

Измерение силы взаимодействия между эритроцитами в агрегате с помощью лазерного пинцета

А.Ю.Маклыгин, А.В.Приезжев, А.В.Карменян, С.Ю.Никитин, И.С.Оболенский, А.Е.Луговцов, Кисун Ли

Создан двухканальный лазерный пинцет и продемонстрирована возможность его использования для измерения сил взаимодействия красных клеток крови (эритроцитов). Экспериментально установлено, что длительное удержание эритроцитов в жестко сфокусированном лазерном пучке не приводит к видимым изменениям их формы или размера. Измерена сила взаимодействия между эритроцитами в агрегате, деформированном с помощью лазерного пинцета.

Ключевые слова: оптическая ловушка, лазерный пинцет, эритроцит, агрегат, сила взаимодействия эритроцитов.

1. Введение

Значительным достижением лазерной физики последних десятилетий является создание лазерного пинцета (оптической ловушки) – прибора, позволяющего управлять движением мелких частиц без механического контакта с ними. Действие лазерного пинцета основано на явлении светового давления при условии преобладания градиентной составляющей силы над отталкивающей. Такие условия возникают, в частности, при фокусировке лазерного пучка. Впервые однолучевой захват на основе оптической градиентной силы был продемонстрирован в конце двадцатого века [1]. Экспериментальные и теоретические аспекты оптического захвата обсуждались в целом ряде работ (см., напр., [2–6]). Было показано, что лазерный пинцет обеспечивает высокую точность позиционирования частиц ($\sim 10^{-10}$ м) и возможность измерения сверхмалых сил ($\sim 10^{-12}$ Н). В настоящее время лазерные пинцеты широко применяются в разных областях науки и техники, в том числе в биологии и медицине.

Применение лазерных пинцетов перспективно и в такой области, как реология крови. В исследованиях кровеносной системы человека большое внимание уделяется микрореологическим параметрам крови, таким как деформируемость и агрегационная способность эритроцитов. Установлено, что эти параметры существенно влияют на микроциркуляцию крови, а потому имеют прямое отношение к диагностике и лечению целого ряда заболеваний. К настоящему времени уже исследованы многие аспекты поведения биологических клеток, в частности эритроцитов, в оптической ловушке. В работе [7] с помо-

щью двухканального лазерного пинцета изучены особенности агрегации красных клеток крови. Измерена сила взаимодействия двух эритроцитов как функция расстояния между их центрами. Установлено, что скорости агрегации эритроцитов крови здоровых доноров и пациентов, страдающих различными заболеваниями, существенно отличаются друг от друга. В работах [8–11] сообщается о наблюдении дифракционных картин при рассеянии лазерного пучка на отдельных эритроцитах и других микроскопических частицах, захваченных оптической ловушкой. Лазерная ловушка в сочетании с техникой микропотоков позволяет проводить автоматическую сортировку клеток [12].

С помощью лазерных пинцетов изучают форму поверхности эритроцитов [13], а также особенности взаимодействия клеток в процессе коагуляции [14]. В работе [15] измеряли деформируемость эритроцита с помощью двухлучевой оптической ловушки на встречных лазерных пучках. Такая ловушка не требует жесткой фокусировки излучения, поэтому плотность мощности излучения, воздействующего на захваченную частицу, оказывается более низкой, что существенно при работе с живыми клетками. С помощью лазерных пинцетов измеряли коэффициент упругости мембраны эритроцита [16], а также, методом прямого растяжения клеток, деформируемость эритроцитов [17]. В этих опытах максимальная сила растяжения достигала 400 пН. В работе [18] наблюдалось существенное изменение формы эритроцитов и их вращение под действием светового поля оптической ловушки. При помощи лазерной ловушки возможно измерение таких параметров, как эластичность и вязкость мембраны эритроцитов [19], а также толщины двойного слоя заряда вокруг клетки в электролитическом растворе [20]. В работе [21] оптическая ловушка применялась для исследования свойств цитоскелета красных клеток. Установлено [22, 23], что ориентация эритроцита в оптической ловушке зависит от поляризации лазерного излучения и от ионного состава окружающей клетку среды. В работе [24] оптический захват применяли для изучения механизмов агрегации и дезагрегации красных клеток крови.

Тем не менее остается еще много фундаментальных проблем биофизики клетки, которые трудно решить без использования оптической ловушки. К таким проблемам

А.Ю.Маклыгин, С.Ю.Никитин, И.С.Оболенский, А.Е.Луговцов, Кисун Ли. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы; e-mail: mclugin@gmail.com

А.В.Приезжев. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы; Международный учебно-научный лазерный центр МГУ им. М.В. Ломоносова; e-mail: avp2@mail.ru

А.В.Карменян. National University Yang-Ming, Taipei, Taiwan; e-mail: akarmenyan@gmail.com

относится, в частности, проблема агрегации эритроцитов в норме и при различных патологиях. В настоящее время данный вопрос интенсивно исследуется методами светорассеяния на суспензиях эритроцитов [25]. Однако полученные при этом результаты характеризуют большие ансамбли этих частиц, а их индивидуальные особенности оказываются скрытыми. Так, остается неясным, почему некоторые клетки не участвуют в образовании агрегатов или же приводят к образованию агрегатов специфической формы, например разветвленных линейных или комкообразных. Для ответа на этот вопрос необходимо иметь возможность измерения сил взаимодействия между отдельными клетками и агрегатами в покое и в потоке.

Целью настоящей работы является создание двухканального лазерного пинцета для исследования взаимодействия красных клеток крови, в частности для измерения силы взаимодействия между эритроцитами в агрегате.

2. Экспериментальная установка

Для осуществления манипуляции двумя или более эритроцитами потребовалось создание двухканального лазерного пинцета с независимым управлением каждым из пучков. Схема установки представлена на рис.1. Источниками излучения служили непрерывный Nd:YAG-лазер с диодной накачкой, длиной волны 1064 нм и мощностью до 300 мВт в TEM₀₀-моду, а также полупроводниковый лазер с длиной волны 810 нм и мощностью до 500 мВт. С помощью дихроичного зеркала оба лазерных пучка направляются в водоиммерсионный объектив Olympus LUMPlanFl 100^x с числовой апертурой NA = 1.00. Изображение, сформированное объективом, фокусируется линзой на видеокамеру DCC1645C (Thorlabs). Лишняя засветка от лазерного излучения отсекается сине-зеленым фильтром. Управление лазерными пучками в предметной

плоскости объектива осуществляется за счет поворотов телескопа (увеличение 1:3) в плече полупроводникового лазера и телескопа (1:2) в плече Nd:YAG-лазера. Центры телескопов расположены в плоскости, сопряженной с плоскостью входной апертуры объектива. Таким образом, при небольших поворотах пучки остаются в пределах входной апертуры объектива.

3. Проверка работоспособности системы

Для юстировки системы и обнаружения области оптического захвата использовались красные клетки крови, помещенные в физиологический раствор в соотношении 1:500. Максимальная мощность после объектива составляла 55 мВт для Nd:YAG-лазера и 60 мВт для полупроводникового лазера. Минимальный размер пятна фокусировки (оцененный на поверхности покровного стекла относительно размера тестовых полистирольных микросфер) составил 2.5 мкм для пучка Nd:YAG-лазера и 3.5 мкм для пучка полупроводникового лазера. Следовательно, интенсивность лазерного излучения в области фокальной перетяжки пучков достигала 1 МВт/см².

Нагрев эритроцита сфокусированным лазерным пучком можно оценить по формуле $\Delta T = P\delta/(4\pi\chi)$, где ΔT – приращение температуры эритроцита; P – мощность лазерного пучка в области фокальной перетяжки; δ – коэффициент поглощения света материалом частицы; χ – коэффициент теплопроводности воды. Полагая $P = 60$ мВт, $\delta = 800$ м⁻¹, $\chi = 0.6$ Вт/(м·К), получаем $\Delta T \approx 6$ К. Эта оценка показывает, что нагрев клетки лазерным излучением находится в физиологических пределах. Наши эксперименты выявили, что при удержании эритроцита в каждом из каналов лазерного пинцета в течение 15 мин с ним не происходило никаких видимых изменений. Соответствующие изображения эритроцитов представлены на рис.2.

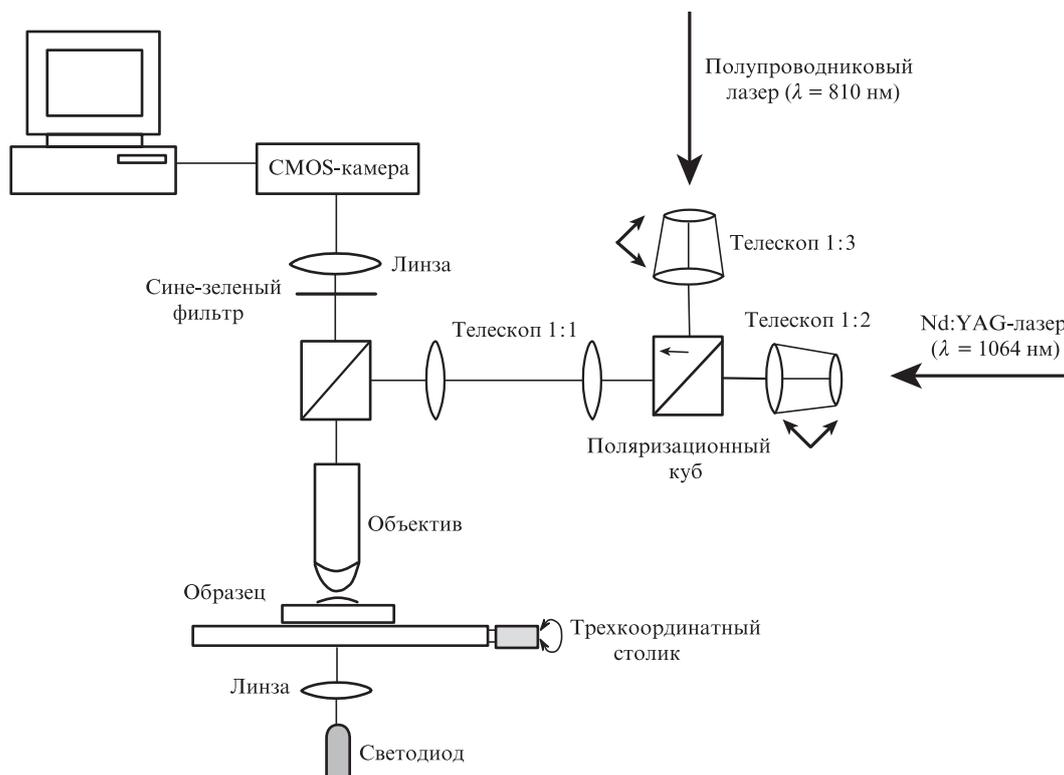


Рис.1. Схема двухканального лазерного пинцета.

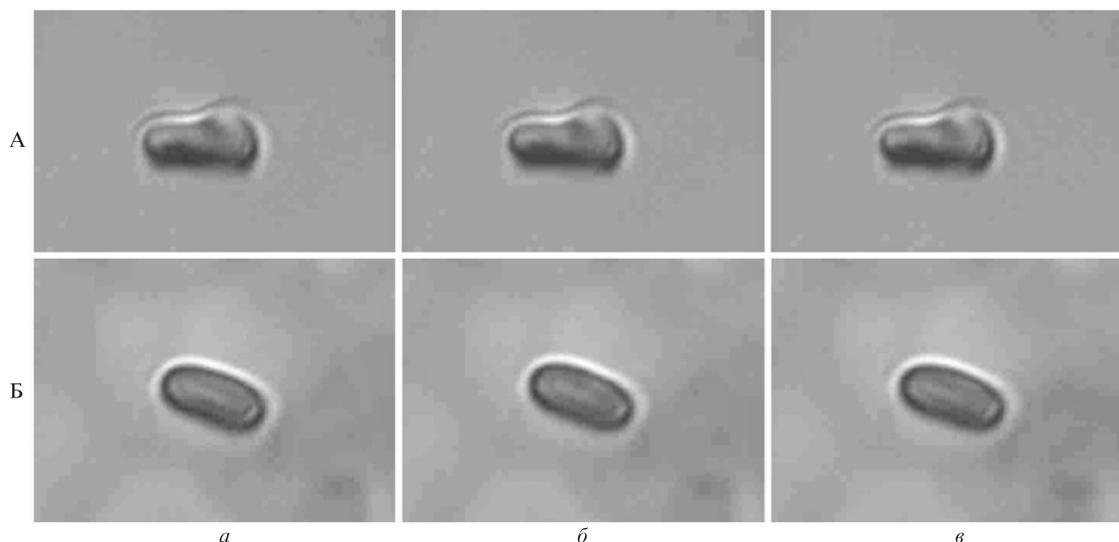


Рис.2. Изображения эритроцита сразу после захвата (а), а также после 10 мин (б) и 15 мин (в) удержания в ловушке. Изображения А соответствуют каналу, создаваемому Nd:YAG-лазером, Б – полупроводниковым лазером.

4. Калибровка лазерного пинцета

Для измерения силы взаимодействия между эритроцитами в агрегате была использована следующая методика. С помощью двухканального лазерного пинцета агрегат растягивался за два противоположных конца. Мощность одного пучка (от полупроводникового лазера) оставалась неизменной, а второго (от Nd:YAG-лазера) – уменьшалась до тех пор, пока сила взаимодействия между клетками не превысила силу оптического захвата и конец агрегата не был вырван из ловушки. Для проведения количественных измерений с помощью лазерного пинцета его необходимо откалибровать.

Калибровка осуществлялась методом, основанным на использовании силы вязкого трения, действующей на частицу со стороны потока жидкости. Поток жидкости создавался перемещением предметного столика с кюветой относительно захваченного эритроцита. Момент отрыва эритроцита фиксировался видеокамерой. Далее, с помощью программы ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) по видеозаписи определялась скорость потока жидкости. После этого сила, вырывающая эритроцит из ловушки, вычислялась по формуле Стокса:

$$F_{\text{vis}} = \gamma v = 6\pi\eta r v,$$

где η – коэффициент вязкости жидкости; r – эффективный радиус эритроцита (радиус сферы, объем которой равен объему эритроцита); v – скорость потока жидкости.

Суспензия эритроцитов готовилась путем добавления в физиологический раствор капли цельной крови в соотношении 1 : 1000. Таким образом, вязкость жидкости, в которой находились эритроциты, считалась равной вязкости воды, для которой $\eta = 0.00101$ Па·с. Эффективный радиус эритроцита r был выбран равным 2.7 мкм, что соответствует объему эритроцита $V = 82$ мкм³. Скорость потока v определялась в результате пяти-семи измерений с разными эритроцитами.

Таким образом, измеряя при различных мощностях лазерного пучка скорость потока жидкости, вырывающего частицу из оптической ловушки, можно получить за-

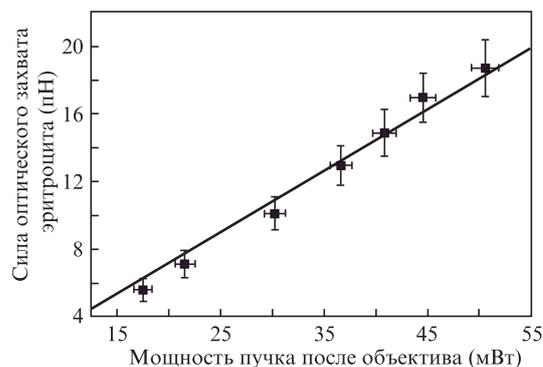


Рис.3. Экспериментально измеренная зависимость силы оптического захвата от мощности лазерного пучка, падающего на эритроцит.

висимость силы оптического захвата от мощности лазерного излучения. Полученная в наших экспериментах зависимость представлена на рис.3; отметим, что она близка к линейной. Максимальная сила захвата эритроцита, равная 20 пН, достигалась при мощности пучка Nd:YAG-лазера 50 мВт.

Эффективность захвата частицы оптической ловушкой можно охарактеризовать коэффициентом Q , определяемым формулой $F = Qn_m P/c$. Здесь F – сила захвата; P – мощность лазерного пучка, падающего на частицу; n_m – показатель преломления окружающей частицу среды; c – скорость света в вакууме. Оценка по этой формуле показывает, что в наших экспериментах эффективность захвата эритроцита лазерным пинцетом $Q \approx 0.09$.

5. Измерение силы взаимодействия между эритроцитами в агрегате

Для проведения соответствующих измерений суспензия эритроцитов была приготовлена специальным образом. Сначала свежесвятая кровь отстаивалась в пробирке в течение нескольких часов до оседания большей части эритроцитов. Затем с помощью микропипетки из верхнего слоя откачивался 1 мл плазмы и в него добавлялось 5 мкл осевших эритроцитов. Таким образом, концентрация красных клеток крови значительно снижалась, что



Рис.4. Изображения агрегатов в виде монетных столбиков и более мелких частиц (тромбоцитов) на дне кюветы.

позволяло работать с отдельными эритроцитами и агрегатами. После помещения капли образца на предметное стекло необходимо было выждать 10–15 мин, пока все крупные частицы (эритроциты, тромбоциты и пр.) не осядут на дно кюветы. В противном случае работа осложняется тем, что в ловушку попадают посторонние частицы. Кроме того, за это время практически все эритроциты объединяются в агрегаты, и клеток в свободном состоянии практически не остается (рис.4).

Измерения проводились с линейными агрегатами, состоящими из нескольких клеток (2–9). Сначала с помощью одной ловушки агрегат поднимался со дна кюветы. Затем, перемещая предметный столик, создавали поток жидкости, разворачивающий агрегат в горизонтальной плоскости, и противоположный конец агрегата захватывался второй ловушкой. После этого лазерные пучки разводились в противоположные стороны, что приводило к разрушению агрегата – дезагрегации. Все стадии процесса показаны на рис.5.

В одном из наших опытов линейный агрегат эритроцитов, так называемый монетный столбик, захватывался за концы двухканальным лазерным пинцетом. Затем лазерные пучки разводились в противоположные стороны на некоторое расстояние, что вызывало деформацию (растяжение) агрегата. После этого мощность пучков Nd:YAG-лазера начинали уменьшать. При некоторой мощности P этого пучка соответствующий конец агрега-

та вырывался из ловушки. Был сделан вывод, что при данной мощности пучка сила оптического захвата F равна силе взаимодействия эритроцитов в агрегате F_{int} .

Величину силы F можно определить с помощью калибровочной кривой (рис.3). Однако для более точной оценки следует учесть, что физические характеристики плазмы крови отличаются от физических характеристик воды. В связи с этим была проведена отдельная калибровка лазерного пинцета в плазме. Было установлено, что скорость потока плазмы, вырывающего эритроцит из ловушки при данной мощности лазерного пучка P , равна 96 ± 13 мкм/с. Коэффициент вязкости плазмы $\eta = 0.001717$ Па·с. Отсюда по формуле Стокса получаем $F = 8.4 \pm 1.1$ пН. Таким образом, сила взаимодействия эритроцитов в агрегате, деформированном с помощью двухканального лазерного пинцета, $F_{int} = 8.4 \pm 1.1$ пН.

6. Выводы

В настоящей работе создан двухканальный лазерный пинцет, пригодный для измерения сил взаимодействия красных клеток крови. Эксперименты показали, что лазерный пинцет обеспечивает надежный захват эритроцитов и их агрегатов. Установлено также, что при удержании эритроцита в оптической ловушке в течение 15 мин с ним не происходит никаких видимых изменений.

Проведена калибровка лазерного пинцета методом, основанным на использовании силы вязкого трения. Получена экспериментальная зависимость силы оптического захвата от мощности лазерного пучка, которая оказалась близкой к линейной. Продемонстрирована возможность измерения силы взаимодействия между эритроцитами в агрегате, деформированном с помощью лазерного пинцета. Разработанная методика может быть использована для оценки прочности линейных агрегатов эритроцитов в различных условиях.

Авторы благодарны В.В.Фирсову за помощь в проведении экспериментов, а также РФФИ за частичную поддержку этой работы.

1. Ashkin A., Dziedzic J.M., Bjorkholm J.E., Chu S. *Opt.Lett.*, **11** (5) 288 (1986).
2. Neuman K.C., Block S.M. *Rev. Sci. Instr.*, **75** (9) 2787 (2004).
3. Ахманов С.А., Никитин С.Ю. *Физическая оптика* (М.: Изд-во Моск. ун-та, 1998, с. 89).

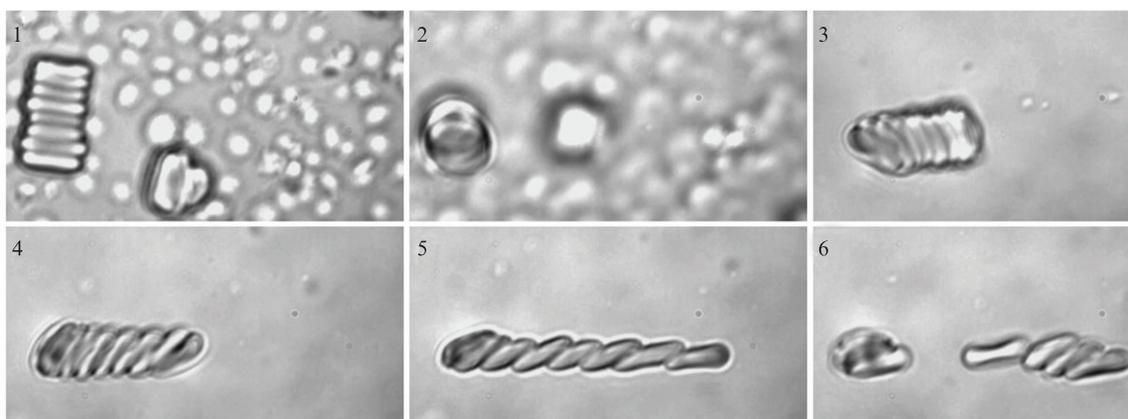


Рис.5. Стадии процесса измерения силы взаимодействия между эритроцитами в агрегате: 1 – с помощью одной ловушки агрегат захватывается на дне кюветы; 2 – агрегат поднимается со дна кюветы; 3 – поток жидкости разворачивает агрегат в горизонтальной плоскости; 4 – агрегат удерживается двумя ловушками за противоположные концы; 5 – лазерные пучки разводятся в противоположные стороны, эритроциты начинают «соскальзывать» друг с друга; 6 – разрушение агрегата (дезагрегация).

4. Grier D.G. *Nature*, **424**, 810 (2003).
5. Федосов И.В. *Когерентно-оптические методы в измерительной технике и биофотонике*. Под ред. В.П. Рябухо и В.В. Тучина (Саратов: Сателлит, 2009, с. 59).
6. Никитин С.Ю., Приезжев А.В., Луговцов А.Е., Маклыгин А.Ю. *Физика – ПС*, № 2 (939), 53 (2012).
7. Khokhlova, M.D., Lyubin E.V., Zhdanov A.G., Rykova S.Yu., Krasnova T.N., Sokolova I.A., Fedyanin A.A. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **7715**, 77150M (2010).
8. Berg M.J., Hill S.C., Videen G., Gurton K.P. *Opt. Express*, **18** (9), 9486 (2010).
9. Kinnunen M., Kauppila A., Karmenyan A., Myllyla R. *Biomed. Opt. Express*, **2** (7), 1803 (2011).
10. Collins M., Kauppila A., Karmenyan A., Gajewski L., Szezewyk K., Kinnunen M., Myllyla R. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **7376**, 7376 (2010).
11. Ramser K., Hanstorp D. *J. Biophotonics*, **3** (4), 187 (2010).
12. Bruns T., Becsi T., Talkenber M., Wagner M., Weber P., Mescheder U., Schneckenburger H. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **7376**, 7376OM (2010).
13. Kumar R., Sarasvati S., Shakher C., Mehta D.S. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **7376**, 7376OG (2010).
14. Bor-Wen Yang, Zhe Li. *Biomed. Opt. Express*, **1** (4), 1217 (2010).
15. Guck J., Ananthkrishnan R., Mahmood H., Moon T.J., Cunningham C.C., Kas J. *Biophys. J.*, **81**, 767 (2001).
16. He'non S., Lenormand G., Richert A., Gallet F. *Biophys. J.*, **76**, 1145 (1999).
17. Lim C.T., Dao M., Suresh S., Sow C.H., Chew K.T. *Acta Materialia*, **52**, 1837 (2004).
18. Ghosh A., Supurna Sinha, Dharmadhikari J.A., Roy S., Dharmadhikari A.K., Samuel J., Sharma S., Mathur D. *Phys. Biol.*, **3**, 67 (2006).
19. Huruta R.R., Barjas-Castro M.L., Saad S.T.O., Costa F.F. *Blood*, **92** (8), 2975 (1998).
20. Fontes A., Fernandes H.P., Thomaz A.A., Barbosa L.C., Barjas-Castro M.L., Cesar C.L. *J. Biomed. Opt.*, **13** (1), 014001-1 (2008).
21. Guck J., Ananthkrishnan R., Cunningham C.C., Kas J. *J. Phys.: Condens. Matter*, **14** (19), 4843 (2002).
22. Dharmadhikari J.A., Mathur D. *Current Science*, **86** (10), 1432 (2004).
23. Khan M., Mohanty S.K., Sood A.K. *Pramana – J. Phys.*, **65** (5), 777 (2005).
24. Bronkhorst P.J.H., Grimbergen J., Brakenhoff G.J., Heethaar R.M., Sixma J.J. *British J. Haematol.*, **96**, 256 (1997).
25. Priezzhev A.V., Ryaboshapka O.M., Firsov N.N., Sirko I.V. *J. Biomed. Opt.*, **4**, 76 (1999).