения” (Москва, Россия, 2012), “19th International Conference on Advanced Laser Technologies” (Золотые Пески, Болгария, 2011), “CLEO, Optical Society of America” (Сан Хосе, США, 2010), “International Conference on Lasers, Applications, and Technologies” (Казань, Россия, 2010), “Современные достижения бионаноскопии” (Москва, Россия, 2009)

Результаты диссертационной работы опубликованы в 4 статьях научных журналов из списка ВАК России.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и списка литературы. Объем диссертации составляет 148 страниц, включая список литературы, 42 рисунка. Список цитированной литературы содержит 113 наименований, включая публикации автора по теме диссертации.

Личный вклад автора в настоящую диссертационную работу состоит в развитии методики оптического пинцета для прямого измерения сил агрегации эритроцитов на уровне одиночных клеток, определения механизмов эритроцитарной агрегации, определения микромеханических свойств одиночных эритроцитов, в проведении экспериментов, обработке и анализе полученных результатов.

Содержание работы

Глава 1. Обзор литературы: метод оптического пинцета для исследования упругих и агрегационных свойств эритроцитов

В первой главе представлен обзор литературы по применениям метода оптического пинцета для исследования микромеханических и агрегационных свойств эритроцитов. Описан принцип работы оптического пинцета и методы его калибровки. Описаны существующие на сегодняшний день альтернативные способы диагностики вязкоупругих и агрегационных свойств эритроцитов.

Глава 2. Изучение вязкоупругих свойств одиночных эритроцитов методами активной и пассивной микрореологии в оптическом пинцете

Во второй главе описывается новая методика 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 диагностики 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 оптических захваченных в жидкости клеток. Для исследования более высокочастотных особенностей упругих свойств эритроцитов (вплоть до 250 кГц) использовался метод активной микрореологии в оптическом пинцете. Для диапазона частот от 100 Гц

до 1 кГц была разработана методика измерения эффективного времени релаксации мембраны клетки при внешнем периодическом воздействии и показана чувствительность методики к изменениям эластичных свойств мембраны. Подробно результаты исследований изложены в работе [1].

Мембраны взвешенных в жидкости эритроцитов находятся в постоянном хаотическом колебательном движении, называемом фликкером эритроцитов, спектр которого лежит в диапазоне частот от единиц Гц до 100 Гц. Статистические характеристики фликкера эритроцита определяются механическими свойствами клетки. В работе показана возможность измерения параметров фликкера эритроцитарной мембраны методом пассивной микрореологии в двухлучевом оптическом пинцете, который в отличие от альтернативных методов позволяет позиционировать клетку вдали от подложки и напрямую измерять малые смещения мембраны путем регистрации смещений рассеянного на краях эритроцита сфокусированного лазерного пучка с помощью квадрантных фотодиодов (КФД). Для изготовления образцов использовалась суспензия эритроцитов в натрий-фосфатном буфере. Длина волны лазерного излучения, формировавшего оптические ловушки, составляла 980 нм, длины волн лазеров, использующихся для регистрации малых смещений мембраны клетки — 670 и 635 нм. Сила оптического захвата краев эритроцита составляла около 7 пН, расстояние между ловушками ~ 7 мкм, что соответствует практически недеформированному захваченному эритроциту. Картина рассеяния лазерного излучения на краях эритроцита представляла собой достаточно контрастную интерференционную картину для измерения малых тепловых смещений краев эритроцита с помощью КФД. Смещения противоположных краев эритроцита регистрировались в течение 100 секунд. Далее рассчитывались авто- и кросс-корреляционные функции смещений краев клетки, вид которых 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. 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, $G(\tau)$ и $g(\tau)$, соответственно, полученных для нормальных и фиксированных клеток, показаны на Рис. 1а, б. Черными и серыми кругами обозначены нормированные авто-корреляционные функции смещений первого и второго краев эритроцита, соответственно, черными треугольниками — 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 были рассмотрены уравнения Ланжевена для движения двух краев эритроцитов, на каждый из которых действуют случайные броуновские силы, силы оптического захвата, си-

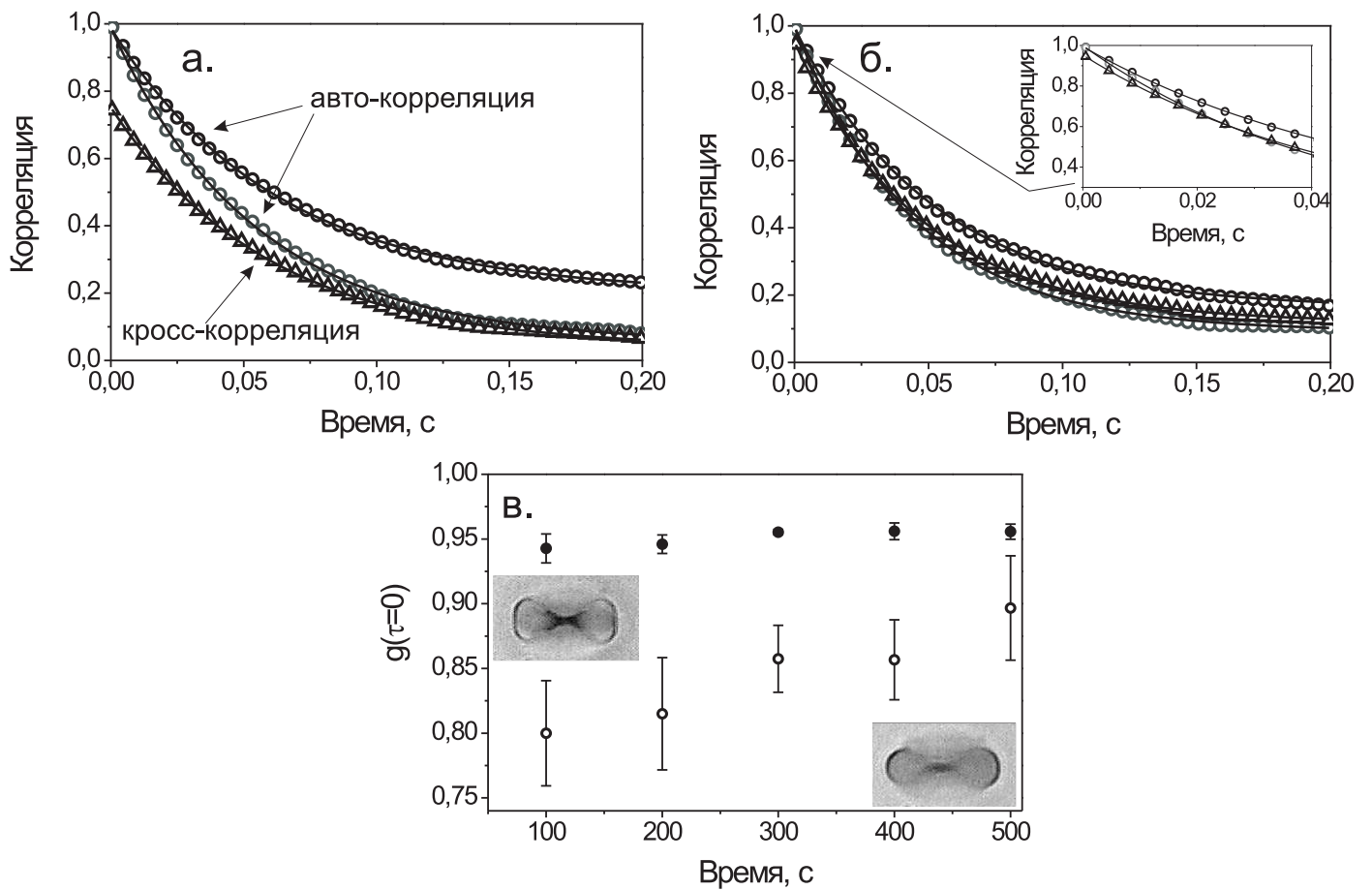


Рис. 1: Корреляционный анализ малых смещений краев эритроцитов. а. Нормированные авто- (черные и серые круги) и кросс-корреляции (черные треугольники) смещений краев нормального эритроцита. Сплошные линии соответствуют аппроксимации экспериментальных данных суммой двух экспонент. б. Нормированные авто- (черные и серые круги) и кросс-корреляции (черные треугольники) смещений краев фиксированного жесткого эритроцита. Сплошные линии соответствуют аппроксимации экспериментальных данных суммой двух экспонент. На вставке те же зависимости в увеличенном масштабе. 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.

лы вязкости и упругости. Формальное решение уравнений дает выражения для авто- и кросс-корреляционных функций, имеющие вид суммы двух экспонент, показанные на Рис. 1 черными линиями. 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. Выражение для кросс-корреляционной функции смещений краев эритроцита в случае $\tau = 0$ имеет вид:

$$g(\tau = 0) = \frac{k + 2K}{2(k + K)} - \frac{k}{2(k + K)} = \frac{K}{K + k}, \quad (1)$$

где k — жесткость оптической ловушки при захвате края эритроцита, K — коэффициент эффективной жесткости клетки. Таким образом, измеряя $g(\tau = 0)$ и зная жесткость захвата края эритроцита k , можно определить величину эффективной жесткости эритроцита:

$$K = \frac{kg(\tau = 0)}{1 - g(\tau = 0)}. \quad (2)$$

Таким образом, предполагается, что чем больше значение K , тем больше должно быть значение $g(\tau = 0)$. На Рис. 1в представлены значения $g(\tau = 0)$, измеренные для нормальных клеток (незаполненные точки) и для эритроцитов с увеличенной жесткостью — фиксированных 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 и 10 фиксированным клеткам, соответственно. Видно, что значения $g(\tau = 0)$ для жестких фиксированных эритроцитов больше тех же значений для нормальных эритроцитов, что соответствует выражению (2). Эффективная жесткость нормальных клеток составила $K_{norm} = 9,6 \pm 3,2$ пН/мкм, что согласуется с независимыми измерениями эластичных свойств клетки методом оптического пинцета, а также литературными данными. 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, вследствие чего локальная эффективная жесткость мембраны может расти.

Как уже отмечалось выше, интерес представляет исследование механических свойств одиночных клеток в широком диапазоне частот. Метод пассивной микрореологии ограничен сверху частотами около 100 Гц, так как он позволяет регистрировать 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 в аутологичной плазме захватывался двумя оптическими ловушками с противоположных краев. При этом положение одной из ловушек осциллировало с амплитудой 100 нм и задаваемой частотой. Увлекаемый за ловушкой край эритроцита начинал осциллировать, колебания передавались по клетке, и фиксировался отклик противоположного края эритроцита. С помощью КФД в течение 1–5 секунд, в зависимости от частоты воздействия, измерялась фаза колебаний края эритроцита, захваченного в неподвижную ловушку (φ_2), относительно колебаний этой ловушки, фаза колебаний края эритроцита, захваченного в осциллирующую с ловушкой (φ_1), определялась их разность $\Delta\varphi = \varphi_2 - \varphi_1$ и рассчитывался тангенс разности фаз колебаний противоположных краев эритроцита $tg(\varphi_2 - \varphi_1)$. Мощность лазерного излучения внутри каждой из оптических ловушек составляла около 10 мВт. Частотные зависимости величины тангенса разности фаз $tg\Delta\varphi$ между колебаниями противоположных краев эритроцита, захваченного в оптическую ловушку, в диапазоне частот от 100 Гц до 1 кГц приведены на Рис. 2а. Видно, что зависимость с хорошей точностью является линейной. 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 результатов была предложена сле-

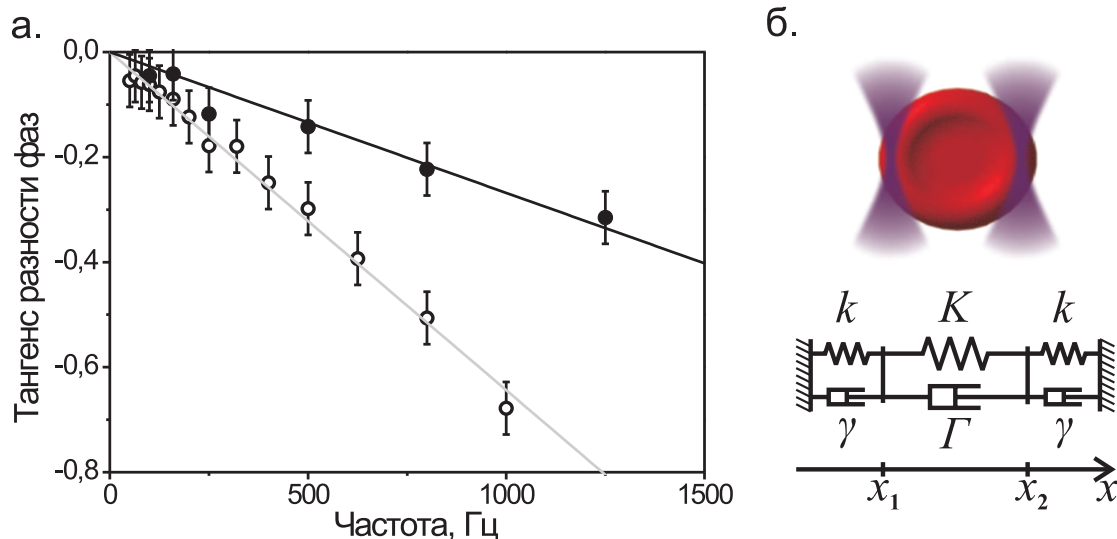


Рис. 2: а. Тангенс разности фаз между колебаниями противоположных краев эритроцита как функция частоты колебаний оптической ловушки. Незаполненные точки соответствуют нормальным эритроцитам. Черные точки соответствуют эритроцитам, которые были предварительно фиксированы глутаровым альдегидом. б. Схематичное изображение модели, описывающей систему оптически захваченного эритроцита. K — коэффициент эффективной жесткости эритроцита, k — эффективная жесткость оптических ловушек, γ — эффективный коэффициент вязкости при движении края эритроцита в плазме, Γ — эффективный коэффициент вязкости клетки.

дующая феноменологическая модель (Рис. 2б). Эритроцит, захваченный с двух сторон в две оптические ловушки, в жидкости можно описать с помощью эффективных параметров: K — коэффициента эффективной жесткости эритроцита, k — эффективной жесткости оптических ловушек, γ — эффективного коэффициента вязкости при движении края эритроцита в плазме, Γ — эффективного коэффициента вязкости клетки. Рассмотрение уравнения движения края эритроцита, находящегося в неподвижной ловушке, для диапазона частот, удовлетворяющих условию $\omega^2 \ll k(k + K)/\Gamma(\Gamma + \gamma)$, то есть для частот до 1 кГц, дало выражение для тангенса разности фаз колебаний краев эритроцита:

$$\operatorname{tg} \varphi = -\frac{\Gamma k - \gamma K}{k(k + K)}\omega = -\omega\tau_c. \quad (3)$$

Коэффициент пропорциональности τ_c определяется эффективными вязкоупругими свойствами всей клетки, захваченной в оптическом пинцете. Так как τ_c имеет размерность времени, его можно рассматривать как эффективное время отклика клетки, характеризующее распространение механических колебаний по эритроциту. Заметное уменьшение экспериментально измеренного τ_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 τ_c для контроля состояния и вязкоупругих свойств клеток.

При увеличении частоты осцилляций оптической ловушки до 250 кГц, а амплитуды колебаний до 500 нм были измерены разности фаз колебаний противоположных краев эритроцита $\varphi_1 - \varphi_2$ и амплитуды колебаний двух краев клетки на частоте внешнего воздействия. Результаты представлены на Рис. 3. Усреднение проводилось по 4 сериям измерений для каждого эритроцита и выборке из 7-ми различных эритроцитов одинакового размера внутри одной пробы крови. Количество и тип особенностей зависимости разности фаз от частоты колебаний оптической ловушки (Рис. 3а) не меняется от клетки к клетке. Ошибка среднего значения разности фаз, однако, возрастает для частот выше 150 кГц, что связано с ослаблением полезного сигнала 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 Рис. 3б. Заполненными точками отмечены амплитуды колебаний края, захваченного в подвижную ловушку. Незаполненными точками указаны амплитуды колебаний 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

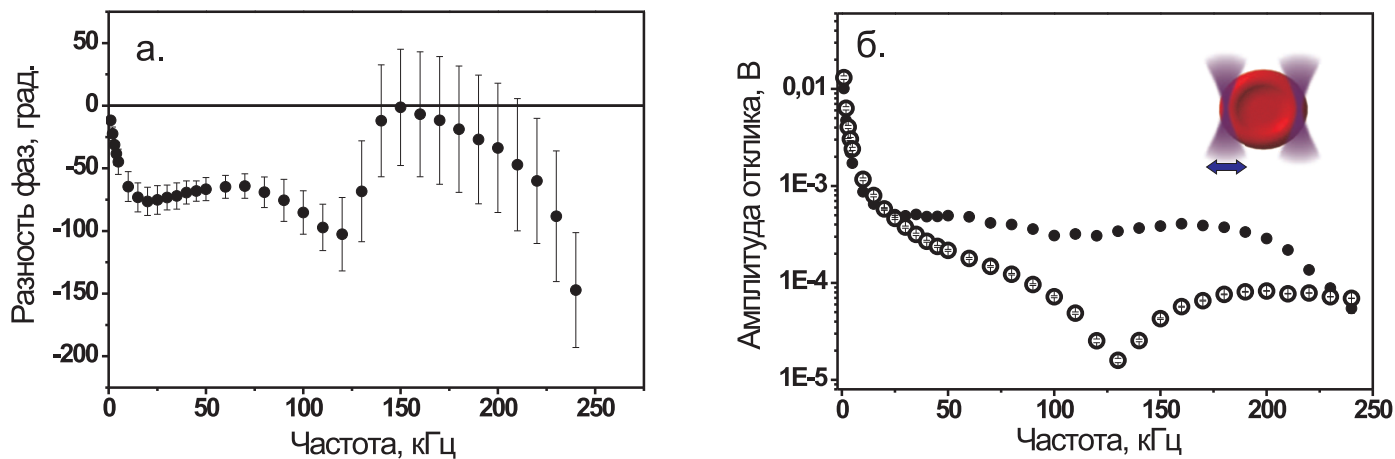


Рис. 3: Отклик эритроцита на внешнее воздействие со стороны оптической ловушки. а. Зависимость разности фаз между колебаниями противоположных краев эритроцита от частоты колебания положения одной из ловушек. б. Амплитуды колебаний противоположных краев эритроцита на частоте внешнего воздействия как функции этой частоты. Заполненные черные точки соответствуют колебаниям края клетки, захваченного в подвижную ловушку, незаполненные точки — колебаниям края, захваченного в неподвижную ловушку.

это внешнее воздействие, то есть наблюдается диссипация энергии на частотах около 130 кГц.

Вид кривой зависимости разности фаз от частоты (Рис. 3а) и амплитуд колебаний противоположных краев клетки (Рис. 3б) должен зависеть от микромеханических свойств эритроцита. В работе было проведено измерение тех же величин в тех же экспериментальных условиях, однако с заведомо измененными механическими свойствами эритроцитов — сравнивались измеряемые величины для нормальных недеформированных клеток с размером 8 мкм и для эритроцитов, которые были изначально растянуты на 800 нм посредством увеличения расстояния между оптическими ловушками. Так в мембрану клетки вносилось постоянное механическое напряжение, которое должно было изменить вязкоупругие свойства клетки в целом. На Рис. 4 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° для растянутых клеток и -66° 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. Результаты сравнения представлены на Рис. 5. Видно, что кривые зависимостей для нормальных и фиксированных клеток отличаются для высоких частот, начиная от 50 кГц. Скачок разности фаз для фиксированных клеток так же происходит на частотах около 130 кГц, однако этот скачок более явный, от -200° до $+50^\circ$ (Рис. 5а). В зависимости амплитуд фурье-гармоник от частоты внешнего воздействия (Рис. 5б) для фиксированных эритроцитов также

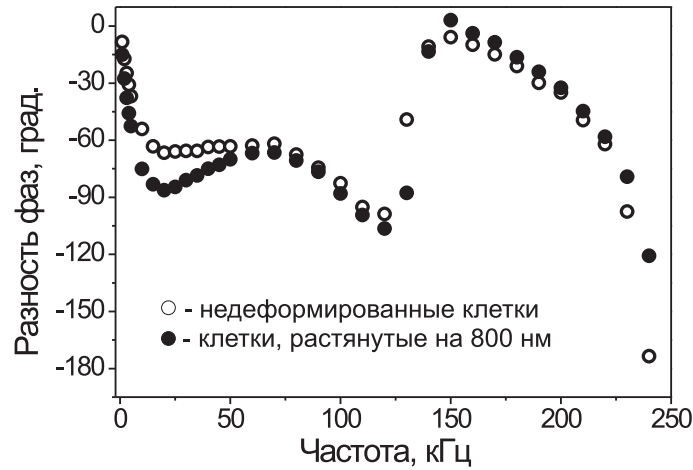


Рис. 4: Сравнение отклика нормального и деформированного в одном измерении эритроцита на внешнее воздействие со стороны оптической ловушки. Зависимость разности фаз между колебаниями противоположных краев эритроцита от частоты колебания положения одной из ловушек. Незаполненные точки соответствуют нормальным эритроцитам. Заполненные — клеткам, растянутым на 800 нм.

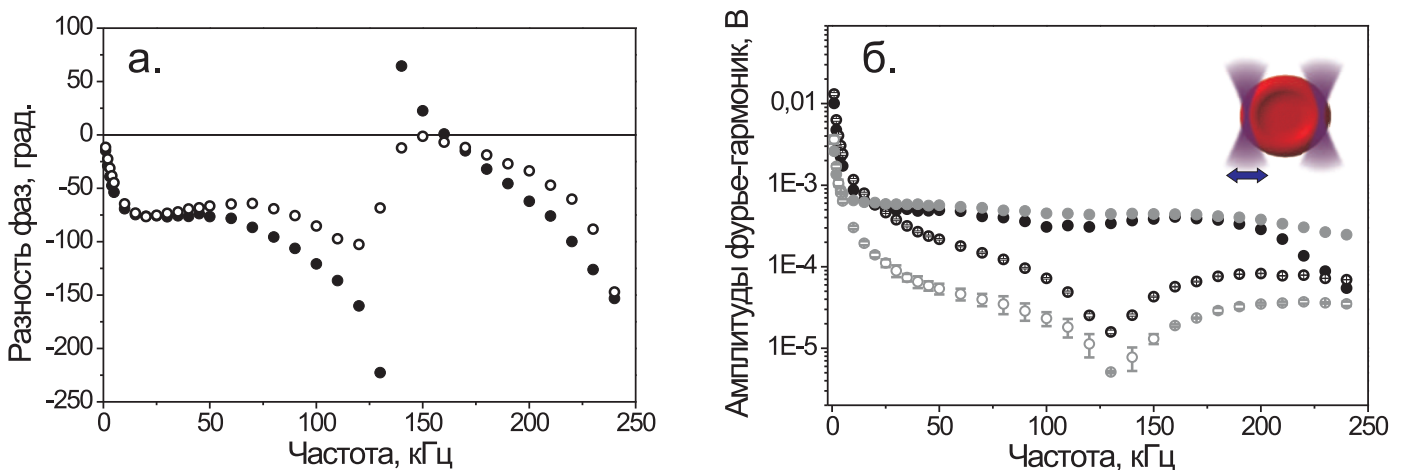


Рис. 5: Сравнение отклика нормального и фиксированного эритроцита на внешнее воздействие со стороны оптической ловушки. а. Зависимость разности фаз между колебаниями противоположных краев эритроцита от частоты колебания положения одной из ловушек. Незаполненные точки соответствуют нормальным эритроцитам. Заполненные — фиксированным. б. Амплитуды колебаний противоположных краев эритроцита на частоте внешнего воздействия как функции этой частоты. Заполненные черные точки соответствуют амплитудам колебаний края клетки в осциллирующей оптической ловушке для нормальных эритроцитов, незаполненные черные точки — колебаниям края клетки в неподвижной оптической ловушке для нормальных эритроцитов. Заполненные серые точки соответствуют амплитудам колебаний края фиксированной клетки в осциллирующей оптической ловушке. Незаполненные серые точки — амплитудам колебаний края фиксированной клетки в неподвижной ловушке.

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

Глава 3. Изучение агрегационных свойств эритроцитов в аутологичной плазме

Во третьей главе диссертационной работы рассматривается методика оптического пинцета для экспериментального исследования сил агрегации эритроцитов, ее временной динамики и особенностей для нормы и патологии. Подробно результаты исследований изложены в работах [2, 3].

Для формирования двух независимых оптических ловушек использовались два непрерывных инфракрасных АИГ-Nd лазера с длиной волны излучения 1,064 мкм. Для экспериментальных образцов использовалась венозная кровь 39 здоровых доноров и 6 пациентов, больных системной красной волчанкой (СКВ). Эритроциты суспендировались в аутологичной плазме в концентрации около $\sim 5 \cdot 10^3$ /мкл. Для наблюдения процесса агрегации два произвольных одиночных эритроцита захватывались в две оптические ловушки. Затем с помощью ловушек эритроциты сближались до касания, после чего лазерные пучки выключались. Клетки агрегировали, образуя двойной “монетный столбик”. На Рис. 6а изображен искусственно собранный с помощью оптической ловушки эритроцитарный агрегат. Для реализации процесса сдвиговой 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 — удачный разрыв агрегата (Рис. 6б), разрыве агрегата до состояния, когда между клетками оставалась прочная точечная связь (Рис. 6в), разъединение агрегата до конечных площадей перекрытия клеток (Рис. 6г) и неудачный разрыв агрегата, при котором прикладываемых сил оптических ловушек не хватало для разъединения клеток (Рис. 6д).

В работе была проведена калибровка сил оптического захвата краев эритроцита, которая позволила сопоставить мощность лазерного излучения внутри каждой из оптических ловушек с силой и жесткостью оптического захвата. Зная количественные характеристики оптической ловушки, можно непосредственно измерять силовое взаимодействие одиночных эритроцитов при их дезагрегации. Для этого агрегат из двух эритроцитов разъединялся с помощью оптических ловушек, сила которых последовательно изменялась. Скорость смещения оптических ловушек контролировалась и составляла 0,3 мкм/с. Для каждого значения силы захвата измерялось критическое расстояние между центрами клеток, которое могло быть достигнуто до “вылета” эритроцитов из ловушек (Рис. 7). Измерения были усреднены для 77 пар эритроцитов (39 образцов здоровой крови) — незаполненные точки на Рис. 7 и 17 пар эритроцитов (6 образцов крови больных СКВ) — заполненные точки на Рис. 7. Важным наблюдением является качественный рост силы агрегации клеток от ~ 8 пН до ~ 30 пН при увеличении расстояния между их центрами. В работе предложена феноменологическая модель для объяснения роста зависимости силы агрегации эритроцитов при уменьшении площади перекрытия клеток, основывающаяся на предположении, что эритроциты в парных агрегатах могут сохранять двояковогнутую форму. Соответственно, эффектив-

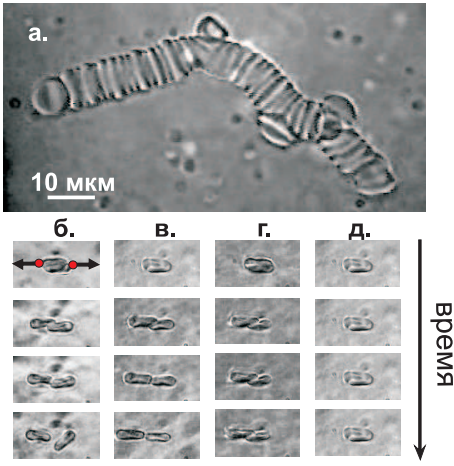


Рис. 6: Микрофотографии экспериментов по искусственной агрегации и disagregации эритроцитов. а. — эритроцитарный агрегат, искусственно собранный методом оптического пинцета. б, в, г, д — демонстрация четырех различных сценариев искусственной disagregации (полная disagregация, disagregация до “точки”, до “критической площади перекрытия” и неудавшийся разрыв агрегата, соответственно).

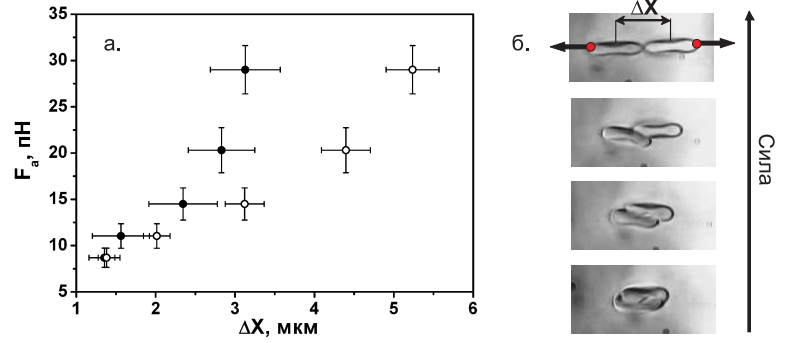


Рис. 7: Измерение силового взаимодействия между эритроцитами. а. — Экспериментальная зависимость силы взаимодействия одиночных эритроцитов (сила агрегации F_a) от расстояния между их центрами ΔX при искусственной disagregации. Незаполненные точки — усреднение по всем измерениям силы агрегации здоровых эритроцитов, заполненные точки — усреднение по измерениям силы агрегации эритроцитов больных СКВ. б. — микрофотографии эритроцитарного агрегата, полученные последовательно при увеличении силы оптических ловушек.

ные площади перекрытия клеток могут иметь форму не дисков, а колец (Рис. 8а). В предположении, что сила агрегации эритроцитов является поверхностной, а область перекрытия клеток в агрегате имеет форму диска, эту силу можно выразить как функцию расстояния между центрами колец ΔX следующим образом:

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

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

где σ — постоянная величина, R, r — внешний и внутренний радиусы диска, соответственно. Экспериментальные кривые зависимости силы агрегации от расстояния между центрами клеток (Рис. 7) качественно повторяют теоретические зависимости, полученные для модели колец (Рис. 8б). Причем наблюдения соответствуют не только возрастающей части теоретической кривой, но и ниспадающему участку. При реализации полного разъединения агрегата сила взаимодействия при смещении клеток сначала возрастала, но при достижении определенной площади перекрытия эритроциты disagregировали без приложения сил со стороны оптических ловушек, то есть сила взаимодействия между клетками

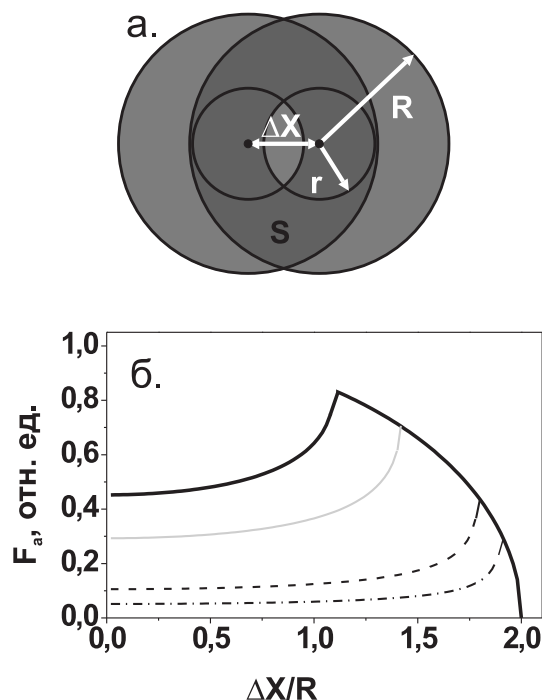


Рис. 8: а. Модель взаимодействия двух одиночных эритроцитов. б. Зависимость силы взаимодействия эритроцитов (в нормированных единицах) от расстояния между центрами эритроцитов (в нормированных на радиус эритроцита единицах). Различные кривые соответствуют различным соотношениям внутреннего и внешнего радиусов колец r/R : $r/R=0,3$ – сплошная черная линия, $r/R=0,5$ – сплошная серая линия, $r/R=0,8$ – штриховая серая линия, $r/R=0,9$ – штрих-пунктирная серая линия.

уменьшалась.

При изучении характера дезагрегации эритроцитов была обнаружена временная динамика силы агрегации. Эксперименты по дезагрегации эритроцитов с различным временем формирования агрегатов t_a показали, что при увеличении этого времени сила взаимодействия между клетками возрастает. 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. Среднее значение тангенса угла наклона линейных аппроксимаций зависимостей dX от t_a составило $0,14 \div 0,72$. 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.

В работе было проведено экспериментальное сравнение параметров агрегации эритроцитов для нормальной и патологически измененной крови на примере СКВ. Вероятности реализаций различных сценариев дезагрегации в пробах нормальной крови и крови больных СКВ при времени формирования агрегатов ~ 5 секунд и с силами оптического захвата краев эритроцитов ~ 29 пН представлены в таблице 1. Видно, что в среднем сила агрегации патологически измененных эритроцитов повышена по сравнению с силой агрегации здоровых эритроцитов. Для СКВ наблюдалось в 2,5 раза большее количество неудавшихся разрывов агрегата (сценарий 4), чем для нормы, в то время как для нормы полных разрывов

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.

агрегатов (сценарий 1) было зарегистрировано в 6 раз больше, чем для эритроцитов больных СКВ. Также в работе было проведено измерение скорости агрегации для одиночных пар клеток. Значения скоростей агрегации были усреднены и составили $0,53 \pm 0,06$ мкм/с с достоверностью 0,99 для образцов патологически измененной крови и $0,30 \pm 0,08$ мкм/с с достоверностью 0,99 для нормальных эритроцитов. 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 методом двухлучевого оптического пинцета.

Глава 4. Исследование механизмов агрегации эритроцитов в растворах различных белков, а также рецепторного механизма агрегации

Третья содержательная часть диссертационной работы посвящена исследованию механизмов агрегации эритроцитов на одиночных клетках. Двухлучевой оптический пинцет с калиброванными силами захвата эритроцитов использовался для прямого измерения сил взаимодействия между клетками в растворах основных белков плазмы крови, участвующих в агрегации эритроцитов: иммуноглобулина, фибриногена и альбумина. Длина волны излучения лазеров, формирующих оптические ловушки, составляла 980 нм, мощность излучения в каждой из оптических ловушек изменялась в диапазоне от 0 до 13 мВт. Экспериментальные образцы представляли собой суспензии эритроцитов в натрий-фосфатном буфере. В суспензию клеток поочередно добавлялись белки плазмы крови с различной концентрацией для выявления влияния каждого из них, а также их совместного эффекта на силы и характер взаимодействия эритроцитов.

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. Два свободных эритроцита перекрывались друг с другом на 1/4 часть своих поверхностей с помощью оптических ловушек. 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 Рис. 9 представлены зависимости сил, необходимых для полного разрыва двойного агрегата эритроцитов, от концентрации белков в растворе, усредненные по 15 парам эритроцитов внутри каждой пробы. Серой сплошной чертой на рисунке обозначено значение сил, ниже которых было невозможно прямое измерение сил агрегации клеток методом оптического пинцета. Видно, что в растворах, где из белков плазмы, влияющих на агрега-

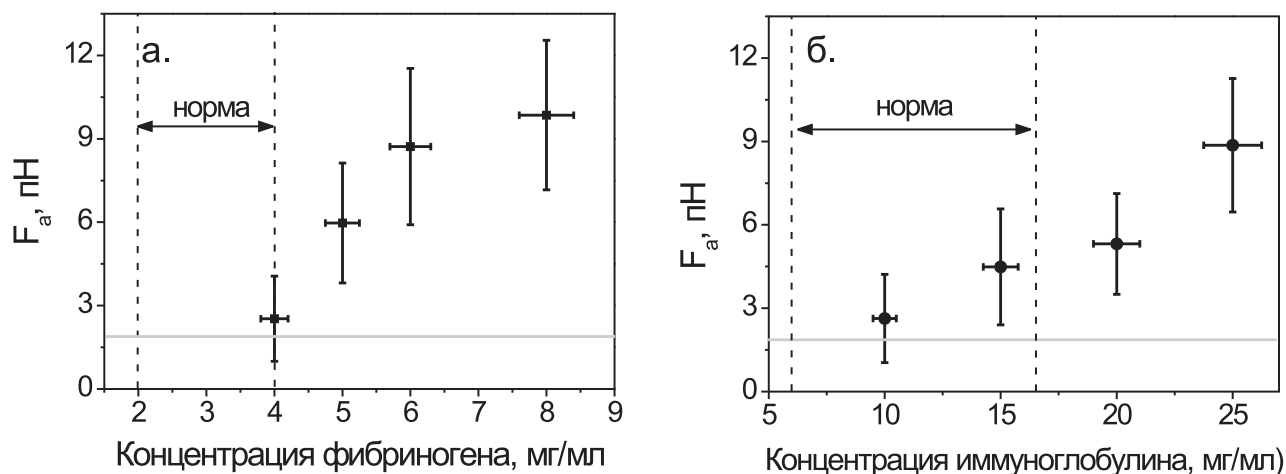


Рис. 9: Зависимость силы агрегации двух одиночных эритроцитов от концентрации белков плазмы. а. Зависимость от концентрации фибриногена. б. Зависимость от концентрации иммуноглобулина. Пунктирной линией указан диапазон значений концентраций, соответствующих физиологической норме. Серой сплошной чертой обозначено значение силы агрегации, меньше которого невозможно измерение методом оптического пинцета.

цию 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 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 Рис. 10б, в. В

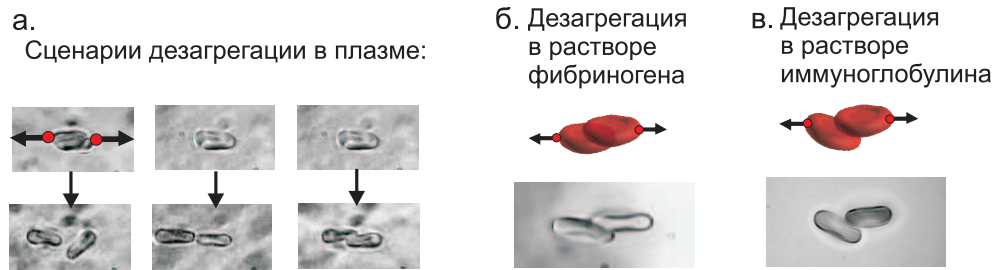


Рис. 10: а. Характер дезагрегации эритроцитов в аутологичной плазме. б. Характер дезагрегации эритроцитов в растворе фибриногена — равномерное по поверхности взаимодействие клеток. в. Характер взаимодействия эритроцитов в растворе иммуноглобулина — точечные связи на поверхностях клеток.

Главе 3 было показано, что при дезагрегации двойного агрегата в аутологичной 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 (Рис. 10а). 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 силу фибриноген-индуцированной и иммуноглобулин-индуцированной агрегации эритроцитов. Результаты усреднения по 15 эритроцитам для каждой из концентраций белков представлены на Рис. 11. Видно, что как для раствора фибриногена, так и для раствора иммуноглобулина увеличение концентрации альбумина в значительной степени увеличивает силу, необходимую для полной дезагрегации клеток. Таким образом, сосуществование альбумина с любым из двух других белков, влияющих на агрегацию эритроцитов, приводит к синергетическому эффекту, который выражается в значительном увеличении силы агрегации клеток. При фиксированной концентрации фибриногена, соответствующей физиологической норме, и увеличении концентрации альбумина в 2 раза — сила агрегации увеличивается в 1,35 раз. При фиксированной концентрации иммуноглобулина, соответствующей физиологической норме, и увеличении концентрации альбумина в 2 раза — 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 человека концентрации альбумина.

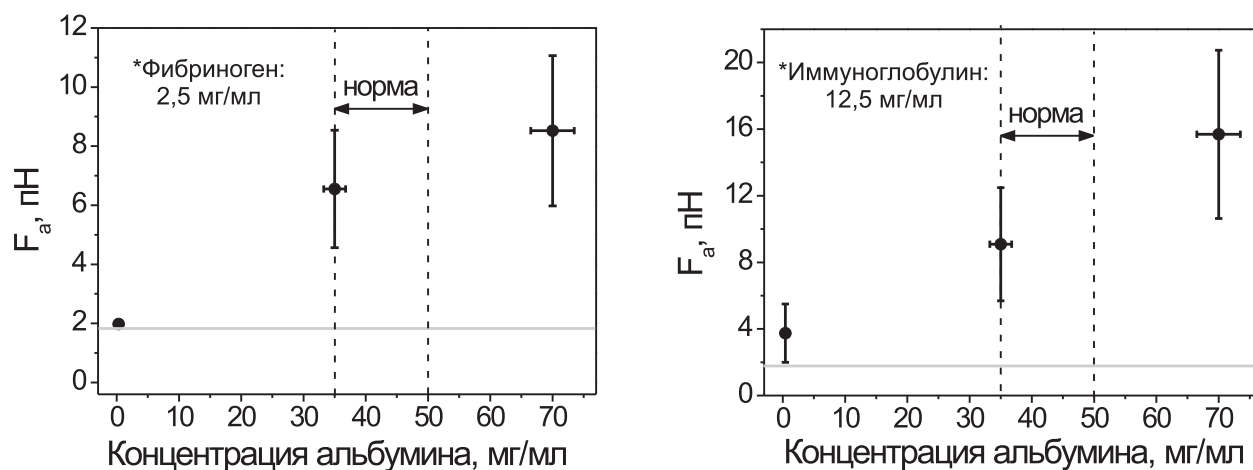


Рис. 11: Зависимость силы агрегации двух одиночных эритроцитов от концентрации альбумина: а. — при фиксированной концентрации фибриногена 2,5 мг/мл. б. — при фиксированной концентрации иммуноглобулина 12,5 мг/мл. Пунктирной линией указан диапазон значений концентраций белков, соответствующих физиологической норме. Сплошной серой линией обозначено значение силы агрегации, меньше которого невозможно измерение сил методом оптического пинцета.

В работе также исследовался вклад специфического рецепторного механизма агрегации в норме и при нарушениях реологических свойств крови человека. Согласно общепринятым представлениям фибриноген-индуцированная агрегация эритроцитов происходит благодаря исключительно неспецифическим процессам связывания фибриногена и белков на мембранах эритроцитов. Однако результаты недавних исследований предполагают наличие добавочного, специфического механизма, заключающегося во взаимодействии фибриногена с рецептором (гликопротеин II_{β}/III_{α}) на поверхности мембраны эритроцита. Целью исследования явилось изучение влияния ингибиторов специфического связывания фибриногена (ИССФ) на кинетику эритроцитарной агрегации и дезагрегации и на прочность агрегатов. Исследовались суспензии нормальных эритроцитов в аутологичной плазме (73 различные пробы крови). Модификацию свойств проб осуществляли с помощью ингибитора связывания фибриногена — моноклонального антитела CRC64, который является антагонистом комплекса гликопротеинов II_{β}/III_{α} . Работа проводилась совместно с лабораторией биомеханики (Научно-исследовательский институт механики МГУ им. М. В. Ломоносова). Агрегацию и дезагрегацию эритроцитов в суспензии исследовали методом регистрации лазерного обратного светорассеяния, дезагрегацию отдельных парных агрегатов — методом оптического пинцета. Результаты, полученные двумя методиками, сравнивались [4]. Исследование взаимодействия одиночных эритроцитов в агрегате проводилось методом двухлучевого оптического пинцета. 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 агре-

гации пара эритроцитов разъединялась с пошагово возрастающей силой оптического захвата. Параметром, регистрируемым в эксперименте, являлось изменение расстояния между центрами эритроцитов при увеличении силы сдвиговой дезагрегации с ~ 6 пН до ~ 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. На основании серии опытов, проведенных 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. В серии экспериментов

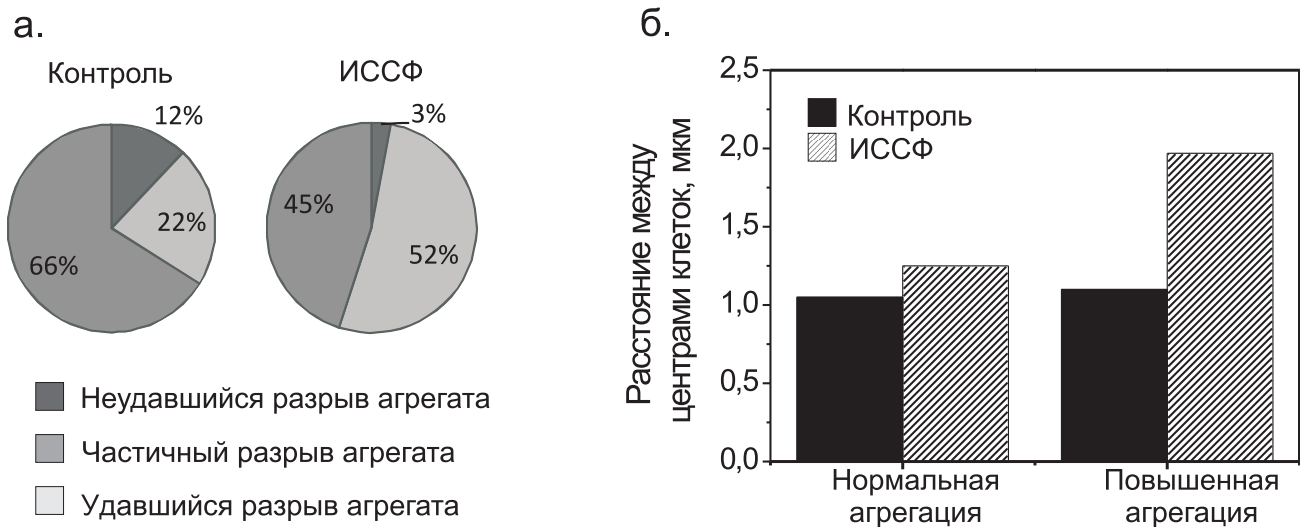


Рис. 12: Влияние ингибирования специфического связывания фибриногена на агрегацию эритроцитов. а. Статистическое распределение сценариев дезагрегации одиночных эритроцитов для образцов с изначально усиленной агрегацией — для контрольной группы и при добавлении ИССФ. б. Изменение расстояния между центрами 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 силы агрегации эритроцитов.

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. 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. Уменьшение силы взаимодействия эритроцитов на фоне действия ИССФ в подгруппе здоровых доноров 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 от 6 пН до 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 12б). Усреднение проводилось по 14 различным пробам крови, уровень значимости составлял 0,05. При регистрации различных сценариев дезагрегации пар эритроцитов оптическими 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 примерно в 4 раза (Рис. 12а).

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.

Основные результаты и выводы

Основные результаты диссертационной работы могут быть сформулированы следующим образом.

- Разработан и развит оптический метод прецизионного измерения малых смещений одиночного микрообъекта на примере смещений противоположных краев мембраны эритроцита, сочетающий метод оптического пинцета для удержания и позиционирования исследуемого микрообъекта с регистрацией и анализом малых смещений лазерных пучков, рассеянных на краях клетки, мембрана которой совершает колебания с амплитудой на уровне десятков нанометров. Разработан оптический метод диагностики микромеханических характеристик одиночных эритроцитов, основанный на совмещении метода оптического пинцета и подхода пассивной реологии с прецизионным измерением тепловых смещений исследуемых микрообъектов. Измерены корреляционные функции броуновских смещений двух противоположных краев эритроцита, локализованных в двух оптических ловушках, посредством регистрации смещений рассеянных на краях клетки сфокусированных лазерных пучков. Развита методика определения эффективных упругих свойств одиночных эритроцитов по корреляционному анализу фликкера мембраны клетки на частотах от 1 до 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 за-

хваченного эритроцита при осцилляции положения 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 эритроцитом механической энергии на частотах в области 130 кГц.

- Разработан метод калибровки силы оптического захвата краев эритроцитов и прямого измерения сил агрегации эритроцитов методом двухлучевого оптического пинцета. Показано, что силы взаимодействия между эритроцитами в агрегате увеличиваются при увеличении расстояния между центрами клеток. Выявлены четыре принципиально различных сценария дезагрегации эритроцитов в аутологичной плазме. Обнаружена 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 составляло 3 мкм, равна 29 ± 3 пН, что более чем в 2 раза больше сил агрегации нормальных эритроцитов, для которых это значение составило 14 ± 3 пН. Методом оптического пинцета напрямую 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.
- Методом прямого измерения сил агрегации одиночных эритроцитов с помощью двухлучевого оптического пинцета 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.
- Методом оптического пинцета 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.

Содержание диссертации отражено в следующих статьях:

- [1] 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. — v. 17. — p. 101510.
- [2] 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. — v. 17. — p. 025001.
- [3] Соколова И. А., Рыкова С. Ю., Шахназаров А. А., Гафаров М. Э., Краснова Т. Н., Хохлова М. Д., Любин Е. В., Скрыбина М. Н., Жданов А. Г., Федянин А. А. Агрегация эритроцитов: некоторые вопросы и гипотезы // *Российский журнал биомеханики*. — 2011. — т. 15. — с. 7–22.
- [4] 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., Shah-nazarov A. A. An effect of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors on the kinetics of red blood cells aggregation // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. — v. DOI 10.3233/CH-131774.

Подписано в печать 03.09.2014.

Формат А5.

Бумага офсетная. Печать цифровая.

Тираж 110 экз. Заказ № 2709.

Отдел полиграфии Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова
119192 Москва, Ломоносовский проспект, 27