

СОВМЕЩЕНИЕ ОПТИЧЕСКОЙ КОГЕРЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ С ОПТИЧЕСКИМ ПИНЦЕТОМ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛЕТОК

М. А. Сиротин, М. Н. Ромодина, Е. В. Любин,
И. В. Соболева, А. А. Федянин

Был реализован метод, совмещающий фазочувствительную оптическую когерентную микроскопию (ОКМ) и оптический пинцет, для изучения механических свойств микрообъектов, в том числе биологических клеток. С помощью разработанного метода были исследованы процессы захвата микрочастиц в ловушку. Получен и измерен отклик мембраны эритроцита (дискоцита и сфероцита) на возмущение, вызванное оптической ловушкой.

Ключевые слова: оптическая когерентная микроскопия, оптический пинцет, эритроциты, механические свойства клеток.

1. *Введение.* На сегодняшний день актуальной задачей является изучение микромеханических свойств одиночных эритроцитов. Деформационные и агрегационные свойства эритроцитов определяют реологию крови на уровне микрососудов, то есть в значительной степени влияют на микроциркуляцию крови и связаны с такими патологиями, как анемия [1] и пойкилоцитоз [2]. В связи с этим особый интерес представляет развитие методик, позволяющих определять микромеханические свойства одиночных живых клеток.

Основными методами изучения механических свойств одиночных клеток являются: атомно-силовая микроскопия, метод втягивания в микропипетку [3], цитометрия при переменном магнитном поле [4], метод регистрации обратного светорассеяния [5], оптический пинцет [6] и оптическая когерентная микроскопия [7]. Целью работы была

МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991 Россия, Москва, Ленинские горы, 1; e-mail: sirotin@nanolab.phys.msu.ru.

разработка метода, который позволял бы неинвазивно создавать механическое возмущение на поверхности клетки и одновременно детектировать ее отклик. Для этого была спроектирована и собрана установка, совмещающая два метода изучения микрообъектов: оптический пинцет и оптическую когерентную микроскопию (ОКМ). Оптический пинцет позволяет управлять объектами и создавать на их поверхности механическое возмущение с субмикронной точностью [6]. ОКМ позволяет детектировать смещения с точностью до 10 нм и строить трехмерные изображения объекта [7]. Основным преимуществом совмещения двух методов является возможность создавать механическое возмущение на поверхности клетки пинцетом, одновременно детектируя смещение мембраны с помощью фазочувствительной ОКМ и изучая при этом трехмерную структуру клетки.



Рис. 1: Схема установки.

2. Метод.

2.1. Установка. Для создания механического возмущения с помощью оптического пинцета использовался инфракрасный лазер (мощность излучения в оптической ловушке составляла 20–40 мВт, длина волны 1050 нм), чоппер для периодического сигнала (частота 2–10 Гц) и подвижные линзы для смещения положения ловушки (рис. 1). Излучение сфокусировано водно-иммерсионным объективом с апертурой $NA = 1.2$.

Для детектирования клеточного движения с помощью ОКМ использовался источник с широким спектром, получаемым с помощью фотонно-кристаллического волокна

(ширина спектра суперконтинуума – 320 нм, интегральная мощность 10 мВт), опорный и сигнальный лучи для интерференции и гальвазеркала для сканирования (ширина и высота поля сканирования – 50 мкм).

Получаемый интерференционный спектр может быть обработан двумя способами: извлечением амплитуды Фурье, которая дает информацию об отражательной способности образца в зависимости от глубины (амплитудная ОКМ), получаемые разрешения по всем осям – 1 мкм. Или извлечением фазы Фурье, которая характеризует рельеф мембраны клетки (фазовая или фазочувствительная ОКМ). Аксиальное разрешение второго, фазочувствительного, метода в 100 раз выше и составляет 10 нм [7].

Сочетание методов ОКМ и оптического пинцета уже использовалось для захвата клеток и их визуализации в ловушке [8], однако объединение двух методик впервые применяется для определения механических свойств биологических клеток. В нашем методе оптический пинцет создает механическое возмущение на поверхности клетки, одновременно с чем фазочувствительная ОКМ регистрирует ее отклик.

2.2. Подготовка биологических клеток. Для проведения экспериментов с дискоцитами (нормальными эритроцитами) была использована свежая венозная кровь (не более 1–2 дней хранения). Кровь была разделена на плазму и эритроцитарную массу методом центрифугирования, далее использовалась только плазма в качестве естественного буферного раствора. Непосредственно перед экспериментом в 1 мл плазмы добавлялось 5 мкл свежей капиллярной крови (одного из авторов), 40 мкл полученного раствора использовалось в качестве образца.

Для приготовления образца со сфероцитами (сферическими эритроцитами) был использован раствор с пониженной осмолярностью, состоящий из 1 части натрий-фосфатного буфера, 12 частей дистиллированной воды и 32 частей физиологического раствора.

3. Результаты.

3.1. Движение микрошарика. Для начала, разработанный метод был использован для изучения движения неживых объектов. Мы использовали оптический пинцет для захвата полистиролового микрошарика диаметром 10 мкм и фазочувствительную ОКМ для детектирования его траектории в потенциале ловушки.

На рис. 2 изображены измеренные с помощью фазочувствительной ОКМ траектории движения микрошарика в процессе его захвата в оптическую ловушку при разных мощностях излучения в оптической ловушке.

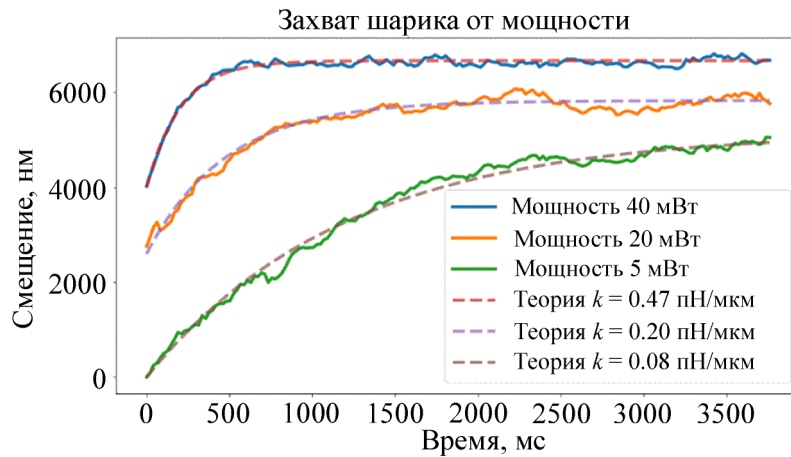


Рис. 2: Траектории захвата микрошарика при разных мощностях излучения в оптической ловушке (эксперимент и теория); k – жесткость потенциала ловушки.

В результате проведения калибровочных экспериментов с микрошариками была оценена жесткость гармонического потенциала ловушки k , которая составила 0.1–0.5 пН/мкм (жесткость k в экспериментах с живыми клетками не оценивалась).

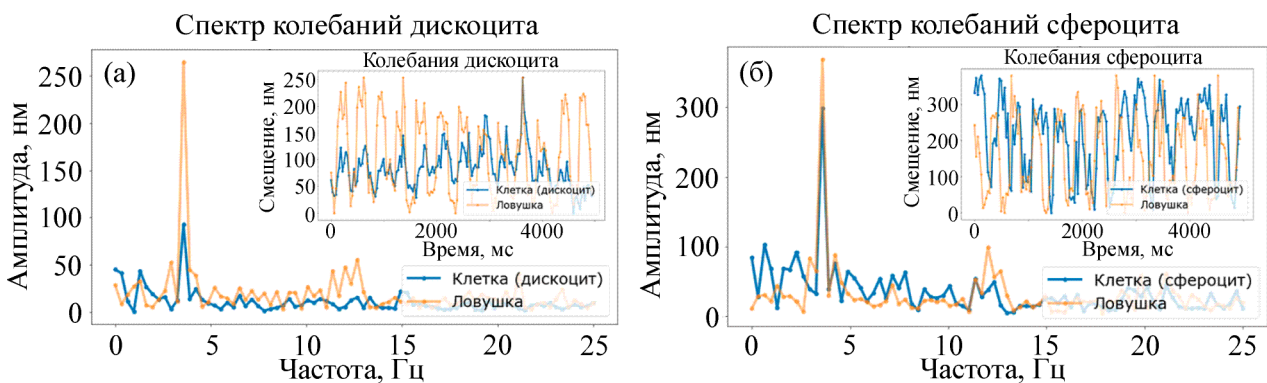


Рис. 3: Отклики дискоцита (а) и сфероцита (б) на поднятие края клетки.

3.2. Изучение движения живых клеток. В следующем эксперименте было использовано сочетание фазочувствительной ОКМ и оптического пинцета для исследования механических свойств клеток.

Мы использовали оптический пинцет для создания одинакового механического возбуждения на поверхности дискоцита и сфероцита: а именно, периодического смещения края клетки из-за пондеромоторных сил. Было обнаружено, что амплитуды отклика дискоцита и сфероцита существенно отличаются.

В других работах (напр., [9]) было показано, что жесткость мембраны сфероицита в несколько раз больше жесткости дискоцита, однако полученная нами амплитуда отклика сфероицита оказалась примерно в 3 раза больше амплитуды отклика дискоцита. Это, вероятно, вызвано тем, что в нашей конфигурации эксперимента большее влияние на величину отклика оказывают форма клетки и точка приложения к ней внешнего воздействия, а не жесткость мембраны. Кроме того, может сказываться и разница в составах сред, в которых были исследованы дискоцит и сфероцит.

4. Заключение.

Разработанный метод дает возможность неинвазивно создавать механическое возмущение клетки и детектировать ее отклик посредством записи трехмерного фазового сигнала, что позволяет получать больше информации о механических свойствах клеток.

Метод позволил обнаружить, что амплитуда отклика дискоцита на внешнее воздействие в 3 раза меньше амплитуды отклика сфероицита, что может объясняться разной формой клеток. Разработанный метод в будущем также может быть использован для изучения движения не только клеточной мембраны, но и внутренних структур клеток, таких как ядро и органеллы.

Эта работа была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты №№ 17-08-01716, 18-32-20217 и 18-02-00880), Российским научным фондом (грант №№ 18-72-00247, создание экспериментальной установки), а также Грантом Президента РФ МК-2951.2019.2. Часть исследований выполнена при поддержке Центра квантовых технологий МГУ и при поддержке Министерства науки и высшего образования (№14.W03.008.31, моделирование спектров пропускания).

Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] A. M. Dondorp, B. J. Angus, K. Chotivanich, et al., *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **60**, 733 (1999). DOI: 10.4269/ajtmh.1999.60.733
- [2] William T. Tse, Samuel E. Lux, *British Journal of Haematology* **104**, 2 (1999). DOI: 10.1111/j.1365-2141.1999.01130.x
- [3] R. M. Hochmuth, *Journal of Biomechanics* **33**, 15 (2000). DOI: 10.1016/S0021-9290(99)00175-X
- [4] Marina Puig-de-Morales-Marinkovic, Kevin T. Turner, James P. Butler, et al., *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **293**, 597 (2007). DOI: 10.1152/ajpcell.00562.2006
- [5] M. Shahrooz Amin, YoungKeun Park, Niyom Lue, et al., *Opt. Express* **15**, 17001 (2007). DOI: 10.1364/OE.15.017001

- [6] M. Dao, C.T. Lim, S. Suresh, Journal of the Mechanics and Physics of Solids **51**, 2259 (2003). DOI: 10.1364/OE.15.017001
- [7] Vasilica Crecea, Benedikt W. Graf, Taewoo Kim, et al., IEEE Journ. of Sel. Top. in Quan. Elec. **20**, 25 (2014). DOI: 10.1109/JSTQE.2013.2280501
- [8] Woo June Choi, Kwan Seob Park, Tae Joong Eom, et al., Proc. SPIE **8227**, 1 (2012). DOI: 10.1117/12.908380
- [9] Gabriel Popescu, YoungKeun Park, Wonshik Choi, et al., Blood Cells, Molecules, and Diseases **41**, 10 (2008). DOI: 10.1016/j.bcmed.2008.01.010

Поступила в редакцию 21 января 2020 г.

После доработки 16 марта 2020 г.

Принята к публикации 17 марта 2020 г.

Публикуется по рекомендации XVII Всероссийского молодежного Самарского конкурса-конференции научных работ по оптике и лазерной физике (Самара).