

**Ю.М. Ширшов, К.В. Костюкевич, Р.В. Христосенко,  
Н.Я. Грідіна, С.О. Костюкевич, Ю.В. Ушенін, А.В. Самойлов**

## **ОПТИЧНИЙ КОНТРОЛЬ МЕЖІ РОЗПОДІЛУ МІЖ ПОВЕРХНЕЮ ЗОЛОТА ТА ЗРАЗКАМИ КЛІТИН КРОВІ**

Звернено увагу на оптичні властивості границі розподілу між плоскою поверхнею скла чи плівки золота та суспензією клітин крові, що вміщує інформацію щодо форми власне клітин крові – еритроцитів. З метою визначення товщини перехідного шару між поверхнею та об'ємом суспензії було використано порівняння кутів поверхневого плазмонного резонансу  $\varphi_{ППР}$  та повного внутрішнього відбиття  $\varphi_{ПВВ}$ . Ми встановили розрахунковим шляхом, що для двох зовнішніх середовищ з відмінними показниками заломлення, між кутами  $\varphi_{ППР}$  та  $\varphi_{ПВВ}$  існує лінійне співвідношення. Коефіцієнт нахилу цього співвідношення дозволяє визначити товщину перехідного шару, якщо він є тоншим за 300 нм. Експеримент проведено в геометрії Кретчмана для зразків крові ~ 100% гематокрита (об'ємний процент заповнення крові еритроцитами) у нативному стані та після гемолізу (руйнування мембрани еритроцитів). Також використано зразки еритроцитів, які промито та розбавлено у буферному розчині. Показано, що еритроцити у нативних зразках крові ~ 100% гематокрита щільно прилягають до поверхні золота (на відстані 80÷100 нм), що свідчить про сильну деформацію клітин, які після центрифугування перебувають у формі поліедричних з низкою плоских ділянок на поверхні. Промивання та розбавлення клітин у буфері призводить до релаксації форми еритроцитів у звичайну дискоцитну форму та віддаляє цитоплазму еритроцита від поверхні завдяки збільшенню радіуса викривлення мембрани.

**Ключові слова:** поверхневий плазмонний резонанс, повне внутрішнє відбиття, показник заломлення, еритроцити, гематокрит.

### **1. ВСТУП**

Оптичні методи дослідження клітин та тканин на основі мікроскопії, спектроскопії та розсіювання світла займають важливе місце у біології та медицині [1,2]. В останній час цей арсенал ефектів поповнюється поверхневим плазмонним резонансом (ППР), де електромагнітне поле біля поверхні резонансно підсилюється магнітним полем поверхневого току. Локалізація цього підсиленого поля над поверхнею металу складає долі довжини хвилі світла, тому метод ППР особливо чутливий до вказаної області простору. Зазвичай його використовують для контролю афінності взаємодії біомолекул, коли одну молекулу хімічно прив'язують до поверхні, а другу вводять до розчину і процес їхньої взаємодії відбувається в області підсиленого поля, так званої зникаючої хвилі (evanescent wave). Зв'язок двох молекул призводить до локального збільшення рефракції середовища і реєструється за зміною положення мінімальної довжини хвилі  $\lambda_{min}$  у спектрі відбиття при освітленні білим світлом, або мінімального кута падіння  $\varphi_{min}$  при монохроматичному освітленні. Кінетика зміни  $\lambda_{min}$  або  $\varphi_{min}$  несе інформацію про афінність взаємодії молекул [3]. Однак використання ефекту ППР при вивченні тканин, клітинних шарів та крові людини зустрічає перешкоди. Тому на сьогодні невелика кількість спроб застосування ефекту ППР до живих об'єктів – бактерій [4], клітин лінії НЕК 293 [5], тучних клітин (mast cells) [6], клітин печінки MDSK II [7,8] та особливо до червоних клітин крові [9,10]. Несподіваними виявилися відомості про реакцію живих клітин на хімічні подразники. Наприклад, автори [7,8] помітили зміни у відгуку ППР при дослідженні впливу хімічних агентів на зовнішню поверхню моношару клітин, що були відділені від поверхні золота мікронним проміжком.

Помітна кількість оптичних досліджень з використанням спектрів поглинання, повного внутрішнього відбиття (ПВВ) та розсіювання світла проведено на клітинах крові. Інтерпретацію результатів із розсіювання світла окремими еритроцитами виконували на основі розрахунку Мі для сфер з постійним комплексним показником заломлення

© Ю.М. Ширшов, К.В. Костюкевич, Р.В. Христосенко, Н.Я. Грідіна,  
С.О. Костюкевич, Ю.В. Ушенін, А.В. Самойлов, 2021

$N = n + ik$  [11]. Однак надійність застосування методики розсіювання світла знижується при відмінності форми еритроцитів від сферичної. Тому у [12] було розроблено способи зміни цитоскелету для отримання сферичної форми еритроцитів та експериментально продемонстровано вплив патологій організму людини на їхній показник заломлення ( $N$ ). Пізніше [13] за спектрами поглинання колімованого променя для кулеподібних еритроцитів були остаточно отримані необхідні формули та складені таблиці для практичної діагностики. При використанні методики ПВВ для усування сильного розсіювання світла роблять гемоліз крові, завдяки якому сильнорозсіювальні мембрани еритроцитів руйнуються та перетворюються у слабозсіювальні малі фрагменти. Для цього зазвичай застосовують багатократне заморожування-відтавання крові  $\sim 100$  % гематокрита (об'ємний процент заповнення крові еритроцитами), або руйнування мембрани еритроцитів за рахунок екстремального гравітаційного навантаження (до 20000 об/хв). Кров після гемолізу перетворюється на сильно поглинаюче, але слабозсіювальне середовище, що дає можливість визначити кут ПВВ за допомогою стандартного рефрактометра. У такий спосіб в [14] уточнили значення  $N$  для зразків крові довільного гематокрита, в [15,16] отримали детальний спектр  $N$  крові  $\sim 100$  % гематокрита та провели його співставлення з відомими даними. Необхідно підкреслити, що у відомих статтях наводять різні значення  $N$ . Зокрема, при  $\lambda = 650$  нм для цільної крові (260 г/л гемоглобіну) в [16] знайдено значення  $N = 1.3792$ , в [17] –  $N = 1.348$ , в [11] –  $N = 1.39$ , а в [18] –  $N = 1.4218$ . Практично відсутні дані по надійному визначенню кута ПВВ для нативної крові без гемолізу, а спосіб оцінки кута ПВВ за максимумом похідної залежності коефіцієнта відбиття  $R$  від кута падіння  $\varphi$  [19,20] підлягає сумніву. На цьому тлі вивчення поведінки мінімуму відбиття ППР ( $\varphi_{ППР}$ ) є оптимістичним, оскільки він надійно спостерігається для крові будь-якого гематокрита. Тем не менш, відомо лише кілька праць [21-25] із дослідження кінетики зміни мінімуму ППР при згортанні крові, яку пояснили процесом формування шару фібриногену, а не властивостями еритроцитів. В статтях [26,27] ППР-біосенсор з іммобілізованими на поверхні золота антитілами застосували для визначення групи крові. Також було показано, що величину зсуву кута ППР при зміні буферного розчину на зразок крові 100 % гематокрита можна зв'язати з деякими патологіями організму людини [28,29]. Однак задача контролю  $N$  нативної крові різного гематокрита на основі ефекту ППР практично не ставилася.

## **2. ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ ЕФЕКТУ ППР ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ СУСПЕНЗІЙ**

При дослідженні зразків крові у геометрії Кретчмана гарантовано спостерігається ефект ППР з чітким мінімумом відбиття в області ПВВ, незважаючи на сильне розсіювання світла в області прозорості. Тому представляє інтерес провести більш систематичне тестування зразків суцільної крові та її компонентів на основі одночасного дослідження ефектів ПВВ та ППР. Ефекти ПВВ та ППР докорінно відрізняються за механізмом відбиття світла. Повне внутрішнє відбиття світла на границі скло-середовище виникає завдяки зменшенню швидкості розповсюдження променя у зовнішньому середовищі, так що вимога когерентності парціальних хвиль заломленого променя може бути виконана лише за умови  $\varphi < \varphi_{ПВВ} = \text{asin}(N/N_{gl})$ , де  $N_{gl}$  – показник заломлення скла. При  $\varphi > \varphi_{ПВВ}$  проникнення світла в оптично менш щільне середовище заборонено. Поява розсіювальних частинок у розчині збільшує інтенсивність відбиття світла при кутах, близьких до ПВВ (в області прозорості), і зменшує відбиття при кутах, що перевищують ПВВ, що призводить до нівелювання різкої границі „світло-тінь”. За умови суттєвої каламутності середовища (що характерно для крові), цю границю неможливо встановити зовсім, а значення  $R = 1$  не досягається. На відміну від цього, ефект ППР не пов'язаний із когерентністю вторинних хвиль, що викликаються осциляціями поляризаційних зарядів на

границі скло-середовище. Він спостерігається при кутах падіння світла, що значно перевищують критичний кут. Суть ефекту ППР полягає у тому, що поляризаційні заряди на межі розподілу середовищ викликають появу омічних токів у тонкій плівці металу. Омічні токи, в свою чергу, продукують магнітне поле, яке, за правилом Ленца, призводить до появи зарядів, що перешкоджають причині їх виклику. Ці додаткові заряди у металі компенсують вихідні поляризаційні заряди від падаючої хвилі і, у результаті, відбита хвиля пригнічується. Відбитий промінь ніби зникає. Очевидно, що при цьому процеси розсіювання падаючої світлової хвилі на мікрочастинках суспензії не грають визначальної ролі, і величина  $\phi_{ППР}$  несе інформацію не про об'ємний показник заломлення контактуючої рідини, а про умови резонансу високочастотного електричного поля з високочастотним магнітним полем, яке викликано поверхневими токами. Поляризаційні заряди (викликані світловою хвилею) відіграють роль конденсатора, а поверхневі токи у металі – роль індуктивності. Їхнє паралельне включення призводить до резонансу при умові рівності енергії магнітного та електричного полів. Таким чином, навіть послаблена металевою плівкою світлова хвиля викликає велике підсилення приповерхневого поля і призводить до появи додаткових зарядів, які гасять відбитий промінь.

Особливість оптичних вимірювань в геометрії Кретчмана полягає у тому, що при дослідженні однорідного зовнішнього середовища можна одночасно спостерігати ефекти ПВВ та ППР при різних кутах падіння світла. Тому співставлення цих ефектів може відкрити додаткову інформацію про оптичні властивості приповерхневої області у контакті зі зразками крові людини. Автори [13] проаналізували розкид експериментальних даних для клітинних елементів крові за останні 20 років та висловили ідею про те, що на межі розподілу середовищ локальне значення  $N$  може залежати від типу контакту („повітря-кров” або „скло-кров”). Традиційні ППР дослідження спрямовані на підвищення чутливості реєстрації  $\phi_{ППР}$  за рахунок збільшення адсорбційної ємності робочої поверхні (наприклад, використовуючи додатковий шар декстрину зі штучними рецепторами [30]) або реєструючи, замість амплітуди, фазу світлової хвилі, яка змінює свій знак при куті  $\phi_{ППР}$  [31]. У той же час практично не застосовується аналіз форми резонансної кривої ППР, яка надає цінну інформацію про детальне улаштування товстих молекулярних шарів між плоскою і достатньо однорідною поверхнею плівки золота та об'ємом аналіту [32]. Ця обставина є резервом в області оптичного контролю такої суспензії, як кров.

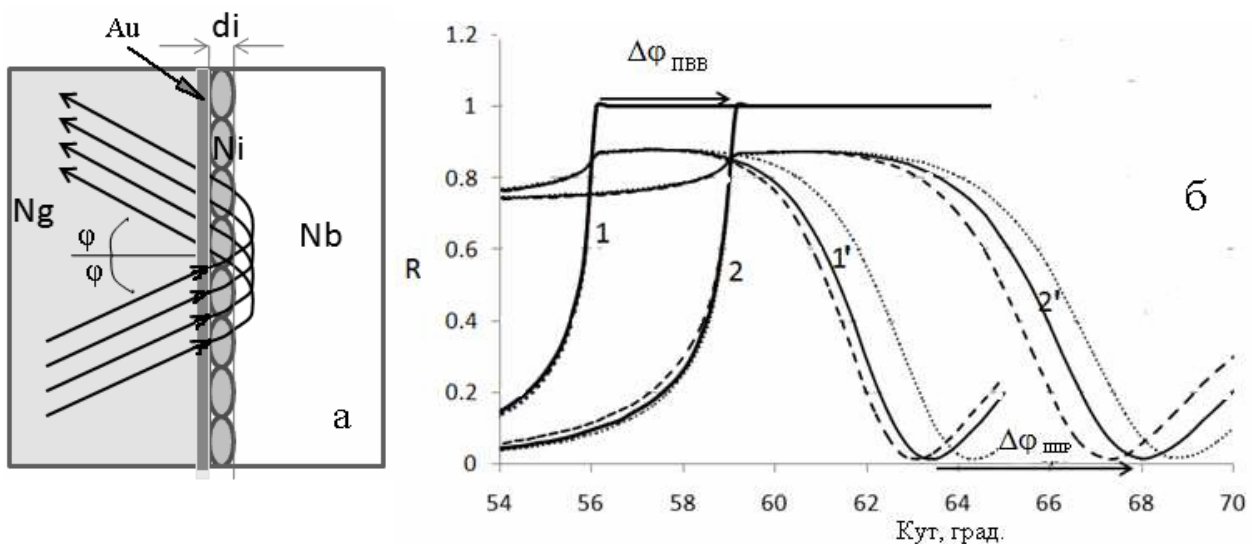
В роботі ми фокусуємо увагу на межі розподілу між плоскою поверхнею і об'ємом суспензії, що складається з легкодеформованих клітин крові (еритроцитів) 10-мікронного розміру в оточенні різного рідкого середовища – нативної плазми крові або розчину солей у воді (буфер). Зразки клітин крові 100 % гематокрита отримують шляхом видавлювання рідкої фази із суспензії за допомогою центрифугування. Зібрана на дні трубки маса являє собою щільно упаковані еритроцити із залишками рідкої маси між ними, оскільки дискотична двоякогнута форма клітини не дозволяє отримати реальну щільну упаковку у силу обмеженої еластичності мембрани і нестисливості цитоплазми еритроцита. Оскільки показник заломлення ( $N$ ) цитоплазми еритроцита (1.36÷1.41) помітно відрізняється від  $N$  оточення (1.335÷1.35), прилегла до плоскої поверхні маса еритроцитів повинна містити „шорсткості”  $N$  у порівнянні із розміром довжини хвилі (0.5÷0.7 мкм). Такий шар ми представляємо у вигляді тонкого проміжку між твердою плоскою поверхнею і об'ємом суспензії з ефективною товщиною та  $N$ . Показник заломлення об'єму суспензії і перехідного шару можна оцінити, використовуючи модель ефективного середовища Максвелла-Гарнетта або Бруггемана. Для отримання додаткових даних проведені експерименти з паралельного дослідження ефектів ППР і ПВВ при зміні  $N$  контактуючого з еритроцитами середовища (нативна плазма крові, буфер) у поєднанні з руйнуванням мембран еритроцитів (гемоліз) та розбавленням промитих буфером еритроцитів.

### 3. МОДЕЛЮВАННЯ ЕФЕКТІВ ПВВ ТА ППР ПРИ ДОСЛІДЖЕННІ ЗРАЗКІВ КЛІТИН КРОВІ

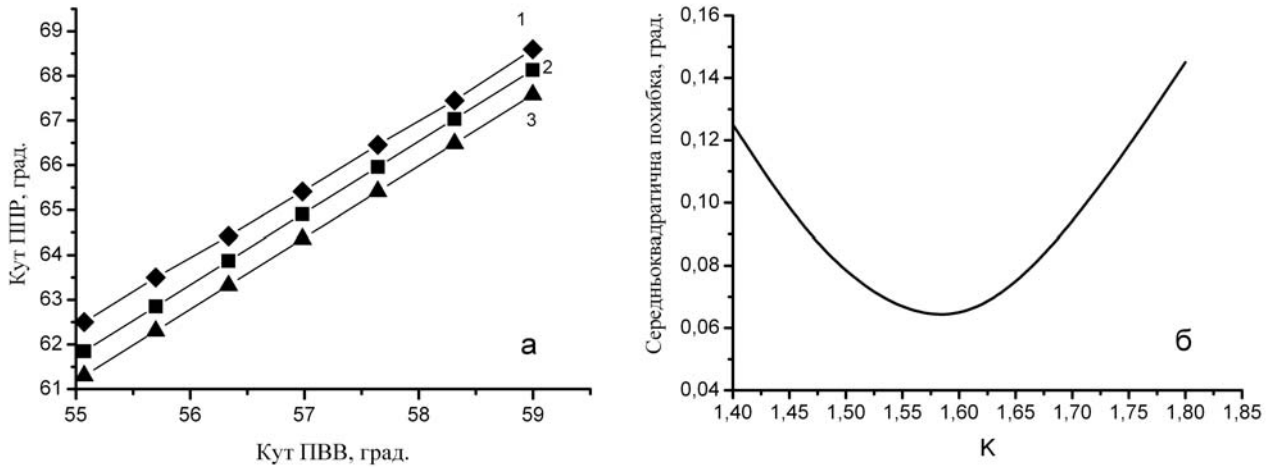
Границя розподілу між поверхнею плівки золота та кров'ю не є різкою. Раніше [33] ми запропонували модель перехідного шару для контакту поверхні плівки золота з нативною кров'ю  $\sim 100\%$  гематокрита (еритроцитами). В роботі ми пропонуємо подальше розвинення моделі та її перевірку із залученням імерсійних вимірювань, коли для зміни внеску об'єму та поверхні суспензії змінюється об'ємний показник заломлення суспензії  $N_b$  шляхом розбавлення. Як було показано у [33], при контакті поверхні плівки золота з плазмою крові формується товстий приповерхневий шар неспецифічно зв'язаних органічних молекул (в основному альбумінів та фібриногену). Цей шар, товщиною  $d = 33 \div 37$  нм і  $N = 1.35 \div 1.355$ , не прибирається промиванням у водних розчинах. Контакт поверхні золота із кров'ю супроводжується виникненням другого шару, природа якого пов'язана із неузгодженням овальної форми клітини еритроциту з плоскою поверхнею плівки золота. Параметри цього шару залежать від концентрації, форми та орієнтації еритроцитів відносно поверхні. Молекули та клітини не можуть сформувати однорідну плівку з ідеальними краями, тому  $d$  і  $N$  зазначених шарів є ефективними. Для зрозуміння взаємозв'язку параметрів зазначених шарів з концентрацією і формою мембрани еритроцитів корисно представити реальну картину інтерфейсу у вигляді п'ятифазної моделі: скло – золото – шар адсорбованих білків плазми крові (відносно щільна плівка) – шар неузгодження еритроцитів (овальні краї великих клітин) – об'єм суспензії еритроцитів. Модель показана на рис. 1а, перехідний приповерхневий шар складається з двох шарів – шару білків з товщиною  $d_{i1}$  і показником заломлення  $N_{i1}$  та шару неузгодження еритроцитів з параметрами  $d_{i2}$ ,  $N_{i2}$ . Дугоподібні лінії схематично відображають зміну хвильового вектору падаючого та відбитого променів світла у приповерхневій зоні згасаючої хвилі. Саме у цій зоні відбувається так званий зсув Гуса-Хенхема при внутрішньому відбитті. При щільному пакуванні ( $\sim 100\%$  гематокрит) еритроцити повинні максимально щільно заповнювати простір. Однак таке „щільне” пакування допускає наявність проміжків між клітинами [34], які заповнюються плазмою крові чи розчином солей. При заміні плазми у міжклітинному просторі на буфер  $N_b$  буде очікувано змінюватися відповідно до парціальної долі розчинника та його показника заломлення. Важливо відзначити, що об'ємне значення  $N_b$  для суспензії еритроцитів завжди більше ніж значення  $N_{i2}$ , тому що показник заломлення еритроцитів перебільшує показник заломлення середовища розчину (плазми крові чи буфера), а круглі краї клітин торкаються до плоскої поверхні лише в окремих плямах, залишаючи помітний простір для міжклітинної рідини. Очевидно, що  $N_b$  зразка крові і параметри приповерхневого перехідного шару будуть залежати від щільності пакування еритроцитів. Тому при зміні  $N_b$  можна отримати додаткову інформацію про властивості перехідного шару. Легше за все це можливо здійснити шляхом розбавлення суспензії еритроцитів ізотонічним буферним розчином, що не призводить до порушення мембрани або цитоскелету клітини. Значення  $N_b$  для суспензії еритроцитів можливо визначити за кутом ПВВ ( $\varphi_{ПВВ}$ ), а величина кута ППР ( $\varphi_{ППР}$ ) вкрай чутлива до наявності додаткових шарів між поверхнею плівки золота і об'ємом суспензії.

На рис. 1б наведено розрахункові (програма Winspall 3.02 [35]) кутові залежності внутрішнього відбиття світла  $R(\varphi)$  від поверхонь скла ( $N_{gl} = 1.61$ ; криві 1, 2) і золота ( $d_{Au} = 45$  нм,  $N_{Au} = 0.3 + i \cdot 3.6$ ; криві 1', 2') у контакті з буфером ( $N_b = 1.335$ ; крива 1) та суспензією еритроцитів ( $N_b = 1.38$ ; крива 2). Показник заломлення перехідного шару  $N_i$  вибирали як більше, так і менше об'ємного показника заломлення контактуючої речовини  $N_b$ . Суцільні криві отримані при відсутності перехідного шару; штрихові – відповідають випадку  $N_i < N_b$ : 1' –  $d_i = 20$  нм,  $N_i = 1.33$ ; 2' –  $d_i = 20$  нм,  $N_i = 1.37$ ; пунктирні – відповідають випадку  $N_i > N_b$ : 1' –  $d_i = 50$  нм,  $N_i = 1.35$ ; 2' –  $d_i = 20$  нм,  $N_i = 1.39$ . Суцільні криві (без урахування перехідного

шару) при відбитті від скла (1, 2) мають класичну Г-подібну форму з чітко вираженою початковою ділянкою гіперболічного зростання в межах кількох кутових градусів до кута ПВВ ( $\varphi_{ПВВ}$ ), при якому  $R = 1$ . Зростання  $N_b$  від 1.335 до 1.38 призводить до росту  $\varphi_{ПВВ}$  від  $\sim 56^\circ$  до  $\sim 59^\circ$ , а врахування перехідного шару (штрихові та пунктирні криві) тільки незначно підвищує або знижує коефіцієнт відбиття в області прозорості ( $\varphi < \varphi_{ПВВ}$ ). З появою металевого шару (1', 2') відбуваються кардинальні зміни у залежності  $R(\varphi)$ : відбиття в області прозорості при кутах  $\sim 53 \div 58^\circ$  кратно зростає (від  $\sim 5 \dots 15\%$  до  $\sim 80\%$ ), а ефект повного внутрішнього відбиття – зникає ( $R$  не досягає одиниці ні при яких значеннях кута). У той же час, при  $\varphi_{ППР} \sim 63$  і  $\sim 68^\circ$  спостерігається різке зниження (провал) коефіцієнта відбиття до нуля, пов'язане зі збудженням ППР. Однак, сходинка відбиття при куті ПВВ зберігається, що дозволяє визначити величину  $\varphi_{ПВВ}$  і, отже, значення  $N_b$ . Помітно, що  $\varphi_{ППР}$  при зростанні  $N_b$  зсувається у той же бік, що і  $\varphi_{ПВВ}$ , однак зсув  $\Delta\varphi_{ППР}$  приблизно у півтора рази перевищує зсув  $\Delta\varphi_{ПВВ}$ . Крім того, на положення  $\varphi_{ППР}$  помітно впливає поява перехідного шару: при появі  $d_i$  з більш високим показником заломлення  $N_i > N_b$  мінімум зсувається праворуч (пунктирні криві), а при  $N_i < N_b$  – ліворуч (штрихові криві). Таким чином, зсув кута  $\varphi_{ППР}$  при варіації показника заломлення середовища містить інформацію про наявність перехідного шару між фазами і його параметрах – товщині та показнику заломлення. Тому ми нижче проведемо аналіз співвідношення кутів  $\varphi_{ППР}$  і  $\varphi_{ПВВ}$  в залежності від варіації показника заломлення аналіта  $N_b$  (метод імерсійного середовища).



**Рис.1 а** – схематичне представлення вимірювань ПВВ і ППР при контакті поверхні скла (золота) зі зразками клітин крові (суспензія еритроцитів) для моделі формування двох приповерхневих перехідних шарів: шару адсорбованих білків плазми крові ( $d_{i1}$ ,  $N_{i1}$ ) та шару, пов'язаного із неузгодженням форми клітин (еритроцитів) й площиною поверхні ( $d_{i2}$ ,  $N_{i2}$ ). **б** – вплив формування одного приповерхневого перехідного шару при контакті поверхні скла ( $N_{gl} = 1.61$ ) і плівки золота ( $d_{Au} = 45$  нм,  $N_{Au} = 0.3 + i \cdot 3.6$ ) з буфером (1,  $N_b = 1.335$ ) та суспензією еритроцитів (2,  $N_b = 1.38$ ) на розрахункові кутові залежності коефіцієнта відбиття світла  $R(\varphi)$  – ПВВ (1, 2) й ППР (1', 2'). Суцільні криві отримані при відсутності перехідного шару; штрихові – відповідають випадку  $N_i < N_b$ ; 1' –  $d_i = 20$  нм,  $N_i = 1.33$ ; 2' –  $d_i = 20$  нм,  $N_i = 1.37$ ; пунктирні – відповідають випадку  $N_i > N_b$ ; 1' –  $d_i = 50$  нм,  $N_i = 1.35$ ; 2' –  $d_i = 20$  нм,  $N_i = 1.39$ .



**Рис.2 а** – розрахункові залежності між кутами  $\varphi_{ППР}$  і  $\varphi_{ПВВ}$  для типових значень оптичних параметрів плівок хром-золото у контакті з однорідним середовищем при плавній зміні її показника заломлення  $N_b$  у діапазоні  $1.33 \div 1.38$ . Точки – точні значення, що розраховані з використанням програми Winspall, лінії – значення, що отримані на основі емпіричної формули (1). Параметри адгезійного шару хрому:  $d_{Cr} = 1.2$  нм,  $n_{Cr} = 3.1$ ,  $k_{Cr} = 3.4$ . Параметри плівок золота:  $d = 54$  нм,  $n = 0.2$ ,  $k = 3.7$  (крива 1), 3.6 (крива 2), 3.5 (крива 3). **б** – середньоквадратичне відхилення (похибка) для розрахунку на основі емпіричної формули (1) при варіації коефіцієнта  $K$  відносно точного розрахунку функції  $\varphi_{ППР}(\varphi_{ПВВ})$  з використанням програми Winspall.

Проведемо моделювання залежності кутів  $\varphi_{ППР}$  і  $\varphi_{ПВВ}$  при плавному зростанні показника заломлення досліджуваного середовища  $N_{bi}$  від деякого початкового значення (дистильована вода – 1.33) до деякого граничного значення (суспензія еритроцитів – 1.38) без формування приповерхневого перехідного шару, а також при зміні оптичних параметрів плівки золота (рис. 2 а,б). Точні значення кутів  $\varphi_{ППР}$  і  $\varphi_{ПВВ}$  при довжині хвилі  $\lambda = 650$  нм для скляної призми ( $N_{gl} = 1.61$ ) в геометрії Кретчмана розраховані з використанням програми Winspall та показані точками на рис. 2а.  $N_b(x)$  задавали уручну та враховуючи адгезивний шар хрому з оптичними параметрами  $d_{Cr} = 1.2$  нм,  $n_{Cr} = 3.1$ ,  $k_{Cr} = 3.4$ . Як довели наші попередні дослідження [33, 36-39], оптичні параметри плівок золота, що отримані методом термічного випаровування у вакуумі, звичайно змінюються від зразка до зразка. Розкид значень для показника заломлення складає ( $n = 0.2 \div 0.3$ ), коефіцієнта екстинкції – ( $k = 3.5 \div 3.7$ ) і товщини – ( $d = 44 \div 54$  нм). На рис. 2а наведено співставлення розрахункових функцій  $\varphi_{ППР}(\varphi_{ПВВ})$  для трьох зразків плівок золота з параметрами  $d = 54$  нм,  $n = 0.2$ ,  $k = 3.7$  (крива 1), 3.6 (крива 2), 3.5 (крива 3), оскільки  $k$  має найбільший вплив на значення  $\varphi_{ППР}$ . (Оптичні параметри масивного золота при  $\lambda = 660$  нм зафіксовані у значенні комплексного показника заломлення ( $N_{Au} = 0.14 + i \cdot 3.697$ ) [40]).

Точно розраховані залежності кутів  $\varphi_{ППР}$  і  $\varphi_{ПВВ}$  (точки) можливо апроксимувати лінійною залежністю (суцільна лінія), яка не впливає із формул, що описують ефекти ППР і ПВВ, являє собою емпіричне спостереження:

$$\varphi_{ППРi} = \varphi_{ППР0} + K \cdot (\varphi_{ПВВи} - \varphi_{ПВВ0}), \quad (1)$$

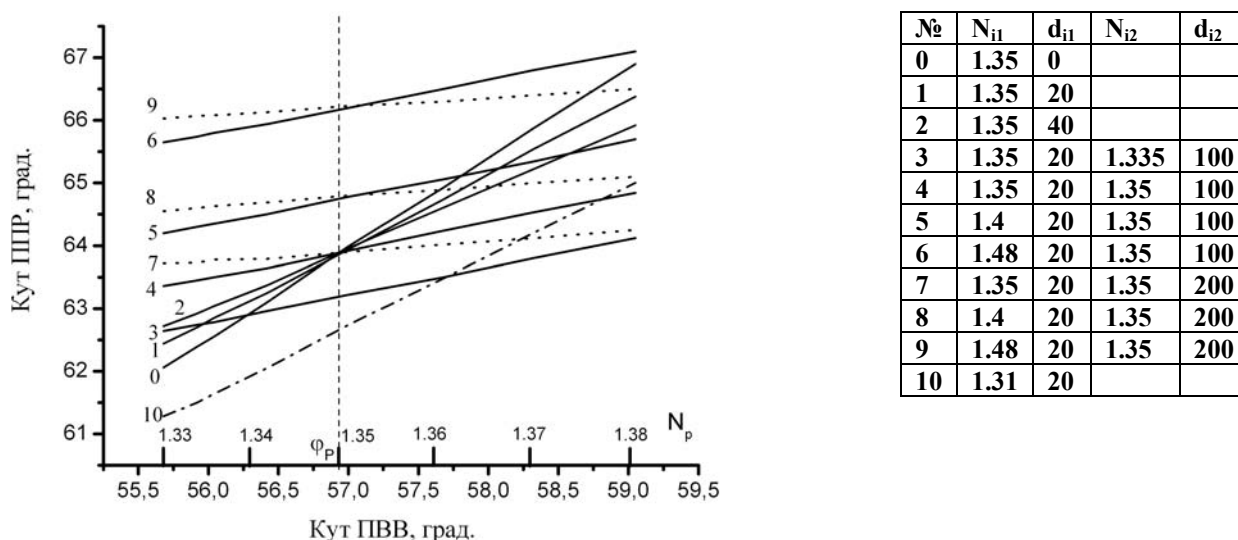
де  $\varphi_{ПВВи} = \arcsin(N_{bi}/N_{gl})$ , коефіцієнт  $K$  визначається за мінімальним значенням середньоквадратичного відхилення ( $\Delta\varphi$ ) між точно розрахованими ( $\varphi_{ППРc}$ ) та апроксимованими ( $\varphi_{ППРа}$  – поліномом першої степені) значеннями кута ППР:

$$\Delta\varphi = \left[ \frac{1}{i} \left( \sum_i (\varphi_{ППРc} - \varphi_{ППРа})^2 \right) \right]^{1/2}, \quad (2)$$

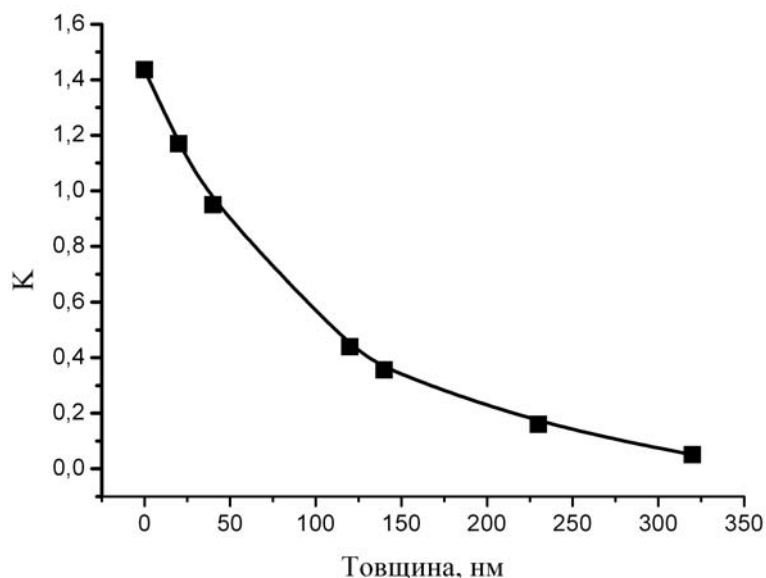
а  $i$  – кількість точок. На рисунку 2б показана залежність  $\Delta\varphi(K)$  звідки помітно, що мінімальне середньоквадратичне відхилення (похибка)  $\Delta\varphi \approx 0.05^\circ$  або  $\approx 3$  кутові хвилини при  $K \approx 1.6$ . Таке значення середньоквадратичного відхилення є прийнятним оскільки формула (1) виявляється емпіричною, тим не менш, вона дозволяє достатньо точно оцінити зміну кута  $\varphi_{ППР}$  у залежності від зміни  $N_{bi}$  і  $\varphi_{ПВВ}$ .

Поява тонких діелектричних шарів між поверхнею золота і об'ємом суспензії призводить до послаблення впливу об'ємного показника заломлення на реєстровану величину  $\varphi_{ППР}$ , зменшенню коефіцієнта  $K$  і нахилу прямої залежності  $\varphi_{ППР}(\varphi_{ПВВ})$ . Оскільки цей ефект має принципове значення для співвідношення величин  $\varphi_{ППР}$  і  $\varphi_{ПВВ}$ , розглянемо його докладніше із урахуванням моделі рис.1. На рис.3 представлена залежність кутів  $\varphi_{ППР}(\varphi_{ПВВ})$  при різних комбінаціях параметрів двох приповерхневих перехідних шарів. На горизонтальній осі представлено два виміри: значення кута ПВВ ( $\varphi_{ПВВ}$  – нижні цифри) та значення показника заломлення досліджуваного середовища ( $N_b$  – верхні цифри).

Суцільна лінія (0) представляє випадок відсутності перехідного шару у рідині (нахил становить  $\sim 1.6$ ). Інші лінії на рис.3 відображають різні комбінації параметрів першого та другого перехідних приповерхневих шарів. Лінія 1 стосується випадку, коли на поверхні знаходиться шар  $d_{i1} = 20$  нм з  $N_{i1} = 1.35$  (вище вихідного значення  $N_b$  на 0.02). Наслідком цього виявляється: по-перше, збільшення  $\varphi_{ППР}$  майже на півградуса у порівнянні з точкою 0, а по-друге, зменшення нахилу таким чином, що із зростанням  $N_b$  лінія 1 перетинає лінію 0 при  $N_b = 1.35$  й далі віддаляється від неї. Ця точка, що зветься точкою просвітлення, дозволяє легко визначити  $N_{i1}$ . Цікаво, що коли  $N_{i1} = 1.31$ , тобто на 0.02 менше вихідного ( $N_b = 1.33$ ), то значення  $\varphi_{ППР}$  дзеркально пересунеться донизу приблизно на ті ж  $0.5^\circ$  (лінія 10). При цьому нахил зберігається як у лінії 1. Природно, що лінія 10 розходиться з лінією 0 та про їх перетинання мова не йде (цей приклад наведено для ілюстрації та в подальшому обговорюватися не буде). Далі будемо вважати, що  $N_{i1}$  величина стала і дорівнює приблизно 1.35, як нами було показано у [33]. Лінія 2 відповідає збільшенню шару  $d_{i1}$  удвічі до 40 нм. Помітно, що у лівій точці графіка величина  $\varphi_{ППР}$  зросла майже у два рази порівняно з лінією 1, однак перетин лінії 2 з лінією 0 відбувається також при  $N_b = 1.35$ . Так як на інтерфейсі з'являється тонкий шар  $d_{i1}$  з рефракцією  $N_{i1} > N_b$ , то показник заломлення цього шару можна визначити за точкою перетину прямої  $\varphi_{ППР}(\varphi_{ПВВ})$  з прямою 0 при  $N_{i1} = N_b$ .



**Рис.3.** Розрахункові залежності між кутами  $\varphi_{ППР}$  і  $\varphi_{ПВВ}$  для комбінації товщини та показника заломлення складових перехідного шару, що наведені у таблиці.



**Рис.4.** Вплив товщини перехідного шару між поверхнею плівки золота та об'ємом досліджуваного середовища на кут нахилу залежності  $\varphi_{ППР}(\varphi_{ПВВ})$  або значення коефіцієнта  $K = d\varphi_{ППР}/d\varphi_{ПВВ}$ .

Розглянемо випадок, коли поряд з шаром  $d_{i1}$  на інтерфейсі з'являється другий додатковий шар  $d_{i2}$ . Цьому відповідає лінія 3, для якої  $d_{i2} = 100$  нм,  $N_{i2} = 1.335$  (буфер). Сумарна товщина перехідного шару при цьому зростає у 6 разів, однак початкове значення  $\varphi_{ППР}$  (при  $N_b = 1.33$ ) збільшується незначно у порівнянні з лінією 1 (крайні точки ліворуч), але суттєво зменшується нахил прямої 3. Якщо  $N_{i2}$  збільшити до 1.35 (лінія 4), нахил зберігається і лінія 4 перетинає лінію 0 у тій самій точці, що лінії 1 й 2, оскільки  $N_{i1} = N_{i2} = 1.35$  та фактично існує лише один перехідний шар. Розглянемо вплив зміни показника заломлення першого приповерхневого перехідного шару  $N_{i1}$  на поведінку функції  $\varphi_{ППР}(\varphi_{ПВВ})$  – лінії 5 і 6. Помітно, що зі зростанням  $N_{i1}$  від 1.35 (лінія 4) до 1.4 й 1.48 лінії залишаються візуально паралельними, а їхні початкові точки переміщуються угору до  $64.2$  та  $65.7^\circ$ . Модель для ліній 7, 8 і 9 відрізняється від ліній 4, 5 і 6 товщиною другого перехідного шару  $d_{i2} = 200$  нм. Збільшення  $d_{i2}$  у два рази призводить до зменшення нахилу прямих, що відповідає зростанню значення  $\varphi_{ППР}$  у початкових точках приблизно на  $0.3^\circ$ .

Досліджувані моделі однозначно свідчать, що наявність перехідного шару між поверхнею плівки золота та об'ємом досліджуваного середовища призводить до зменшення кута нахилу залежності  $\varphi_{ППР}(\varphi_{ПВВ})$  або значення коефіцієнта  $K = d\varphi_{ППР}/d\varphi_{ПВВ}$  при варіації  $N_b$ . Залежність параметра  $K$  від товщини приповерхневого перехідного шару (рис.4) виглядає як спадаюча функція, що наближається до нуля при  $d > 350$  нм, а при  $d = 0$  –  $K = 1.6$ . Таким чином, якщо впродовж експерименту провести виміри двох різних пар кутів  $\varphi_{ППР}$  і  $\varphi_{ПВВ}$ , можливо зробити однозначний висновок про наявність та товщину перехідного шару. Фізичний зміст цієї залежності полягає в тому, що близькі до поверхні золота ділянки розташовані в області найбільшого резонансного підсилення електромагнітного поля світла. Та якщо зміна рефракції оточуючого середовища не лежить у цій області, така зміна не впливає на значення  $\varphi_{ППР}$  і, тому використання ефекту ППР – безглуздо. Іноді значення показника заломлення перехідного шару  $N_{i1}$  можна визначити за кутом  $\varphi_{ПВВ}$ , який відповідає перетину експериментальної кривої (наприклад, 1, 2, 4) з кривою 0, за формулою  $N_{i1} = N_{gl} \cdot \sin\varphi_p$ , де  $\varphi_p$  – кут перетину (штрихова вертикальна лінія на рис.3). Звичайна річ, для цього необхідно наперед знати співвідношення  $\varphi_{ППР}$  і  $\varphi_{ПВВ}$  для використовуваного носія плазмонних коливань (плівки хром-золото), що має контакт з гомогенним середовищем – водою чи буферним розчином (лінія 0). Як помітно із формули (1) та рис.3, емпіричний



нахил  $K = 1.6$  при відсутності приповерхневих шарів забезпечує мінімальну погрішність у розрахунку  $\varphi_{ППР}$  за відомим значенням  $\varphi_{ПВВ}$  і складає  $0.05^\circ$  незалежно від коефіцієнта екстинкції плівки золота. Тому, якщо є впевненість, що система двофазна, то знаючи величину  $\varphi_{ППР_0}$  для одного значення  $N_b$ , можливо завжди знайти значення  $\varphi_{ППР}$  для будь-якого іншого значення  $N_b$  за формулою  $\varphi_{ППР} = \varphi_{ППР_0} + 1.6 \cdot (\varphi_{ПВВ} - \varphi_{ПВВ_0})$ . Таким чином, щоб зробити висновок про наявність перехідних шарів у досліджуваній системі, необхідно мати хоча б одне вимірювання пари  $\varphi_{ППР}$  і  $\varphi_{ПВВ}$  для дійсно різкої границі „золото-рідина”. Зазвичай у якості такої пари обирають перше вимірювання  $R(\varphi)$  для свіжого зразка у контакті з відомими рідинами – водою чи стандартним буферним розчином. При дослідженні зразків крові значення  $N_b$  заздалегідь невідоме, тому необхідно потурбуватися про його вимір, виходячи з інших оптичних експериментів. Таким чином, відкривається можливість оцінювання товщини перехідного шару за нахилом  $K = d\varphi_{ППР}/d\varphi_{ПВВ}$  для двох вимірів: у референтному середовищі (буфер чи вода) та досліджуваному середовищі (промиті буферним розчином й розбавлені зразки клітин крові).

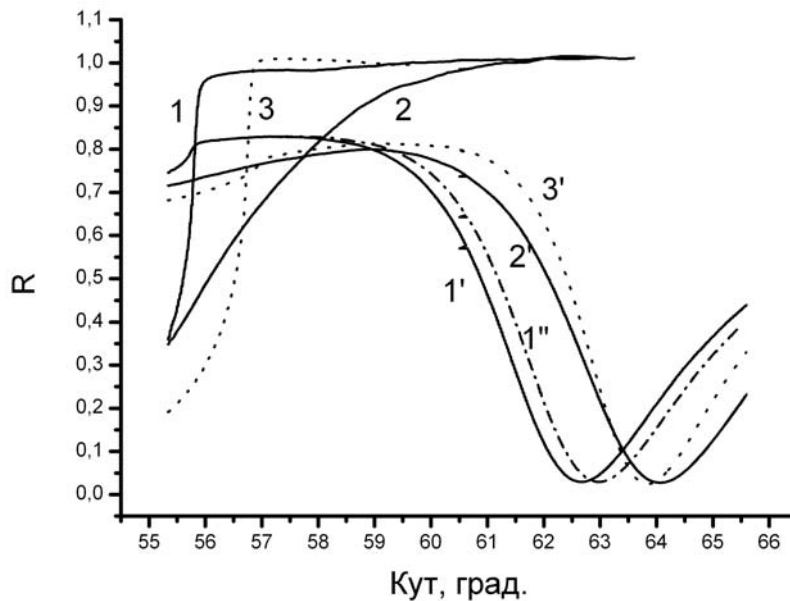
#### 4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РЕЗУЛЬТАТИ

В експериментальній частині проведено експерименти по паралельному дослідженню ефектів ППР і ПВВ при контакті поверхні плівки золота та скла зі зразками клітин крові (суспензією еритроцитів): клітинами крові  $\sim 100\%$  гематокрита (об’ємний процент заповнення крові еритроцитами); промитими буферним розчином еритроцитами крові у розбавленнях 3:1 (75% гематокрит) та 1:1 (50% гематокрит), а також при використанні гемолізу крові, результатом якого є руйнування мембран еритроцитів та перетворення сильнорозсіювальні клітин у слабкорозсіювальні дрібні фрагменти. Для розрахунку „нульової” залежності  $\varphi_{ППР}(\varphi_{ПВВ})$  за формулою (1), перше вимірювання кутової залежності коефіцієнта відбиття світла  $R(\varphi)$  проводили у контакті з буферним розчином ( $N_b = 1.335$ ).

**Методи і матеріали.** Вимірювання повної кривої ППР проводили у геометрії Кретчмана на основі ретровідбивної призми при механічній зміні кута падіння світла в діапазоні  $55 \div 66$  градусів (у склі) з використанням автоматизованого біосенсора типу „Плазмон” [41].

Тонкі (50 нм) шари золота наносили методом термічного випаровування у вакуумі (ВУП-4; залишкове тиснення парів  $4 \cdot 10^{-4}$  Па, швидкість нанесення  $40 \div 50 \text{ \AA}/\text{с}$ ) на скляну підкладку (ТФ-1,  $20 \times 20 \text{ мм}^2$ ,  $N_{gl} = 1.61$ ) з попередньо нанесеним шаром хрому (порядку 2 нм). Чипи зберігали при кімнатній температурі у контейнері з азотом та перед експериментом додатково не обробляли. При вимірюванні кута ПВВ використовували скляні підкладки без шару золота.

**$R(\varphi)$  для клітин крові  $\sim 100\%$  гематокрита.** Експериментальні кутові залежності коефіцієнта відбиття світла  $R(\varphi)$  наведені на рис.5. Криві 1-3 отримані при відбитті від чистого скла: 1 – у контакті з буфером, 2 – у контакті з клітинами крові  $\sim 100\%$  гематокрита, 3 – у контакті з клітинами крові після гемолізу  $\sim 100\%$  гематокрита. При відбитті світла від поверхні скла у контакті з клітинами крові  $\sim 100\%$  гематокрита (крива 2) зникає різка границя в області прозорості, що спостерігається при контакті з буфером (крива 1). У той же час, гемоліз крові (руйнування клітин еритроцитів мікронного розміру) призводить до повернення границі прозорості (крива 3), що дозволяє визначити величини кута  $\varphi_{ПВВ} = 57.02^\circ$  і показника заломлення  $N_b = 1.3505$  для клітин крові 100% гематокрита. При відбитті світла від скла, вкритого плівкою золота (криві 1', 1'', 2', 3') спостерігається чіткий мінімум ППР для усіх зразків (аналітів). Криві 1' і 1'', отримані у контакті з буфером до та після контакту з клітинами крові, демонструють процес формування неспецифічно зв’язаного шару білків із плазми крові [33], який проявляється у тому, що мінімум ППР не вертається до попереднього значення приблизно на  $0.3^\circ$ .

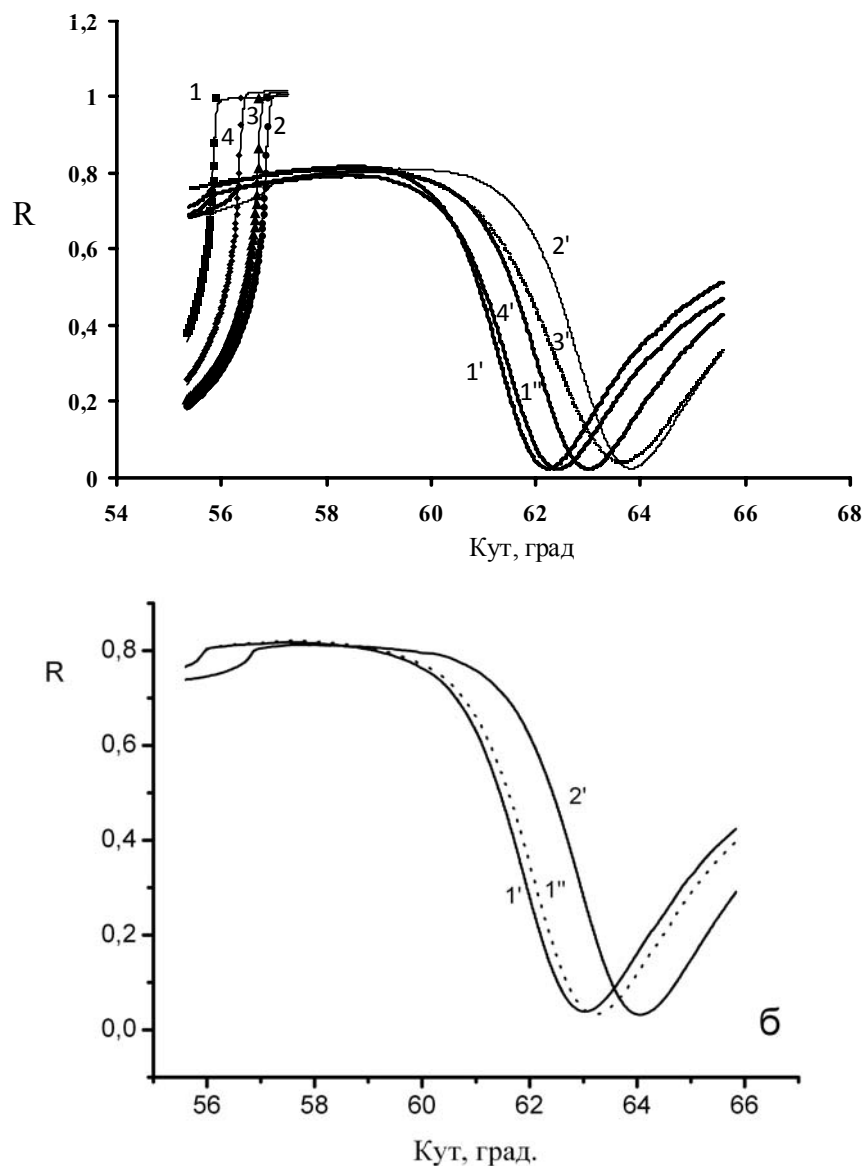


**Рис.5.** Експериментальні кутові залежності коефіцієнта відбиття світла  $R(\varphi)$  для контакту поверхні скла і золота з буфером, клітинами крові  $\sim 100\%$  гематокрита та клітинами крові після гемолізу  $\sim 100\%$  гематокрита: 1, 2, 3 – при відбитті від поверхні скла; 1', 1'', 2', 3' – при відбитті від поверхні плівки золота; 1, 1', 1'' – у контакті з буфером; 2, 2' – у контакті з клітинами крові  $\sim 100\%$  гематокрита; 3, 3' – у контакті з клітинами крові після гемолізу  $\sim 100\%$  гематокрита; 1' і 1'' – у контакті з буфером до та після контакту з кров'ю.

Необхідно відзначити, що для кривих 1', 1'', 3' в області  $57^\circ$  спостерігається характерна сходинка і її кутове положення співпадає з кутом ПВВ на кривих 1 й 3. Однак максимальне відбиття у присутності на поверхні скла плівки золота настає не при  $R = 1$ , а при  $R = 0.82$  через поглинання світла у плівці металу. Заміна буфера на зразок крові (криві 1, 2) докорінно змінює форму та кривину залежності  $R(\varphi)$ : для 1 в області  $55 \div 56^\circ$  нахил кривої зростає при наближенні до  $\varphi_{ПВВ} = 56^\circ$ , а для 2 навпаки, зі збільшенням кута нахилу падіння світла спостерігається зниження нахилу таким чином, що значення  $R = 1$  досягається при більше ніж  $62^\circ$ ! Однак для крові після гемолізу (3, 3') залежності  $R(\varphi)$  мають вигляд характерний для різкої границі розділу двох фаз.

**$R(\varphi)$  для клітин крові після гемолізу розбавлених буфером.** В теоретичній частині статті було показано, що у дисперсних системах для отримання інформації про перехідний шар необхідно знати два параметра:  $\Delta\varphi_{ПІПР}$  і  $\Delta\varphi_{ПВВ}$  при двох значеннях  $N_b$  (показник заломлення аналіта). Рисунок 6а демонструє результат розбавлення клітин крові після гемолізу з використанням буфера. Криві 1, 1', 1'' отримані у контакті з буфером, криві 2, 2' – з клітинами крові після гемолізу  $\sim 100\%$  гематокрита, криві 3, 3' і 4, 4' – з клітинами крові після гемолізу 75% (розбавлення буфером 3:1) та 50% (розбавлення буфером 1:1) гематокрита відповідно.

Залежності  $R(\varphi)$  для контакту усіх аналітів (1÷4) з поверхнею скла наведені на рис.6а: лінії відповідають експерименту, а точки розраховані за формулами Френеля (двофазна система). Співставлення кривих показує добре узгодження експериментальних даних із розрахованими за винятком невеликої ділянки поблизу  $R = 1$ . Ця особливість співпадає з літературними даними [42] та свідчить про невелике відхилення обраної моделі від реальних умов. Кількісне співставлення розрахованої кривої та експериментальних точок отримано шляхом мінімізації цільової функції при варіації об'ємного показника заломлення аналіта  $N_b$  (друга колонка таблиці 1).



**Рис.6.** Експериментальні кутові залежності коефіцієнта відбиття світла  $R(\varphi)$ . а – для контакту поверхні скла (1÷4) і золота (1'÷4') зі зразками клітин крові після гемолізу при розбавленні буфером: 1, 1', 1'' – буфер; 2, 2' – клітини крові після гемолізу ~ 100% гематокрита; 3, 3' – клітини крові після гемолізу 75% гематокрита (розбавлення буфером 3:1); 4, 4' – клітини крові після гемолізу 50% гематокрита (розбавлення буфером 1:1). Експериментальні точки, що отримані у контакті зі склом, показані на графіку суцільними лініями, а значки відповідають розрахунку за формулами Френеля для двофазної системи. б – для контакту поверхні плівки золота з буфером до (1) та після (1'') контакту з плазмою крові (2), які демонструють рівність кута ПВВ для кривих 1' й 1''.

Таблиця 1. Значення  $N_b$ ,  $\varphi_{ПВВ}$ ,  $\varphi_{ППР}$  для клітин крові після гемолізу при розбавленні буфером

Аналіти	$N_b$	$\varphi_{ПВВ}$	$\varphi_{ППР}$
Буфер до контакту з плазмою крові	1.335	56.01	62.26
Буфер після контакту з плазмою крові	1.335	56.01	62.48
Гемоліз 50% гематокрит	1.34	56.464	63.02
Гемоліз 75% гематокрит	1.3434	56.69	63.40
Гемоліз 100% гематокрит	1.3505	57.01	63.88
Плазма крові	1.345	56.8	64.01

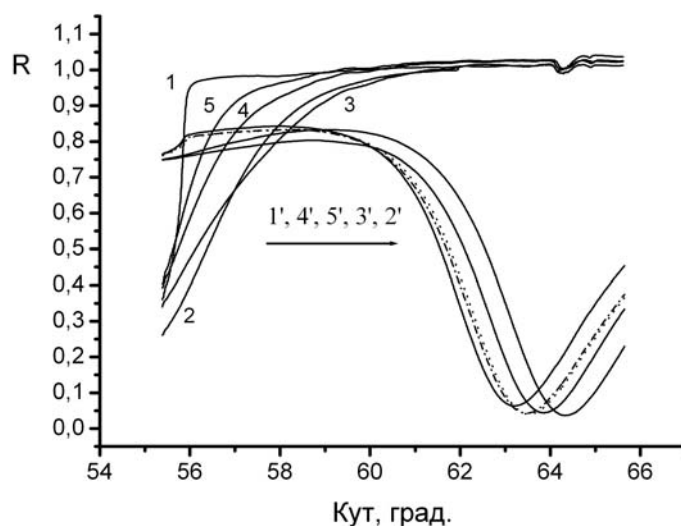
Аналогічні вимірювання на іншому прозорому об'єкті – плазмі крові – продемонстровані на рис. 6б, а у таблиці 1 наведені значення  $N_b$ ,  $\varphi_{ПВВ}$  і  $\varphi_{ППР}$  для усіх аналітів. Отримані результати свідчать, що суспензія еритроцитів після гемолізу являє собою оптично однорідне середовище, а кутова залежність відбиття світла  $R(\varphi)$  при її контакті з поверхнею скла добре описується рівнянням Френеля для двофазної системи. Це надає можливість точного визначення показника заломлення об'ємної фази досліджуваних аналітів у контакті з поверхнею плівки золота.

**$R(\varphi)$  для клітин крові без гемолізу промитих та розбавлених буфером.** Інші результати виходять для клітин крові без гемолізу (нативні)  $\sim 100\%$  гематокрита, а також нативних клітин крові, промитих та розбавлених буферним розчином (рис.7) у контакті з поверхнею скла ( $1 \div 5$ ) і золота ( $1' \div 5'$ ). Представимо експерименти у наступній послідовності: 1, 1' – буфер; 2, 2' – клітини крові  $\sim 100\%$  гематокрита; 3, 3' – промиті буфером клітини крові  $100\%$  гематокрита (штрихова лінія); 4, 4' і 5, 5' – промиті та розбавлені буфером до  $75\%$  (розбавлення 3:1) й  $50\%$  (розбавлення 1:1) клітини крові (суспензія еритроцитів у розбавленнях).

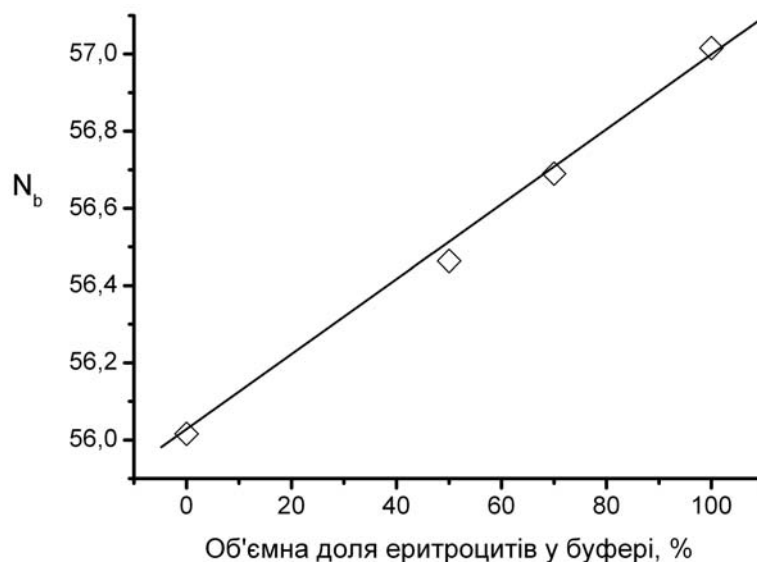
У контакті зі склом тільки крива 1 демонструє різку границю „пропускання-повне відбиття” в області кута  $\varphi_{ПВВ} \sim 56^\circ$ , яка змінюється ділянкою повільного росту у контакті зі зразками клітин крові. Найбільшу крутість та зсув вбік збільшення кутів демонструє контакт з нативними клітинами крові (2). Промивання (3) і розбавлення (4 й 5) нативних клітин крові (які не виявляють чіткої сходинки, властивій куту ПВВ у двофазних системах), у буфері наближує лінії до 1. Похідна  $dR/d\varphi$  кривих 3÷5 регулярно зменшується до  $R = 1$ , що не дозволяє експериментально отримати значення об'ємного показника заломлення ( $N_b$ ) цих аналітів. Тому для оцінки параметра  $N_b$  можна скористатися даними, що отримані для зразків того ж складу після гемолізу (рис.6, таблиця 1). Рисунок 8 представляє залежність  $N_b$  від ступеня розбавлення для зразків крові після гемолізу, де експериментальні значення представлені точками, а розрахунок (суцільні лінії) проведено за середньозваженою формулою [43]:

$$N_b = x \cdot N_{100\%} + (1 - x) \cdot N_l, \quad (3)$$

де  $N_l$  – показник заломлення буфера. Достатньо добра збіжність експериментальних значень з розрахунковими переконає у коректності застосування процедури визначення  $N_b$  і, отже, формули  $\varphi_{ПВВ} = \text{asin}(N_b / N_{gl})$ .



**Рис.7.** Експериментальні кутові залежності коефіцієнта відбиття світла для контакту поверхні скла ( $1 \div 5$ ) і золота ( $1' \div 5'$ ) зі зразками клітин крові без гемолізу при розбавленні буфером: 1, 1' – буфер; 2, 2' – клітини крові  $100\%$  гематокрита; 3, 3' – промиті буфером клітини крові  $100\%$  гематокрита (штрихова лінія); 4, 4' – промиті буфером клітини крові  $75\%$  гематокрита (розбавлення буфером 3:1); 5, 5' – промиті буфером клітини крові  $50\%$  гематокрита (розбавлення буфером 1:1).

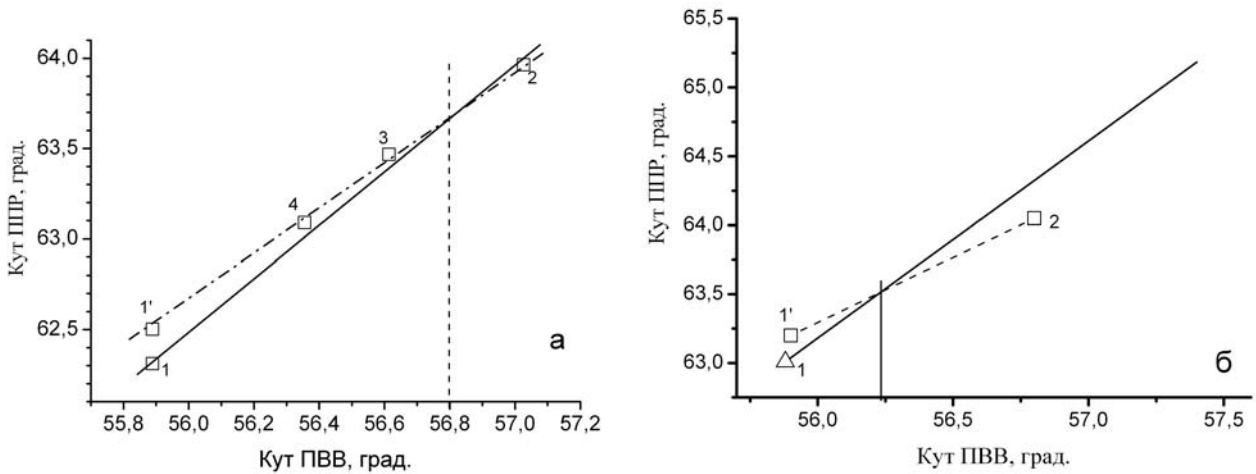


**Рис.8.** Залежність об'ємного показника заломлення ( $N_b$ ) клітин крові після гемолізу від об'ємної долі клітин крові (еритроцитів) при розбавленні буфером.

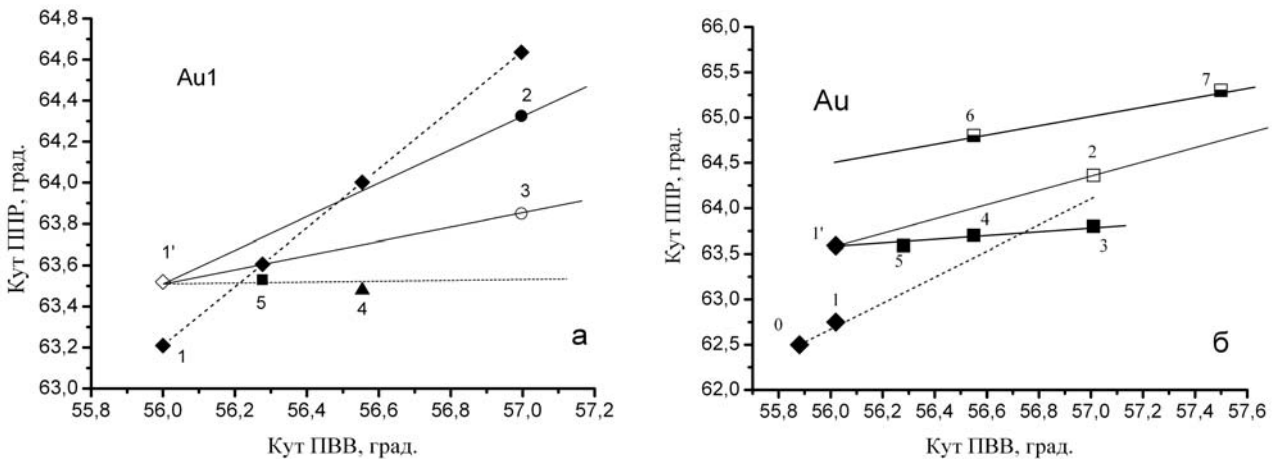
При гемолізі клітин крові 100% гематокрита у 2 мл крові додається всього 100 мкл (парціальний об'єм не перевищує 5%) ПАР (поверхнево-активної речовини) Triton X100 (показник заломлення 1.46), що не може значно змінити вихідний показник заломлення досліджуваного аналіта. Таким чином, значення  $N_b$  і  $\varphi_{ПВВ}$  для промитих і розбавлених буфером еритроцитів будуть близькими до клітин крові після гемолізу (таблиця 1).

**$\varphi_{ППР}(\varphi_{ПВВ})$  при розбавленні зразків клітин крові.** Після того, як встановлені значення  $\varphi_{ПВВ}$  для кожного розбавлення, і, використовуючи дані для  $\varphi_{ППР}$ , що представлені на рис. 5÷7, проаналізуємо рух „точки взаємозв'язку кутів”  $\varphi_{ППР}(\varphi_{ПВВ})$  для зразків клітин крові при розбавленні у контакті з різними плівками золота. Перше (реперне) значення  $\varphi_{ППР}$  отримано на свіжому чипі золота у контакті з буфером (точка 1) для розрахунку „нульової” залежності  $\varphi_{ППР}(\varphi_{ПВВ})$  за формулою (1), а точка 1' характеризує значення  $\varphi_{ППР}$  для того ж чипу і у тому ж середовищі, але після контакту з плазмою крові (точка 2). Положення точки 1' відтворюється у контакті з буфером при усіх подальших маніпуляціях зі зразками крові, що свідчить про стабільність товщини шару білків плазми крові, сформованого у першу мить взаємодії з поверхнею плівки золота. Сенс інших точок пояснюється у підписах до рисунків.

На рис. 9а показана еволюція „точки взаємозв'язку” у координатах ( $\varphi_{ПВВ}$ ,  $\varphi_{ППР}$ ) для випадків контакту свіжої поверхні плівки золота (Au2) з буфером, зразком крові після гемолізу ~ 100% гематокрита та його розбавленнями буфером до 75 і 50% від об'єму. Експериментальні точки лежать на прямій лінії (штрихова), яка перетинає суцільну лінію при  $56.87^\circ$  (перпендикуляр до осі абсцис). Припускаючи, що у цьому випадку існує тільки один перехідний шар, за значенням кута перетину, ми розрахували його показник заломлення  $N_{il} = 1.348$ . А товщину цього шару ( $d_{il} = 25$  нм) ми оцінили, виходячи з нахилу штрихової лінії рис.2а та калібрувальної кривої рис. 4. Другий прозорий зразок – плазма крові – демонструє приблизно те саме поведіння (рис. 9б). Пряма 1'-2 перетинає розраховану лінію з нахилом ~ 0.85, що відповідає товщині  $d_{il} \approx 50$  нм, а перетин ліній відбувається при  $\sim 56.7^\circ$ , що дає  $N_{il} \approx 1.4$ .



**Рис. 9.** Положення „точки взаємозв’язку” кутів  $\varphi_{ППР}(\varphi_{ПВВ})$ . а – для контакту поверхні плівки золота з буфером до (1) та після (1’) контакту зі зразками клітин крові після гемолізу: 2 –  $\sim 100\%$  гематокрита, 3 –  $75\%$  гематокрита (розбавлення буфером 3:1), 4 –  $50\%$  гематокрита (розбавлення буфером 1:1). Суцільна лінія – розрахунок „нульової” залежності  $\varphi_{ППР}(\varphi_{ПВВ})$  за формулою (1) при відсутності перехідного шару. б – для контакту поверхні плівки золота з буфером до (1) та після (1’) контакту з плазмою крові (2).



**Рис. 10.** Положення „точки взаємозв’язку” кутів  $\varphi_{ППР}(\varphi_{ПВВ})$  для контакту поверхні різних чипів Au1 (а) і Au (б) з буфером до (1) та після (1’) контакту зі зразками клітин крові без гемолізу: 2 – клітини крові  $100\%$  гематокрита, 3 – промиті буфером клітини крові  $100\%$  гематокрита, 4 – промиті буфером клітини крові  $75\%$  гематокрита (розбавлення буфером 3:1), 5 – промиті буфером клітини крові  $50\%$  гематокрита (розбавлення буфером 1:1). Штрихова лінія – розрахунок „нульової” залежності  $\varphi_{ППР}(\varphi_{ПВВ})$  за формулою (1) при відсутності перехідного шару. Точки 6 і 7 розраховані на основі даних роботи [5] для контакту поверхні плівки золота з шаром клітин НЕК-293 у двох різних розчинах солей. Точка 0 належить до чистої води.

Залежності  $\varphi_{ППР}(\varphi_{ПВВ})$  для контакту різних чипів таблиці 2 зі зразками клітин крові без гемолізу показані на рис.10а,б. Вихідні точки 1 і 1’ стосуються контакту з буфером до та після контакту зі зразками клітин (чи плазми) крові відповідно. У результаті контакту плівки золота зі зразками крові на її поверхні формується зв’язаний молекулярний шар білків плазми крові (точка 1’ завжди вища за точку 1). Фазова товщина (ф.т. =  $2\pi N_{il} \cdot d_{il}/\lambda$  (градуси)) шару  $d_{il}$  для зразка рис. 10а (Au1) складає  $\sim 0.3^\circ$ , а для зразка рис. 10б (Au)  $\sim 0.8^\circ$ . Точка 2 (контакт з нативними клітинами крові  $\sim 100\%$  гематокрита) розташована достатньо близько до штрихової лінії в обох випадках, а нахил відповідних ліній (1’-2) – найбільший. Точки 3 (промиті еритроцити  $\sim 100\%$  гематокрита) в обох випадках лежать значно нижче за точки 2, а подальше розбавлення зразків буфером призводить до того, що точки 4 і 5

опускаються ще нижче, якісно вкладаючись на пряму лінію з практично горизонтальним ухилом. Для прикладу на рис. 10б також наведені дані роботи [5] для моношару клітин невмирущої лінії НЕК-239, що розраховувалися наступним чином. Ми визначили з приведених у джерелі рисунків значення кутів  $\varphi_{ПВВ}$ ,  $\varphi_{ППР}$  на основі залежності для контакту поверхні плівки золота з шаром клітин НЕК-239 у двох різних розчинах солей та перерахували ці значення з урахуванням показника заломлення призми, що використано у нашій роботі (точки 6 і 7). Далі по нахилу ( $K = 0.215$ ) лінії (6-7) визначили товщину перехідного шару. Аналогічна процедура з донорськими даними одного з авторів статті [33] призвела до таких результатів –  $N_b = 1.406$ ,  $d_{i1} = 34$  нм,  $d_{i2} = 50$  нм. Усі вищезгадані відомості зведені у таблиці 2.

## 5. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

**Об’ємний показник заломлення крові.** Підсумкові параметри моделі рис.1 для всіх досліджуваних аналітів, а також дані з літературних джерел наведені у таблиці 2. Для прозорих аналітів – клітин крові після гемолізу та плазми крові (перші два рядки даних) – значення об’ємного показника заломлення встановлені. Для плазми крові  $N_b = 1.345$ , що співпадає з даними [44] – 1.345, [14] – 1.3479 та [17] – 1.345. У той же час, для клітин крові ~ 100% гематокрита  $N_b = 1.3505$  відрізняється від  $N_b = 1.406$ , що наведено у [29,33]. Таку різницю треба пояснити на основі аналізу відомих даних. В оглядовій статті [13] величина зв’язана з концентрацією гемоглобіну крові формулою  $N_b(\lambda, c_{Hb}) = N_{H_2O}(\lambda) + c_{Hb} \cdot \alpha(\lambda)$ , де  $N_{H_2O}$  – показник заломлення води,  $c_{Hb}$  – концентрація гемоглобіну (г/л),  $\alpha$  – експериментально встановлений коефіцієнт (рис.3 джерела [13]). Оскільки при 100% гематокриті вміст гемоглобіну у нормі становить біля 250 г/л, отримуємо для  $\alpha$  при  $\lambda = 650$  нм наступні значення:  $2.7 \cdot 10^{-4}$  [18];  $2.12 \cdot 10^{-4}$  [13,45];  $1.45 \cdot 10^{-4}$  [46,47]. Це відповідає наступним показникам заломлення для крові 100% гематокрита: 1.40, 1.386 й 1.369. Перша цифра 1.40 добре узгоджується з наведеною у [29,33] цифрою 1.406 (останній рядок таблиці 2). Однак величина  $N_b = 1.3505$  навіть нижча за значення [46]. Причинами цього може бути зниження концентрації гемоглобіну в еритроцитах через патології організму людини або зниження парціальної долі еритроцитів у нижній частині трубки для центрифугування. В роботі [12] показано, що у хворих на гіпохромію показник заломлення еритроцитів може бути на 0.02 менший, ніж у клітин здорових людей. В статтях [48,49] наголошено на тому, що у показники гематокрита треба вводити корекцію до 10% за рахунок неповного видалення плазми крові, тобто реальним гематокрит може бути 90-95% замість 100%. Враховуючи ці поправки та вищезазначений розрахунок, отримуємо  $N_b = 1.373...1.345$ , куди укладається отримане значення  $N_b = 1.3505$ . Найбільш вірогідна причина такого розходження полягає у тому, що у [33] кров для дослідження забирали у одного з авторів, а в даній роботі дослідження проведені на випадковому зразку з банку крові.

Таблиця 2. Підсумкові параметри перехідних шарів для контакту поверхні різних чипів зі зразками нативних, промитих у буфері (пр.) і розбавлених буфером еритроцитів.

чип	$d_{i1}$		$d_{i2}$ нативні		$d_{i2}$ пр. 100%		$d_{i2}$ пр. 75%		$d_{i2}$ пр. 50%		$N_b$	$N_{il}$
	ф.т.°	$d$ , нм	$K$	$d$ , нм	$K$	$d$ , нм	$K$	$d$ , нм	$K$	$d$ , нм		
гемоліз	0.22	25									1.3505	1.348
плазма	0.3	50									1.345	1.339
Au1	0.31		0.805	60	0.33	180	0	400+	0	400+	1.3505	
Au	0.84		0.45	105	0.15	280	0.15	280	0.15	280	1.3505	
[5]	?	?	0.215	190	-	-	-	-	-	-	1.356	?
[33]	0.3	34	0.87	50	-	-	-	-	-	-	1.406	1.35

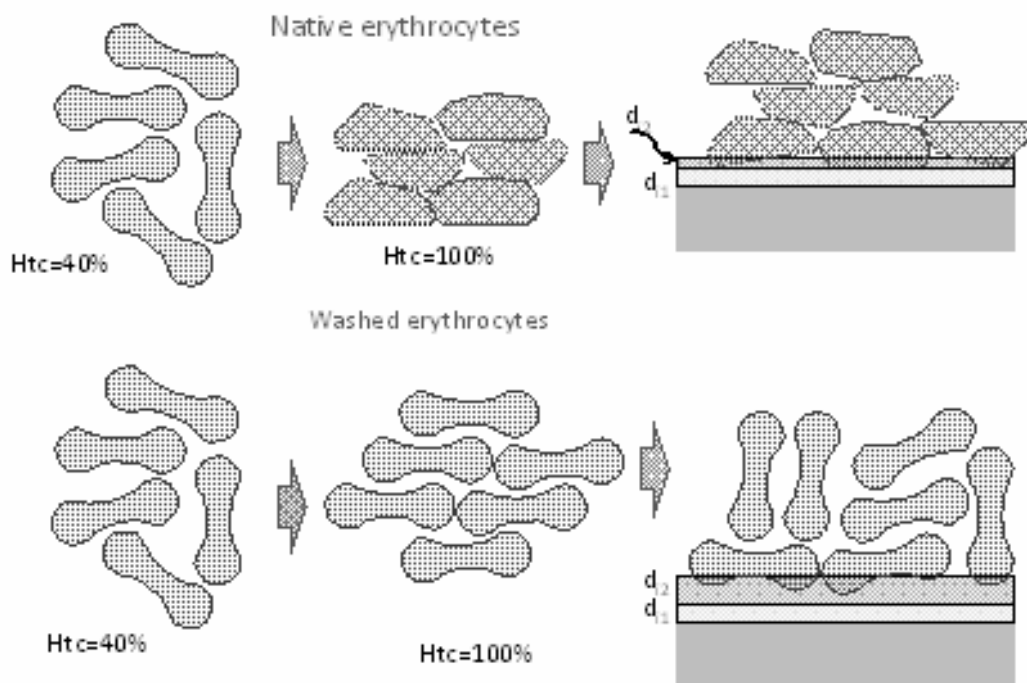
**Перехідний шар для контакту золота з плазмою крові та еритроцитами після гемолізу.** Розмір еритроцитів на порядок вищий за довжину хвилі падаючого світла ( $\lambda$ ), коли розмір частинок (білків плазми крові та залишків мембран еритроцитів після гемолізу) плазми крові та клітин крові після гемолізу значно менший за  $\lambda$ . У плазмі крові мають перевагу глобулярні білки – альбуміни, а у залишків мембран еритроцитів після гемолізу – білок гемоглобін (до 29-30%), який має інтенсивний пік поглинання при  $\lambda = 430$  нм і слабший – при 570 нм. На довжині хвилі 650 нм поглинання гемоглобіну на 2 порядки менше, ніж при  $\lambda = 430$  нм, що і зумовлює інтенсивний червоний колір крові. Зазвичай молекули білку можуть встановлювати досить міцний зв'язок з поверхнею плівки золота через групу HS у цистеїні та формувати шар зв'язаних білків. Гемоглобін включає чотири одиниці цистеїну, що надає йому змогу також зв'язуватися з поверхнею золота. Відомо [33], що у результаті такого неспецифічного зв'язування виникає шар, який має підвищену, у порівнянні з об'ємом, концентрацію білків товщиною 25-30 нм. Упаковка білків у цьому шарі не є щільною, а значну частину займає рідка фаза – розчин солей у воді (буфер). Показник заломлення цього перехідного шару залежить від рефракції рідкої фази та становить  $N_{il} \sim 1.352$  для води, а при зміні води на буфер  $N_{il}$  зростає до 1.353-1.358. Ми отримали більш низьке значення  $N_{il} = 1.348$  для еритроцитів після гемолізу (рис. 9, таблиця 1). Це може спричинитися присутністю гемоглобіну, що має меншу кількість цистеїну, а отже знижену кількість зв'язків Au=S порівняно з іншими білками плазми крові. Іншими факторами можуть слугувати наявність безформних уламків клітинних мембран, що перешкоджають формуванню більш щільного шару, або невелика кількість молекул ПАВ Triton X100. Однак враховуючи на невисоку точність запропонованого підходу при визначенні  $N_{il}$ , зазначену збіжність можливо вважати достатньо задовільною. Той же висновок стосується експерименту з плазмою крові, де знайдено  $N_{il} = 1.339$ . Важливим фактором збільшення  $d_{il}$  до 50 нм може бути конкуренція різних білків „об'ємної” плазми крові при встановленні рівноваги між об'ємом та зв'язаними білками (адсорбція-десорбція). У будь-якому випадку, наявність невеликого перехідного шару між плоскою поверхнею золота і достатньо гомогенною (у порівнянні з  $\lambda$ ) гемолізованою суспензією є виправданою. Такий шар повинен формуватися також у випадку контакту поверхні золота з нативними еритроцитами, оскільки певна кількість плазми залишається через неможливість повного витискання рідини із суспензії, що містить частинки некубічної форми. З цього приводу наявність шару слід прийняти як неминучу обставину, перш ніж перейти до аналізу сильнонеоднорідної суспензії – нативних клітин крові  $\sim 100\%$  гематокрита та промитих буфером еритроцитів.

**Перехідний шар для контакту золота з нативними еритроцитами.** На рис.10 а,б показана еволюція „точки взаємозв'язку кутів” у координатах ( $\varphi_{ПВВ}$ ,  $\varphi_{ППР}$ ) для контакту поверхні плівки золота з різними зразками клітин крові. Вихідні точки 1 і 1' належать до контакту з буфером до та після контакту зі зразками клітин крові (чи плазми крові) відповідно. Точка 1' знаходиться завжди вище точки 1, що свідчить про наявність шару зв'язаних білків  $d_{il}$  з фазовою товщиною  $0.3^\circ$  (Au1) та  $0.84^\circ$  (Au) (таблиця 2). Як показано у [33], його товщина визначається кількістю молекул білку у плазмі крові і формується випадковим чином. Розкид за товщиною  $d_{il}$  обумовлений поверхневими властивостями плівки золота і залежить від низки причин. У даному випадку золотим чипам, що отримані у різних технологічних циклах, притаманна різна мікроструктура поверхні, яка разом з гідрофобністю поверхні, керує процесами неспецифічного зв'язування білків з поверхнею золота за рахунок SH зв'язків. При контакті клітин крові  $\sim 100\%$  гематокрита точка  $\varphi_{ППР}(\varphi_{ПВВ})$  зсувається у положення 2, наближуючись до пунктирної лінії (рис. 10а), або перетинаючи її (рис. 10б). Нахил лінії 1'-2 помітно менший за розрахований для двофазної системи і складає  $K = 0.8$  й  $0.45$  відповідно. Згідно з даними рис. 4, це свідчить про появу



шару  $d_{i2}$ . За нахилом  $K$  для цих випадків знаходимо  $d_{i2} = 60$  нм і 105 нм відповідно (таблиця 2). Згідно з наведеними припущеннями, поява цього шару найбільш вірогідно пов'язана з невідповідністю форми мембрани еритроцитів та плоскою поверхнею золота. У нормальних умовах (нативна кров) радіус кривини еритроцита становить  $\sim 1$  мкм [50,51]. З цієї причини неможливо уявити, що середня щілина між такими достатньо великими клітинами дискоїдної форми та плоскою поверхнею складає усього 100 нм. Хоча мембрана цих клітин достатньо легко деформується, щоб проникнути до мікронних капілярів, вона не може включати ділянок з надто високою кривизною (кутів), оскільки це призведе до руйнування цілісності мембрани.

На перший погляд здається звичайною справою залучити до інтерпретації описаних результатів процеси агрегації еритроцитів, що широко застосовується для виявлення запальних процесів в організмі людини. Дійсно, у процесі агрегації еритроцити спочатку злипаються у так звані rouleaux („руло”, монетні стовпчики), що виростають у нитки. Далі отримані нитки згортаються у клубочки діаметром 50 мкм під дією слабких дисперсійних сил [52,53], а потім починають тонути через різницю у щільності, зі швидкістю, що залежить від розміру клубочка. Однак для таких щільних суспензій, як кров  $\sim 100\%$  гематокрита, де клітини займають до 95% об'єму, описаний механізм агрегації та седиментації неприйнятний через відсутність достатнього простору для формування rouleaux. Для цього випадку ми залучили недавні представлення про суттєвий вплив механічних сил на форму еритроцитів при центрифугуванні [54-57]. Одним з останніх відкриттів у цьому напрямку є перетворення двоввігнутих дискоцитів на поліедроцити з великою кількістю плоских граней [58-60]. Зокрема показано, що за прискоренням більш ніж 1000g (2500 об/хв) еритроцити починають приймати форму поліедрів, які займають мінімальний простір. Однак після зняття механічного навантаження, клітини можуть релаксувати та протягом деякого часу знов приймають форму двоввігнутих дискоцитів.



**Рис. 11.** Схема формування другого перехідного шару між поверхнею плівки золота і об'ємом суспензії клітин крові: 1, 4 – вихідна кров (гематокрит 40%); 2 – кров після центрифугування 3500 об/хв (гематокрит  $\sim 100\%$ ); 3 – щільне прилягання плоских фрагментів еритроцитів до поверхні плівки золота та формування тонкого перехідного шару  $d_{i2}$ ; 5 – релаксація форми клітин після видалення білків плазми крові; 6 – формування товстого перехідного шару  $d_{i2}$ .

Наслідуючи цьому ефекту, опишемо результати досліджень нативних еритроцитів на основі рис. 11. У вихідній суспензії 1 (гематокрит 40%) клітини мають форму двоввігнутих дискоцитів. Процес центрифугування (3000 об/хв) призводить до того, що частина клітин перетворюється у поліедроцити 2 з плоскими ділянками мембрани та забезпечують достатньо щільне упакування ( $Htc = \sim 100\%$ ). Прокачування цієї щільної суспензії крізь комірку приладу „Плазмон” сприяє появі щільного механічного контакту плоскої частини еритроцитів з плоскою поверхнею шару білків  $d_{i1}$ . У результаті щілина між плоским шаром білків  $d_{i1}$  і об’ємом суспензії 3 стає мінімальною. Таким чином, досягається мінімальна ефективна відстань між плоскою поверхнею золота та об’ємом суспензії. Близькість точок 2 до штрихової лінії рис.9 відображає саме цю ситуацію. Вочевидь, це можливо тільки у випадку, коли окремі ділянки мембрани еритроцитів володіють достатньою еластичністю для зменшення загальної поверхні еритроцита при збереженні об’єму (цитоплазма клітини не стискується). Як показує таблиця 2, для нативних клітин крові товщина перехідного шару дорівнює 60 і 105 нм, а у статті [33] сума шарів  $d_{i1}$  і  $d_{i2}$  складає 84 нм. Цей факт неможливо пояснити без припущення про наявність плоских граней на мембрані еритроцитів після центрифугування. Таким чином, ми маємо справу з ансамблем поліедроцитів, що відділені від шару неспецифічно зв’язаних білків на поверхні плівки золота тонкою щілиною білків плазми крові. Розмір еритроцита (товщина 3 мкм) більш ніж на порядок перевищує товщину цієї щілини.

**Перехідний шар для контакту золота з промитими еритроцитами.** Процеси видалення плазми з нативної крові та заміна її на буферний розчин (промивка еритроцитів) суттєво змінюють структуру міжклітинного простору – вона стає більш пухкою, оскільки поверхні мембрани еритроцитів втрачають плоскі грані. Відбувається релаксація форми клітин до вихідного стану. Очевидно, це пов’язано з видаленням білків плазми крові з міжклітинного простору, що є суттєвим для здатності мембрани до зміни форми з метою досягнення мінімуму механічної енергії у системі. У результаті плоскі ділянки мембран зникають та після промивки у буфері еритроцити, в основному, зберігають вихідну кривизну – зображення 6 на рис. 11. Це призводить до зростання ефективної товщини шару  $d_{i2}$  (до 280...400 нм згідно з таблицею 2 ) і відбивається у зменшенні нахилу  $K$ , як показано для точок 3 на рис.10 а,б. За такий механізм свідчить факт визначального впливу білків плазми крові на вірогідність виникнення поліедроцитів при центрифугуванні із прискоренням понад 1000g (2500 об/хв) [60,61]. Тому в експериментах ППР, при зміні складових плазми крові, можливо помітити зміни у розмірі щілини (перехідної області) між об’ємом еритроцитів та поверхнею плівки золота. Найбільш ефективно це виявляється при дослідженні суцільних шарів клітин, що формували безпосередньо на поверхні золота (точки 6 і 7 на рис. 10, отримані у роботі [5]). У наведеному експерименті виявили присутність діелектричного шару товщиною 200 нм поблизу мембрани клітин, прилеглих до поверхні золота. Однак його показник заломлення може бути як вищим, так і нижчим за показник заломлення цитоплазми клітини в залежності від механізму формування цього шару. Зокрема, він може бути пов’язаний з неспецифічно сорбованими білками на поверхню золота або властивостям деяких органел всередині цитоплазми.

**Вплив розбавлення промитої суспензії на параметри перехідного шару.** Точки 4 і 5 на рис. 10 а,б демонструють результат розбавлення промитих клітин крові  $\sim 100\%$  гематокрита буфером до 75 й 50%. На відміну від оптично однорідних зразків нативних еритроцитів після гемолізу та плазми крові, значення  $\varphi_{ППР}$  у точках 4 й 5 для зразка рис.10а не залежить від розбавлень рідкої фази в об’ємі. Це свідчить про те, що перехідна область між поверхнею золота і об’ємом суспензії еритроцитів перевищує 400 нм та складається, в основному, з буферного розчину. Для другого чипа на рис. 10б нахил лінії 1'-3 складає менше за 0.15, що наближається до шумового розкиду, а товщина області дорівнює 280 нм.

Вірогідно, що в цьому випадку мембрана клітин ще не пройшла релаксацію до вихідної форми та зберігає деяку кількість плоских граней.

## 6. ВИСНОВКИ

1. При дослідженні кутових залежностей відбиття у геометрії Кретчмана для рідкого середовища з різними показниками заломлення кути  $\varphi_{ППР}$  і  $\varphi_{ПВВ}$  пов'язані між собою лінійною залежністю  $\varphi_{ППР} - \varphi_{ППР0} = K \cdot (\varphi_{ПВВ} - \varphi_{ПВВ0})$ , де нахил  $K$  має максимальне значення у випадку двофазної системи та зменшується з появою тонкого перехідного шару  $d_i$ . Отримано емпіричну залежність між розрахунковими значеннями  $K$  і  $d_i$  для призми з показником заломлення 1.61 та різної товщини перехідного шару. Показано, що максимальна величина  $K$  складає 1.6 та спадає до нуля при  $d_i > 400$  нм.

2. Контакт поверхні золота зі щільною суспензією еритроцитів – кров'ю 100% гематокрита – призводить до формування двох перехідних шарів: шару адсорбованих білків плазми крові ( $d_1, N_1$ ) та шару, пов'язаного з геометричним фактором невідповідності кривої поверхні еритроцита з плоскою поверхнею золота ( $d_2, N_2$ ). Товщина другого шару є ефективною та визначається кривизною клітин, контактуючих з поверхнею золота та наявністю плоских ділянок на мембрані клітини. Для нативного зразка крові  $\varphi_{ПВВ}$  можна визначити після гемолізу при руйнуванні мембран еритроцитів, у той же час величину  $\varphi_{ППР}$  можна легко виміряти незалежно від цілісності мембрани клітин. Для зразків крові після гемолізу (а також для прозорих зразків плазми крові) шар найбільш тонкий (28 і 50 нм) та складається з білків плазми та залишків мембран клітин.

3. Для контакту нативної крові 100% гематокрита без гемолізу характерне зростання перехідного шару  $d_1$  до 60-100 нм. Така незначна (у порівнянні з радіусом краю еритроцита) товщина, вірогідно, є наслідком трансформації форми еритроцитів з дискоцитів у поліедроцити при центрифугуванні, які мають можливість найбільш щільно наблизитися до плоскої поверхні золота за рахунок орієнтації плоских граней мембрани.

4. Промивка щільної маси еритроцитів буфером сприяє релаксації форми їхньої мембрани (за рахунок віддалення активних білків) від поліедроцитів до вихідного стану (дискоцитів). Тому ефективна товщина перехідного шару різко зростає до 180-280 нм. Подальше розбавлення суспензії буфером збільшує значення  $d_2$  до 400 нм та більше. В цьому випадку область зникаючого (evanescent) поля над металом не досягає об'єму суспензії і наявність еритроцитів не проявляється у сигналі ППР.

5. Перспективним для дослідження клітинних шарів є використання одночасного вимірювання кутів  $\varphi_{ППР}$  і  $\varphi_{ПВВ}$  з метою контролю еластичності мембран еритроцитів, а також цитоплазми інших клітин, які вирощені на поверхні золота. Докладні дослідження відкривають деякі перспективи контролю життєвих процесів клітин *in situ*.

**Yu.M. Shirshov, K.V. Kostyukevych, R.V. Khistosenko, N.Ya. Gridina,  
S.A. Kostyukevych, A.V. Samoylov, Yu.V. Ushenin**

## **OPTICAL CONTROL OF THE INTERFACE BETWEEN GOLD SURFACE AND BLOOD CELL SAMPLES**

The optical properties of blood (spectra of the extinction coefficient,  $k$ , refractive index,  $n$ , etc.) carry important diagnostic information and are usually monitored using bulk samples. In this work, attention is drawn to the interface between the blood volume and the surface of glass or thin gold films on it, where the refractive index may differ from the bulk one. We draw attention to the relationship between two effects – SPR and TIR. It is shown that if the named effects are measured for two different external media 0 and 1 with different refractive indices, then the values of the angles SPR and TIR will be linearly related by the empirical formula  $j_{SPR1} = j_{SPR0} + (j_{TIR1} - j_{TIR0}) \cdot K$ , where the coefficient  $K$  depends on the thickness of the transition layer  $d_i$  between the surface and the volume of the liquid medium (suspension). Numerical calculation of  $K(d_i)$  for gold films shows that  $K = 1.6$  at  $d_i = 0$  and monotonically decreases to 0.01 with an increase in  $d_i$  to 300 nm (and further to 0). Measurement of the angular dependences of reflection,  $R(j)$ , on (1) ~ 100% hematocrit blood samples, (2) hemolyzed samples and (3) washed erythrocytes with dilutions with a buffer solution. It was shown that all samples exhibit a minimum SPR, but the TIR angle can be measured only for blood samples with destroyed membranes (hemolyzed), buffer solution and plasma. The  $n$ -value for hemolyzed blood is 1.3505, which is indicative of a low hemoglobin content in the sample. At the same time,  $d_i$  for a sample of ~ 100% hematocrit was 60-105 nm, which indicates a strong deformation of erythrocytes in the form of polyhedrocytes and their dense packing after centrifugation. Washing the cells with a buffer increases  $d_i$  to 280 nm and more and practically eliminates blood cells from the SPR sensitivity region. The reason for this may be that in the blood of ~ 100% hematocrit, erythrocytes are in the form of polyhedrocytes tightly adhering to the gold surface, while as a result of washing and diluting with a buffer solution, the cells relax back into discocytes. As a result, the containing hemoglobin erythrocyte cytoplasm moves away from the surface at a distance  $d_i > 300$  nm into the suspension volume and leaves the area of the enhanced plasmon-polariton field.

**Keywords:** surface plasmon resonance (SPR), total internal reflection, (TIR), refractive index, erythrocytes, hematocrit.

1. Tuchin V.V., Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnostics, 3rd Edition, SPIE Press, Bellingham, WA (2015).
2. Novel Biophotonics Techniques and Applications III V.A. Saetchnikov, E.A. Tcherniavskaia, A.V. Saetchnikov, G.Schweiger, A.Ostendorf *SPIE Proceedings* (Optical Society of America, 2015), paper 954005.
3. Christina Boozer, Gibum Kim, Shuxin Cong, HannWen Guan, Timothy Londergan Looking towards label-free biomolecular interaction analysis in a high-throughput format: a review of new surface plasmon resonance technologies. *Current Opinion in Biotechnolog.* 17, (2006) 400–405.
4. Chiang Y.-L., Lin C.-H., Yen M.-Y., Su Y.-D., Chen S.-J., Chen H.-f. Innovative antimicrobial susceptibility testing method using surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics.* №24, (2009) 1905–1910.
5. Chabot V., Cuerrier C.M., Escher E., Aimez V., Grandbois M., Charette P. G. Biosensing based on surface plasmon resonance and living cells. *Biosensors and Bioelectronics.* №24, (2009) 1667–1673.
6. Hide M., Tsutsui T., Sato H., Nishimura T., Morimoto K., Yamamoto S., Yoshizato K. Real-Time Analysis of Ligand-Induced Cell Surface and Intracellular Reactions of Living Mast Cells Using a Surface Plasmon Resonance-Based Biosensor. *Analytical Biochemistry.* №302, (2002) 28–37.
7. Robelek R., Wegener J. Label-free and time-resolved measurements of cell volume changes by surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics.* 25, (2010) 1221–1224.8. Baumgarten, S., Robelek, R. Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensors for the rapid, sensitive detection of the cellular response to osmotic stress. *Sensors and Actuators B: Chemical.* Volume 156, Issue 2, August, (2011) 798-804.
8. Quinn J.G., O'Neill S., Doyle A., McAtamney C., Diamond D., MacCraith B. D., O'Kennedy R. Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions. *Analytical Biochemistry.* 281, (2000) 135-143.
10. Quinn J.G., Kennedy R. O., Smyth M., Moulds J., Frame T. Detection of blood group antigens utilising immobilized antibodies and surface plasmon resonance. *Journal of Immunological Methods.* 206, (1997) 87–96.
11. Bosschaart N., Edelman G.J., Aalders M.C.G., van Leeuwen T.G. A literature review and novel theoretical approach on the optical properties of whole blood Faber Lasers. *Med Sci.* 29, (2014) 453–479.
12. Ghosh N., Buddhiwant P., Uppal A., Majumder S. K., Patel H. S., Gupta P. K. Simultaneous determination of size and refractive index of red blood cells by light scattering measurements. *Applied physics letters.* 88, (2006) 084101.
13. Gienger J., Smuda K., Müller R., Bär M., Neukammer J. Refractive index of human red blood cells between 290 nm and 1100 nm determined by optical extinction measurements. *Nature. Scientific reports.* 9, (2019) 4623.

14. Jin Y. L., Chen J. Y., Xu L., Wang P. N. Refractive index measurement for biomaterial samples by total internal reflection. *Phys. Med. Biol.* 51 (2006) 371–379.
15. Lazareva E.N., Tuchin V.V. Measurement of refractive index of hemoglobin in the visible/NIR spectral range. *Journal of Biomedical Optics.* 23(3), (2018) 035004.
16. Lazareva E.N., Tuchin V.V. Blood refractive index modelling in the visible and near infrared spectral regions *J of Biomedical Photonics & Eng.* 4(1), (2018) 010503-1.
17. Liu S., Deng Zh., Li J., Wang J., Huang N., Cui R., Zhang Q., Mei J., Zhou W., Zhang Ch., Ye Q., Tian J. Measurement of the refractive index of whole blood and its components for a continuous spectral region. *Journal of Biomedical Optics.* 24(3), (2019) 035003.
18. Friebel M., Meinke M. Model function to calculate the refractive index of native hemoglobin in the wavelength range of 250–1100 nm dependent on concentration. *Applied Optics.* 45 (12), (2006) 2838-2842.
19. Li H., Xie Sh. Measurement method of the refractive index of biotissue by total internal reflection. *Appl. Opt.* 35 (10), (1996).
20. Hui Li, Lei Lin, Shusen Xie Refractive index of human whole blood with different types in the visible and near-infrared ranges. *Proc SPIE.* 3914, (2000) 517 – 521.
21. Hansson K.M., Vikinge T.P., Ranby M., Tengvall P., Lundstrom I., Johansen K., Lindahl T.L. Surface plasmon resonance (SPR) analysis of coagulation in whole blood with application in prothrombin time assay. *Biosensors & Bioelectronics.* 14, (1999) 671–682.
22. Hansson K.M., Tengvall P., Lundstrom I., Ranby M., Lindahl T. L. Comparative studies with surface plasmon resonance and free oscillation rheometry on the inhibition of platelets with cytochalasin E and monoclonal antibodies towards GPIIb/IIIa. *Biosensors and Bioelectronics.* 17, (2002) 761-771.
23. Hansson K. M., Tengvall P., Lundstrom I., Ranby M., Lindahl T. L. Surface plasmon resonance and free oscillation rheometry in combination: a useful approach for studies on haemostasis and interactions between whole blood and artificial surfaces. *Biosensors and Bioelectronics.* 17, (2002) 747-759.
24. Hansson K. M., Johansen K., Wettero J., Klenkar G., Benesch J., Lundstrom I., Lindahl T. L., Tengvall P. Surface plasmon resonance detection of blood coagulation and platelet adhesion under venous and arterial shear conditions. *Biosensors and Bioelectronics.* 23, (2007) 261–268.
25. Johansen K, Wetterö J, Klenkar G, Benesch J, Lundström I, Lindahl T.L., Tengvall P. Surface plasmon resonance detection of blood coagulation and platelet adhesion under venous and arterial conditions. *Biosens. Bioelectron.* 23(2), (2007) 261-268.
26. Quinn J. G., O’Neill S., Doyle A., McAtamney C., Diamond D., MacCraith B. D., O’Kennedy R. Development and Application of Surface Plasmon Resonance-Based Biosensors for the Detection of Cell-Ligand Interactions. *Analytical Biochemistry.* 281, (2000) 135–143.
27. Baoxia Li, Juan Chen, Mian Long Measuring binding kinetics of surface-bound molecules using the surface plasmon resonance technique. *Analytical Biochemistry.* 377, (2008) 195–201.
28. Gridina N. Ya. Utilizing SPR as a novel technique to measure cell aggregation for ketamine treated brain gliomas cancer and oncology research. *Canc Onc.* 1(1), (2013) 1-5.
29. Gridina N., Dorozinsky G., Khristosenko R., Maslov V., Samoylov A., Ushenin Yu., Shirshov Yu. Surface Plasmon Resonance Biosensor. *Sensors & Transducer.*, 149(2), (2013) 60-68.
30. Chegel V., Shirshov Yu., Avilov S., Demchenko M., Mustafaev M. A novel aldehyde dextran sulfonate matrix for affinity biosensors Author links open overlay panel. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods.* 50, Issues 2–3, (2002) 201-216.
31. Kabashin A. V., Patskovsky S., Grigorenko A. N. Phase and amplitude sensitivities in surface plasmon resonance bio and chemical sensing. *Optics Express.* Vol. 17, No. 23, (2009) 21191.
32. Ekgasit S., Tangcharoenbumrungsuk A., Yu F., Baba A., Knoll W. Resonance shifts in SPR curves of nonabsorbing, weakly absorbing, and strongly absorbing dielectrics. *Sensors and Actuators. B* 105, (2005) 532–541.
33. Shirshov Yu. M., Kostyukeych K. V., Khrystosenko R. V., Samoylov A. V., Ushenin Yu. V., Gridina N. Ya. Analysis of forming blood elements using surface plasmon-polariton resonance model of transition layer. *Optoelectron. Semicond. Tech.* 55, (2020) 136-150.
34. Douglas B. Lebedeva T., Chandrasekaran N., Hayes V., Masefski W., Rustem I., Rauova L., Thomas J., Weisel W. Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood.* v 123, No 10, (2014) 1596-1603.
35. <http://www.res-tec.de>
36. Beketov G. V., Shirshov Yu. M., Shynkarenko O. V., Chegel V. I. Surface plasmon resonance spectroscopy: prospects of superstrate refractive index variation for separate extraction of molecular layer parameters. *Sensors and Actuators B.* 48, (1998) 432–438
37. Posudievsky O. Yu., Samoylov A. V., Surovtseva E. R., Khristosenko R. V., Kukla A. L., Shirshov Yu. M. Extraction of optical constants of polyaniline thin films by surface plasmon resonance. *Thin Solid Films.* 516, (2008) 6104–6109.

38. Samoylov A. V., Mirsky V. M., Hao Q., Swart C., Shirshov Yu. M., Wolfbeis O. S. Nanometer-thick SPR sensor for gaseous HCl. *Sensors and Actuators B*. 106, (2005) 369–372.
39. Kostyukevych K.V., Shirshov Yu.M., Khristosenko R.V., Samoylov A.V., Ushenin Yu.V., Kostyukevych S.A., Koptiukh A.A. Angular spectrum peculiarities of surface plasmon-polariton resonance under investigation of latex water suspension in the Kretschmann geometry. *Optoelectron. Semicond. Tech.* 53, (2018) 220- 239.
40. Johnson P. B., Christy V. Optical constants of the noble metals. *Phys. Rev.B*. vol.8, No12, (1972) 125-134.
41. Beketov G. V., Klimov O. S., Matyash I. E., Oberemok E. A., Rudenko S. P., Savenkov S. M., Samoylov a. V., Serdega B. K., Ushenin Yu. V., Shirshov Yu. M. . Physical bases of polarimetry of high informative ability / Edited by B.K. Hearts. - Kyiv: NTUU "KPI" VP VPK "Polytechnic", 2013. – 249 p. ISBN 978-966-622-608-5.
42. James H. Georgiadis G. Temperature-Dependent Refractive Index Determination from Critical Angle Measurements: Implications for Quantitative SPR Sensing. *Anal. Chem.* 71, (1999) 4392-4396.
43. Heller W. Remarks on refractive index mixture rules. *The Journal of Physical Chemistry*. 69(4), (1966) 1123–1129.
44. Shuying Cheng H. Y., Shen G., Zhang a C.H., Huang X. J. Measurement of the refractive index of biotissue at four laser wavelengths. *Proceedings of SPIE*. Vol. 4916, (2002 ) 172 – 176.
45. Park Y. K., Yamauchi T., Choi W., Dasari R., Feld M.S. Spectroscopic phase microscopy for quantifying hemoglobin concentrations in intact red blood cells. *Opt Lett.* 34(23), (2009) 3668–3670.
46. Zhernovaya O., Sydoruk O., Tuchin V., Douplik A. The refractive index of human hemoglobin in the visible range. *Phys. Med. Biol.* 56, (2011) 4013–4021.
47. Wang J., Deng Z., Wang Xi, Ye Q., Zhou W., Mei J., Zhang Ch., Tian J. Measurement of the refractive index of hemoglobin solutions for a continuous spectral region. *Biomedical optics express*. Vol. 6, No. 7, (2015) 2536-2541.
48. Chaplin H., Molisson P. L. Correction for Plasma Trapped in the Red Cell Column of the Hematocrit. *Blood*. 7 (12), (1952) 1227–1238.
49. Sirs J. Automatic Recording of the Rate of Packing of Erythrocytes in Blood by a Centrifuge. *Phys. Med. Biol.* VOL. 15, NO. 1, (1970) 9-14.
50. E.Ponder Grune and Stretton Hemolysis and related Phenomena. NY 1948 Waverly press Inc.
51. Application of digital holographic microscopy to investigate the sedimentation of intact red blood cells and their interaction with artificial surfaces I.Bernhardt, L.Ivanova, P.Langehanenberg, B.Kemper, G.vonBally.
52. Thomas L. Fabry Mechanism of Erythrocyte Aggregation and Sedimentation. *Blood*. Vol 70, No 5 (November), (1987) 1572-1576.
53. Multicenter study of an erythro-aggregometer: quality control and standardization L.L. Houbouyan , M. Delamaire, A. Beauchet, M. Gentil, G. Cauchois, A. Taccoen, J.P. Yvert, N. Montredon, M.F. Roudaut , S. Zhao, A. Goguel, G. Potron, M. Boisseau, J.-F. Stoltz.
54. Corry W. D., Meiselman H. J. Deformation of human erythrocytes in a centrifugal field. *Biophysical Journal*. vol.21, (1978) 19-34.
55. Thomas M. , Stöhr-Liesen M., Schmid-Schönbein H. The red cell as a fluid droplet: tank tread-like motion of the human erythrocyte membrane in shear flow. *Science*. Nov. 24, Vol. 202, (1978) 894- 896.
56. Hoffman J. F., Inoue S. Directly observed reversible shape changes and hemoglobin stratification during centrifugation of human and *Amphiuma* red blood cells. *PNAS*. vol. 103, (2006) 2971–2976.
57. Mohandas N., Gallagher P. G. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*. V 11215, (2008) 3939-3948.
58. Gajos G., Siniarski A., Natorska J., Ząbczyk M., Siudut J., Malinowski K. P., Gołębiowska R., Rostoff P., Undas A. Polyhedrocytes in blood clots of type 2 diabetic patients with high cardiovascular risk: association with glycemia, oxidative stress and platelet activation. *Cardiovascular Diabetology*. 17, (2018) 146.
59. Cines D. B., Lebedeva T., Nagaswami Ch., Hayes V., Masefski W., Litvinov R. I., Rauova L., Lowery T. J., Weisel W. Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood*. V. 123, No 10, (2014) 1596 - 1603.
60. Tutwiler V., Mukhitov A. R., Peshkova A. D., Minh G. L., Khismatullin R. R., Vicksman J., Nagaswami Ch., Litvinov R. I., Weisel J. W. Shape changes of erythrocytes during blood clot contraction and the structure of polyhedrocytes. *NATURE scientific reports*. 8, (2018) 17907.
61. Gokhin D. S., Fowler V. M. Feisty filaments: actin dynamics in the red blood cell membrane skeleton. *Curr Opin Hematol*. 23(3), (2016) 206–214.
62. Himbert S., Alsop R. J., Rose M., Hertz L., Dhaliwall A., Moran-Miraba J. M., Verschoor C. P., Bowdish D. M. E., Kaestner L., Wagner C., Rheinstädter M. C. The Molecular Structure of Human Red Blood Cell Membranes from Highly Oriented, Solid Supported Multi-Lamellar Membranes. *Nature.Scientific reports*. 7, (2017) 39661.