**Изучение взаимодействия пары эритроцитов в растворе белков методом оптического захвата**

***Ли Кисун1, Хохлова Мария Дмитриевна1, Федянин Андрей Анатольевич1, Приезжев Александр Васильевич1, 2***

*Аспирант, аспирантка, профессор, доцент*

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,*

*физический факультет, Москва, Россия*

*Международный лазерный центр МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

*E–mail: leekisung1991@gmail.com*

Лазерный пинцет позволяет захватывать и манипулировать микроразмерными частицами с помощью жестко сфокусированного лазерного излучения. При надлежащей калибровке лазерный пинцет может с большой точностью измерять силы порядка нескольких пиконьютон. Эти силы сопоставимы с силами межклеточных или молекулярных взаимодействий, тем самым лазерный пинцет позволяет прецизионно изучать биофизику отдельных клеток или молекул. Лазерный пинцет, таким образом, открывает новые горизонты во многих областях биофотоники и биомедицины, находя все больше и больше применений [1].

Процесс обратимой агрегации эритроцитов, который изучается в данной работе, является фундаментальный процессом, который определяет вязкость крови при низких сдвиговых скоростях. Наряду с гематокритом крови и деформируемостью эритроцитов, агрегация в основном определяет реологию крови. Именно поэтому, исследование механизмов образования агрегации эритроцитов остающихся еще не до конца изучены, является одной из важной задач реологии крови.

В данной работе с помощью двухканального лазерного пинцета измерены силы взаимодействия между эритроцитами и исследована кинетика их взаимодействия в растворах основных белков плазмы крови, участвующих в агрегации эритроцитов: иммуноглобулина, фибриногена и альбумина.

Основные элементы экспериментальной установки: объектив с масляной иммерсией 100Х (NA = 1.25), CMOS камера (DCC1645C, Thorlabs), система линз, диодные лазеры 980 нм (LU 980, Lumics). Длина волны лазерного излучения выбрана из соображения минимизации нагрева живой клетки и соответствует минимуму поглощения эритроцита. При этом нагрев эритроцита за время эксперимента согласно расчетам не превышал нескольких градусов. Калибровка лазерного пинцета проводилась по методу вязкого трения, с использованием формулы Стокса.

Подготовка образца проходила следующим образом, кровь, взятая из пальца, разбавлялась в PBS (фосфат буферный раствор) и отмывалась центрифугированием 2 раза, затем разбавлялась повторно в PBS в соотношении 1:2000 для достижения концентрации эритроцитов 0,05%. Это было необходимо для захвата и манипуляцией отдельными клетками. Затем в раствор добавлялись белки плазмы крови для изучения их влияния на взаимодействие эритроцитов. Для предотвращения прилипания эритроцитов ко дну стеклянной кюветы ее внутренняя поверхность обрабатывалось раствором человеческого сывороточного альбумина.

При исследовании зависимости кинетики агрегации от типа белка были использованы следующие концентрации: фибриноген 4, 5, 6, 8 мг/мл, иммуноглобулин 10, 15, 20, 25 мг/мл, альбумин 35, 70 мг/мл. При изучении синергического действия двух белков использовались следующие концентрации: фибриноген 2,5 мг/мл с альбумином 35 и 75 мг/мл, глобулин 12,5 мг/мл с альбумином 35 мг/мл и 70 мг/мл. В растворе, содержащем только фибриноген и иммуноглобулин, эти белки агрегировали с образованием крупных частиц типа комков. Поэтому такие растворы не использовались.

Использовались также растворы белков, имитирующие плазму. При этом были взяты две разные концентрации белков: фибриноген 3,5 и 7,5 мг/мл, альбумин 35 и 70 мг/мл, иммуноглобулин 12,5 и 25 мг/мл соответственно. В первом случае концентрации белков соответствовали физиологической концентрации белков в аутологической плазме, во втором − превышала её примерно в 2 раза.

Получены зависимости возможных исходов процесса агрегации-дезагрегации эритроцитов от белкового состава раствора и концентрации белков. Результаты измерения силы взаимодействия показывают хорошую корреляцию увеличения силы взаимодействия эритроцитов с увеличением концентрации белков.

Характер взаимодействия можно разделить на три вида: образование практически неразрывных нитевидных тяжей между эритроцитами, равномерное взаимодействие клеток по всех их площади соприкосновения и точечные взаимодействия. При этом в предыдущих работах в аутологической плазме можно было наблюдать все три вида взаимодействия эритроцитов [2, 3]. Данные результаты позволяют определить вклад каждого из белков, влияющих на агрегацию эритроцитов, во взаимодействие между ними.

**Литература**

1. Ramser K., Hanstorp D. Optical manipulation for single-cell studies. *Journal of Biophotonics*, 2010, vol. 3 (4), pp. 187-206.
2. Khokhlova M.D., et al. Normal and system lupus erythematosus red blood cell interactions studied by double trap optical tweezers: direct measurements of aggregation forces. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, vol. 17 (2), p. 025001.
3. Маклыгин А.Ю. и др. Измерение силы взаимодействия между эритроцитами в агрегате с помощью лазерного пинцета, *Квантовая Электроника*, 2012, т. 42 (6), стр. 500-504.