

**Одиннадцатая Международная научно-техническая конференция
«Оптические методы исследования потоков»
Москва, 27 — 30 июня 2011 г.**

УДК 535.4; 57.04

А.В. Приезжев^{1*}, А.Е. Луговцов¹, С.Ю. Никитин¹, Ю.С. Самсонова¹,
В.Г. Ионова^{2**}, Ч.-Л. Ченг^{3***}, Е.В. Переведенцева³, С.Л. Чен³

¹ Физический факультет и Международный лазерный центр
МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы 1,
*E-mail: avp2@mail.ru

² НЦ неврологии РАМН, Россия, Москва, 125367, Волоколамское шоссе, 80,
**E-mail: iovic@mail.ru

³ Физический факультет Национального университета Донг Хва,
Тайвань, 974, г.Хуалинь, ***E-mail: clcheng@mail.ndhu.edu.tw

**ОПТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НАНОЧАСТИЦ АЛМАЗА
С КОМПОНЕНТАМИ КРОВИ ПРИ ИЗМЕРЕНИИ IN VITRO**

Цель работы состоит в исследовании влияния наночастиц алмаза на микрореологию крови, в частности, на способность красных клеток крови деформироваться в сдвиговом потоке и спонтанно агрегировать. Мотивацией работы является то обстоятельство, что вводить наночастицы в живой организм предполагается внутривенно. Однако их возможное влияние на кровь и на ее способность нормально течь по сосудам разных диаметров обычно не учитывается.

Для изучения этого влияния методами диффузного обратного рассеяния света и лазерной дифрактометрии проведены измерения in vitro нескольких параметров кинетики агрегации и индекса деформируемости. Использовались водные суспензии наночастиц алмаза с размерами от 5 до 500 нм разных концентраций, добавляемые в пробы свежесвзятой крови. Также проведен теоретический анализ влияния разброса размеров частиц, моделирующих красные клетки крови, на видность дифракционной картины в дифрактометре, по форме которой измеряется индекс деформируемости клеток. Кроме того методом динамического светорассеяния исследовано взаимодействие наночастиц алмаза с белками плазмы крови альбумином и γ -глобулином в водных растворах, также влияющими на микрореологию крови.

Показано, что наночастицы снижают деформируемость клеток в сдвиговом потоке и изменяют кинетику агрегации клеток в in vitro экспериментах, причем степень этого влияния зависит от концентрации и размеров наночастиц. Одним из возможных механизмов этого влияния может быть обнаруженная нами адсорбция белков плазмы крови на поверхности наночастиц алмаза.

**НАНОЧАСТИЦЫ, АЛМАЗ, КРОВЬ, ЭРИТРОЦИТ, БЕЛКИ, ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ,
АДСОРБЦИЯ**

ВВЕДЕНИЕ

Использовались наночастицы алмазов (ND) разных размеров (от 5 до 500 нм) и с разными состояниями поверхности (функционализации). В частности, частицы функционализированные путем нанесения на их поверхность карбоксильных групп (сND), что обычно повышает биосовместимость их с компонентами живых структур. Исследовалась кровь от здоровых доноров (норма) и от пациентов, страдающих неврологическими заболеваниями (патология). Для визуализации взаимодействия наночастиц с эритроцитами использовались методы флуоресцентной, светлопольной и сканирующей конфокальной микроскопии [1]. Количественные измерения влияния наночастиц на деформируемость и параметры спонтанной агрегации и сдвиговой дезагрегации красных клеток крови (эритроцитов) проводились методами дифрактометрии и диффузного рассеяния на специализированном приборе, построенном на основе цилиндрической ячейки Куэтта [2]. Для обоснования количественных измерений проведен теоретический анализ влияния разброса размеров частиц, моделирующих красные клетки крови, на видность дифракционной картины в дифрактометре, по форме которой измеряется индекс деформируемости клеток. Индекс деформируемости измерялся в разбавленных суспензиях клеток при различных скоростях сдвига в диапазоне 05 – 2000 сек⁻¹. Параметры спонтанной агрегации (T_1 - время образования линейных агрегатов, T_2 – время образования трехмерных агрегатов, AI – амплитуда полной агрегации и Бетта – гидродинамическая прочность агрегатов) измерялись на образцах цельной крови. Измерения на каждой пробе крови проводились по 5-7 раз и результаты усреднялись. Вычислялась инструментальная и статистическая погрешность, которая варьировала от 3 до 7 % для разных образцов крови.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ С КРАСНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ

На Рис. 1 приведены типичные результаты экспериментов по визуализации взаимодействия наночастиц с эритроцитами в образцах цельной крови и разбавленных суспензий. На этих изображениях видно, что сND прикрепляются к мембранам эритроцитов.

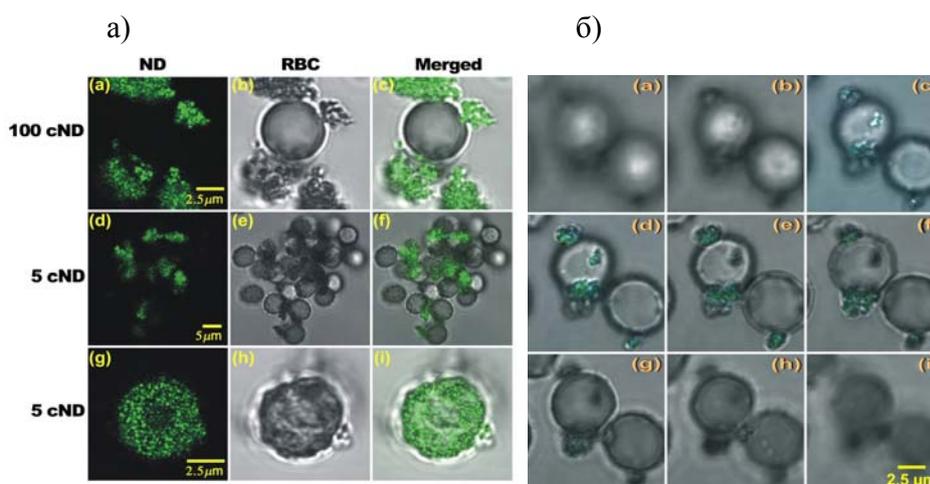


Рис. 1. (а) Оптические флуоресцентные и светлопольные изображения функционализированных наноалмазов (сND), эритроцитов), а также сND размеров 100 нм и 5 нм при их взаимодействии с эритроцитами. (б) Z-сканы ассоциатов сND и ККК. Изображения соответствуют разным положениям вдоль оси Z с шагом 1 мкм.

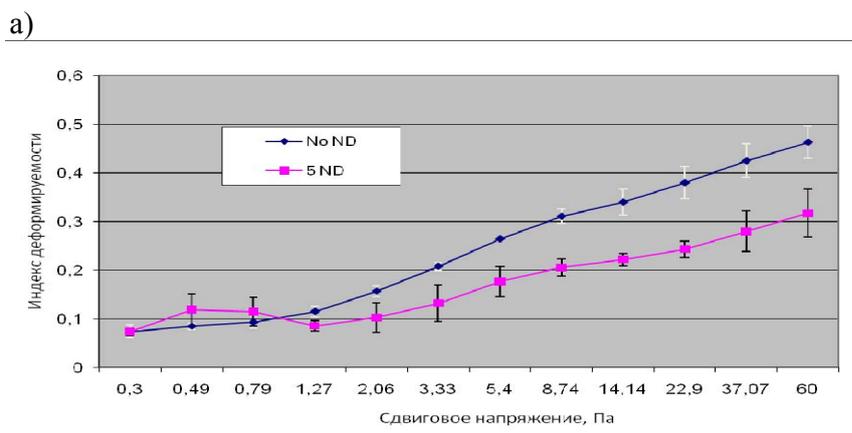
Было также обнаружено, что наночастицы алмазов наименьших размеров, использовавшихся в экспериментах, (5 нм) проникают внутрь эритроцитов и взаимодействуют с гемоглобином.

ВЛИЯНИЕ НАНОАЛМАЗОВ НА МИКРОРЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРОВИ

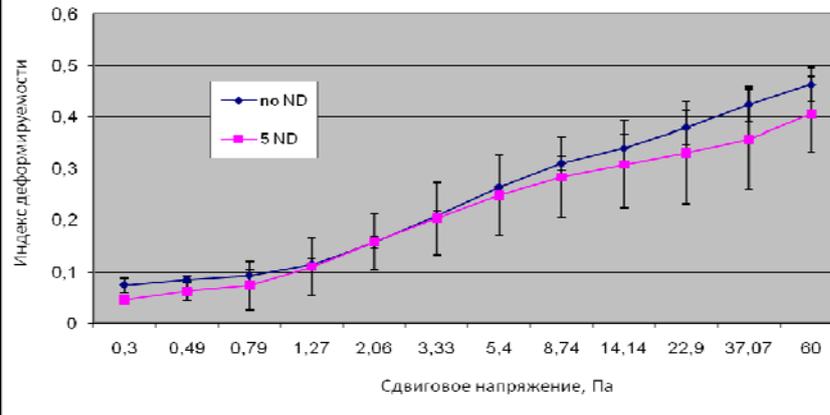
Было проведено экспериментальное исследование влияния различных наночастиц на микрореологические параметры эритроцитов в образцах цельной крови и разбавленных суспензий (*in vitro*). Растворы наночастиц изготавливались с использованием бидистиллированной воды медицинской очистки с весовыми концентрациями частиц 33, 100, 330 и 1000 мкг/мл. Пробы цельной крови с различными гематокритами (20, 30 и 40 %), стабилизировались 10% раствором ЭДТА в целях отключения системы свертывания. Кроме того проводилась обработка взвесей nanoалмазов ультразвуком для разрушения агрегатов. В экспериментах использовалась кровь, свежевзятая их локтевых вен здоровых добровольцев (молодых людей 20-25 лет) или пациентов клиники Института неврологии РАМН. Время инкубации эритроцитов в суспензии наночастиц перед измерениями составляло 1 час. Время от взятия крови из вены донора до начала измерений не превышало 2-х часов. Измерения проводились при комнатной температуре в соответствии с новейшими методическими рекомендациями для гемореологических лабораторий.

В экспериментах по исследованию методами светорассеяния влияния наночастиц на микрореологические параметры эритроцитов были получены результаты о снижении деформируемости красных клеток крови и ухудшении их агрегационных характеристик при взаимодействии с nanoалмазами. Изучены зависимости эффекта от концентрации частиц, от их размеров и от свойств их поверхности. Существенных различий в степени отрицательного влияния nanoалмазов на эритроциты в норме и в патологии не выявлено.

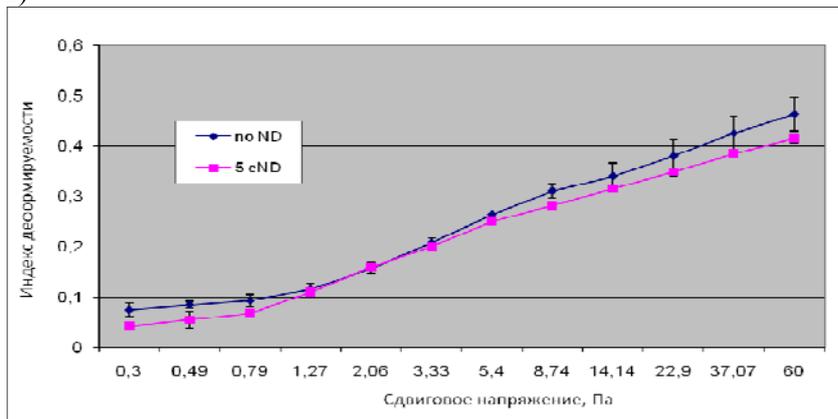
На Рис. 2 (а-г) приведены зависимости индекса деформируемости эритроцитов от сдвигового напряжения без nanoалмазов и с nanoалмазами размером 5 нм в концентрациях 1000 мкг/мл (а) и 100 мкг/мл (б); с функционализированными nanoалмазами размером 5 нм в концентрации 100 мкг/мл (в) и с nanoалмазами размером 500 нм в концентрации 100 мкг/мл (г).



б)



в)



г)

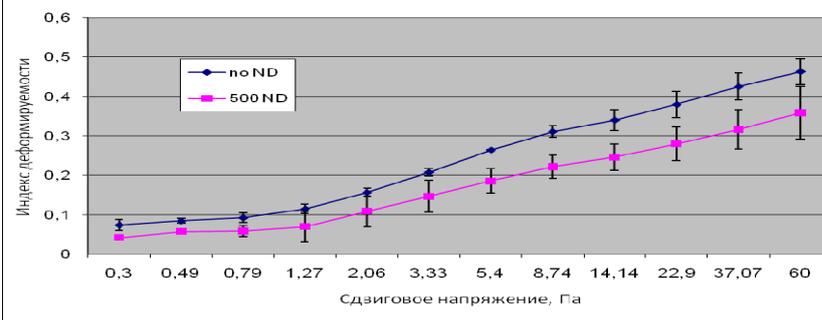


Рис. 2. Зависимости индекса деформируемости эритроцитов от сдвигового напряжения без наноалмазов (no ND) и с наноалмазами размером 5 нм (5 ND) в концентрации 1000 мкг/мл (а); с наноалмазами размером 5 нм (5 ND) в концентрации 100 мкг/мл (б); с функционализированными наноалмазами размером 5 нм (5 cND) в концентрации 100 мкг/мл (в); с наноалмазами размером 500 нм (500 ND) в концентрации 100 мкг/мл (г).

На Рис. 3 приведены диаграммы характерных времен образования линейных (T_1) и трехмерных (T_2) агрегатов и степени агрегации клеток (AI) для разных типов наноалмазов и их концентраций в цельной крови.

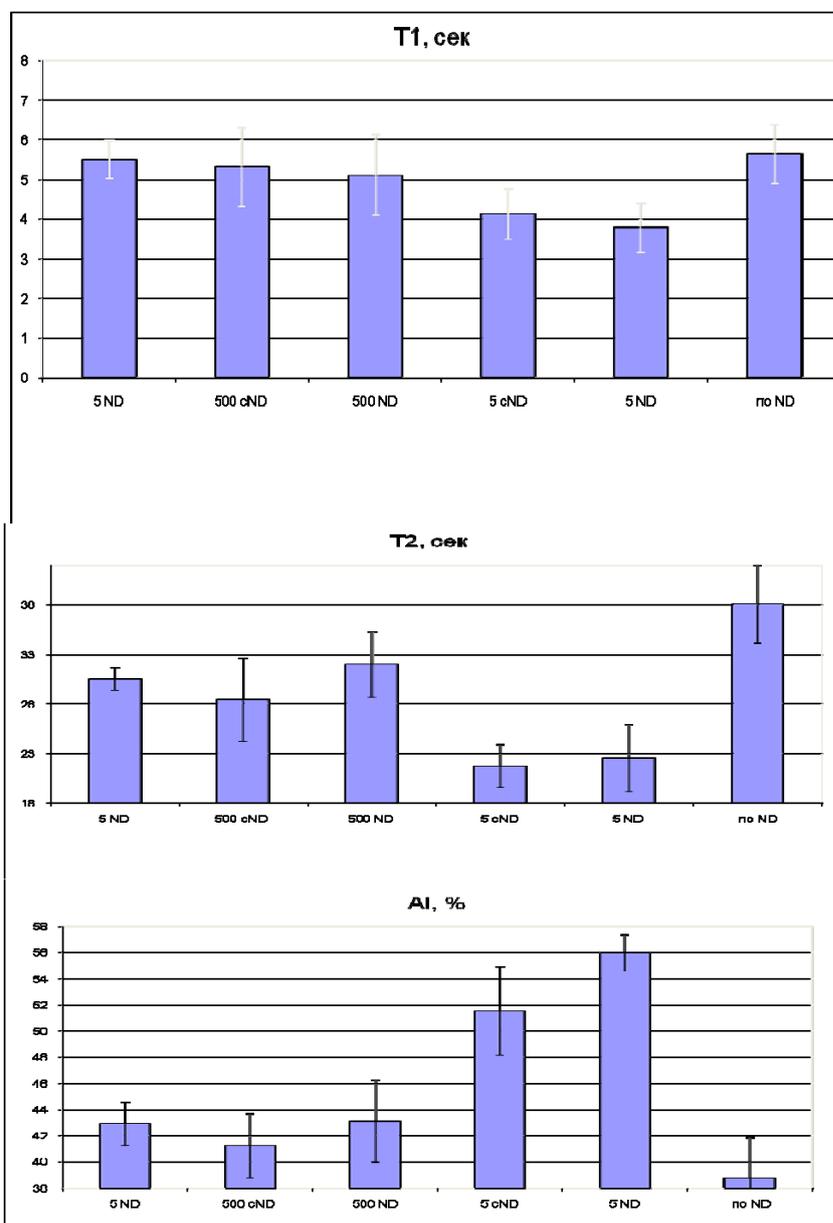


Рис. 3. Диаграммы характерных времен образования линейных (T_1) и трехмерных агрегатов (T_2) и степени агрегации клеток (AI) для разных типов наноалмазов и их концентраций в цельной крови.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ С БЕЛКАМИ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Изменение агрегационных и деформационных свойств эритроцитов при их взаимодействии с наноалмазами обусловлено множеством факторов, таких как изменение

внутренней вязкости эритроцитов, изменения упругости мембраны и пр. Одной из возможных причин может быть взаимодействие нанодiamondов непосредственно с эритроцитами, либо с белками плазмы крови (адсорбция белков на наночастицах), например, с альбумином, который является основным компонентом молекулярной плазмы крови (его содержится около 40%) и γ -глобулином. Характер взаимодействия наночастиц с биологическими молекулами и клетками существенно зависит от особенностей поверхности наночастиц и, в частности, расположения на ней тех или иных функциональных групп.

Ранее это взаимодействие исследовалось нами методами спектроскопии поглощения и ИК Фурье спектроскопии [3]. В частности, было показано, что нанодiamondы адсорбируются на молекулах белков размером и при этом изменяется их вторичная структура и функциональное состояние. Кроме того, показано, что 100 нм вызывают менее значительные изменения структуры и функционального состояния белков, чем нанодiamondы размером 5 нм.

В настоящей работе взаимодействие наночастиц алмаза с белками плазмы крови альбумином и γ -глобулином в водных растворах исследовалось методом динамического светорассеяния. При этом анализ сигнала осуществлялся с помощью фотон-корреляционной спектроскопии (ФКС) [4]. После обработки численными методами полученных автокорреляционных функций вычислялись средние размеры или распределение дисперсных частиц по размерам.

В данной работе исследования проводились на спектрометре Zetasizer-Nano. Внешний вид установки для измерений приведен на рис. 4. Кювета 3, заполненная суспензией частиц, помещается в специальный отсек для образцов 4 находящийся сверху установки.

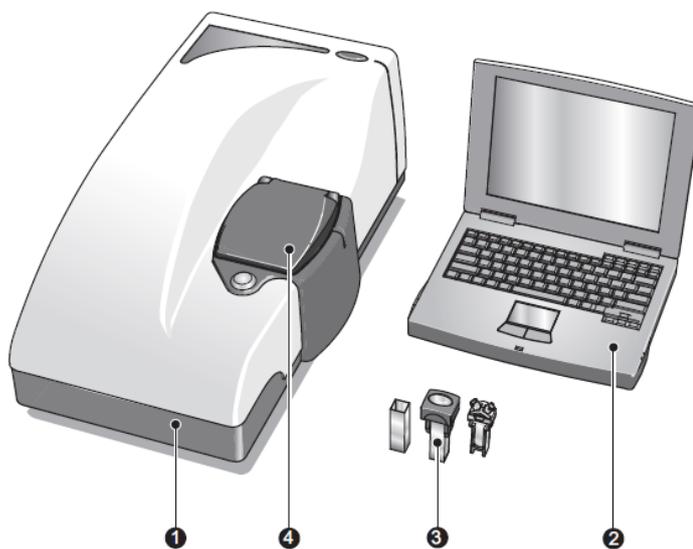


Рис. 4. Внешний вид спектрометра Zetasizer-Nano. 1 – внешний вид спектрометра, 2 – компьютер с специальным программным обеспечением для обработки сигнала и экспериментальных данных, 3 – кювета с образцом, 4 – отсек для образцов.

Пучок света попадает на фокусирующий узел, далее проходит через кювету с исследуемым раствором. Рассеянный под углом 173° свет регистрируется ФЭУ (Perkin Elmer), выходной сигнал, которого обрабатывается на компьютере. В кювете с

исследуемым раствором поддерживается комнатная температура (20°C) при помощи встроенного термостата (рис. 5).

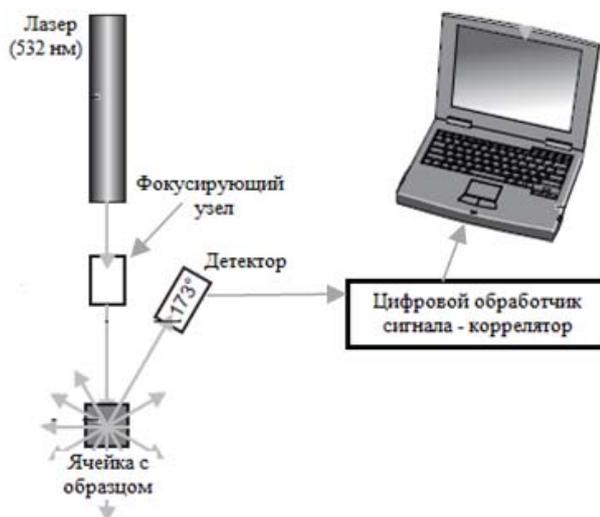


Рис. 5. Схема фотон-корреляционного спектрометра Zetasizer-Nano.

Обработка сигнала, длительность и число выборок которого устанавливается экспериментатором, включает в себя построение и усреднение автокорреляционных функций, и далее решение обратной задачи определения коэффициентов диффузии, а после расчет значений гидродинамических радиусов рассеивающих частиц.

В наших экспериментах использовались человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) и γ -глобулин фирмы "Sigma", а также наночастицы алмаза с размерам 100 нм (производство General Electric, США), которые считаются наиболее перспективными для биомедицинских приложений. Были проведены измерения с двумя типами наноалмазов: без функционализации поверхности (100 ND); с функционализацией поверхности карбоксильными группами (100 cND)).

В экспериментах по взаимодействию наноалмазов и молекул альбумина мы использовали концентрацию альбумина 40 мг/мл (что соответствует концентрации альбумина в крови в нормальных условиях), а концентрацию наноалмазов 5 мкг/мл. В экспериментах по взаимодействию наноалмазов с γ -глобулином использовались концентрация γ -глобулина 30 мкг/мл и концентрация наноалмазов 2 мкг/мл. Водородный показатель среды (pH) варьировался с помощью добавления малых количеств (1-5 мкл) уксусной кислоты или щелочи.

При приготовлении образцов во всех случаях использовалась дистиллированная вода с pH 7.0. Все измерения проводились при температуре 20 °C, а подготовленные двухкомпонентные суспензии наночастиц и белков предварительно сонифицировались 5 минут, чтобы исключить начальную агрегацию и адсорбцию молекул белков на наноалмазах.

Измерения зависимости размеров агрегатов наноалмазов и молекул белков были проведены при трех различных pH водного раствора: pH 3.9; 4.9 и 7.4. Z-потенциал наноалмазов 100 cND при данных pH не меняется и остается отрицательным (от - 40 до - 50 мВ). Заряд на поверхности молекулы альбумина распределен неравномерно, т.е. существуют некоторые области локализации положительных и отрицательных зарядов, а в целом они создают общий электрический потенциал молекулы, который мы будем

принимать за Z-потенциал. Z-потенциал альбумина в случае 1 (рН 3.9) в целом положительный, в случае 2 (рН 4.9) в целом молекула альбумина электронейтральна (изоэлектрическая точка альбумина), и в случае 3 (рН 7.4) Z-потенциал в целом отрицательный.

Если считать, что главным механизмом адсорбции альбумина на нанодиамазах является их электростатическое взаимодействие, то из рис. 6 можно сделать следующие выводы. При рН равным 3.9 нанодиамазы имеют отрицательный потенциал, а белок в целом положительный, ввиду этого происходит сильное взаимодействие и размеры агрегатов достигают больших значений ~ 310 нм. При рН 4.9 нанодиамазы опять же имеют отрицательный потенциал, а поверхность альбумина в целом электронейтральна (изоэлектрическая точка), поэтому адсорбция присутствует и существенная, но не такая сильная, как в случае с рН 3.9, агрегаты достигают размеров ~ 250 нм. В случае рН 7.4 нанодиамазы опять же имеют отрицательный потенциал, потенциал белков также в целом отрицателен, поэтому взаимодействие резко уменьшается вследствие электростатического отталкивания и размеры агрегатов составляют примерно 230 нм. Наличие взаимодействия в случае рН 7.4, когда адсорбцию нельзя объяснить электростатическим взаимодействием, объясняется неравномерностью распределения поверхностного заряда молекулы альбумина.

При взаимодействии молекул альбумина с частицами 100 ND (см. рис. 7) также можно видеть резкое уменьшение взаимодействия нанодиамазов с альбумином (уменьшение адсорбции) в изоэлектрической точке с рН равным 4.9, однако при повышении рН адсорбция опять увеличивается, что может быть связано с соответствующим изменением Z-потенциала нефункционализированных нанодиамазов.

Зависимости размеров агрегатов нанодиамазов 100 ND и 100 сND с γ -глобулином от рН приведены на рис. 8 и 9 соответственно. Изоэлектрическая точка гамма-глобулина имеет широкие пределы: от 5.5 до 7.0. Измерения проведены при шести различных значениях рН водного раствора: 4.2; 5.0; 5.6; 6.6; 7.6 и 11.2.

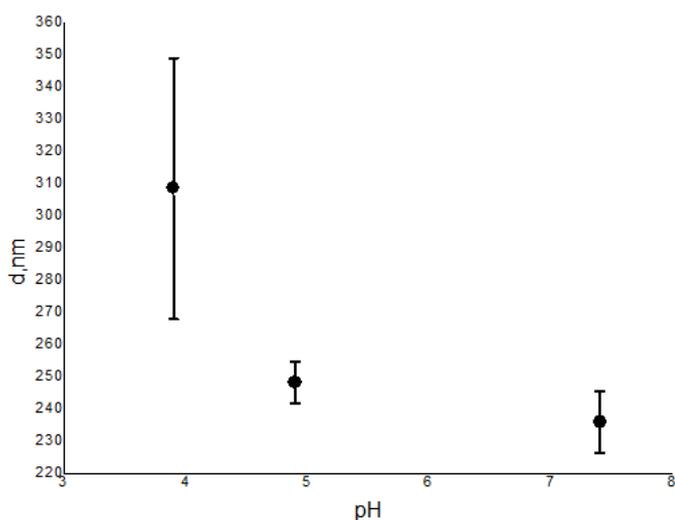


Рис. 6. График зависимости размеров агрегатов нанодиамазов 100 сND и молекул альбумина в зависимости от значения рН. Концентрация альбумина 40 мг/мл, концентрация нанодиамазов 5 мкг/мл.

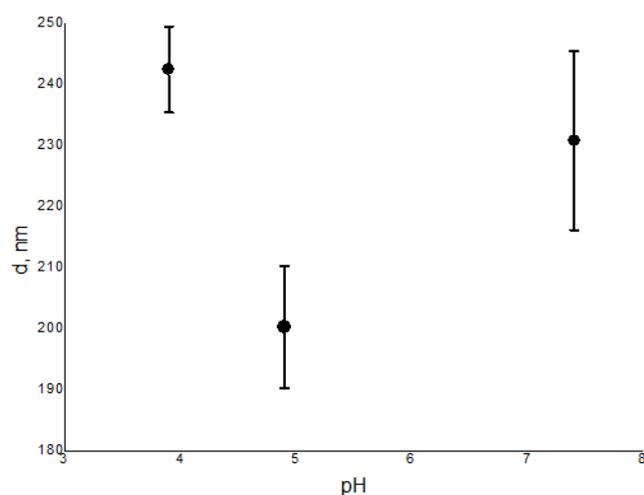


Рис. 7. График зависимости размеров ассоциатов наноалмазов 100 ND и молекул альбумина в зависимости от значения pH. Концентрация альбумина 40 мг/мл, концентрация наноалмазов 5 мкг/мл.

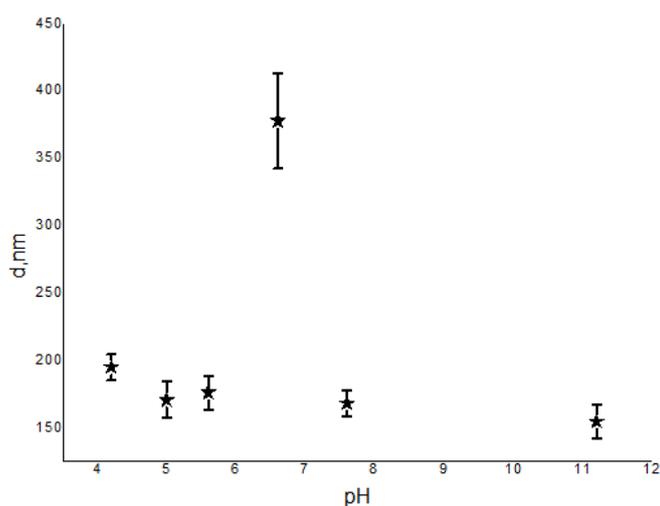


Рис. 8. График зависимости размеров агрегатов наноалмазов 100 ND и молекул γ -глобулина в зависимости от значения pH. Концентрация γ -глобулина 30 мг/мл, концентрация наноалмазов 2 мкг/мл.

Видно, что во всех случаях, когда водородный показатель далек от значений $\text{pH} = 5.5 \sim 7.0$ гидродинамические радиусы близки к радиусам наноалмазов, что свидетельствует о слабом взаимодействии и практическом отсутствии адсорбции вдали от изоэлектрического диапазона (возможно из-за небольшой концентрации наночастиц). При приближении pH к изоэлектрическому диапазону молекул γ -глобулина можно наблюдать увеличение размеров агрегатов. Возможно, увеличение агрегатов связано не с адсорбцией белков на наноалмазах, а с агрегацией молекул γ -глобулина друг с другом.

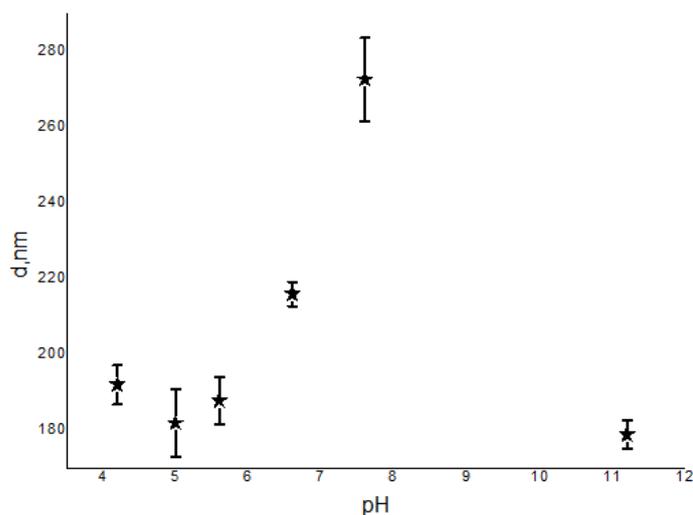


Рис. 9. График зависимости размеров агрегатов наноалмазов 100 сND и молекул γ -глобулина в зависимости от значения pH. Концентрация γ -глобулина 30 мг/мл, концентрация наноалмазов 2 мкг/мл.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ РАЗБРОСА РАЗМЕРОВ ЧАСТИЦ, МОДЕЛИРУЮЩИХ КРАСНЫЕ КЛЕТКИ КРОВИ, НА ВИДНОСТЬ ДИФРАКЦИОННОЙ КАРТИНЫ В ДИФРАКТОМЕТРЕ

В работе [5] установлена связь между дисперсией размеров эритроцитов и видностью дифракционной картины, наблюдаемой при рассеянии лазерного пучка на суспензии эритроцитов в эктацитометре. Возникает вопрос: нельзя ли использовать данные лазерной дифрактометрии эритроцитов для оценки дисперсии этих частиц по размерам? Центральная часть дифракционной картины (центральное светлое пятно и первое темное кольцо на экране наблюдения) не удобна для решения этой задачи, поскольку видность этого фрагмента дифракционной картины слабо зависит от дисперсии размеров частиц [5]. При тех же условиях видность других частей дифракционной картины может зависеть от дисперсии размеров частиц значительно сильнее. В настоящей работе мы оцениваем влияние разброса частиц по размерам на видность периферической части дифракционной картины – прежде всего фрагмента, состоящего из первого темного и первого светлого кольца.

Модель ансамбля эритроцитов

Будем моделировать отдельный эритроцит круглым прозрачным диском. Средний радиус диска $\bar{R} = 4 \text{ мкм}$, толщина диска $h = 1.5 \text{ мкм}$, относительный показатель преломления материала частицы $n = 1.05$. Радиус эритроцита R будем считать случайной величиной. Предположим, для простоты, что величина R равномерно распределена в некотором интервале, а именно

$$w(R) = \frac{1}{2\Delta R} \cdot \begin{cases} 1, & |R - \bar{R}| \leq \Delta R \\ 0, & |R - \bar{R}| > \Delta R \end{cases},$$

где \bar{R} - среднее значение радиуса частицы, ΔR - максимальное отклонение радиуса частицы от его среднего значения. Дисперсия радиусов частиц определяется формулой $\sigma^2 = (\Delta R)^2 / 3$. Мы будем предполагать также, что $\Delta R \ll \bar{R}$, т.е. неоднородность ансамбля по размерам частиц является относительно слабой.

Аналогичное распределение имеет параметр размера частицы $\rho = kR$, где $k = 2\pi / \lambda$ - волновое число, λ - длина волны излучения. А именно,

$$w(\rho) = \frac{1}{2\Delta\rho} \cdot \begin{cases} 1, & |\rho - \bar{\rho}| \leq \Delta\rho \\ 0, & |\rho - \bar{\rho}| > \Delta\rho \end{cases}.$$

Здесь $\bar{\rho} = k\bar{R}$ - среднее значение параметра размера частицы, $\Delta\rho = k\Delta R$ - максимальное отклонение параметра размера от его среднего значения. Длину волны лазерного излучения будем полагать $\lambda = 0.633$ мкм. В этом случае $\bar{\rho} = 39.7$.

Рассеяние света на ансамбле частиц одинакового размера

Рассмотрим рассеяние лазерного пучка на тонком слое суспензии эритроцитов в эктацитометре. Будем считать, что все частицы лежат в одной и той же плоскости так, что оси симметрии частиц параллельны лазерному пучку. Метод расчета углового распределения интенсивности рассеянного света изложен в нашей работе [5]. В частности, при рассеянии лазерного пучка на однородном по размерам ансамбле частиц, угловое распределение интенсивности света описывается формулой

$$I(\theta, \rho) = I_0 \cdot N \cdot |\alpha|^2 \left(\frac{\rho^2}{2kz} \right)^2 \cdot \left[\frac{2J_1(\rho\theta)}{\rho\theta} \right]^2 \quad (1)$$

Здесь I_0 - интенсивность лазерного пучка, θ - угол рассеяния, ρ - параметр размера частицы, N - число частиц, освещаемых лазерным пучком, z - расстояние от измерительного объема до экрана наблюдения, $J_1(x)$ - функция Бесселя первого порядка, $|\alpha|^2 = 4 \cdot \sin^2(\Delta\varphi/2)$. Параметр $\Delta\varphi$ определяется формулой $\Delta\varphi = k \cdot n_0 \cdot h \cdot (n - 1)$, где n - относительный показатель преломления частицы, n_0 - абсолютный показатель преломления окружающей частицу среды. Для интересующих нас условий $h = 1.5$ мкм, $n_0 = 1.33$, $\Delta\varphi \approx 1$ рад, и $|\alpha|^2 \approx 1$.

Рассеяние света на неоднородном по размерам ансамбле частиц

Учет разброса частиц по размерам проведем путем усреднения выражения (1) по параметру размера частицы. Возможность такой процедуры обоснована в работе [5]. Таким образом, получаем следующую формулу для углового распределения интенсивности света:

$$I(\theta) = \langle I(\theta, \rho) \rangle_\rho.$$

Эта формула описывает дифракционную картину, возникающую при рассеянии лазерного пучка на неоднородном по размерам ансамбле частиц. Далее мы рассмотрим области дифракционной картины, близкие к дифракционному минимуму и дифракционному максимуму. В этих областях функция Бесселя допускает простую (линейную или квадратичную) аппроксимацию.

Первый дифракционный минимум

В области первого минимума дифракционной картины (первое темное кольцо на экране наблюдения) функцию Бесселя можно аппроксимировать линейной функцией

$$J_1(x) = \beta \cdot (x - x_1).$$

Здесь x_1 - значение аргумента функции Бесселя, при котором она обращается в ноль, β - величина производной функции Бесселя в точке $x = x_1$. Известно [6], что $x_1 = 3.82$ и $\beta = -0.4$. Угол θ_1 , под которым виден первый дифракционный минимум, определяется формулой $\theta_1 = x_1 / \bar{\rho}$. В интересующем нас случае $\theta_1 = 0.09 \text{ рад}$.

Расчет по приведенным выше формулам приводит к следующему выражению для интенсивности света в первом минимуме дифракционной картины

$$I(\theta_1) = I(0) \cdot (2\beta)^2 \frac{\varepsilon^2}{3}.$$

Здесь

$$I(0) = I_0 \cdot N \cdot |\alpha|^2 \left(\frac{\bar{\rho}^2}{2kz} \right)^2$$

- интенсивность света в нулевом (центральном) максимуме дифракционной картины. Безразмерная величина $\varepsilon = \Delta R / \bar{R}$ является мерой разброса частиц по размерам.

Первый дифракционный максимум

В области первого дифракционного максимума (первое светлое кольцо на экране наблюдения) функцию Бесселя можно аппроксимировать квадратичной функцией

$$J_1(x) = a + \frac{1}{2}b \cdot (x - x_2)^2,$$

где x_2 - значение аргумента, при котором функция Бесселя достигает минимума, $a = J_1(x_2)$, b - величина второй производной функции Бесселя в точке $x = x_2$. Известно [6], что $x_2 = 5.32$, $a = -0.346$ и $b = 0.4$. Угол θ_2 , под которым виден первый дифракционный максимум, определяется формулой $\theta_2 = x_2 / \bar{\rho}$. В интересующем нас случае $\theta_2 = 0.13 \text{ рад}$.

Расчет по приведенным выше формулам приводит к следующему выражению для интенсивности света в первом минимуме дифракционной картины

$$I(\theta_2) = I(0) \cdot \left(\frac{2a}{x_2}\right)^2 \left[1 + \frac{\varepsilon^2}{3} \left(1 + \frac{b}{a} x_2^2\right)\right].$$

Оценка видности дифракционной картины

Видностью дифракционной картины называется величина

$$v = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}},$$

где I_{\max} и I_{\min} интенсивности света в соседних максимуме и минимуме дифракционной картины [7]. В интересующем нас случае приближенная оценка видности дифракционной картины в районе первого минимума и первого максимума интенсивности света дается формулой

$$v = 1 - \gamma \cdot \delta_R^2.$$

Здесь введена величина $\delta_R = \sigma / \bar{R}$, имеющая смысл величины относительного разброса частиц по размерам. Параметр γ определяется формулой

$$\gamma = 2 \cdot \left(\beta \frac{x_2}{a}\right)^2 \approx 76.$$

Например, полагая $v = 1/2$, получим $\delta_R = 0.08$. Таким образом, двукратное уменьшение видности дифракционной картины в районе первого минимума и первого максимума интенсивности происходит уже при величине стандартного отклонения размеров частиц от среднего значения, равной 8%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из представленных выше результатов, можно сделать вывод о том, что начоастицы при их введении в кровь взаимодействуют как с белками плазмы крови, так и с эритроцитами. При этом на характер и силу взаимодействия влияют параметры самих наночастиц, их размеры и покрытие. Функционализация поверхности частиц карбоксильными группами уменьшает адсорбцию белков альбумина и γ -глобулина на их поверхности. Сила взаимодействия явным образом зависит от pH раствора, что подтверждает предположение о том, что главным механизмом адсорбции молекул белков на наноалмазах является их электростатическое взаимодействие. Теоретическая оценка видности дифракционной картины, наблюдаемой при рассеянии лазерного пучка на суспензии эритроцитов в эктацитометре, показывает, что видность дифракционной картины в районе первого минимума и первого максимума интенсивностей света весьма чувствительна к величине разброса частиц по размерам. Это открывает возможность измерения дисперсии размеров эритроцитов методом лазерной дифрактометрии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 08-02-92002) и ННС Тайваня (грант №NSC 97-2923-M-259-001-MY3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lin Y.-C., Tsai L.-W., Perevedentseva E., Chang H.-H., Lin C.-H., Lugovtsov A., Priezhev A., Jani M., Su F.-Y., and Cheng C.-L. Nanodiamond interacts with RBCs: influence on the oxygenation states and micro rheological properties of human blood cells in vitro // ACS Nano (accepted for publication).
2. Приезжев А.В., Фирсов Н.Н., Ладеман Ю. Диагностика агрегации эритроцитов в пробах цельной крови методом обратного светорассеяния // Оптическая биомедицинская диагностика / под ред. В.В. Тучина. М.: Физматлит, 2007. Перевод с англ. Глава 11. С.17-35.
3. Переведенцева Е.В., Су Ф.-И., Су Т.-Х., Лин И.-Ч., Ченг Ч.-Л., Карменян А.В., Приезжев А.В., Луговцов А.Е. Лазерно-оптическое исследование воздействия наночастиц алмаза на структуру и функциональные свойства белков // Квантовая электроника. 2010. Т. 40. № 12. С. 1089-1093.
4. Г.З. Камминс, Э.Р. Пайк. Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов // М.: Книжный дом “Университет”, 2002.
5. Никитин С.Ю., Луговцов А.Е., Приезжев А.В. К проблеме видности дифракционной картины в лазерной дифрактометрии эритроцитов // Квантовая электроника. 2010. Том 40. № 12. С. 1074-1076.
6. Янке Е., Эмде Ф., Лёш Ф. Специальные функции. М.: Наука, 1977.
7. Ахманов С.А., Никитин С.Ю. Физическая оптика. М.: Наука, 2004.

СПИСОК ОБОЗНАЧЕНИЙ

cND - наночастицы алмазов, поверхности которых функционализированы путем нанесения на них карбоксильных групп;
ND - наночастицы алмазов с нефункционализированными поверхностями;
 T_1 - время образования линейных агрегатов эритроцитов;
 T_2 – время образования трехмерных агрегатов эритроцитов;
AI – амплитуда полной агрегации;
Бетта – гидродинамическая прочность агрегатов;
d – диаметр частиц, измеренных по методике динамического светорассеяния;
 ν - видность дифракционной картины.

A.V. Priezhev^{1*}, A. Lugovtsov¹, S.Yu. Nikitin¹, Yu.S. Samsonova¹,
V.G. Ionova^{2**}, C.-L. Cheng^{3***}, E. Perevedentseva^{3,4}, C.L. Chen³

¹ *Physics Department and International Laser Center*

M.V. Lomonosov Moscow State University, Russia, 119991, Moscow, Leninskie Gory, 1

**E-mail: avp2@mail.ru*

² *Neurology Research Center of RMAS, Russia, Moscow, 125367, Volokolamskoe shosse, 80,*

***E-mail: iovic@mail.ru*

³ *Physica Department, National Dong Hwa University,*

*Taiwan, 974 Hualien, ***E-mail: clcheng@mail.ndhu.edu.tw*

⁴ *P.N. Lebedev Physics Institute of RAS, Russia, 119991 Moscow, Leninsky prospect, 53.*

OPTICAL INVESTIGATIONS OF INTERACTIONS OF DIAMOND NANOPARTICLES WITH BLOOD COMPONENTS AT IN VITRO MEASUREMENTS

SUMMARY

The aim of this work is to investigate the effect of diamond nanoparticles on blood microrheology, in particular, on the ability of red blood cells to deform in shear flow and to spontaneously aggregate. The research is motivated by the fact that the nanoparticles are supposed to be administered into a live organism via the blood flow intravenously. However, their possible effect on blood and its ability to normally flow along the vessels of different diameters is usually not accounted for.

In order to study this effect by the methods of diffuse backward light scattering and laser diffractometry *in vitro* measurements were conducted of several parameters of aggregation kinetics and deformability index. Aqueous suspensions of nanoparticles with sizes from 5 to 500 nm were used, which were added into the samples of freshly drawn blood. Also, a theoretical analysis was performed of the effect of size distribution of the particles modeling red blood cells on the visibility of the diffraction pattern in the diffractometer. The shape of this pattern is used in ektacytometry to measure the deformability index of red blood cells.

Besides, the interaction of diamond nanoparticles with blood plasma proteins albumin and γ -globulin in aqueous solutions also affecting the blood microrheology was studied with dynamic light scattering technique.

It was shown that nanoparticles decrease the cell deformability in shear flow in *in vitro* experiments, this effect being dependent on nanoparticle concentration, sizes and properties of the surfaces. One of possible mechanisms of this effect can be based on blood plasma proteins adsorption on the surfaces of diamond nanoparticles that we have demonstrated in our experiments.

NANOPARTICLES, DIAMOND, BLOOD, ERYTHROCYTE, PROTEINS,
INTERACTION, ADSORPTION