

ПАРАМЕТРЫ УПРАВЛЕНИЯ РАЗДЕЛЕНИЕМ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕМ ЭРИТРОЦИТОВ И ЛИМФОЦИТОВ КРЫС, ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В ПОЛЕ СТОЯЧЕЙ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ВОЛНЫ

© 2022 г. Т.Н. Пашовкин, Д.Г. Садикова

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, Институтская ул., 3

E-mail: pashovkin@mail.ru

Поступила в редакцию 30.03.2022 г.

После доработки 08.04.2022 г.

Принята к публикации 11.04.2022 г.

Исследованы параметры управления разделением клеток эритроцитов и лимфоцитов, и показана возможность быстрого (минуты) разделения клеток крови на фракции в поле стоячей ультразвуковой волны. Выделено семь основных параметров управления, связанных: с энергией поля стоячей ультразвуковой волны, с линейной скоростью прокачки суспензии клеток, геометрическими размерами клеток, соотношением плотностей клеток и сред суспендирования, соотношением скоростей ультразвука в материале клеток и средах суспендирования. Показано, что при условии эффективного термостатирования камер ультразвуковых систем разделения и концентрирования с суспензией клеток возможно резкое (более чем на порядок) сокращение времени разделения и концентрирования клеток не только разного вида, но и близких по размерам одинаковых клеток, выделенных из крови разных видов животных.

Ключевые слова: ультразвук, стоячие волны, акустический импеданс, плотность, скорость продольных волн, клетки, эритроциты, лимфоциты, разделение, концентрирование.

DOI: 10.31857/S0006302922030152, **EDN:** AOUXHJ

Явление формирования узлов давления акустических колебаний давно известно. Еще 200 лет назад Э. Хладни показал, что на резонансных пластинах возможно создание геометрических узоров из песка во время его движения к узловым точкам [1]. Данные закономерности были названы фигурами Хладни.

Тот же самый эффект можно наблюдать при воздействии стоячей ультразвуковой волны на частицы или клетки в суспензии. При этом на взвешенные частицы воздействует первичная акустическая сила (сила радиационного давления), в результате чего частицы движутся к узлам или пучностям стоячей волны в зависимости от свойств материала частицы и среды. При движении в среде частицы могут сливаться в агрегаты. Изменяя силу Стокса, можно осуществить разделение частиц по их размеру и свойствам.

Разделение частиц имеет большое значение в таких областях как нефтехимия, биотехнология, фармацевтика, химия, медицина и клеточная

Сокращение: ПУС – продольное ультразвуковое селективное.

биология. Возможность разделения клеток в объеме под действием силы радиационного давления в поле стоячей волны и силы Стокса привела к развитию ряда новых методов концентрирования и разделения клеток в поле стоячей ультразвуковой волны для научных исследований в области биологии клетки и медицины [2–9]. В последнем случае это связано с возможностью увеличения эффективности подготовки проб для анализа крови за счет значительного уменьшения времени выделения клеток, необходимых для работы, и увеличения времени работы с этими клетками. Дальнейшее развитие ультразвуковых методов разделения и концентрирования клеток, выделенных из различных биологических объектов, зависит не только от разработки новых, более совершенных методов концентрирования и разделения с помощью ультразвуковой техники, но и от изучения физических процессов, которые являются основополагающими для этих методов.

Целью нашей работы было показать возможность разделения разных видов клеток крови с помощью метода продольного ультразвукового селективного.

**ПРИНЦИП РАБОТЫ СИСТЕМ
УЛЬТРАЗВУКОВОГО РАЗДЕЛЕНИЯ
И КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ КЛЕТОК В ПОЛЕ
СТОЯЧЕЙ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ВОЛНЫ**

В нашей работе используется система продольного ультразвукового селективного разделения, показанная на рис. 1. Данная система состоит из одного пьезоэлектрического преобразователя и камеры, в которой создается стоячая волна [10, 11]. Камера располагается в системе термостатирования. Одновременно термостатирующая жидкость является контактной средой между излучателем и ячейкой. Поле стоячей ультразвуковой волны в камере образуется за счет интерференции волн, падающих под разными углами. В результате этого в камере образуются пучности и узлы давления.

Концентрирование клеток в проточной системе зависит как от действия силы радиационного давления, которое возникает в ультразвуковом поле, так и за счет потока жидкости вокруг частиц, удерживаемых полем. Силу радиационного давления для эритроцитов можно выразить следующим образом [12]:

$$F = \frac{D^2}{4} \pi \bar{E} k H K \sin(2kx), \quad (1)$$

где $\bar{E} = \frac{I}{C_0}$ – средняя плотность энергии (I – интенсивность ультразвукового поля, C_0 – скорости ультразвука в частицах и суспендирующей среде соответственно), D – диаметр эритроцитов, H – высота эритроцитов, K выражается как:

$$K = \left[\frac{\frac{\rho_0}{\rho} - 1 + 2(1 - \frac{\rho_0}{\rho})}{\left(\frac{c}{c_0}\right)^2 - 2 + \frac{\rho_0}{\rho}} \right],$$

где ρ и ρ_0 – плотность частицы и среды соответственно.

Для лимфоцитов сила радиационного давления:

$$F = 4/3 \pi E k r^3 K \sin(2kx), \quad (2)$$

где r – радиус лимфоцитов.

Когда частицы находятся в жидкости, которая осуществляет ламинарное движение вдоль всей ячейки, на них действует сила Стокса, которая выражается как:

$$F_{тр} = 6 \pi r \nu \eta, \quad (3)$$

где r – радиус клеток, ν – скорость потока жидкости, η – вязкость жидкости.

Когда на частицы действует сила радиационного давления, их направление в акустическом поле определяется коэффициентом K . Если $K < 0$, то частицы будут двигаться к узлу давления, если $K > 0$, то частицы будут двигаться к пучности. Большинство частиц имеют отрицательный коэффициент K , в соответствии с этим они движутся к узлу акустического давления.

В данной работе проведено исследование эритроцитов и лимфоцитов, и показана возможность разделения клеток крови на фракции. Для этого мы выделяли и сравнивали между собой эритроциты и лимфоциты крыс. В том числе были исследованы параметры эритроцитов человека, чтобы понять, возможно ли разделение клеток

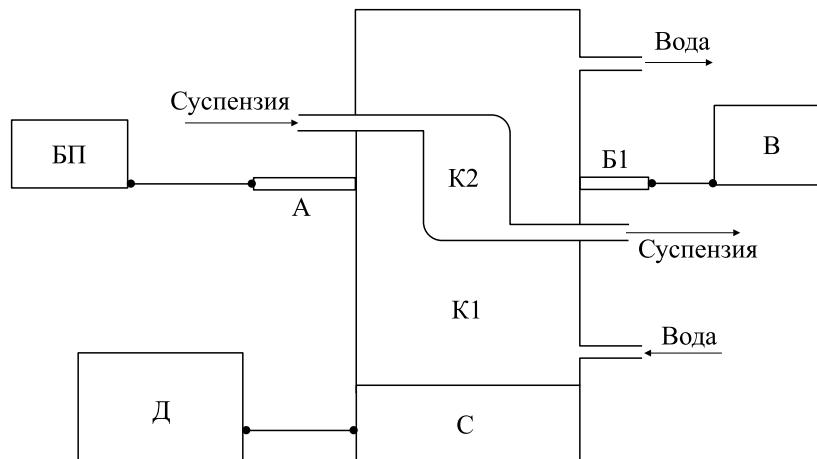


Рис. 1. Устройство продольного ультразвукового селективного разделения: К1 – внешняя термостатирующая камера, К2 – термостатируемая камера разделения и концентрирования клеток, С – ультразвуковой излучатель, Д – генератор ультразвука, А – лазерный излучатель, В – приемник светового излучения, БП – блок питания лазера, В – компьютерная система анализа сигнала.

с небольшим различием в физических свойствах (в данном случае эритроцитов крыс и человека).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В качестве объектов исследования мы использовали эритроциты и лимфоциты крысы, а также эритроциты человека. Выбор объектов исследования объясняется различием их свойств.

Эритроциты крысы были получены из хвостовой вены крыс Вистар. Кровь помещали в 0.9%-й физиологический раствор NaCl с добавлением гепарина. Затем клетки трижды промывали и разводили в 0.9% NaCl до требуемой концентрации.

Лимфоциты получали из цельной крови крыс серии Вистар, выделенных по методике, описанной в работе [13].

После декапитации животного в собранную кровь добавляли гепарин. Затем кровь с гепарином разводили в фосфатно-солевом буфере с ЭДТА в соотношении 1:2. В пробирки типа «Эппендорф» (2 мл) на 0.5 мл верофиколла аккуратно наслаивали по 1.5 мл разведенной крови. Центрифугировали 20 мин при 3400 об/мин на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия). После центрифугирования образовывался осадок эритроцитов и пленка гранулоцитов на поверхности осадка. На границе верофиколла и плазмы располагался тонкий слой мононуклеаров – лимфоцитов и моноцитов. Этот слой отбирали в отдельную пробирку и отмывали от верофиколла и плазмы в фосфатно-солевом буфере с ЭДТА, для этого центрифугировали содержимое 7 мин при 2600 об/мин. Надосадочную жидкость убрали и суспендировали осадок.

Эритроциты человека были получены капиллярным методом. Кровь помещали в 0.9%-й физиологический раствор NaCl с добавлением гепарина. Затем клетки трижды промывали и разводили в 0.9% NaCl до требуемой концентрации.

Размер клеток определяли с помощью световой микроскопии. С этой целью клетки в камере Горяева были сфотографированы с помощью видеоокуляра. Затем измеряли диаметр клетки. В случае эритроцитов измеряли не только наружный диаметр, но и диаметр двояковогнутой мембраны. С использованием трассировки IGL 1.26b [14] измеряли диаметр клеток.

Плотность клеток рассчитывали по весу сухой клетки, определяемой путем испарения воды из суспензии клеток в термостате до постоянной массы с учетом концентрации и объема клеток. Взвешивание проводили с использованием микровесов (Mettler, Швейцария) с точностью 0.0001 г.

Плотность вычислялась далее по формуле: $\rho = m/V$, где m – масса, V – объем клеток. Стати-

стическую обработку результатов проводили с помощью программы Sigma Plot 8.

Метод продольного ультразвукового селектирования. Метод разделения и концентрирования основан на принципе, названном его автором Н.Н. Князьковым [10, 11] продольным ультразвуковым селектированием (ПУС) суспензий. Данный метод заключается в том, что клетки ограничены полем стоячей ультразвуковой волны во время течения суспензии вдоль направления распространения ультразвука. В этом случае на частицы в поле стоячей волны воздействуют различные силы.

Чтобы обеспечить эффективную реализацию способа, длина волны ультразвука выбирается из соотношения $\lambda \leq 2na$, где λ – длина волны ультразвука и a представляет собой характерный размер n частиц, смещаемых полем. Если это условие нарушается, то использование силы излучения становится неэффективным.

Из-за сложной зависимости силы излучения от характеристик системы ПУС способ работы не может быть описан простым математическим выражением. Поэтому скорость жидкости и интенсивность ультразвукового поля определяются экспериментально для каждого конкретного случая.

Устройство для разделения и концентрирования жидкой дисперсионной системы (рис. 1) содержит камеру К1 с входными и выходными трубками для перекачки клеточных суспензий, которая помещена в стеклянную термостатирующую камеру К2. Излучатель с рабочей частотой 2.64 МГц установлен в конце камеры К2. Стеклянная поверхность 3 на другом конце камеры К2 служит отражателем; таким образом, генерируется стоячая ультразвуковая волна. В двух системах ПУС был использован фокусирующий преобразователь площадью 4 см². В фокальной области ультразвукового поля радиус фокального пятна и длина фокальной области составляли 1.2 и 7 мм соответственно. Интенсивность ультразвука контролировали с помощью дифференциальной термомпары, калиброванной по интенсивности ультразвука. Затем проводили пересчет интенсивности в среднюю плотность энергии в фокальной области излучателя.

Экспериментальное определение граничных условий концентрирования/разделения для тестируемых клеток в стоячей ультразвуковой волне. Определение граничных условий для концентрирования/разделения в поле ультразвука выполняли с использованием камер для разделения методом ПУС (рис. 1).

Пример концентрирования клеток методом ПУС приведен на рис. 2.



Рис. 2. Концентрирование клеток в поле стоячей ультразвуковой волны при $f = 2.64$ МГц: эритроциты крысы. Стрелки указывают камеры, в которых сосредоточены клетки. Время концентрирования составляет 0, 5 и 10 мин после включения ультразвука. Средняя плотность энергии составляет $1.2 \cdot 10^{-4}$ Дж/см³.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При использовании системы для концентрирования с протоком суспензии, необходимо рассматривать движение клеток под действием радиационной силы при наличии влияния на них потока жидкости. При концентрировании клеток в ультразвуковой стоячей волне на них действует не только сила радиационного давления и трения (сила Стокса), но и другие силы, которые либо компенсируют друг друга, либо пренебрежимо малы. Исследуя силы радиационного давления и Стокса, можно подбирать граничные условия для разделения и концентрирования клеток в суспензии в поле стоячей ультразвуковой волны.

В табл. 1 приведены результаты измерений некоторых физических параметров клеток (эритроцитов крысы, эритроцитов человека и лимфоцитов крысы), использованных при расчетах сил, действующих на клетки в поле стоячей ультразвуковой волны.

Используя полученные данные, приведенные в табл. 1, мы вычислили силу радиационного давления и силу Стокса. Сила радиационного давления или радиационная сила и силы Стокса были рассчитаны по формулам (1, 2) и (3) соответственно. В результате расчетов были получены радиационные силы и силы Стокса, как представлено в табл. 2.

Математически сила радиационного давления для всех клеток имеет отрицательный знак. Физически это означает, что все типы рассматриваемых клеток перемещаются, а затем собираются в узлах переменного давления. Зависимость силы радиационного давления от средней плотности энергии ультразвукового поля для эритроцитов крысы, лимфоцитов крысы и эритроцитов человека линейна с углом наклона, характерным для каждого типа клеток.

Чтобы получить граничные значения линейной скорости прокачки суспензии клеток в камере для ультразвукового концентрирования, необ-

Таблица 1. Измеренные параметры клеток и сред суспендирования

	Свойства клеток			Свойства сред суспендирования		
	Эритроциты крыс	Лимфоциты крыс	Эритроциты человека	Дистиллированная вода	0.9% NaCl	Фосфатно-солевой буфер
Плотность, кг/м ³	1.092	1.107	1.038	0.999	1.005	1.004
Размеры, мкм	6.8	3	7.5	–	–	–
Скорость ультразвука, м/с	1584.2	1591.6	1569.2	1484.2	1507	1493.4

Таблица 2. Силы, действующие на клетки в поле стоячей ультразвуковой волны

	Эритроциты крыс	Лимфоциты крыс	Эритроциты человека
Радиационная сила, Н	$1.918 \cdot 10^{-11}$	$0.33 \cdot 10^{-11}$	$2.56 \cdot 10^{-11}$
Сила Стокса при $v = 1$ см/мин, Н	$1.068 \cdot 10^{-11}$	$0.4712 \cdot 10^{-11}$	$1.178 \cdot 10^{-11}$

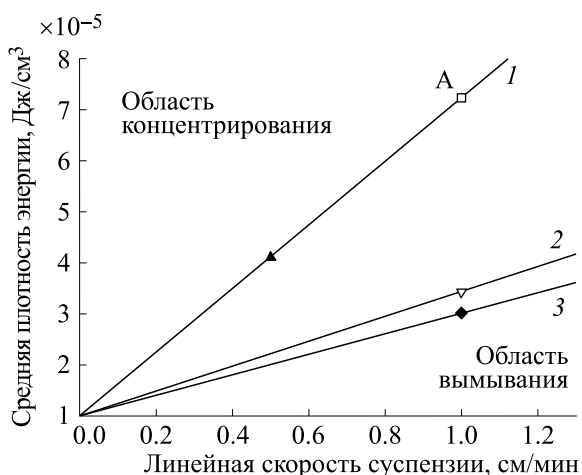


Рис. 3. Определение областей концентрирования, разделения и вымывания для трех типов клеток в системе координат средней плотности энергии стоячей ультразвуковой волны и линейной скорости потока суспензии клеток. Теоретически рассчитанные линии разделения областей и экспериментальные данные (символы) для лимфоцитов крысы (1), эритроцитов крысы (2) и эритроцитов человека (3). А — Теоретически рассчитанная граничная точка для лимфоцитов при скорости прокачки суспензии клеток 1 см/мин.

ходимо было сравнить радиационные силы, действующие на клетки при разных средних плотностях ультразвуковой энергии с силами Стокса, действующей на клетки при наличии потока сред суспендирования, либо потока суспензии клеток [15].

При условии, что $F_r \geq F_{S1}$, клетки будут удерживаться в ультразвуковом поле (F_r — радиационная сила, F_{S1} — сила Стокса).

Результаты теоретических расчетов представлены в виде графиков со средней плотностью энергии ультразвукового поля и линейной скоростью потока суспензии ячейки в качестве осей координат, а также в табл. 2. Прямые линии на графиках разделяют области концентрации клеток, разделения и вымывания. Наклон этих прямых линий является характеристикой определенного типа ячейки. Сравнение таких зависимостей для трех типов клеток показывает, что существует область, в которой клетки одного типа будут вымы-

ваться, а клетки другого типа будут концентрироваться (рис. 2). Области между двумя типами клеток будут областями разделения клеток на фракции. Таким образом, можно определить параметры ультразвукового поля и скоростей прокачки суспензий клеток, при которых будет наблюдаться как концентрирование, так и разделение клеток.

Чтобы проверить выбранные граничные условия, представленные в табл. 3, мы провели ряд экспериментов по изучению удерживания клеток в камере для ультразвуковой сепарации при различных скоростях прокачки среды суспендирования. Для этого в каждом эксперименте в камеру помещали фиксированное количество клеток.

Для изменения скорости потока клеточной суспензии использовали перистальтический насос, откалиброванный перед каждым экспериментом. Для регулирования скорости прокачки суспензии клеток были использованы трубки разного диаметра (1–5 мм). Клеточная суспензия заполняла камеру К2 (рис. 1). Затем накладывалось ультразвуковое поле. Через камеру пропускали постоянный объем среды суспендирования. Затем суспензию клеток забирали из камеры К2. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева. В этом случае количество ячеек было рассчитано в пяти или более больших квадратах. Для каждого типа клеток было проведено не менее пяти экспериментов. Таким образом, была определена средняя концентрация клеток, которые удерживаются в стоячей ультразвуковой волне, и ошибки среднего значения.

Рис. 4–6 показывают, что при заданной скорости прокачки и средней плотности энергии концентрация клеток соответствует теоретическому ожиданию нашего эксперимента. Поэтому можно сделать вывод, что для каждого изучаемого вида клеток рассматриваемая теория действия акустических сил применима с высокой степенью точности.

Исходя из данных, представленных в табл. 1 и 3, можно сказать, что плотность и размер клетки играют наиболее важную роль при управлении смещением частиц с помощью поля стоячей ультразвуковой волны. При этом размер в нашем случае играет определяющую роль. Несмотря на прямую зависимость средней плотности энергии от размера клеток, использовать только один па-

Таблица 3. Выбранные для экспериментальной проверки значения средней плотности энергии на теоретически определенных граничных прямых

	Эритроциты крыс	Лимфоциты крыс	Эритроциты человека
$E \cdot 10^{-5}$, Дж/см ³	55.6	71	46

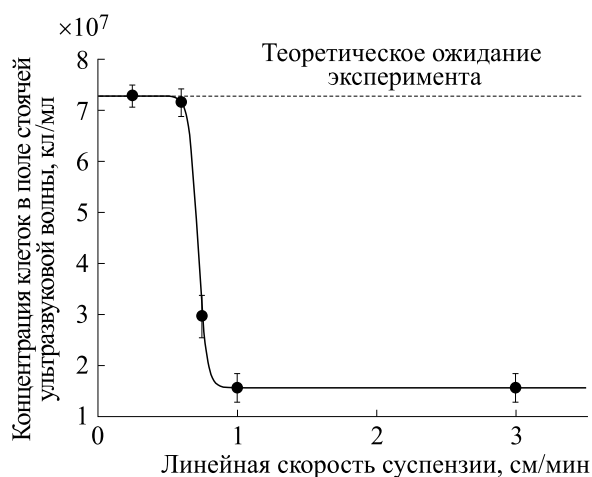


Рис. 4. Зависимость концентрации лимфоцитов от линейной скорости потока суспензии в стоячей ультразвуковой волне при средней плотности энергии $71 \cdot 10^{-5}$ Дж/см³.

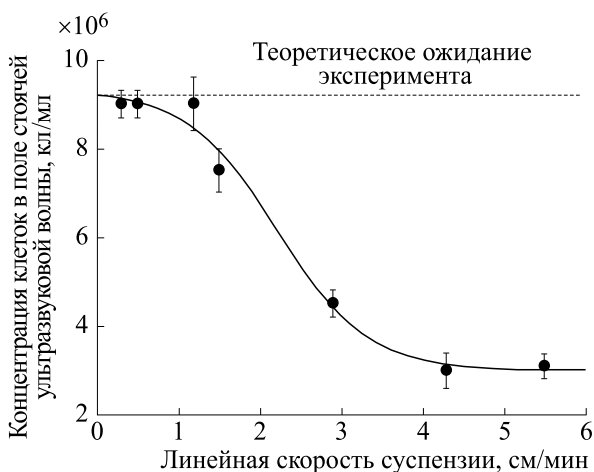


Рис. 5. Зависимость концентрации эритроцитов человека от линейной скорости потока суспензии в стоячей ультразвуковой волне при средней плотности энергии $46 \cdot 10^{-5}$ Дж/см³.

раметр для получения угла наклона не корректно. Такое упрощение привело бы к неточности, что не позволило бы эффективно разделить клетки близкие по размеру, такие как эритроциты человека и крыс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разделение клеток с помощью стоячих акустических волн является перспективной технологичной альтернативой обычным методам разделения и выделения, таких как фильтрование, центрифугирование, гравитационного осаждения и многих других. В настоящий момент технология концен-

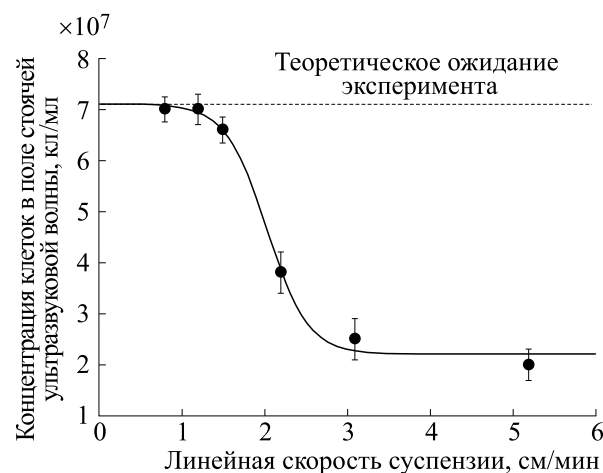


Рис. 6. Зависимость концентрации эритроцитов крысы от скорости потока суспензии в стоячей ультразвуковой волне при средней плотности энергии $55.6 \cdot 10^{-5}$ Дж/см³.

трирования и разделения клеток в суспензии в стоячей ультразвуковой волне успешно используется в отдельных лабораториях.

В целом мы теоретически и экспериментально продемонстрировали возможность концентрирования и разделения клеток с разной плотностью, размером и другими физическими свойствами. Было показано, что существует возможность успешного разделения данных клеток без использования нескольких ультразвуковых излучателей и камер.

Как показывают теоретические исследования данного вопроса, эффективность разделения можно повысить за счет увеличения мощности и/или снижения скорости прокачки суспензии в камере.

Несмотря на всю сложность данного явления, мы считаем, что для полноценного использования метода для большинства видов клеток достаточно рассмотрения двух сил — силы радиационного давления и силы Стокса. Данные силы включают в себя все необходимые параметры для управления перемещением клеток в ультразвуковом поле. Такой подход позволяет упростить в дальнейшем проектирование оборудования для ультразвукового концентрирования и разделения клеток.

Несомненно, усложнение геометрии используемых частиц (клеток) требует дополнительного исследования для эффективной работы с такими клетками.

Данный метод разделения клеток в поле стоячей ультразвуковой волны имеет большой потенциал для использования в качестве дополнительного оборудования в медицинских, биологических и биотехнологических лабораториях, а

также получить развитие для применения на производстве.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены. Процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От всех участников предварительно было получено информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. S. Bardell, *J. Sound Vib.* **174** (5), 655 (1994).
2. J. J. Hawkes and W. T. Coakley, *Sens. Act. B: Chem.* **75** (15), 213 (2001).
3. C. M. Cousins, J. R. Melin, W. A. Venables, and W. T. Coakley, *Bioseparation*, **9**, 343 (2001).
4. R. Bosma, W. A. van Spronsen, J. Tramper, and R. H. Wijffels, *J. Appl. Phycol.* **15**, 143 (2003).
5. G. D. Pangu and D. L. Feke, *Chem. Eng. Sci.* **64** (7), 1445 (2009).
6. T. Franke, S. Braunmüller, L. Schmid, et al., *Lab Chip* **10**, 789 (2010).
7. T. Franke, A. R. Abate, D. A. Weitza, and A. Wixforth, *Lab Chip* **18**, 2625 (2009).
8. D. Foresti, N. Bjelobrk, M. Nabavi, and D. Poulidakos, *J. Appl. Phys.* **109** (9), 093503 (2011). DOI: 10.1063/1.3571996
9. G. R. Goddard, C. K. Sanders, J. C. Martin, et al., *Anal. Chem.* **79** (22), 8740 (2007).
10. N. N. Knyaz'kov and G. V. Shil'nikov, *Bull. Exp. Biol. Med.* **121** (3), 287 (1996).
11. N. N. Knyaz'kov, E. D. Makarova, and A. D. Rabinovich, *Sci. Instrument*, **19** (1), 40 (2008).
12. В. А. Шутилов, *Основы физики ультразвука* (Изд-во ЛГУ, Л., 1980), сс. 114–117.
13. Л. Б. Хейфец и В. А. Абалакина, *Лаб. дело*, № 10, 579 (1973).
14. J. C. Fiala, In *Proc. Int. Joint Conf. on Neural Networks* (Honolulu, HI, 2002), pp. 1–4/
15. T. N. Pashovkin and D. G. Sadikova, *Acoust. Phys.* **55** (4–5), 584 (2009).

Parameters of Control Scheme for Monitoring Separation and Concentration of Murine Erythrocytes and Lymphocytes and Human Erythrocytes in the Field of a Standing Ultrasonic Wave

T.N. Pashovkin and D.G. Sadikova

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Institutskaya ul. 3, 142290 Russia

In this paper, the parameters of control scheme for monitoring the separation of erythrocyte and lymphocyte cells are investigated, and the possibility of rapid separation of blood cells (within minutes) for fractioning blood components in the field of a standing ultrasound wave is shown. The seven key parameters of control scheme that are associated with the energy density in the field of the standing ultrasonic waves, the linear flow velocity of cell suspension, the geometric dimensions of the cells, cell number per suspension media volume, the ratio of ultrasonic velocity related to cell density to that in suspension media are identified. It is shown that effective temperature control of ultrasonically treated cell suspension in the processing chamber can drastically shorten the time (more than ten times larger) required for separation and reduction in concentration of cells not only of different types, but also of similar-sized identical cells isolated from blood of different animal species.

Keywords: ultrasound, standing waves, acoustic impedance, density, velocity of longitudinal waves, cells, erythrocytes, lymphocytes, separation, concentration