

МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ДВИЖЕНИЯ ЖИВЫХ КЛЕТОК (ЭРИТРОЦИТОВ) С ПОМОЩЬЮ ЛАЗЕРНО-ПРОЕКЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Р.В. Амбарцумян, Б.В. Еремеев, С.Д. Захаров, К.И. Земсков,
М.А. Казарян, Г.Г. Петраш, С.П. Чертанов

УДК 621.378.325 + 612.13

Для изучения уникальных упругих свойств эритроцита применен лазерный проекционный микроскоп в сочетании с проточной системой, аналогичной системе искусственного кровообращения. При этом моделируется движение клеток сквозь капилляры в условиях, близких к естественным.

В последнее время усиливается интерес к физическим механизмам феноменальной упругости эритроцитов, наблюдаемой в широком диапазоне удлинений (до 3-клеточных размеров). Эти механизмы пока не удается описать в рамках гидромеханического или термодинамического подходов /1/. Дальнейшее совершенствование физических моделей сдерживается недостатком экспериментальных фактов об особенностях упругого поведения живых клеток. Однако получить подобные данные затруднительно из-за сложности наблюдения клеток в состоянии, близком к естественному при их движении по кровеносным сосудам.

Эритроциты или красные клетки крови в покое напоминают по форме двояковогнутые диски диаметром около 7,6 мкм. Основная их функция — доставка кислорода тканевым клеткам. Отдача кислорода происходит в тканевых капиллярах. Условия прохождения эритроцитов через капилляры в основном определяют общее гидродинамическое сопротивление потока крови /2/, но малодоступны для изучения. Внутри капилляров красные клетки существенно деформируются. Их деформируемость моделируют в различных физических устройствах, из которых наиболее удачным представляется так называемый эктацитометр /3/. Это устройство с помощью лазерного луча, используемого как оптический зонд, позволяет оценивать сдвиговые деформации эритроцитов в узком зазоре между двумя прозрачными концентрическими цилиндрами, один из которых вращается с регулируемой скоростью.

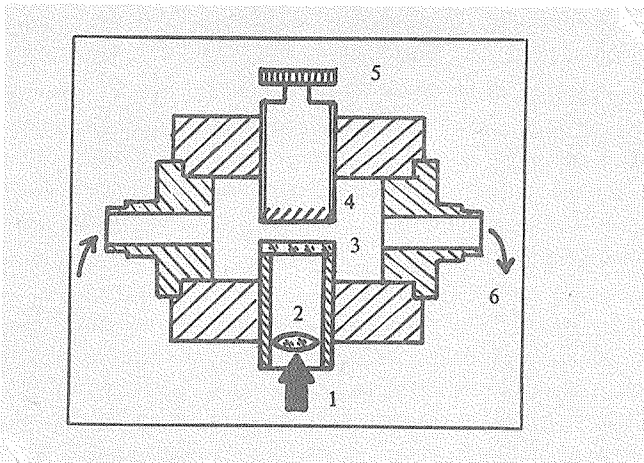
Однако при движении красных клеток в потоке жидкости характер их деформаций оказывается более сложным, чем простой сдвиг. Эритроциты могут испытывать изгибные возмущения, колебания, а также участвовать в нерегулярном вращательном движении [2]. Такие клеточные движения в эктацитометре регистрировать невозможно; нельзя также наблюдать взаимодействие клеток, влияющее на общий характер движения. Кроме того, эктацитометр является по своей сути прибором для изучения деформируемости клеток вне организма, тогда как для практических целей важно разработать методику, которая могла бы по мере ее развития оказаться пригодной и для исследований на живом организме.

В данном сообщении рассмотрен новый метод регистрации движущихся в капиллярном зазоре эритроцитов, лишенный указанных недостатков. Он основан на применении принципа лазерной проекционной микроскопии [4] к проточному варианту кюветы в схеме искусственного кровообращения. Отличительной особенностью лазерного проекционного микроскопа (ЛПМ) является возможность получения величины световой мощности в пучке, формирующем изображение, на несколько порядков больше, чем мощности, направляемой на объект. Поэтому освещенность объекта можно выбрать так, чтобы в процессе исследований в клетках не происходило нежелательных физико-химических изменений, индуцированных световыми квантами или теплом. В то же время освещенность на проекционном экране определяется требованиями информативности изображения и зависит от усилительных свойств активных лазерных элементов, используемых в ЛПМ. Кроме того, лазер работает в импульсно-периодическом режиме, что дает возможность использовать его для изучения процессов, требующих временного разрешения (например, при исследовании дрожаний эритроцитов [5]).

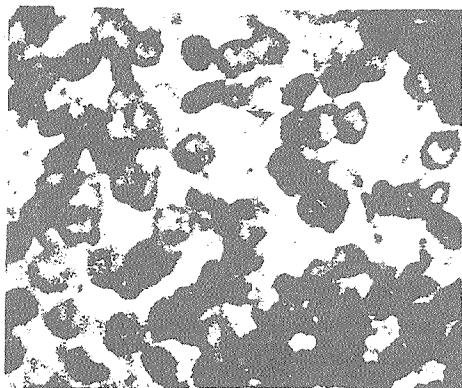
Схема экспериментальной установки аналогична использованной в [6] для работы в проходящих пучках. В качестве объективов использовались стандартные микрообъективы с увеличением в 2, 4 и 8 раз. Усилитель яркости — активный элемент на парах меди длиной 50 см и внутренним диаметром 2 см — возбуждался с частотой повторения около 10 кГц. Для выделения рабочей длины волны 510,5 нм использовался интерференционный светофильтр; последний отсекал также излучение от нагретого до 1500 °С активного элемента. Усиление для слабого сигнала составляло 10^4 .

Для экспериментов использовалась донорская кровь. Исследуемый поток центральной крови протекал в термостабилизированных условиях ($37 \pm 0,5$ °С) через узкий зазор кюветы, образованный двумя плоскими пластинками (рис. 1), одна из которых (стеклянная) служила в качестве входного окна

для светового пучка, а другая (из нержавеющей стали) являлась отражающим зеркалом.



Р и с. 1. Схема проточной кюветы: 1 – световой пучок; 2 – объектив; 3 – входное окно; 4 – зеркало; 5 – микрометрический винт; 6 – вывод к перистальтическому насосу.



Р и с. 2. Фотография, полученная с проекционного экрана. Увеличение в 800 раз.

Расстояние между указанными пластинами могло варьироваться с помощью микрометрической подачи, обеспечивая переменную толщину (вплоть до 30 мкм) протекающего слоя эритроцитов. Скорость потока регулировалась посредством изменения скорости прокачки перистальтического насоса. Средняя плотность светового потока в фокусе объектива на кювете не превышала 1 Вт/см^2 . При диаметре фокального пятна $4 \cdot 10^{-2} \text{ см}$, толщине

кюветы 30 мкм и скорости потока через кювету 1 см/с оцениваемый нагрев клеток за время экспозиции не превышал 1 °С.

На экране размером несколько квадратных метров наблюдалось увеличенное в сотни или тысячи раз изображение потока эритроцитов, текущих через кювету. Уменьшая толщину кюветы, можно было наблюдать переход от многослойного потока к монослойному. В последнем случае при дальнейшем уменьшении зазора могла наблюдаться остановка движения потока. На рис. 2 приведена сделанная с экрана фотография потока эритроцитов, близкого к монослойному. Отчетливо различаются отдельные эритроциты, некоторые из которых заметно деформированы. При различных зазорах и скоростях потока наблюдалось также прохождение малых воздушных пузырьков, которые имели различные размеры и в большинстве случаев вносили турбулентность в движение, а иногда прилипали к стеклянному окну.

Из-за того, что лазерный свет проходил через пузырьки без поглощения, освещенность соответствующих мест экрана максимальна; поэтому изображение пузырьков выделялись на общем фоне.

В заключение отметим, что в данной схеме предусмотрена возможность локального воздействия мощным световым пучком на отдельные эритроциты или их фрагменты /7, 8/.

Поступила в редакцию 22 июля 1985 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. И в е н с И., С к е й л а к Р. Механика и термодинамика биологических мембран. М., Мир, 1981.
2. К а р о К. и др. Механика кровообращения. М., Мир, 1981.
3. B e s s i s M., M o h a n d a s N. Blood Cells. 1, 307 (1975).
4. З е м с к о в К.И., К а з а р я н М.А., П е т р а ш Г.Г. УФН, 126, 695 (1978).
5. F r i c k e K., S a c k m a n n E. Biochem. Biophys. Acta, 803, 145 (1984).
6. З а х а р о в С.Д. и др. Вопросы биологической и медицинской техники. Мецниереба, Тбилиси, 1984, с. 69.
7. Б у н к и н Ф.В. и др. ДАН СССР, 243, 1568 (1978).
8. П е т р а ш Г.Г. Вестник АН СССР, № 2, 66 (1982).