

© 1994 г. АТАУЛЛАХАНОВ Ф.И., ВИТВИЦКИЙ В.М., ЛИСОВСКАЯ И.Л.,  
ТУЖИЛОВА Е.Г.

## АНАЛИЗ ГЕОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ И МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДОМ ФИЛЬТРАЦИИ ЧЕРЕЗ МЕМБРАННЫЕ ЯДЕРНЫЕ ФИЛЬТРЫ.

### 1. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Построена и исследована математическая модель, количественно описывающая скорость прохождения эритроцитов через поры ядерных мембранных фильтров при фильтрации разбавленной суспензии эритроцитов под действием постоянного гидростатического давления. При построении модели учитывались следующие основные факторы: геометрические ограничения, связывающие между собой площадь поверхности эритроцитарной мембраны, объем эритроцита и геометрические параметры пор фильтра; механические характеристики мембраны эритроцита; вязкость внутриклеточного содержимого. Исследование модели позволяет сделать вывод о возможности получать независимую информацию обо всех перечисленных выше характеристиках эритроцита на основе экспериментальных кривых зависимости скорости фильтрования суспензии эритроцитов от осмотичности внеклеточной среды.

Способность эритроцита проходить через узкие капилляры определяется его способностью легко деформироваться, принимая форму канала, в котором он находится. В силу этого деформируемость эритроцита оказывается одной из важнейших характеристик, определяющих реологические свойства крови [1,2]. Деформируемость эритроцита весьма чувствительна к нарушениям практически всех важных метаболических систем этой клетки. Поэтому информационная ценность методов измерения деформируемости очень высока, а наиболее простыми и удобными являются фильтрационные методы. Они широко используются при диагностике различных патологий и могут найти широкое применение для оценки функционального состояния эритроцитов [3,4]. Главный недостаток данных методов является следствием их достоинств: высокая чувствительность к практически любым нарушениям метаболизма не позволяет получать информацию о том, где локализован дефект.

Эта ограниченность методов фильтруемости может быть в значительной степени преодолена расширением пространства (увеличением числа) параметров, варьируемых в таких экспериментах. Задачей данной работы является анализ влияния геометрических параметров и механических свойств эритроцитов на процесс прохождения эритроцита через узкий канал. Цель работы – найти способы определения этих факторов прямо из экспериментов по фильтруемости.

Будем рассматривать метод, в котором эритроциты фильтруются через ядерные мембранные фильтры. Каналы в таких фильтрах имеют вид цилиндрических отверстий, геометрические параметры которых варьируют незначительно. Это сильно упрощает анализ, позволяя получить количественную интерпретацию результатов экспериментов.

Обычно в экспериментах используются ядерные фильтры толщиной 10 мкм с диаметром пор 3–5 мкм. Диаметр диска эритроцита – 8 мкм, поэтому для прохождения через канал в мембране эритроцит должен изменить свою форму, т.е. деформироваться. Сила, вызывающая деформацию, определяется разностью давлений по обе стороны от мембраны. Обычно это небольшие давления, порядка

0,01 атм. Силы, возникающие при таких давлениях, не способны растянуть клеточную мембрану [5].

Среди множества воздействий на клетку, доступных экспериментатору, в нашем случае наиболее удобным является изменение осмотического давления (осмотичности) среды ( $u$ ), в которой находится эритроцит, путем изменения концентрации NaCl.

В эксперименте удобно варьировать также диаметр пор в мембране ( $d$ ), длину канала (толщину мембраны) ( $l$ ), разность давлений ( $p$ ), определяющую поток жидкости, и гематокрит суспензии эритроцитов ( $n$ ).

Для оценки вкладов факторов в скорость фильтрования суспензии эритроцитов, необходима математическая модель процесса.

## МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

*Постулаты модели.* Для описания процесса фильтрования эритроцита использовали следующие постулаты.

1. Скорость прохождения эритроцита через канал в мембране ( $w$ ) постоянна.

2. На эритроцит в канале действует постоянная сила, равная произведению разности давлений по обе стороны мембраны на площадь поперечного сечения канала

$$F = p\pi d^2/4, \quad (1)$$

3. Мембрана эритроцита нерастяжима.

4. Сила трения эритроцита о стенки канала пропорциональна скорости движения эритроцита и состоит из двух компонент. Первая компонента силы трения обусловлена вязкостью внутриклеточного содержимого  $q_i$

$$F_1 = a(d,l) \cdot q_i \cdot w, \quad (2)$$

где  $a(d,l)$  – параметр, характеризующий изменение формы эритроцита, которое приводит к перетеканию части содержимого клетки. Предполагается, что это перераспределение внутриклеточного содержимого мало меняется при изменении объема и его можно считать постоянным. Этот параметр, конечно, зависит от геометрических параметров канала. Однако получить явный вид этой зависимости представляется весьма затруднительным.

Вторая компонента силы трения связана с понятием предельного объема эритроцита. Как известно, при максимально возможном объеме эритроцит имеет форму сферы. В силу нерастяжимости эритроцитарной мембраны такая сфера не может пройти через канал (пору), диаметр которой меньше диаметра сферы. Очевидно, что через заданный канал с диаметром меньшим, чем диаметр эритроцита, клетки перестанут проходить при некотором предельном объеме, меньшем, чем максимально возможный объем эритроцита. При приближении объема эритроцита к предельному для данного канала значению сила трения эритроцита в этом канале стремится к бесконечности. Для описания изменений этой силы при увеличении объема в первом приближении полагаем, что эти изменения определяются разностью между предельным и текущим значением объема ( $V$ ):

$$F_2 = b(d,l) \cdot w / (V_k - V)^n, \quad (3)$$

где  $b(d,l)$  – параметр, характеризующий изгибную упругость клеточной мембраны или клетки,  $V_k$  – предельное значение объема эритроцита,  $n$  – показатель степени, позволяющий подобрать адекватное соответствие между деформацией клетки и величиной изменения объема.

5. Объем клетки обратно пропорционален осмотичности среды.

*Скорость движения эритроцита* в канале, согласно этим постулатам, будет постоянной при равенстве силы давления силам трения

$$F = F_1 + F_2, \quad (4)$$

откуда

$$w = (\pi r d^2 / 4) / [a(d, l) q_i + b(d, l) / (V_k - V)^n] \quad (5)$$

В этой формуле вязкость ( $q_i$ ) и объем являются функциями осмотичности среды. Для того, чтобы получить зависимость скорости фильтрования эритроцитов от осмотичности, нужно определить, как зависят от нее параметры  $q_i$  и  $V_k$ .

Связь между объемом и осмотичностью среды (буфера), в которой находится эритроцит, определена постулатом N 5 и подтверждается результатами многочисленных измерений зависимости объема от осмотичности среды инкубации [6].

$$V = f/u + V_0, \quad (6)$$

где  $f$  — коэффициент.

$V_0$  — минимальное значение объема, до которого сжимается эритроцит при стремлении осмотичности буферного раствора к бесконечности. Как будет показано ниже, эта величина определяется содержанием гемоглобина в эритроците. Параметр  $f$  зависит от концентрации гемоглобина и многих параметров ионного гомеостаза клетки. Он не может быть определен так же просто, как  $V_0$ , поэтому мы его оставляем как эмпирически определяемый коэффициент.

Зависимость внутриклеточной вязкости от осмотического давления среды определяется в основном концентрацией гемоглобина в эритроците. С ростом концентрации гемоглобина вязкость растет экспоненциально [7]. Зависимость хорошо описывается формулой

$$q_i = q \cdot \exp [y_1 \cdot Hb / (1 - y_0 \cdot y_1 \cdot Hb)], \quad (7)$$

где  $Hb$  — внутриклеточная концентрация гемоглобина,  $q = 0,7$  сантипуаз (вязкость воды),  $y_0 = 0,4$ ,  $y_1 = 0,0036$  г/л.

При изменении осмотичности среды внутриклеточная концентрация гемоглобина (но не его количество) будет изменяться в связи с изменением объема. Пусть  $H$  — количество гемоглобина в отдельном эритроците. Тогда

$$H = Hb \cdot V.$$

При возрастании осмотичности концентрация гемоглобина будет расти до тех пор, пока, согласно уравнению (7), вязкость внутриклеточного содержимого не устремится к бесконечности. Этим определяется предельная концентрация гемоглобина в эритроците ( $Hb_0$ ) и минимальный объем клетки

$$\begin{aligned} y_0 \cdot y_1 \cdot Hb_0 &= 1, \\ Hb_0 &= 1 / (y_0 \cdot y_1) = 694,4 \text{ г/л}, \\ V_0 &= H / Hb_0, \end{aligned} \quad (8)$$

откуда

$$q_i = q \cdot \exp [y_1 \cdot H / (V - V_0)]. \quad (9)$$

Из соотношения (5), учитывая (6), (8) и (9), найдем скорость движения эритроцита через канал

$$w = \pi r d^2 / 4 [a \cdot q \cdot \exp (y_1 \cdot H \cdot u / f) + b / (V_k - H / Hb_0 - f/u)^n], \quad (10)$$

Геометрические ограничения при прохождении эритроцита через канал

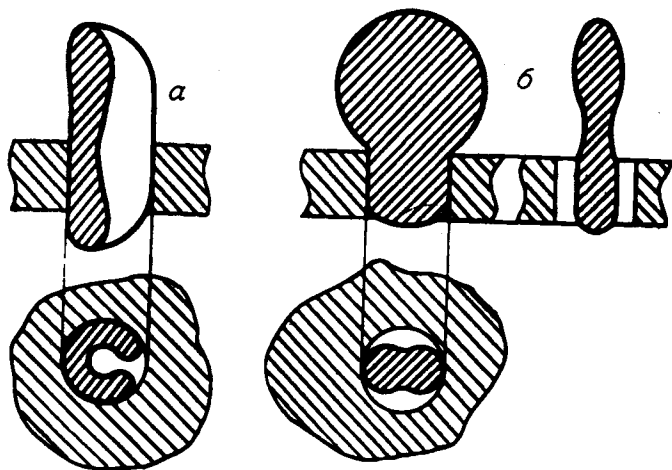


Рис.1. Схематическое изображение двух вариантов прохождения эритроцита через канал (пору) мембранного ядерного фильтра: *a* – эритроцит сворачивается в трубочку; *b* – сохраняет осевую симметрию

в мембране фигурируют в формуле для скорости фильтрации эритроцита как критическое значение объема  $V_k$ . Посмотрим, как оно связано с размерами канала в мембране и геометрическими параметрами эритроцита.

В случае достаточно широкого канала эритроцит дисковидной формы может легко пройти через него свернувшись в «трубочку» или слегка сплющиваясь, как показано на рис.1 [8]. Первый вариант прохождения возможен в том случае, когда площадь центрального поперечного сечения эритроцита плоскостью, перпендикулярной диску, не превосходит площади поперечного сечения канала. Увеличение объема эритроцита при фиксированной площади поверхности или уменьшение диаметра канала приведет к тому, что эритроцит начнет целиком заполнять объем канала. При этом эритроцит может помещаться в канал либо целиком (рис.2,*a*), либо частично, «перетекая» с одной стороны мембраны на другую (рис.2,*b*).

Очевидно, что эритроцит перестанет проходить через канал, когда свободные от контакта со стенками канала участки мембраны станут сферическими поверхностями. Несложный анализ показывает, что критический объем, т.е. наименьший объем, при котором эритроцит перестанет проходить через канал в случае, изображенном на рис.2,*a*, соответствует форме цилиндра, ограниченного двумя полусферами, а в случае, изображенном на рис.2,*b*, форме, при которой радиусы сфер, образовавшихся по обе стороны мембраны, равны между собой. Предельные значения объема эритроцита ( $V_k$ ) для случаев, изображенных на рис.2,*a*, *b* могут быть рассчитаны по следующим формулам:

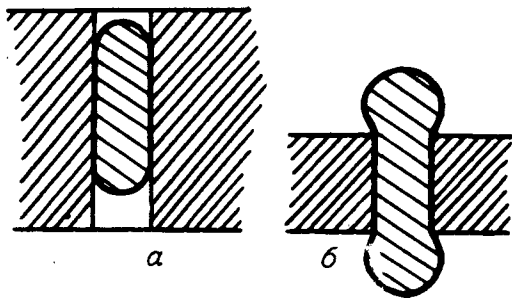


Рис.2. Схематическое изображение эритроцита, находящегося в поре мембранного ядерного фильтра: *a* – объем эритроцита меньше объема поры; *b* – объем эритроцита больше объема поры

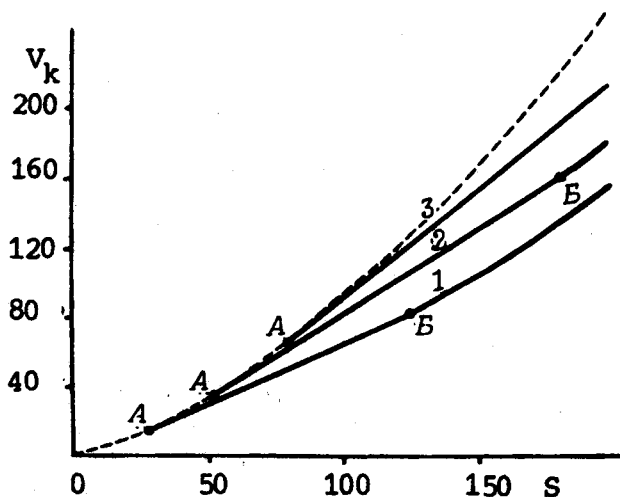


Рис.3. Зависимость предельного объема эритроцита от площади его поверхности для разных диаметров (мкм) пор фильтра: 1 - 3, 2 - 4, 3 - 5. (Длина канала  $l = 10$  мкм)

$$V_k = \begin{cases} ds/4 - \pi d^3/12, & S < \pi d^2 + \pi dh \\ \pi d^2 h/4 + (S - \pi dh)^2/3C - \pi d^2(S - \pi dh)/6C + d^2 C/24, & S > \pi d^2 + \pi dh \end{cases} \quad (11)$$

где  $C = \{8\pi[s - \pi d(h + d/2)]\}^{1/2}$

Если измерять скорость прохождения эритроцитов через канал как функцию осмотичности буферного раствора, то в определенной области с уменьшением осмотического давления (что соответствует росту объема эритроцита) скорость фильтрации будет снижаться и станет нулевой, когда осмотичность среды будет соответствовать предельному для данного канала объему эритроцита. Это предельное значение осмотичности определяется только геометрическими ограничениями и не должно зависеть от вязкоупругих свойств клетки.

На рис.3. показана связь предельного объема эритроцита с площадью его поверхности, полученная из (11) для разных каналов с размерами, характерными для размеров каналов в мембранах, используемых при измерениях фильтруемости эритроцитов.

При площади поверхности, меньшей чем площадь в точке А, эритроцит будет проходить через канал при любом объеме, ограниченном этой поверхностью. Для каждого канала значения объемов, лежащие выше соответствующей кривой, относятся к клеткам, которые не могут пройти через данный канал.

При значениях площади поверхности, лежащих между точками А и В на кривых, критический объем эритроцитов определяется первым из условий (11), а при больших, чем в точке В, значениях - вторым из условий (11). Как видно из рис.3, для канала с диаметром 5 мкм критический объем определяется вторым из условий (11) при всех разумных значениях площади поверхности эритроцита.

*Микрохарактеристики процесса фильтрования. Связь скорости прохождения эритроцита через канал в мембране со скоростью протекания суспензии клеток.* Для того, чтобы охарактеризовать деформируемость эритроцита, необходимо измерить скорость его прохождения через канал в мембране. В эксперименте измеряется другая величина - время протекания определенного объема суспензии эритроцитов через фильтр и вычисляется показатель деформируемости  $D$ , или индекс ригидности  $I$  [9]:

$$D = 100/I = t_b h / (t_s - t_p), \quad (12)$$

где  $t_s$  – время протекания заданного объема суспензии эритроцитов,  $h$  – гематокрит суспензии,  $t_d$  – время протекания такого же объема буфера через тот же фильтр.

Чтобы связать этот показатель со скоростью прохождения эритроцита через канал, рассмотрим этот процесс подробнее. Сделаем следующие допущения.

1. Все каналы в мембране одинаковы и имеют диаметр  $d$ .

2. Когда эритроцит находится в канале, буфер через этот канал не течет, т.е. эритроцит полностью его блокирует.

Пусть  $w$  – средняя объемная скорость прохождения одного эритроцита через канал в мембране,  $V$  – объем эритроцита,

$$t_e = V/w - \text{среднее время пребывания эритроцита в канале} \quad (13)$$

$Q$  – фильтруемый объем суспензии (буфера)

$$Qh = NV, \quad (14)$$

где  $N$  – общее число эритроцитов в суспензии.

Если  $M$  – общее число каналов в мембране, то через один канал протекает объем суспензии  $Q/M$ .

Время протекания этого объема равно

$$t_s = t_1 + t_2, \quad (15)$$

где  $t_1$  – время протекания буферного раствора, в котором взвешены клетки. Объем этого раствора  $Q(1-h)/M$ .

$$t_1 = t_b [Q(1-h)M] \cdot (M/Q) = t_b(1-h), \quad (16)$$

$t_2$  – время, в течение которого канал занят эритроцитами. Через один канал в среднем проходит эритроцитов

$$N/M = Qh/(M V) \quad (17)$$

$$t_2 = t_e M V / (Q h). \quad (18)$$

Подставив (15) и (16) в (18), получим

$$t_e = [(t_s - t_b(1-h))/Qh] \cdot M V. \quad (19)$$

Скорость фильтрования буфера  $w_b$  связана с числом каналов

$$t_b = Q/(w_b \cdot M). \quad (20)$$

Найдем  $M$  из (20), подставим в (19) и из (13) найдем скорость фильтрования эритроцита

$$w = w_b t_b h / [t_s - t_b(1-h)], \quad (21)$$

$$w/w_b = t_b h / [t_s - t_b(1-h)]. \quad (22)$$

Здесь  $w_b$  – скорость протекания буферного раствора через цилиндрический канал определяется по формуле Пуазейля:

$$w_b = \pi p d^4 / 128 l q, \quad (23)$$

где  $q$  – вязкость буферного раствора.

Из сопоставления соотношений (10) и (22) видно, что при малых значениях гематокрита показатель деформируемости соответствует отношению скорости фильтрования эритроцита к скорости фильтрования буфера.

Соотношение (22) нарушается, если в фильтре имеются каналы с другими характеристиками. Известно, что в ядерных фильтрах встречаются отверстия, образованные двумя или более сомкнувшимися каналами. Если предположить, что доля таких каналов  $m/M$ , а их площадь равна удвоенной площади одиночного канала, то выражение (22) для скорости движения эритроцитов через одиночный канал примет вид

$$\frac{w}{w_b} = \frac{[t_b (1 + 4 m/M) - 4 m/M t_s] h /}{t_s [1 + 4 m/M (1 - h)] - t_b (1 - h) (1 + 4 m/M)} \quad (24)$$

Из этой формулы следует, что, если скорость фильтрования эритроцитов через одиночный канал равна нулю, время протекания суспензии через фильтр не обращается в бесконечность. Оно равно

$$t_{s_0} = t_b (1 + M/4m). \quad (25)$$

Анализ формулы (24) показывает, что даже если доля двойных каналов невелика, они могут практически полностью определять время фильтрации суспензии при малых скоростях прохождения эритроцитов через одиночный канал. Так, если  $m/M = 0,1$ , то  $t_{s_0} = 3,5t_b$ . При этом показатель деформируемости дает сильно искаженное представление о деформируемости эритроцитов.

Связь между скоростью фильтрования эритроцита и временем фильтрации суспензии еще более усложняется, если нарушается допущение 2. В этом случае возможность протекания буфера через канал, частично занятый эритроцитом, может даже изменить величину гематокрита суспензии, прошедшей через фильтр. Если гематокрит при фильтровании меняется мало, можно считать, что допущение 2 выполняется.

## Результаты

Учитывая связь между скоростью прохождения эритроцита через одиночный канал (10) и показателем деформируемости эритроцитов  $D$  (12), (22) и выражение для скорости протекания буфера (23), для малых значений гематокрита получим формулу, описывающую зависимость показателя деформируемости от осмотичности среды

$$D = w/w_b = 1/[a_1 \exp(y_1 H u/f) + b_1/(V_k - H/Hb_0 - f/u)^n], \quad (26)$$

где  $a_1 = a/32 \cdot l$ ;  $b_1 = b/128 \cdot l \cdot q$ .

Из формулы (26) следует, что показатель фильтруемости  $D$  не зависит от разности давлений  $p$ . Зависимость показателя  $D$  от геометрических параметров канала выразить нельзя, пока неизвестна эта зависимость для параметров  $a$  и  $b$ .

На рис.4 изображена зависимость показателя деформируемости от осмотического давления внеклеточной жидкости, рассчитанная по модели для нормальных эритроцитов человека при разных значениях показателя  $n$ . Видно, что с ростом осмотичности среды (уменьшением объема эритроцита) кривая резко идет вверх, оставаясь линейной на довольно большом участке. Чем больше показатель  $n$ , тем длиннее линейный участок и резче максимум на кривой. При больших  $n$  кривая может нарастать с «разгоном». Точное значение показателя  $n$  в модели может быть определено из условия наилучшего совпадения теоретических кривых с экспериментальными данными по зависимости деформируемости эритроцитов от осмотичности среды. При фиксированном значении  $n$  крутизна возрастающего участка на зависимости деформируемости эритроцитов от осмотичности среды определяется упругостью клетки или клеточной мембраны

(рис.5). Снижение деформируемости эритроцитов при больших значениях осмотичности среды в модели связано с ростом внутриклеточной вязкости 1,2 (рис.6).

Из выражения (26) следует, что осмотическое давление среды, при котором эритроцит имеет критический объем, соответствует нулевому значению показателя деформируемости.

### Обсуждение результатов

Наибольший интерес для проверки рассмотренной здесь модели представляет исследование зависимости фильтруемости эритроцитов от осмотического давления внеклеточной среды. Изучение этой зависимости при различном содержании гемоглобина в эритроцитах, при варьировании механических свойств мембраны, а также при различных исходных значениях объема эритроцита позволило бы провести исчерпывающую количественную проверку правильности учета этих факторов в модели.

Важно также исследовать зависимость фильтруемости эритроцитов от разности гидростатического давления на мембране и от размеров каналов в мембране.

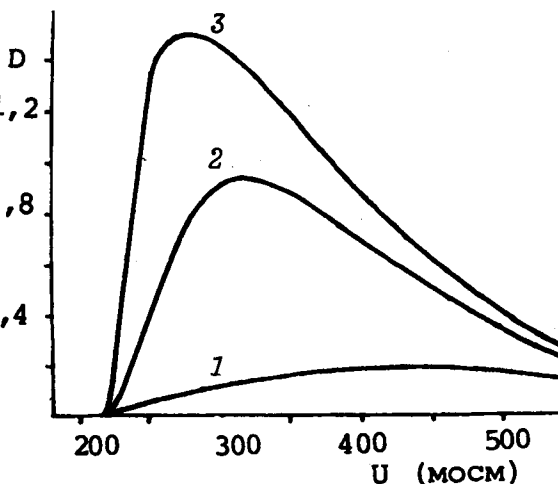


Рис.4. Рассчитанная по модели зависимость показателя деформируемости  $D$  от осмотического давления среды  $u$  при разных значениях показателя  $n$ : 1 - 1; 2 - 2,3; 3 - 3. ( $a_1 = 0,1$ ,  $b_1 = 143$ ,  $V_k = 102,48$ ,  $H = 25,33$ ,  $Hb_0 = 0,6944$ )

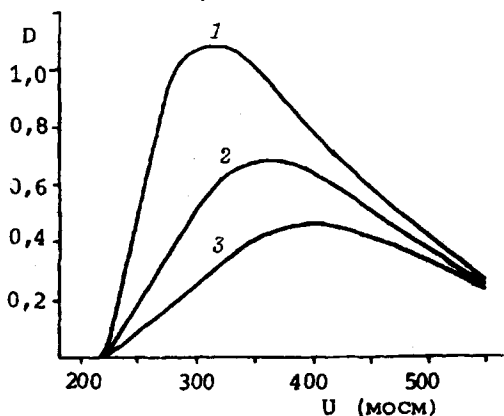


Рис. 5

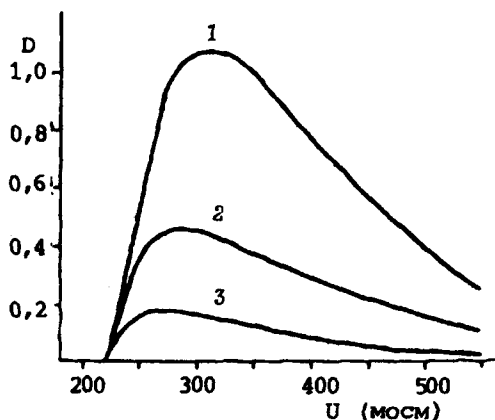


Рис. 6

Рис.5. Рассчитанная по модели зависимость показателя деформируемости  $D$  от осмотического давления среды  $u$  при разных значениях параметра  $b_1$ , характеризующего упругость клетки и/или клеточной мембраны: 1 - 1285,7; 2 - 7285; 3 - 21857,1; ( $a_1 = 0,1$ ;  $V_k = 102,48$ ;  $H = 25,33$ ;  $Hb = 0,6944$ )

Рис.6. Рассчитанная по модели зависимость показателя деформируемости  $D$  от осмотического давления среды  $u$  при разных значениях параметра  $a_1$ , характеризующего вклад вязкого трения: 1 - 0,1; 2 - 0,3; 3 - 9;  $b_1 = 1285,7$ ;  $V_k = 102,48$ ;  $H = 25,33$ ;  $Hb_0 = 0,6944$ )



Такое исследование позволило бы более полно учесть влияние экспериментальных условий на значение показателя деформируемости эритроцитов.

Особый интерес представляют предсказания модели, касающиеся критического объема. При осмотическом давлении, соответствующем критическому объему, скорость фильтрации эритроцитов равна 0. Это означает, что выводы, касающиеся критического объема не зависят от большинства постулатов модели, например от количества и вязкости гемоглобина, показателя  $n$ , соотношений разных компонент сил трения  $b$  и т.д. Этот параметр определяется только геометрическими характеристиками эритроцита и канала. Если выводы модели о критическом объеме получают количественное подтверждение в эксперименте, то эта модель может давать корректную информацию, даже если полное модельное описание зависимости фильтруемости от осмотичности окажется в плохом соответствии с экспериментом.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chien S., Dormandy J., Ernst E., Matrai A. (eds). Clinical hemorheology. Boston, 1987.
2. Chien S. //Ann. Rev. Physiol. 1987. V.49. P.177.
3. Nash G.B. //Clin.Hemorheol. 1990. V.10, №4. P.353.
4. Belboul A. //Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1990. V.50, №3. P.297.
5. Ивенец И., Скейлак П. Механика и термодинамика биологических мембран. М.: Мир, 1982.
6. Freedman J., Hoffman J.H. //J.Gen.Physiol. 1979. V.74. P.157.
7. Ross P.D., Minton A.P. //Biochem. Biophys. Res. Comm. 1977. V.76, №4. P.971.
8. Reinhart W.H., Yuang C., Vayo M., Norwich G., Chien S., Skalak R. //Biorheology. 1991. V.28. P.537.
9. Hanss M., Koutsouris D. //Biochem. Biophys. Res. Comm. 1984. V.76. P.461.

Гематологический научный центр РАМН, Москва

Поступила в редакцию  
08.06.1993

### ANALYSIS OF GEOMETRICAL PARAMETERS AND MECHANICAL PROPERTIES OF ERYTHROCYTES BY FILTRATION THROUGH MEMBRANE NUCLEAR FILTERS. I. A THEORETICAL MODEL

ATAULLAHANOV F.I., VITVITSKY V.M., LISOVSKAYA I.L., TUZHILOVA E.G.

*Haematological Scientific Center, Russian Ac.Med.Sci. Moscow*

A mathematical model is constructed, which quantitatively describes the rate of erythrocyte passage through pores of nuclear membrane filters during filtration of a diluted erythrocyte suspension upon action of a constant hydrostatic pressure. The following main factors have been taken into account: geometrical constraints linking the surface area of the erythrocyte membrane, the erythrocyte volume and the geometrical parameters of the filter pores; mechanical characteristics of the erythrocyte membrane; viscosity of the intracellular content. Analysis of the model allows us to conclude that it is possible to extract information about all above erythrocyte characteristics from the experimental curves describing dependency of the filtration rate of the erythrocyte suspension from the osmoticity of the outer medium.