

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ НАБЛЮДЕНИЕ СТРУКТУРИРОВАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ В ПОЛЕ СТОЯЧИХ ПОВЕРХНОСТНЫХ АКУСТИЧЕСКИХ ВОЛН

© 2017 г. Д. И. Макалкин^{a, b, *}, Б. А. Коршак^{c, **}, А. П. Брысев^{a, b, ***}

^aМеждународная Ассоциированная Лаборатория критических
и сверхкритических явлений в функциональной электронике, акустике и флюидике
^bНаучный центр волновых исследований Института общей физики им. А.М. Прохорова РАН,
119991 Москва, ул. Вавилова 38

^cМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет,
119991 ГСП-1, Москва, Ленинские горы

*e-mail: dmitrymakalkin@ya.ru

**e-mail: bkorshak@mail.ru

***e-mail: brysev@ya.ru

Поступила в редакцию 11.11.2016 г.

Приведены экспериментальные результаты наблюдения эффекта структуризации одного из форменных элементов крови — эритроцитов — в поле стоячих поверхностных акустических волн. Получены характерные изображения полосчатых структур, образованных эритроцитами на поверхности ниобата лития вследствие ультразвукового воздействия. Проведен сравнительный анализ результатов по ультразвуковому структурированию эритроцитов в образце крови и частиц карбоната кальция в водном коллоидном растворе. Отмечается, что реализованный эффект качественно согласуется с теоретической моделью поведения ансамблей коллоидных частиц в акустическом поле, разработанной О.В. Руденко с соавторами.

Ключевые слова: поверхностные акустические волны, радиационное давление ультразвука, эритроциты крови, ультразвуковое структурирование.

DOI: 10.7868/S0320791917040098

ВВЕДЕНИЕ

Технологии “лаборатории на чипах” (*lab-on-a-chip*) [1] — микросистем, например, для био- и химического анализа жидких растворов, оказываются все более востребованными, открывая новые возможности для исследователей в различных областях науки и развития нанотехнологий. Одну из критически важных ролей в технологиях *lab-on-a-chip* играет потребность манипулировать в пространстве и времени различными частицами, находящимися в жидкости. В ряде недавних работ показано, что использование манипуляции частицами актуально для таких различных областей, как генный транспорт [2], клиническая медицина [3], транспорт лекарств [4], пищевые технологии [5].

К настоящему времени предложено и разработано несколько различных методов реализации “лаборатории на чипах”: с применением прецизионного конструирования [6], 3D-печати [7], микро- и нанофлюидики [8]. Наряду с развитием известных, продолжают поиски новых подхо-

дов, в частности, в начале 2000-х была высказана идея создания “лабораторий на чипах” с акустическим “приводом” [9]. Благодаря бесконтактности и дистанционности воздействия акустические технологии имеют свои преимущества в управлении положением частиц. К настоящему времени эта идея реализовалась в виде нового класса акустоэлектронных устройств, предназначенных для проведения в реальном времени химических и биологических автоматизированных анализов жидких растворов с очень малым (порядка микро- и нанолитров) объемом, а также оперативного синтеза таких растворов.

Особая роль в развитии и применении акустических технологий в *lab-on-a-chip* принадлежит устройствам с использованием поверхностных акустических волн (ПАВ) как наиболее совместимым с другими функциональными компонентами и технологиями микро- и наноэлектроники. ПАВ ультразвуковых частот уже используются в опытных образцах лабораторий на чипах, однако ряд особенностей воздействия ПАВ на каплю

жидкости, находящуюся на подложке и содержащую различные частицы, требует дальнейшего изучения. К ним, в частности, можно отнести механизмы структурирующего воздействия ПАВ на коллоидные растворы, нанесенные на акустическую подложку. Изучение такого воздействия представляет интерес для развития ряда инновационных технологий. Одна из них связана с созданием периодических структур микро- и наночастиц, получаемых из коллоидных растворов и проявляющих свойства фотонных кристаллов. Подобные микро- и наноструктуры находят все большее применение в оптических устройствах, элементах хемосенсоров в качестве гибких защитных слоев для светодиодов и пр. В работе [10] экспериментально и с помощью компьютерного моделирования показано, что с помощью ПАВ возможно управление ансамблем коллоидных частиц, а разработанная физическая модель адекватно описывает такие параметры формируемых структур, как пространственный период и интенсивность акустического воздействия на частицы в зависимости от соотношения плотностей частиц и растворителя.

Другая область возможного применения эффекта структуризации коллоидных частиц в поле ПАВ связана с перспективами разработки компьютеризированных устройств анализа крови в технологии *lab-on-a-chip*. На биомедицинское значение эффекта ультразвуковой структуризации впервые было указано в работе [11], а более детальные исследования были проведены в [12]. В этих работах, а также в более поздней работе [13] было показано, что красные кровяные тельца в кровеносных сосудах под действием радиационной силы ультразвука могут концентрироваться (агрегироваться) в узлах объемных стоячих акустических волн, т.е. на расстоянии половины длины акустической волны. С точки зрения возможной закупорки сосудов такое воздействие объемных акустических волн на эритроциты может рассматриваться как негативное. Вместе с тем, принимая во внимание, что число эритроцитов в кубическом миллиметре крови является одним из важнейших параметров среди показателей анализа крови, ультразвуковая группировка эритроцитов есть позитивный эффект. Это может быть использовано в качестве физической основы при разработке новых методов подсчета плотности эритроцитов в медицинской диагностике крови. В этом смысле важно также отметить, что еще одним преимуществом акустических методов применительно к диагностике крови является возможность выполнять подобные анализы без использования каких-либо химических реагентов [13]. В данной работе впервые, насколько нам известно, экспериментально реализован эффект структурирующего воздействия ПАВ на такой важный с

точки зрения возможных приложений в диагностике крови объект, как эритроциты крови.

СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА, МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ, РЕЗУЛЬТАТЫ

Прежде всего отметим, что планирование и подготовка настоящих экспериментов в значительной степени стимулировались результатами, полученными в недавних работах [10, 15]. В этих работах разработаны аналитическая и численная модели, применимые к описанию основных особенностей пространственно-временной эволюции частиц коллоидного раствора, находящегося на подложке в поле стоячих ПАВ. При этом учитывались сила взаимодействия частицы с подложкой, сила, обусловленная взаимодействием с растворителем, зависящая от вязкости и соотношения плотностей частицы и растворителя, результирующая консервативных сил со стороны других частиц, капиллярные силы, ответственные за взаимодействие частицы с межфазной границей раствор—воздух, и наконец, силы, действующие на частицы со стороны акустического поля. Согласно этим моделям движение частиц в жидкости с качественной точки зрения определяется в основном конкуренцией радиационной силы, увеличивающей скорость частиц по отношению к потоку, и силы Стокса, уменьшающей ее. В свою очередь, радиационная сила имеет две составляющие: горизонтальную и вертикальную. В рассматриваемых условиях направление горизонтальной составляющей радиационной силы определяется только горизонтальной координатой, зависимость от которой является периодической. По этой причине в поле стоячих ПАВ горизонтальная компонента радиационной силы характеризуется периодическим чередованием ее направления, а также максимумов и минимумов амплитуды. Вследствие этого находящиеся в жидкости частицы в основном группируются в областях минимумов амплитуды. Поскольку радиационные силы квадратичны по отношению к амплитуде акустического поля, период пространственной структуры, формируемой под их воздействием в горизонтальном направлении, должен быть равен половине длины акустической волны. Вертикальная составляющая радиационной силы, не завися от горизонтальной координаты, способна собирать взвешенные частицы на свободной поверхности жидкости. Это приводит к тому, что при уменьшении толщины слоя жидкости (например, вследствие испарения) частицы оседают на поверхности подложки, сохраняя картину группировки. Следует также отметить еще два важных результата работ [10, 15]. Во-первых, если длина акустической волны намного превышает размер частиц, то они увлекаются потоком жидкости независимо от их плотности, и радиационной си-

лой, действующей на них, можно пренебречь. Вторых, эффективность структурирования взвешенных в жидкости частиц зависит от отношения плотностей частицы и окружающей ее среды: чем ближе это отношение к единице, тем ниже эффективность структурирования. Отсюда следует, что *a priori* возможность акустического структурирования эритроцитов крови не очевидна, так как их плотность мало отличается от плотности плазмы крови (см. далее), и потому экспериментальная проверка такой возможности представляется необходимой и оправданной.

Эксперименты по структурирующему действию ПАВ на коллоидные растворы проводились на подложке YZ-среза монокристалла ниобата лития с размерами $60 \times 12 \times 3$ мм (см. рис. 1). На противоположных концах подложки находилась пара встречно-штыревых преобразователей (ВШП) с рабочими частотами 14.40 либо 28.55 МГц (пары 2–3 и 1–4 соответственно). Каждый ВШП имел по восемь пар электродов с апертурой 8 мм. Период электродов ВШП на 14.40 МГц составлял 120.0 ± 0.5 мкм, их ширина 57.0 ± 0.5 мкм. Для частоты 28.55 МГц период электродов был равен 60.0 ± 0.5 мкм, а их ширина 27.0 ± 0.5 мкм.

Стоячая ПАВ создавалась за счет подачи на ВШП с одинаковой рабочей частотой ВЧ-сигнала, формируемого последовательно включенными генератором сигналов ВЧ и усилителем мощности УЗ-11. Регистрация результатов осуществлялась цифровым фотоаппаратом, объектив которого был сопряжен с окуляром микроскопа, направленного на поверхность подложки. Пространственная калибровка получаемых изображений проводилась по известным размерам электродов ВШП. Наряду с фотоизображениями были получены видеозаписи, позволяющие проследить временную динамику структурирования. С целью минимизации потерь энергии ПАВ за счет преобразования в другие типы волн исследуемая жидкость накрывалась покровным стеклом, что обеспечивало концентрацию акустической энергии в тонком приповерхностном слое, толщина которого не превышала несколько сотен микрометров.

На первом этапе с целью проверки применимости и корректности используемой методики эксперимента, аналогичной той, что применялась в [10], использовалась пара ВШП с рабочей частотой $f = 28.55$ МГц, а в качестве объекта — водный коллоидный раствор зубного порошка. Такой выбор обусловлен стандартизацией по ГОСТ 5972-77 составляющих его частиц карбоната кальция: их размер должен быть порядка 20 мкм, а плотность равняться 2.5 г/см^3 . Объем капли раствора, наносимого на подложку, составлял несколько микролитров. Характерное время формирования картины структурирования

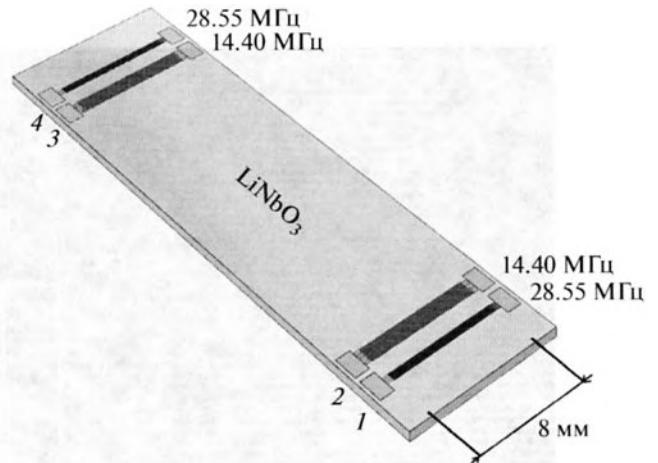


Рис. 1. Подложка из ниобата лития с нанесенными на ее поверхность ВШП.

частиц карбоната кальция (рис. 2) после начала возбуждения ПАВ находилось в пределах 1–2 секунд. Пространственно-регулярный характер и плоская форма темных и светлых полос образованной структуры хорошо соответствуют пространственной структуре поля стоячей ПАВ, излученной плоскими ВШП.

Измерения периода этой пространственной структуры проводились на основе цифровой обработки полученного изображения. Изначально цветное изображение преобразовывалось в градиации серого, затем выделялась область с малой неравномерностью фона (обозначена белым прямоугольником на рис. 2а и в более крупном масштабе на рис. 2б). Далее выполнялась операция усреднения по всем столбцам выделенного фрагмента, позволяющая уменьшить влияние шумов изображения и повысить точность измерений. Результат представлен на рис. 2в, где изображена усредненная зависимость уровня серого от поперечной по отношению к полосам структуры координаты. Средняя величина расстояния L между максимумами или минимумами этой зависимости характеризует среднюю величину пространственного периода образованной структуры. Для определения измерения величины L велось по максимумам, что с учетом калибровки по известным размерам ВШП дало для нее значение $L = (59 \pm 6)$ мкм (рис. 2г).

В пределах точности измерений это значение равно половине длины волны стоячей ПАВ $\lambda/2 = 61 \text{ мкм}^1$ на частоте 28.55 МГц. Этот результат количественно соответствует теоретическим выводам [10] и качественно (в смысле соответствия структуры группировки коллоидных частиц струк-

¹ Длина волны ПАВ приведена без учета уменьшения скорости ПАВ за счет наличия жидкого слоя.

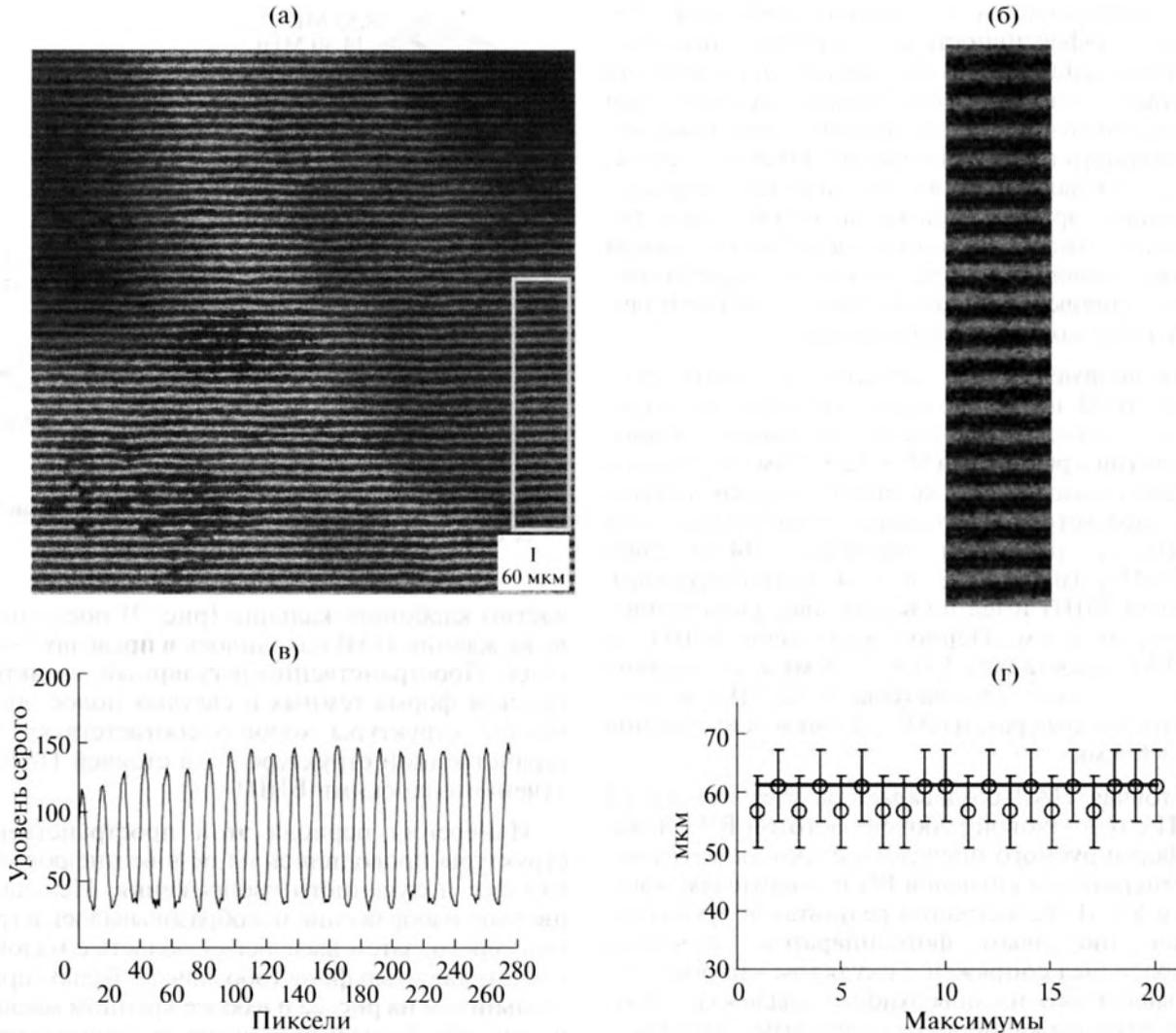


Рис. 2. (а) Фотоизображение пространственной структуры частиц карбоната кальция в воде, образованной в поле стоячих ПАВ частотой 28.55 МГц. Белым прямоугольником выделена область численного анализа, показанная на (б) в увеличенном масштабе. (в) Усредненный по всем столбцам изображения (б) уровень серого в зависимости от поперечной по отношению к полосам структуры координаты. (г) Расстояние между максимумами на (в) в зависимости от номера максимума; для наглядности сплошной линией показано справочное значение $\lambda/2 = 61$ мкм для ПАВ частотой 28.55 МГц на свободной поверхности ниобата лития.

туре вызвавшего ее акустического поля) — экспериментальным результатам указанной работы. Это дает основание сделать вывод о применимости и корректности используемой методики эксперимента. В заключение этого раздела отметим, что при повышенной мощности ПАВ в образце возникали квазистационарные течения, разрушающие упорядоченную структуру.

В экспериментах второго этапа в качестве объекта использовалась кровь человека. Как известно, кровь состоит из жидкой плазмы и взвешенных в ней форменных элементов. У взрослого здорового человека объем плазмы составляет 60% цельной крови, а форменных элементов крови — соответственно 40%. Плотность плазмы состав-

ляет от 1.025 до 1.029 г/см³. Форменные элементы крови представлены эритроцитами, тромбоцитами и лейкоцитами. При сравнимых размерах количество эритроцитов в единице объема на четыре порядка превышает суммарное количество остальных двух форменных элементов крови, поэтому можно считать, что в данных экспериментах форменные элементы представлены главным образом эритроцитами. Диаметр эритроцита человека составляет 6.2–8.2 мкм, толщина 2 мкм, объем 76–110 мкм³, плотность 1.090 г/см³ [14]. Поскольку плотность эритроцитов лишь ненамного превышает плотность окружающей их плазмы, а их размер в несколько раз меньше размера частиц карбоната кальция, то в соответствии

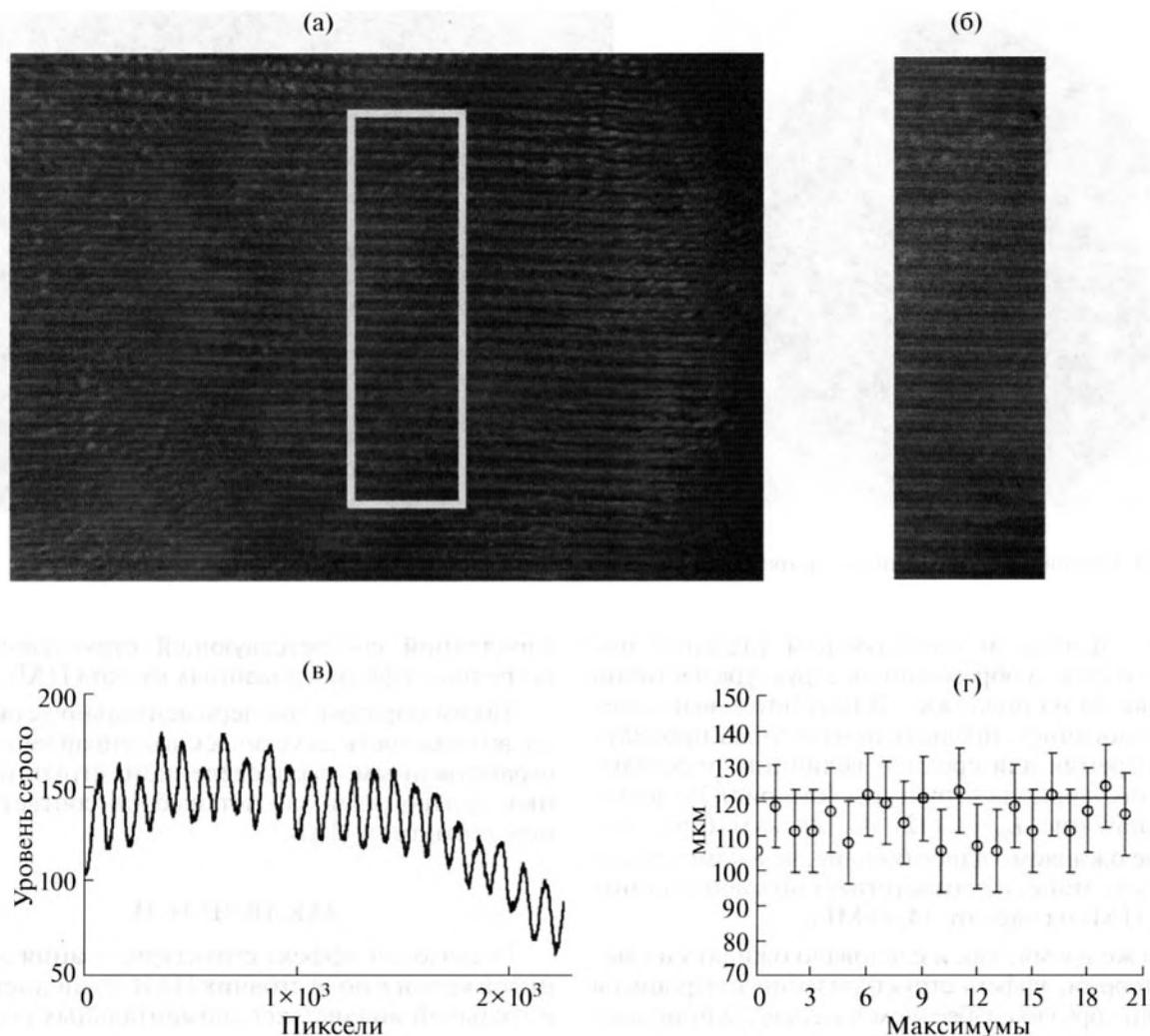


Рис. 3. (а) Фотоизображение пространственной структуры, образованной эритроцитами крови человека в поле стоячих ПАВ частотой 14.40 МГц. Белым прямоугольником выделена область численного анализа, показанная на (б) в увеличенном масштабе. (в) Усредненный по всем столбцам изображения (б) уровень серого в зависимости от поперечной по отношению к полосам структуры координаты. (г) Расстояние между максимумами на (в) в зависимости от номера максимума, для наглядности сплошной линией показано справочное значение $\lambda/2 = 121$ мкм для ПАВ частотой 14.40 МГц на свободной поверхности ниобата лития.

с упомянутой выше теоретической моделью эффективность структуризации эритроцитов в плазме крови, очевидно, должна быть заметно меньше, чем частиц карбоната кальция в воде при прочих равных условиях. Для повышения эффективности структуризации эритроцитов можно уменьшить отношение длины волны ПАВ к характерному размеру эритроцитов за счет повышения частоты ПАВ. Однако такое решение при ограниченной мощности используемого источника возбуждения ВШП, как показали тесты на частотах 14.40 и 28.55 МГц, не позволяет сохранить уровень интенсивности ПАВ, необходимый для уверенного наблюдения эффекта структурирования эритроцитов. Объясняется это тем, что повышение частоты акустических волн сопровождается увели-

чением их затухания, а при распространении ПАВ по подложке со слоем крови поглощение существенно возрастает еще и потому, что вязкость плазмы крови примерно в 5 раз выше, чем вязкость воды. В результате, в качестве оправдавшего себя компромисса, частота ПАВ в экспериментах по структурированию эритроцитов была выбрана равной 14.40 МГц. Это понизило затухание ПАВ и вдвое по сравнению с первым этапом увеличило ее длину волны и, как следствие, ожидаемый период пространственной структуры.

Благодаря такой оптимизации условий эксперимента наблюдение группировки эритроцитов крови человека в поле плоских стоячих ПАВ частотой 14.40 МГц оказалось возможным, что демонстрирует рис. 3а, а также тот факт, что при вы-

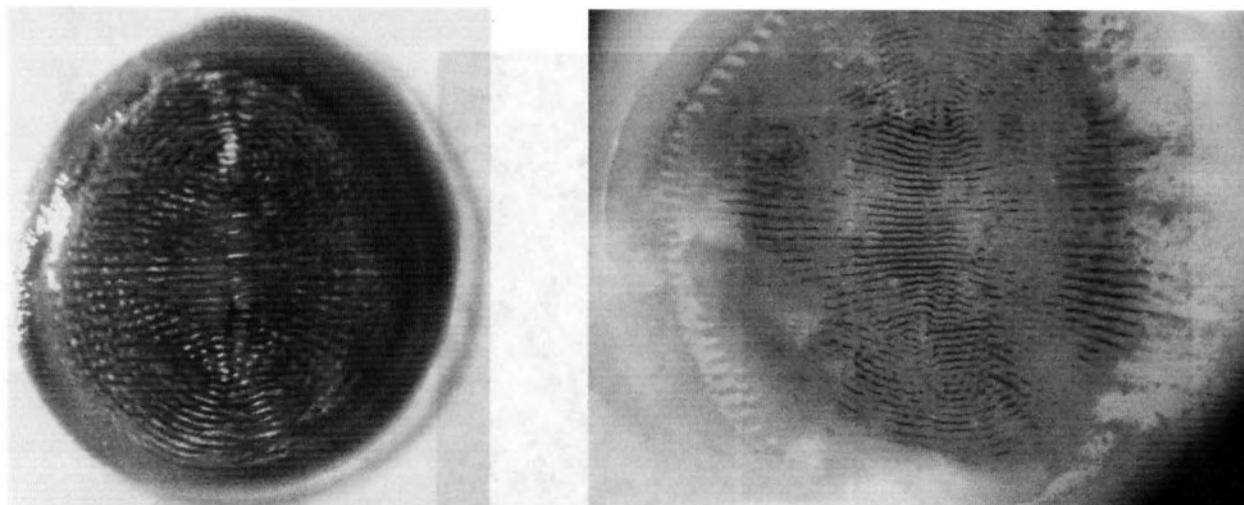


Рис. 4. Группировка эритроцитов внутри капли крови в поле встречных пучков сфокусированных ПАВ.

сыхании плазмы и последующем удалении покровного стекла образованная структура частично сохраняется на подложке. В результате выполнения аналогичной предыдущему случаю процедуры измерения для средней величины пространственного периода структуры (см. рис. 3в) получено значение $L_{bl} = (121 \pm 12)$ мкм (рис. 3г), которое ожидаемо вдвое больше, чем измеренное на первом этапе, и соответствует половине длины волны ПАВ на частоте 14.40 МГц.

В то же время, как и следовало ожидать из выводов теории, эффект структуризации эритроцитов выражен гораздо слабее, чем в случае группировки частиц карбоната кальция из водного коллоидного раствора. Вследствие неполной группировки эритроцитов, а также их большей прозрачности по сравнению с частицами карбоната кальция, изображения на рис. 3 характеризуются большим уровнем шумов и существенно меньшей разностью между максимальным и минимальным уровнем серого. Так, если для рис. 2б характерное значение такого перепада составляет величину порядка 100 (рис. 2в), то для рис. 3б оно порядка 50 (рис. 3в).

Как показали дополнительные эксперименты, структуризация эритроцитов крови оказалась возможной не только в поле плоских стоячих ПАВ, но и в полях других конфигураций. Например, если на подложку ниобата лития нанести небольшую каплю крови, которая под покровным стеклом примет форму круга, то в акустическом тракте ПАВ возникают акустические линзы, образованные искривленными границами жидкой среды. В этом случае изначально плоские встречные пучки ПАВ, распространяясь через эти линзы, преобразуются в сфокусированные. На рис. 4 показан пример такой фокусировки, визуализированной за счет группировки эритроцитов, обу-

словленной соответствующей структурой поля встречных сфокусированных пучков ПАВ.

Таким образом, экспериментально установлена возможность акустического управления пространственным распределением сгруппированных эритроцитов за счет выбора соответствующей геометрии ПАВ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Реализован эффект структурирования эритроцитов крови в поле стоячих ПАВ. Выполнен сравнительный анализ экспериментальных результатов по ультразвуковому структурированию эритроцитов в образце крови и частиц карбоната кальция в водном коллоидном растворе. Выявлены характерные общие особенности и различия в процессе и результате структурирования примененных в экспериментах сред в поле стоячих ПАВ. Установлено качественное соответствие полученных результатов теоретической и численной моделям, развитым О.В. Руденко с соавторами, а также полученным ими экспериментальным результатам по структурированию частиц кремнезема в поле стоячих ПАВ. Полученные в данной работе результаты могут быть полезны в качестве физической основы при разработке технологий *lab-on-a-chip* и создании соответствующих устройств, предназначенных для бесконтактного разделения форменных элементов крови с целью выполнения автоматизированного анализа (в том числе дистанционного) ее параметров, например, определения концентрации частиц раствора.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ, проект № 14-02-93105 НЦНИЛ_a, а также стипендии им. В.И. Вернадского посольства Франции в Москве.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Volpatti L.R., Yetisen A.K.* Commercialization of microfluidic devices // *Trends Biotechnol.* 2014. V. 32. № 7. P. 347–350.
2. *King K.R., Wang S., Irimia D., Jayaraman A., Toner M., Yarmush M.L.* A high-throughput microfluidic real-time gene expression living cell array // *Lab Chip.* 2007. V. 7. № 1. P. 77–85.
3. *Wang H., Lee G.B.* Automatic bio-sampling chips integrated with micro-pumps and micro-valves for disease detection // *Biosens. Bioelectron.* 2005. V. 21. № 3. P. 419–425.
4. *Dittrich P.S., Manz A.* Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery // *Nat. Rev. Drug Discovery.* 2006. V. 5. № 3. P. 210–218.
5. *Sozer N., Kokini J.L.* Nanotechnology and its applications in the food sector // *Trends Biotechnol.* 2009. V. 27. № 2. P. 82–89.
6. *Louizos L.-A., Athanopoulos P.G., Varty K.* Micro-electromechanical systems and nanotechnology. A platform for the next stent technological era // *Vasc. Endovascular Surg.* 2012. V. 46. № 8. P. 605–609.
7. *Saggiomo V., Velders H.A.* Simple 3D printed scaffold-removal method for the fabrication of intricate microfluidic devices // *Adv. Sci.* 2015. V. 2. № 8. P. 10.
8. *Bhargava K.C., Thompson B., Malmstadt N.* Discrete elements for 3D microfluidics // *PNAS.* 2014. V. 111. № 42. P. 15013–15018.
9. *Strobl C.J., Rathgeber A., Wixforth A., Gauer C., Scriba J.* Planar microfluidic processors // *IEEE International Ultrasonics Symposium. Proceedings.* 2002. V. 1. P. 255–258.
10. *Руденко О.В., Коробов А.И., Коршак Б.А., Лебедев-Степанов П.В., Молчанов С.П., Алфимов М.В.* Самосборка ансамблей коллоидных частиц в акустическом поле // *Российские нанотехнологии.* 2010. Т. 5. № 7–8. С. 63–65.
11. *Dyson M., Woodward B., Pond J.B.* Flow of red blood cells stopped by ultrasound // *Nature.* 1971. V. 232. P. 572–573.
12. *Haar J.G., Wyard S.I.* Blood cell banding in ultrasonic standing fields. A physical analysis // *Ultrasound in Med. And Biol.* 1978. V. 4. № 2. P. 111–123.
13. *Гурбатов С.Н., Клемина А.В., Демин И.Ю., Клемина В.А., Долгов В.В.* Безреагентный акустический анализ цельной крови и сыворотки крови человека // *Лаборатория.* 2010. № 2. С. 29.
14. *McLaren C.E., Brittenham G.M., Hasselblad V.* Statistical and graphical evaluation of erythrocyte volume distributions // *Am. J. Physiol.* 1987. V. 252. № 4. Pt. 2. H857–H866.
15. *Gusev V.A., Rudenko O.V.* The field of radiative forces and the acoustic streaming in a liquid layer on a solid half-space // *Acoust. Phys.* 2010. V. 56. № 6. P. 861–870.