

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Объединенного института  
высоких температур РАН  
академик Фортов В.Е.



2014 г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу

ХОХЛОВОЙ Марии Дмитриевны

на тему:

«МЕТОД ОПТИЧЕСКОГО ПИНЦЕТА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИЛ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ  
И МИКРОМЕХАНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КЛЕТОК»,

представленную на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук  
по специальности 01.04.05 – оптика

Диссертация М.Д. Хохловой посвящена развитию лазерной методики оптического пинцета для измерения силовых взаимодействий между одиночными клетками, для исследования механизмов агрегации эритроцитов и для определения их вязко-упругих свойств, что представляет собой как фундаментальный, так и прикладной интерес. В работе представлены результаты определения микромеханических свойств одиночных человеческих эритроцитов в широком диапазоне частот внешнего воздействия на клетки с использованием метода оптического пинцета и подхода, позволяющего проводить прецизионные измерения малых смещений мембран клеток, что имеет практическое значение в клеточной биологии и медицине. Рассматривается актуальная задача прямого измерения сил взаимодействия между одиночными эритроцитами, а также задача разработки методики для определения отличия в агрегационных свойствах эритроцитов для нормы и в случае патологии на уровне одиночных клеток. В работе представлены результаты исследования механизмов агрегации одиночных эритроцитов в растворах различных белков плазмы методом оптического пинцета. Исследование механизмов и особенностей агрегации эритроцитов перспективно для определения вклада каждого из белков плазмы в процесс агрегации эритроцитов в реальных физиологических условиях, а метод оптического пинцета является уникальным подходом для задач, требующих определения сил взаимодействия между одиночными микрообъектами, взвешенными в жидкой среде. Разработанные в работе оптические методы открывают новые возможности

в исследованиях межклеточных взаимодействий и микромеханических особенностей клеток.

**Актуальность** темы диссертационного исследования обусловлена необходимостью развития средств диагностики вязко-упругих и агрегационных характеристик клеток крови для нужд медицины и биофизики, а также фундаментальным интересом к проблемам, связанным с пониманием механизмов агрегации эритроцитов в физиологических условиях.

**Научная новизна** результатов диссертации заключается в следующем.

Впервые предложен оптический метод диагностики микромеханических свойств одиночных эритроцитов с использованием оптического пинцета в широком диапазоне частот внешнего воздействия на клетки. 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 внешнего воздействия на клетку от 1 Гц до 250 кГц. Ранее в литературе встречались работы, в которых было реализовано измерение вязкоупругих свойств одиночных эритроцитов в диапазоне частот до 100 Гц, при этом, в отличие от представленных в диссертации результатов, в данных работах не было исключено влияние подложки на результаты измерения. Предложенный 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 измерена средняя сила, необходимая для сдвиговой дезагрегации эритроцитов из парного агрегата в аутологичной плазме крови на заданное расстояние между центрами клеток. Данная характеристика может быть эффективным показателем агрегации 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 силу и характер агрегации одиночных эритроцитов с помощью метода двухлучевого оптического пинцета. Впервые показана значимость рецепторного механизма агрегации эритроцитов на уровне одиночных клеток.

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

Во введении обосновывается выбор темы исследования, актуальность, научная новизна, значимость работы, формулируются **цели исследования**.

**Глава 1** посвящена обзору литературы, касающейся основ действия метода оптического пинцета, способов его калибровки, применений методики. Подробно рассмотрены различные подходы для исследования рассматриваемых в диссертации агрегационных и микромеханических свойств эритроцитов. Обзор литературы является достаточно полным и однозначно позиционирует результаты диссертационной работы в контексте современного состояния проблемы.

**Глава 2** диссертации посвящена развитию метода, основанного 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.

В **третьей главе** методика оптического пинцета применяется для прямого измерения сил взаимодействия пиконьютонового диапазона между двумя эритроцитами в аутологичной среде при их сдвиговой дезагрегации с помощью двух оптических ловушек с калиброванными силами оптического захвата, а также для определения отличия в силах и скоростях агрегации нормальных и патологически измененных эритроцитов на уровне одиночных клеток.

**Четвертая глава** посвящена изучению 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, а также определению вклада специфического рецепторного механизма агрегации эритроцитов.

В **заключении** приводятся основные результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы. Полученные результаты полностью соответствуют поставленным целям диссертационной работы.

В качестве наиболее важных можно выделить следующие **научные результаты**: Показано, что метод активной и пассивной микрореологии в оптическом пинцете с прецизионным измерением малых смещений оптически захваченных микрообъектов применим для определения эффективных микромеханических характеристик одиночных эритроцитов для частот внешнего воздействия на клетку от единиц Герц до 250 кГц. Для

частот до 100 Гц вязкоупругие свойства клетки характеризует корреляционный анализ броуновских смещений локализованных в оптические ловушки краев эритроцита. 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.

Показано, что сила сдвиговой дезагрегации красных кровяных телец, может быть измерена с помощью метода двухлучевого лазерного пинцета. Расстояние между центрами клеток в парном агрегате возрастает с увеличением сил, приложенных со стороны оптических ловушек и направленных на разъединение клеток. При этом показано, что предложенная методика прямого измерения сил взаимодействия между одиночными эритроцитами позволяет определять разницу между агрегационными свойствами нормальных и патологически измененными эритроцитами.

Методом оптического пинцета при измерении сил взаимодействия одиночных эритроцитов было показано, что сила неспецифической агрегации одиночных эритроцитов в растворе фибриногена или иммуноглобулина увеличивается при увеличении концентрации белков. Показан вклад специфического связывания фибриногена с рецептором на поверхности мембран эритроцитов в силу агрегации одиночных эритроцитов.

**Значимость для науки** связана с развитием новых оптических методик для измерения механических и силовых характеристик объектов на микромасштабах. Предложенная методика измерения сил агрегации эритроцитов может быть использована для изучения механизмов их взаимодействия и большего понимания физиологических изменений при патологических состояниях.

**Практическое значение** работы состоит в возможном использовании полученных результатов в медицине для диагностики заболеваний, связанных с изменением реологических свойств крови.

**Достоверность** полученных результатов подтверждена их согласием с аналитическими оценками, в некоторых случаях – сравнением с результатами других исследовательских групп. Результаты исследований неоднократно обсуждались на семинарах и докладывались на специализированных международных конференциях по проблемам, связанным с тематикой диссертационной работы.

Результаты диссертации **могут быть использованы** в ФИ РАН, ИОФ РАН, МГУ, ИС РАН, ФТИ им. А.Ф. Иоффе, НИИ лазерной физики (ГОИ), ИБФРМ РАН, ИФХЭ РАН и других научных институтах и центрах.

При оценке диссертационной работы следует отметить некоторые **недостатки**:

1. Ввиду того, что настоящая работа посвящена развитию методики оптического пинцета для изучения вязкоупругих и агрегационных свойств форменных элементов крови - эритроцитов, в тексте работы употребляются биологические термины, такие как аутологичная плазма, реология крови, гемореологические нарушения и пр. Данные термины встречаются практически на первых страницах работы, однако пояснение их приводится не сразу, что несколько затрудняет чтение работы и отвлекает от понимания ее сути. Данный недостаток можно было бы решить вынесением встречающихся в тексте работы специфических терминов в отдельное приложение в конце работы.

2. В обзорной части работы (глава 1, стр. 57) при описании достигнутых к настоящему времени результатов в изучении агрегационных свойств эритроцитов автор ссылается на работу *Ben-Ami R., Barshtein G., Mardi T. et. al.* (ссылка [78]), в которой методами оптической микроскопии был исследован вклад различных белков плазмы в процесс агрегации эритроцитов. В работе показано, что усиление агрегации эритроцитов наблюдается только в том случае, когда три белка (фибриноген, альбумин и иммуноглобулин) растворены в плазме с большой концентрацией. В тоже время данные, полученные Хохловой М.Д. (Глава 4), свидетельствуют о том, что увеличение силы агрегации эритроцитов наблюдается даже при увеличении концентрации одного из белков (фибриногена или иммуноглобулина). В соответствии с этим возникает вопрос, не противоречит ли результат, полученный автором диссертационной работы и составляющий суть четвертого защищаемого положения, результатам других авторов?

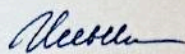
3. В Главе 2 при определении жесткости ловушки в случае захвата края эритроцита была вычислена сила захвата, равная  $29 \pm 3$  пН (для мощности излучения в оптической ловушке 20 мВт). Определение силы захвата методами оптического пинцета (но с помощью диэлектрических микросфер) проводилось также в работе авторов *Fontes A., Fernandes H.P., Thomaz A.A. et.al.* (ссылка [86]), при этом среднее значение силы составило  $14 \pm 10$  пН. Чем может быть обусловлено различие полученных значений? В работе указано, что результаты измерений смещения эритроцита и его удлинения в зависимости от силы захвата усреднены по выборке из 10 различных эритроцитов. Является ли данная выборка достаточной? Использовались ли при этом образцы крови одного или разных доноров и насколько это могло повлиять на результаты измерений?

4. Текст диссертационной работы хорошо выверен и опечатки встречаются крайне редко, но отметим одну из них, а именно, опечатку в имени основоположника методики оптического пинцета на стр. 15, где вместо Артура Ашкина указан Роберт Ашкин (в то время как на стр.7 имя приводится верно).

Указанные выше замечания не снижают общей высокой оценки диссертации М.Д. Хохловой. В целом, диссертация представляет собой серьезную законченную научно-исследовательскую работу на актуальную тему, относящуюся к одной из наиболее активно развивающихся областей современной оптики. Новые научные результаты имеют существенное значение для науки и практики. Выводы достаточно обоснованы. Автореферат диссертации правильно и полно отражает ее содержание. Диссертация и автореферат написаны понятным языком. Все используемые в работе материалы других научных коллективов подкреплены ссылками на соответствующие статьи и книги. Результаты, вошедшие в диссертацию, опубликованы, доложены на конференциях и известны специалистам. Не вызывает сомнений, что содержание диссертации М.Д. Хохловой полностью соответствует специальности 01.04.05 «Оптика» и удовлетворяет требованиям, предъявляемым ВАК РФ к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата наук, а Хохлова Мария Дмитриевна заслуживает присуждения ей учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.05 – оптика.

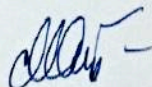
Отзыв на диссертацию Хохловой М.Д. «Метод оптического пинцета для определения сил взаимодействия и микромеханических характеристик клеток» » подготовлен кандидатом физико-математических наук И.В. Ильиной и обсужден на заседании отдела лазерной плазмы «06» октября 2014, протокол № 6.

Старший научный сотрудник, к.ф.-м.н.



Ильина И.В.

Зав. отделом, д.ф.-м.н.



Агранат М.Б.