

УДК 57.087 : 57.086.866

ПРИМЕНЕНИЕ ЛАЗЕРНОГО ПИНЦЕТА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ

© 2009 А.В. Коробцов¹, С.П. Котова¹, Н.Н. Лосевский¹, А.М. Майорова¹,
Р.О. Кленов², Н.А. Кленова²

¹Самарский филиал Физического института им. П.Н. Лебедева РАН

²Самарский государственный университет

Поступила в редакцию 30.12.2008

В работе предлагается оригинальный и эффективный способ растяжения эритроцита с помощью многопучковой ловушки, сформированной дифракционной решеткой, посредством ее перемещения. Определение жесткости эритроцита осуществляется как с помощью такой ловушки, так и с помощью однопучковой (классического оптического пинцета). Проводится сравнительный анализ двух методик и сопоставление полученных данных с данными, полученными методом фильтруемости. Показана эффективность предлагаемых методик для определения жесткости эритроцитарной мембраны.

Ключевые слова: лазерный пинцет, деформация эритроцитов, дифракционная решетка.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время во многих лабораториях мира ведутся работы по использованию оптических манипуляторов в различных биологических задачах, в том числе для деформации биологических объектов и исследованию на основе этих экспериментов их механических свойств. Очень часто объектом таких исследований выступают эритроциты. Это обусловлено несколькими причинами. С одной стороны, эритроциты легко деформируются, и эти деформации являются легко обратимыми. Именно эта способность эритроцитов позволяет им проникать в капилляры, диаметр которых значительно меньше диаметра самой клетки. Плотный контакт между стенками капилляра и мембраной эритроцита облегчает газообмен кислорода и углекислого газа, что способствует полноценному обеспечению организма кислородом.

С другой стороны, контроль степени эластичности эритроцитов имеет большую диагностическую значимость. Это связано с высокой чувствительностью эритроцитов к любым патоло-

гическим изменениям при многих заболеваниях. При этом структурно-функциональная организация эритроцитов в значительной степени определяется показателями жесткости и эластичности мембраны и состоянием адгезивных белков на ее поверхности [1].

Несмотря на широкое распространение в клинической практике различных способов определения деформируемости эритроцитов [2]: метода фильтрации, микропипеточного метода, метода центрифугирования и других, они не лишены ряда недостатков, связанных с трудоемкостью измерений, необходимостью использования больших объемов крови и т.д. Представляет практическую ценность проводить измерения деформируемости эритроцитов, используя малые объемы крови (порядка нескольких пиколитров), а также сократить время на предварительную подготовку исследуемых образцов. Кроме того, актуальной остается задача исследования изменения деформируемости эритроцитов на различные воздействия. Активно развивающимися методами, направленными на решение этих задач, являются дифрактометрия (эктацитометрия) [3-5] и использование оптических пинцетов.

Экспериментам по растяжению, сжатию и вращению эритроцитов и измерению их характеристик (например, модуля Юнга и модуля сдвига, эластичности мембран и др.) с помощью оптических пинцетов посвящено большое количество работ [6-9 и ссылки в них]. При этом используются как двухпучковые [8 и ссылки в ней], так и однопучковые ловушки [9 и ссылки]. В двухпучковых ловушках для растяжения клеток и деформации нитевидных структур используются два слаборасходящихся лазерных пучка, распространяющихся строго навстречу друг дру-

Коробцов Александр Викторович, инженер.

E-mail: korobtsov@fian.smr.ru

Котова Светлана Павловна, кандидат физико-математических наук, заведующая лабораторией.

E-mail: kotova@fian.smr.ru

Лосевский Николай Николаевич, научный сотрудник.

E-mail: losevsky@fian.smr.ru

Майорова Александра Михайловна, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник.

E-mail: alexandramay@mail.ru

Кленов Роман Олегович, аспирант.

E-mail: rklenov@yandex.ru

Кленова Наталья Анатольевна, доктор биологических наук, профессор. E-mail: kln.ssu@rambler.ru

гу из одномодовых волокон. Однопучковые ловушки формируются за счет фокусировки светового поля объективом с высокой числовой апертурой ($NA=0.65$). Для различных деформаций клеточных структур, в том числе растяжения и сжатия, также используются массивы лазерных ловушек [10-14]. Массивы ловушек получают с помощью различных устройств, способных разделять пучок, выходящий из лазера, на несколько отдельных пучков: жидкокристаллических модуляторов света [11, 12], акустооптических дефлекторов [13, 14], геометрооптических систем. Однако для управления положением ловушек, сформированных посредством перечисленных устройств, необходимо либо специальное программное обеспечение, либо достаточно сложные механические системы управления. В настоящей работе предлагается оригинальный и эффективный способ растяжения эритроцита с помощью многопучковой ловушки, сформированной дифракционной решеткой, посредством ее перемещения. Определение жесткости эритроцита осуществляется как с помощью такой ловушки, так и с помощью однопучковой (классического оптического пинцета). Проводится сравнительный анализ двух методик.

1. МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

1.1. Экспериментальная установка для лазерного манипулирования

На рис. 1 представлена схема экспериментальной установки для лазерного манипулирования. Она включала в себя волоконный лазер с длиной волны излучения 1,08 мкм и максимальной выходной мощностью 3 Вт. Выбранная длина волны позволяла попасть в полосу прозрачности эритроцитов и минимизировать негативное воздействие излучения на объект. Пучок от лазера проходил через коллиматор и направлялся в 40х объектив микроскопа МИН-8. Для формирования многопучковой ловушки нами предложено использовать дифракционную решетку, установленную между согласующей линзой и ее

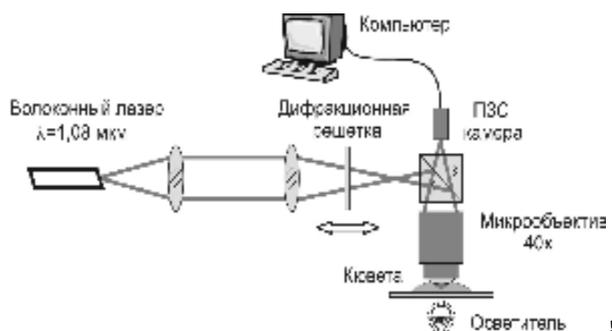


Рис. 1. Схема экспериментальной установки

выходной фокальной плоскостью. Такая схема позволяет посредством перемещения дифракционной решетки вдоль оптической оси системы изменять расстояние между ловушками.

В кювету помещалась суспензия эритроцитов, ресуспендированная в 0,9% хлористом натрии в отношении 1:100. Эксперименты проводились при комнатной температуре. Результаты экспериментов записывались на ПЗС камеру, подключенную к компьютеру. Эксперименты по деформированию проводились на двух группах эритроцитов, заведомо отличающихся друг от друга по возрасту. Одна группа находилась на ранней стадии жизни, другая – на заключительной. Продолжительность жизни эритроцитов составляет 110-120 дней, известно, что в течение жизни жесткость их оболочки возрастает в несколько раз [15]. Методика приготовления образцов описана ниже.

Перед началом эксперимента по деформированию эритроцитов была проведена калибровка оптической ловушки с использованием метода отрывных сил [16]. Суть метода состоит в том, что микрообъект захватывается в ловушку, и начинается перемещение столика микроскопа. Перемещение микрообъекта в жидкости приводит к появлению сил вязкого трения

$$F = \beta \cdot v, \tag{1}$$

где β – коэффициент вязкого трения для сферической частицы, v – скорость перемещения частицы в среде. В случае, когда сферическая частица расположена вблизи стенки, коэффициент β описывается законом Факсена [17]:

$$\beta = \frac{6\pi\eta r}{1 - \frac{9}{16}\left(\frac{r}{h}\right) + \frac{1}{8}\left(\frac{r}{h}\right)^3 - \frac{45}{256}\left(\frac{r}{h}\right)^4 - \frac{1}{16}\left(\frac{r}{h}\right)^5}, \tag{2}$$

где η - вязкость жидкости ($\eta = 0,0013 \text{ Па}\cdot\text{с}$), r – радиус частицы ($r=3,6 \text{ мкм}$), h – расстояние от центра частицы до стенки ($h = 4,5 \text{ мкм}$).

Как только сила вязкого трения сравнивается с отрывной силой ловушки, происходит потеря ловушкой микрообъекта. Скорость перемещения частицы измерялась экспериментально. Таким образом была получена зависимость сил оптической ловушки от мощности светового пучка.

1.2. Методика приготовления эритроцитов

Для исследований были использованы образцы свежей донорской крови из локтевой вены человека, предоставленных Самарской областной станцией переливания крови. Образцы крови подвергали методу отмывки и сепарации на возрастные фракции с использованием метода дифференциального центрифугирования [18]. Фракции молодых и старых клеток помещали в

Таблица 1. Индекс фильтруемости и активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы молодых и старых эритроцитов человека

Фракция эритроцитов	Индекс фильтруемости, %, n=15*	Активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, E**/эрит. в мл гемолизата, 25°C n= 7*	Активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, E**/эрит. в мл гемолизата, 37°C
Молодые клетки	83,2±5,0***	1,278±0,032***	2,830±0,142***
Старые клетки	41,0±0,5	0,940±0,051	2,056±0,115

* Указано количество фракций, выделенных из крови разных доноров

**E – международная единица активности ферментов

***достоверность различий P<0,01

раствор Рингера-Локка в отношении 1:1.

Поскольку известно, что молодые клетки обладают высокой способностью к деформации и для них характерно окисление до 75% глюкозы по пентозофосфатному пути [1], то дополнительно возраст клеток подтверждали, определяя деформируемость клеток с помощью метода фильтруемости [19], а также определяя активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы по методу Конберга [20]. Для определения индекса фильтруемости использовали фильтры фирмы Filtrak с величиной пор 3-6 мкм. Активность фермента определяли с помощью наборов фирмы Boeringer Mainhaim (ФРГ). При этом исследования проводились при комнатной температуре (как указано в стандартной методике) и при 37°C, приближаясь к физиологическим условиям действия фермента в клетке. Результаты отражены в табл.1.

Индекс фильтруемости во фракции старых клеток отличался у большинства клеток в два раза, активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы была ниже на 26-27%, что свидетельствовало о качественном разделении исходной популяции эритроцитов на фракцию, содержащую преимущественно молодые и преимущественно старые клетки.

2. ПРОВЕДЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПО ДЕФОРМИРОВАНИЮ ЭРИТРОЦИТОВ

Эксперименты по деформации проводились двумя способами: многопучковой ловушкой,

сформированной дифракционной решеткой, и однопучковой ловушкой.

Суть первого способа состоит в следующем. В фокальной плоскости микроскопа с помощью дифракционной решетки формировался набор световых пятен. Эритроцит захватывался в два соседних максимума (пучка) дифракционной решетки, причем расстояние между максимумами подбиралось такое, чтобы они приходились на края эритроцита. Под воздействием градиентных сил каждого из пучков эритроцит растягивался в соответствии с приложенными к нему силами. Диаметр перетяжки пучка составлял ~2 мкм. Измеренная мощность пучков составила 55 мВт (1-ый порядок) и 180 мВт (0-ой порядок), что соответствует силам ~13 пН и ~39 пН соответственно. Размер эритроцита определялся по его теневому контуру [8]. Первоначальные размеры эритроцитов составляли от 6,2 мкм до 8,1 мкм. Иллюстрация эксперимента приведена на рис. 2.

Эксперименты были проведены с 24-я эритроцитами каждой фракции. Жесткость оболочки вычислялась по закону Гука. Усредненные значения жесткости оболочки эритроцитов с учетом погрешности измерений приведены в табл. 2.

Во втором методе лазерный пучок заводился в микроскоп без дифракционной решетки, таким образом в фокальной плоскости микроскопа формировалось одиночное пятно. В суспензию с эритроцитами были помещены сферы латекса диаметром 6,1 мкм. Полученная смесь выдерживалась при температуре (t= 25°C) 30

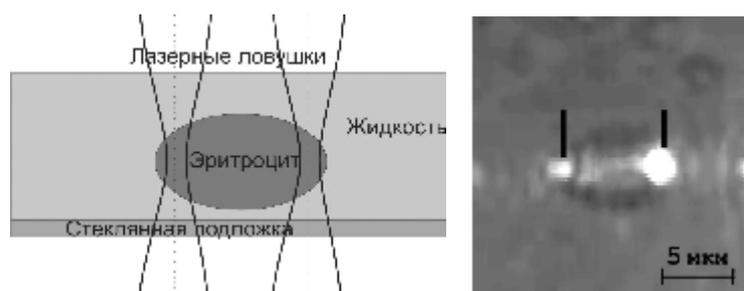


Рис. 2. Иллюстрация эксперимента по деформированию эритроцита при помощи многопучковой ловушки

Таблица 2. Определение деформируемости и жесткости эритроцитов разного возраста с помощью многопучковой ловушки

Фракции эритроцитов	Мощность пучка, мВт	Сила захвата, пН	Изменение длины, мкм	Деформация, %	Жесткость оболочки, мкН/м	δ , %
Молодые клетки	235	52±3	1,1±0,2	16	48±11	23
Старые клетки			0,6±0,2	9	90±37	41

мин, а затем помещалась на предметный столик микроскопа для экспериментов. Было обнаружено, что часть эритроцитов приклеилось к сферам латекса, а сферы латекса приклеились к подложке. Такие эритроциты захватывались оптической ловушкой и производилось перемещение предметного столика. В результате оболочка эритроцитов начинала деформироваться. Иллюстрация эксперимента приведена на рис. 3.

Измерения деформации выполнялось для двух значений мощности 170 мВт и 360 мВт, что соответствует силам ~40 пН и ~85 пН соответственно. Погрешность значений полученных сил не превышает 10%. Эксперименты были проведены с 11-ю эритроцитами каждой фракции. Усредненные значения жесткости оболочки эритроцитов с учетом погрешности измерений приведены в табл. 3.

Сравнительный анализ табл. 2 и 3 показывает, что жесткость оболочки для молодых и старых эритроцитов отличается практически в два раза (отношение жесткостей равно 1,9 – для многопучковой ловушки, 2,2 – для однопучковой), что согласуется с результатами, полученными с помощью

метода фильтруемости (см. табл. 1, 2-й столбец). Средние значения жесткости, определенные методами однопучковой и многопучковой ловушек, совпадают в пределах ошибок измерений. Однако, для многопучковой ловушки, а также однопучковой при меньшем значении мощности светового пучка (170 мВт) происходит перекрытие доверительных интервалов для значений жесткости молодых и старых клеток. Это обусловлено, в первую очередь, большой инструментальной погрешностью измерений размеров эритроцитов, определяемой разрешением оптической системы используемого микроскопа. Другой причиной, на наш взгляд, является недостаточная величина силы, приложенной к деформируемому эритроциту для указанных случаев. Увеличение мощности захватывающих пучков будет способствовать уменьшению погрешности, о чем свидетельствует случай однопучковой ловушки при мощности 360 мВт. В этом случае жесткость оболочки эритроцитов определена с погрешностью 19 – 24 % без перекрытия доверительных интервалов.

Также следует отметить, что точность определения жесткости методом многопучковой ло-

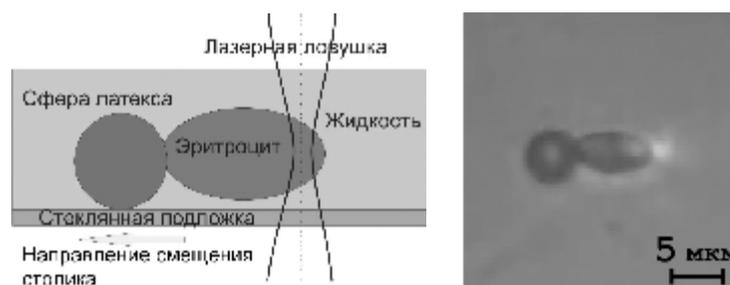


Рис. 3. Иллюстрация эксперимента по деформированию эритроцитов при помощи однопучковой ловушки

Таблица 3. Определение деформируемости и жесткости эритроцитов разного возраста с помощью однопучковой ловушки

Фракции эритроцитов	Мощность пучка, мВт	Сила захвата, пН	Изменение длины, мкм	Деформация, %	Жесткость оболочки, мкН/м	δ , %
Молодые клетки	170	40±3	1,1±0,2	16	35±8	23
	360	85±6	2,7±0,5	38	32±6	19
Старые клетки	170	40±3	0,7±0,2	11	56±19	34
	360	85±6	1,2±0,3	18	70±17	24

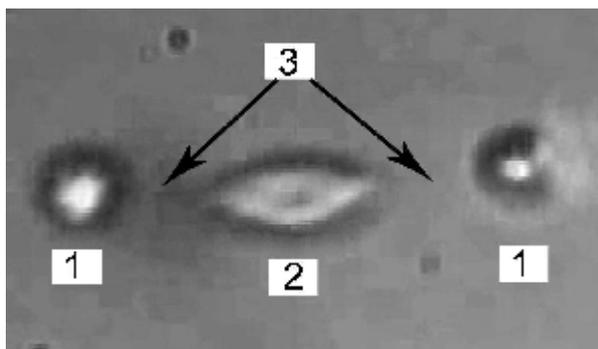


Рис 4. Прилипание углеводных остатков гликофоринов к латексным сферам:
1 – латексные сферы; 2 – растянутый эритроцит;
3 – нити углеводных остатков гликофоринов

вухи может быть повышена за счет использования прикрепленных к эритроциту прозрачных микросфер. В этом случае с большей точностью могут быть определены силы захвата, с одной стороны, а, с другой, увеличены их значения за счет большего показателя преломления микросфер (например, показатель преломления для латекса равен 1,53, а для эритроцита – 1,407).

В экспериментах с однопучковой ловушкой наблюдалось интересное явление. А именно, при помещении эритроцита между двумя латексными микросферами и действии оптического пинцета непосредственно на латекс, происходило прилипание к нему углеводной части гликопротеидов и ее растяжение (рис. 4). После прекращения действия силы эритроцит возвращался в первоначальное положение. Нам не встречалось описание подобного явления в литературе. Таким образом, можно надеяться, что описанный метод будет эффективен для изучения состояния адгезивных белков эритроцитарной мембраны (вероятно, гликофоринов).

Расчет эластичности углеводного остатка гликофоринов может характеризовать способность эритроцитов к прилипанию к сосудистой стенке и силу адгезии, что является очень важным в патогенезе многих сосудистых заболеваний (воспалительные процессы, геморрагический васкулит, тромбоз и др.).

3. ВЫВОДЫ

В работе исследованы два метода определения жесткости мембраны эритроцитов на основе техники оптического захвата: с использованием многопучковой ловушки, сформированной с помощью дифракционной решетки, и однопучковой ловушки. Получено, что жесткость оболочки для молодых и старых эритроцитов отличается практически в два раза, что согласуется с

дополнительно проведенными исследованиями по определению индекса фильтруемости.

Методы не требовательны к чистоте (выделение групп однородных по размеру, возрасту и т.д.) приготовления образцов. При этом метод с использованием многопучковой ловушки менее требователен к качеству приготовленных образцов, однако он более ограничен с точки зрения энергетической эффективности, поскольку в нужные порядки дифракции идет не более 60% энергии лазерного излучения, что приводит к большей погрешности измерений (23 – 41%) по сравнению с методом однопучковой ловушки (19 – 24%). Стоит отметить, что для проведения экспериментов достаточно несколько пиколитров крови. Проанализированы источники ошибок и пути увеличения точности.

Наблюдаемое в ряде экспериментов явление растяжения углеводной части гликопротеидов позволяет надеяться на возможность эффективного использования оптического пинцета для изучения состояния адгезивных белков эритроцитарной мембраны.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Самарской областной станции переливания крови за предоставление образцов донорской крови для проведения исследований. Работа выполнена в рамках бюджетной темы № 01200805602 при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект № 07-02-01280-а) и при поддержке УНК ФИАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Clarc M.R., et al.* The Red Cell Production, Metabolism, Destruction // *Blood*. 1983. V. 610. P. 899-910.
2. *Зинчук В.В.* Деформируемость эритроцитов: физиологические аспекты // *Успехи физиологических наук*. 2001. Т. 32. № 3. С. 66-78.
3. *Захаров С.Д., Иванов А.В.* Светокислородный эффект – физический механизм активации биосистем квазимонохроматическим излучением // *Препринт ФИАН*. Москва. 2006.
4. *Белкин А.В., Марьянских В.В., Шалабодов А.Д.* Исследование деформационных свойств эритроцитов с использованием усовершенствованного эктацитометра // *Тез. докл. VI Всероссийская конференция по биомеханике – Биомеханика – 2002*. Н. Новгород, 2002. С. 33.
5. *Белкин А.В., Марьянских В.В. и др.* Исследование вязкоэластических свойств мембран эритроцитов крыс с различным уровнем двигательной активности и их реакция на стрессы различной этиологии // *Вестник Тюменского Государственного Университета*. 2007. № 3. С. 234-239.
6. *Dao M., Lim C. T., Suresh S.* Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers // *J. Mech. Phys. Solids*. 2003. V. 51. P. 2259-2280.
7. *Brandao M.M., Fontes A., et.al.* Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: application to the

- study of drug response in sickle cell disease // Eur. J. Haematol. 2003. V. 70. P. 207-211.
8. *Bariel P., Sheng Y. et al.* Calculation of spherical red blood cell deformation in dual-beam optical stretcher // Opt. Express. 2007. V. 15. N. 24. P. 16029-16034.
 9. *Gu M., Kuriakose S. et al.* A single-beam near-field laser trap for optical stretching, folding and rotation of erythrocytes // Opt. Express. 2007. V. 15. N. 3. P. 1369-1375.
 10. *Lenormand G., Henon S., et al.* Direct measurement of area expansion and shear moduli of the human red blood cell membrane skeleton // Biophys. J. 2001. V. 81. N. 1. P. 43-56.
 11. *Rodrigo P., Eriksen R., et al.* Interactive light-driven and parallel manipulation of inhomogeneous particles // Opt. Express. 2002. V. 10. N. 26. P. 1550-1556.
 12. *Bingelyte V., Leach J., et al.* Optically controlled three-dimensional of microscopic objects // Appl. Phys. Lett., 2003. V. 82, N. 5. P. 829-831.
 13. *Vossen L.J., Horst A., et al.* Optical tweezers and confocal microscopy for simultaneous three-dimensional manipulation and imaging in concentrated colloidal dispersions // Review of scientific instruments. 2004. V. 75. N. 9. P. 2960-2969.
 14. *Ward A.D., Berry M.G. et al.* Optical sculpture: controlled deformation of emulsion droplets with ultralow interfacial tensions using optical tweezers // Chem. Commun. 2006. P. 4515-4517.
 15. *Федорова З.Д., Котовщикова М.А., Бессмельцев С.С., Попова Т.И.* Об определении индекса деформируемости эритроцитов // Лабораторное дело. 1986. № 12. С. 732-735.
 16. *Svoboda K., Block S.M.* Biological Applications of Optical Forces // Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. 1994. V. 23. P. 247-285.
 17. *Хаптель Дж., Бреннер Г.* Гидродинамика при малых числах Рейнольдса. "Мир". 1976.
 18. *Аврамова Т.В., Боровкина Т.И., Титова И.М.* Анализ регуляции в системе красной крови. Красноярск. 1975. С. 175-180.
 19. *Tannert T.C., Lux K.* Spreading of red cell blood suspensions on paper as a simple test of cell deformability // Acta biol.med.germ.1981. V. 40. P. 739-742.
 20. *Beutler E.* Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency // Am.J.Clin. Pathol and Clin.med. 1963. V. 63. N. 3. P. 203.

APPLICATION OF THE LAZER TWEEZERS FOR STUDY OF MECHANICAL PROPERTIES OF ERYTHROCYTES

© 2009 A.V. Korobtsov¹, S.P. Kotova¹, N.N. Losevsky¹, A.M. Mayorova¹, R.O. Klenov², N.A. Klenova²

¹ Samara Branch of Physics Institute named after P.N. Lebedev of Russian Academy of Science

² Samara State University

In this work an original and effective way is offered for the erythrocyte stretching with a multibeam trap generated by a diffraction grating, by means of its moving. The rigidity of erythrocytes is evaluated both by means of the trap, and with a single-beam trap (standard optical tweezers). A comparative analysis of the two techniques and a comparison of the received data to those obtained by the filterability method are carried out. The efficiency of the techniques offered for the definition of the erythrocytes membranes rigidity is shown.

Keywords: laser tweezers, deformations of erythrocytes, diffraction grating

Alexander Korobtsov, engineer.

E-mail: korobtsov@fian.smr.ru.

Svetlana Kotova, Candidate of Physics and Mathematics, Laboratory Head. E-mail: kotova@fian.smr.ru.

Nikolay Losevsky, Research Fellow.

E-mail: losevsky@fian.smr.ru.

Alexandra Mayorova, Candidate of Physics and Mathematics, Senior Fellow.

E-mail: alexandramay@mail.ru

Roman Klenov, Graduate Student.

E-mail: rklenov@yandex.ru.

Natalia Klenova, Doctor of Biology, Professor.

E-mail: kln.ssu@rambler.ru