

УДК 612.13

ТЕМПЕРАТУРНО-ОСМОТИЧЕСКАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ФИЛЬТРУЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ

© 2004 г. В. Л. Кононенко*, Ю. М. Розенберг**, Я. К. Шимкус*, Ф. И. Атауллаханов**

* Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,
119991 Москва, ул. Косыгина, 4; факс: (095)137-4101;
электронная почта: konon@sky.chph.ras.ru

** Гематологический центр Российской академии медицинских наук,
123167 Москва, Новозыковский проезд, 4а; факс (095) 212-8870,
электронная почта: fazli@blood.ru

Поступила в редакцию 4.06.2003 г.

Выполнены измерения осмотической зависимости времени прохождения эритроцитов человека здоровых доноров через никелевые фильтры толщиной 11 мкм и диаметром пор 3.1 мкм при температурах 25, 37 и 40°C в диапазоне осмолярности среды 210–520 мосМ. Установлено, что рост температуры приводит к монотонному сдвигу границы осмотической отсеки фильтруемости в гипотоническую область, а вся кривая осмотической развертки времени прохождения смещается в сторону меньших времен. Построена приближенная нестационарная теория фильтрации эритроцита через длинный тонкий канал. Теория основана на решении уравнений механического равновесия клеточной мембраны эритроцита совместно с уравнениями гидродинамики для жидкости в канале и для раствора гемоглобина внутри клетки. Получено приблизительное аналитическое решение, описывающее зависимость длительности прохождения эритроцитом канала от осмолярности среды и характерных механических, геометрических и физических параметров клетки, канала и условий измерений. Предложено обобщение формулы Росса-Минтона для концентрационной зависимости вязкости раствора гемоглобина, описывающее влияние температуры. Анализ результатов измерений на основе предложенной теории показал, что температурный сдвиг гипотонической границы фильтруемости эритроцитов объясняется ростом площади их поверхности при практически неизменном объеме. Установлено отсутствие в условиях экспериментов скачкообразных температурных изменений вязкости внутриклеточного раствора гемоглобина, о наблюдении которых в близких условиях *in vitro* сообщалось в литературе.

Механические характеристики клеточной мембраны и внутриклеточного раствора гемоглобина являются одним из основных факторов, определяющих выполнение физиологической функции эритроцитов. В связи с этим изучение реологии эритроцитов в норме и при патологических изменениях в организме, а также развитие реологических методов медицинской диагностики являются важнейшими направлениями фундаментальной и прикладной гематоцитологии. В основе многих экспериментальных подходов в этой области лежат процессы втягивания в микропипетку и прохождения эритроцитов через узкие каналы [1]. На них базируются также многие медико-диагностические методики, использующие эритроциты в качестве биодатчиков состояния организма, в частности, метод фильтрации эритроцитов через пористые фильтры [2–4]. В недавно выполненных работах [5, 6] сообщалось об обнаружении методом втягивания в микропипетку резкого изменения реологических характеристик эритроцитов человека при температуре 36.4°C, т.е. в области физиологически нормальных температур. Авторы [5, 6] связывают этот переход с измене-

ниями коллективных механических характеристик спектриновой подсистемы мембранного скелета, а также с кооперативным изменением вязкости внутриклеточного раствора гемоглобина. С другой стороны, согласно температурным измерениям деформируемости эритроцитов, выполненным в сдвиговом гидродинамическом потоке, относительное удлинение эритроцитов неизменно в диапазоне 25–37°C [7].

Скачкообразные изменения структурно-механических характеристик основных белков эритроцитов в области физиологических температур оказывали бы сильное влияние на поведение эритроцитов в кровотоке как в норме, так и при патологиях. В связи с этим необходимо выяснить возможность наблюдения перечисленных выше эффектов при прохождении эритроцитов через узкие каналы в условиях, близких к нативным в русле микроциркуляции в организме. В настоящей работе приведены результаты исследований процесса прохождения в широком диапазоне осмолярности окружающей среды при разных температурах. Измерения выполнены методом осмотической развертки скорости прохождения эрит-

роцитов через пористые фильтры. Осмотическая развертка позволяет менять концентрацию гемоглобина в клетках в широких пределах, вплоть до сравнительно высоких концентраций, при которых авторы [5, 6] наблюдали скачкообразное изменение вязкости растворов гемоглобина.

Прохождение эритроцитов через узкие каналы изучено не столь детально, как их втягивание в микропипетку. Оно не получило пока надежного количественного описания в рамках клеточной биомеханики и гидродинамики, с установлением количественной связи с механическими характеристиками мембраны эритроцита. Поэтому одной из основных целей данной работы являлось также исследование и теоретическое описание самого процесса прохождения эритроцитов через узкие каналы в условиях широкого варьирования клеточного объема и температуры среды.

1. МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Измерительная установка, методика приготовления проб суспензии эритроцитов при разной осмолярности среды, а также процедура измерений описаны ранее [8]. Для измерений использовался никелевый фильтр толщиной 11 ± 1.1 мкм. Согласно данным электронной микроскопии [9] и сообщению изготовителей, регулярно расположенные цилиндрические поры фильтра диаметром 3.10 ± 0.01 мкм имеют плавное расширение на входе и выходе при длине цилиндрической части 3.65 ± 0.01 мкм. Измерялась зависимость объема протекшей через фильтр суспензии эритроцитов от времени – кинетическая кривая фильтрации. Для таких кривых, полученных при разных осмолярностях и температурах среды ресуспендирования клеток, рассчитывались величины Δt_{er} времени прохождения эритроцита через фильтр, отнесенного к характерному времени прохождения через фильтр среды $(\Delta t)_b$ (определено ниже, в разделе 3.1). Методика обработки первичных экспериментальных данных и определения Δt_{er} описана в [8, 10]. Исследовали кровь здоровых доноров, взятую в день эксперимента. Было выполнено четыре серии измерений осмотической зависимости Δt_{er} в диапазоне 210–520 мосМ при давлении фильтрации 15 ± 0.5 мм H_2O . Измерения в каждой серии проводили на эритроцитах одного донора при температурах 25, 37 и 40°C. Отдельно, при помощи автоматического гематологического анализатора Cobas Micros (La Roche) определяли среднее содержание гемоглобина в клетке и средний объем (при 25°C) эритроцита.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Во всех сериях экспериментов получены близкие данные. Поэтому на рис. 1 приведены резуль-

таты одной из серий температурно-осмотических измерений. Для лучшей демонстрации характера изменения в гипертонической области величина Δt_{er} представлена в логарифмической шкале. В экспериментах наблюдались три тенденции, иллюстрируемые рис. 1. Во-первых, увеличение температуры приводит к монотонному сдвигу границы осмотической отсечки фильтруемости в сторону меньшей осмолярности. Во-вторых, вся кривая осмотической развертки Δt_{er} смещается вниз. В-третьих, в диапазоне 25–40°C зависимость Δt_{er} от осмолярности среды в гипертонической области практически совпадает с осмотической зависимостью вязкости внутриклеточного раствора гемоглобина. Никаких скачкообразных изменений зависимости Δt_{er} в исследованном диапазоне осмолярности не обнаружено.

3. ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ ПРОХОЖДЕНИЯ ЭРИТРОЦИТА ЧЕРЕЗ КАНАЛ

Традиционно используемые методики фильтрации эритроцитов характеризуются специфическими условиями прохождения эритроцитов через поры фильтра. К ним относятся высокая скорость движения клеток в порах (типично $0.1-1$ см s^{-1}), небольшая длина пор (типично 10–15 мкм), сопоставимая с длиной, а иногда меньшая длины втянутого в пору эритроцита, а также малый диаметр пор (типично 3–5 мкм), примерно вдвое меньший диаметра недеформированного эритроцита (порядка 8 мкм). Эти особенности обуславливают принципиальную нестационарность процесса, в том числе, динамический характер деформаций клеточной мембраны эритроцита. Основными факторами, определяющими длительность прохождения, являются вязкое трение в цитоплазматическом растворе гемоглобина на стадии втягивания клетки в канал, упругие и вязкостные натяжения в динамически деформируемой мембране, а также вязкое трение в слое жидкости-буфера между поверхностью клетки и стенкой канала (пристенном зазоре). Динамика формирования и результирующая толщина пристенного зазора в значительной мере определяется механическими свойствами мембраны. Силы трения в зазоре обратно пропорциональны его толщине. В свою очередь толщина зазора определяется балансом сил трения, действующих на оболочку клетки, и механических натяжений, возникающих в оболочке при ее удлинении вдоль потока под действием этих сил.

В рамках теории тонких оболочек мембрана эритроцита характеризуется тремя модулями упругости [1]. Они определяют механические натяжения, возникающие при трех базисных типах деформации двумерного элемента мембраны: всестороннем растяжении–сжатии (модуль растяжения–сжатия (дилатации) K), изменении его формы при

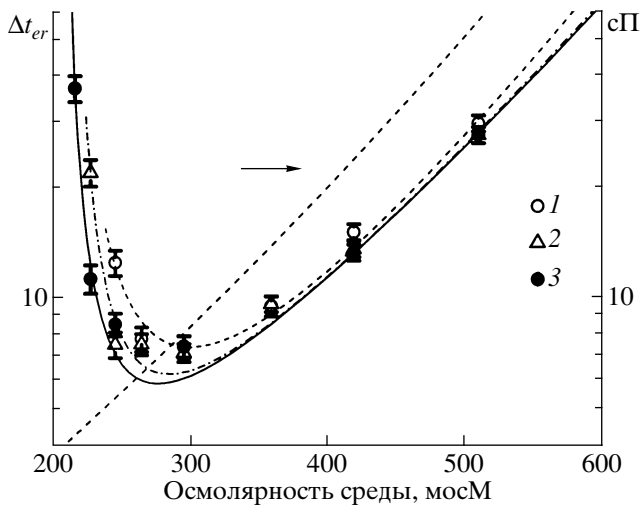


Рис. 1. Осмотические зависимости относительного времени прохождения эритроцита через никелевый фильтр, измеренные при температурах 25°C (1), 37°C (2) и 40°C (3). Стрелкой указана осмотическая зависимость коэффициента вязкости (ось ординат – справа) внутриклеточного раствора гемоглобина при 25°C, рассчитанная по формуле Росса-Минтона (2), модифицированной авторами. Линии соответствуют минимизационной аппроксимации на основе уравнения (3). Параметры аппроксимации: 25°C (штриховая) – $u_{cr} = 220$ мосМ, $a_0 = 0.478$, $b_0 = 162.5$ мкм^{4.5}; 37°C (штрихпунктир) – $u_{cr} = 211$ мосМ, $a_0 = 0.533$, $b_0 = 176.2$ мкм^{4.5}; 40°C (сплошная) – $u_{cr} = 202$ мосМ, $a_0 = 0.454$, $b_0 = 279.6$ мкм^{4.5}. Общие параметры: $H = 30.1 \times 10^{-12}$ г, $u_n = 300$ мосМ, $V_n = 94$ мкм³, $A = 0.589$, $B = 0.411$, $\tilde{\eta} = 3.6$ см³ г⁻¹, $\gamma_0 = 0.4$, $m = 1.5$.

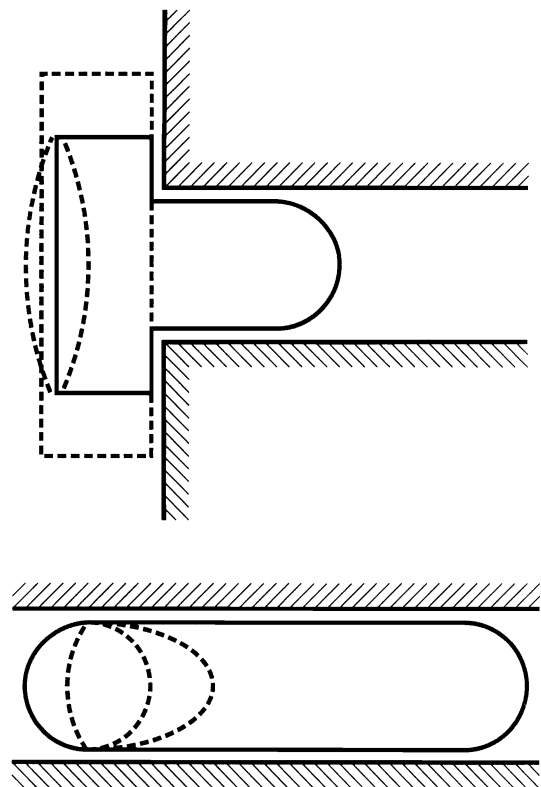


Рис. 2. Модель формы эритроцита в процессе втягивания (вверху) и внутри канала (внизу). Передний торец всегда имеет форму полусферы с радиусом, равным радиусу втянутой цилиндрической части. При неизменной общей площади поверхности оболочки ее задний торец может иметь форму выпуклого или вогнутого сферического сегмента либо вытянутого полусфероида вращения (штриховая линия), в зависимости от величины объема $V(u)$ и длины цилиндрической части (длины втягивания) h . Штриховой линией вверху показан исходный недеформированный диск, сплошным контуром внизу – предельный сфероцилиндр с полусферическими торцами.

постоянной площади (модуль сдвиговой упругости μ) и изгибе (модуль изгибной упругости K_c). Модуль дилатации отражает свойства липидного бислоя как практически несжимаемой жидкости, поэтому он примерно на пять порядков величины превышает модуль сдвига, отражающий энтропийную упругость мембранного скелета эритроцита [1]. В свою очередь сдвиговая жесткость мембраны примерно в такой же степени превосходит ее изгибную жесткость. По этим причинам деформация эритроцита под действием сил трения в пристенном зазоре происходит при практически неизменной площади его поверхности за счет сдвиговых и изгибных деформаций. В результате удлинение оболочки вдоль потока сопровождается ее радиальным сжатием. Таким образом, при малых скоростях движения эритроцита в канале динамика формирования пристенного зазора определяется в основном сдвиговой упругостью мембраны, а толщина зазора растет с увеличением скорости из-за радиального сжатия эритроцита. Однако это сжатие имеет ограничение, обусловленное сохранением объема эритроцита при деформации и чрезвычайно малой рас-

тяжимостью мембраны. По чисто геометрическим причинам характерный поперечный размер r_c замкнутой оболочки, деформируемой путем удлинения при сохранении площади поверхности S и объема V , не может быть меньше некоторой величины. Эта величина определяется значениями S , V и несколько варьирует в зависимости от конкретной предельной формы оболочки, которая обязательно является фигурой вращения.

Предельную форму эритроцита в канале математически удобно и достаточно реалистично описывать цилиндром с полусферическими торцами того же радиуса (предельным сфероцилиндром). Длина цилиндрической части h_{spc} и радиус сфероцилиндра r_{spc} определяются уравнениями $h_{spc} = (S - 4\pi r_{spc}^2) / 2\pi r_{spc}$ и $r_{spc}^3 - (3S/4\pi)r_{spc} + 3V/2\pi = 0$. После достижения формы сфероцилиндра механическое равновесие

оболочки определяется уже дилатационными напряжениями, связанными с необходимым увеличением ее площади. В силу большой относительной величины модуля дилатации дальнейший рост скорости эритроцита в канале и приложенных сил трения приводит лишь к незначительным изменениям r_{spc} и h_{spc} в соответствии со слабым увеличением площади предельного сфероцилиндра. Это геометро-механическое ограничение в значительной мере определяет динамику процесса прохождения эритроцита через узкий канал. Во-первых, возрастание толщины пристенного зазора Δ при увеличении давления фильтрации оказывается существенно нелинейным. Оно характеризуется плавным изломом вблизи геометрического предела $\Delta_g = r_0 - r_{spc}$, определяемого радиусом канала r_0 и параметрами эритроцита S , V . В диапазоне практически используемых давлений фильтрации величина Δ может лишь незначительно превышать этот предел. Во-вторых, для прохождения эритроцита через канал необходимо, чтобы его объем был меньше некоторого критического значения V_{cr} , определяемого условием $r_{spc} = r_0$. В-третьих, гидродинамическое сопротивление пристенного зазора, обратно пропорциональное его толщине, оказывается связанным не только с механическими параметрами эритроцита, но и с геометрическими – величиной отклонения его объема от критического для данного канала.

Перечисленные факторы обуславливают достаточно сложную осмотическую зависимость гидродинамического сопротивления узкого канала прохождению эритроцита. Исходной причиной является зависимость объема клетки V от осмолярности среды ресуспендирования u . Экспериментально установлено, что

$$\frac{V(u)}{V_n} = A \frac{u_n}{u} + B, \quad (1)$$

где V_n – объем при изотонической осмолярности u_n (порядка 300 мосМ); A и B – коэффициенты. Из общих физических соображений можно предполагать, что коэффициенты A и B зависят от осмолярности и температуры среды. Однако измерения показали, что при комнатной температуре они неизменны в широком диапазоне осмолярности. Существенно также, что эти коэффициенты имеют достаточно универсальный характер, поскольку практически одинаковы для данных разных авторов. Так, в работе [12] получено $A = 0.572-0.577$ и $B = 0.428-0.436$ при обработке лите $= 0.572-0.577$ и $B = 0.428-0.436$ при обработке литературных данных для комнатной температуры, и $A = 0.565$, $B = 0.437$ для собственных измерений авторов при $22 \pm 1^\circ\text{C}$. В работе [4] отмечено, что измерения осмотической зависимости объема нормальных эритроцитов человека при комнатной температуре, выполненные различными ав-

торами, хорошо описываются в диапазоне $u = 150-750$ мосМ уравнением (1) с параметрами $A = 0.589$, $B = 0.411$.

Температурная зависимость объема эритроцитов изучена существенно слабее. Исходя из физических соображений, можно ожидать заметных изменений A и B с температурой. С другой стороны, объем эритроцита регулируется не термодинамически, а гомеостатически. Так, в [13, 14] зарегистрировано уменьшение объема эритроцитов с ростом температуры в диапазоне $0-37^\circ\text{C}$, однако характер температурной зависимости и величина эффекта существенно различались для разных сред ресуспендирования клеток. В случае PBS либо буфера HEPES изменение объема было достаточно плавным, и составило $\sim 10\%$ в диапазоне $0-21^\circ\text{C}$ и $\sim 5\%$ в диапазоне $21-37^\circ\text{C}$. Для эритроцитов, помещенных в собственную плазму крови донора, изменения объема в области $21-37^\circ\text{C}$ вообще не наблюдались, а в диапазоне $0-21^\circ\text{C}$ составили $2-3\%$ [14].

Осмотическая зависимость объема эритроцита приводит к изменению концентрации внутриклеточного раствора гемоглобина Hb в силу неизменности весового количества гемоглобина в клетке H . Это обуславливает осмотическую зависимость вязкого трения в растворе гемоглобина. Согласно [15], в широком диапазоне концентраций $Hb \leq 0.45$ г см⁻¹ вязкость η_{Hb} водно-солевых растворов гемоглобина экспоненциально зависит от концентрации белка:

$$\eta_{Hb}(Hb) = \eta_b \exp\left(\frac{\tilde{\eta} Hb}{1 - y_0 \tilde{\eta} Hb}\right), \quad Hb(u) = \frac{H}{V(u)}, \quad (2)$$

где η_b – вязкость буфера, $\tilde{\eta}$ – характеристическая вязкость раствора гемоглобина. Величина $\tilde{\eta}$, согласно [16], имеет вид $\tilde{\eta} = (\eta_{Hb} - \eta_b)/(\eta_b Hb)$ и определена при бесконечном разбавлении раствора ($Hb \rightarrow 0$). По данным измерений, цитируемых в [16], $\tilde{\eta} = 3.6$ см³ г⁻¹. Величина y_0 принята авторами [15] независящей от концентрации раствора. Аппроксимация уравнением (2) зависимостей $\eta_{Hb}(Hb)$ для растворов гемоглобина в среде Рингера и в трис-буфере, измеренных при температуре 37°C в диапазоне $Hb = (0.01-0.45)$ г см⁻³ тремя группами авторов, дала среднее значение $y_0 = 0.40$ [15]. Примеры использования формулы Россаминтона (2) для анализа зависимости $\eta_{Hb}(Hb)$ при других температурах нам не известны. В теоретическом плане вопрос о температурной зависимости параметров y_0 и $\tilde{\eta}$ этой формулы также остается открытым [16]. Тем не менее используя общие физические соображения и некоторые результаты измерений, можно предложить обобщение формулы (2) для учета температурной зависимости вязкости. Это сделано в разделе 3.4.

Отметим, что математический вид зависимостей (1) для $V(u)$ и (2) для $\eta_{Hb}(Hb)$ дает формальную возможность ввести понятия “пределных” концентраций раствора гемоглобина в эритроците. В первом случае такая концентрация соответствует пределу $u \rightarrow \infty$ в формуле (1) и равна $Hb_{0V} = H/(BV_n)$. Во втором такая величина определяется условием $Hb_{0\eta} = (y_0\tilde{\eta})^{-1}$ обращения η_{Hb} в бесконечность. Однако обе формулы (1) и (2) являются в значительной мере эмпирическими, а неизменность их коэффициентов B и y_0 установлена лишь для ограниченных интервалов изменения u и Hb . В связи с формально-эмпирическим определением величин Hb_{0V} и $Hb_{0\eta}$ отсутствуют и фундаментальные основания считать их совпадающими. Более того, из общефизических соображений следует, что такое совпадение было бы случайным. Реально, для типичных экспериментальных значений $B = 0.41-0.44$ [4, 12], $H \approx 30 \times 10^{-12}$ г и $V_n \approx 90 \times 10^{-12}$ см³ величина $Hb_{0V} = 0.76-0.81$ г см⁻³, в то время как $Hb_{0\eta} = 0.694$ г см⁻³.

3.1. ФЕНОМЕНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД

Последовательная количественная теория процесса прохождения эритроцита через узкие каналы конечной длины пока не построена. В работе [3] была предложена феноменологическая теория, основанная на формально-математическом учете двух основных физических факторов, определяющих время прохождения эритроцита через канал, – вязкого трения в цитоплазматическом растворе гемоглобина на стадии втягивания и гидродинамического трения в пристенном зазоре на стадии движения клетки в канале. Прохождение эритроцита через канал рассматривается в этой теории как стационарный процесс, характеризуемый некоторой средней скоростью. Длительность процесса соотносится с характерным временем прохождения через канал буферного раствора $(\Delta t)_b = 8\eta_b l^2 / [(P_2 - P_1)r_0^2]$, где l – длина, r_0 – радиус, $(P_2 - P_1)$ – разность давлений на входе и выходе канала. В этих относительных единицах время Δt_{er} прохождения эритроцита через канал равно [3]:

$$\Delta t_{er}(u) = a_0 \exp \left[\frac{\tilde{\eta} H u}{A V_n u_n + (B V_n - y_0 \tilde{\eta} H) u} \right] + b_0 \left(V_{cr} - B V_n - A V_n \frac{u_n}{u} \right)^{-m} \quad (3)$$

Здесь a_0 и b_0 – свободные параметры, зависящие от индивидуальных свойств конкретной пробы эритроцитов и условий фильтрации. Физический смысл этих параметров в рамках модели не детализируется, а их величины, также как и величина критического объема V_{cr} , определяются путем со-

поставления с зависимостями $\Delta t_{er}(u)$, измеренными для конкретной пробы. Показатель степени m отражает закономерности самого процесса фильтрации эритроцита, поэтому он выбирается более универсальным, на основе наилучшего описания усредненной формы измеряемых зависимостей $\Delta t_{er}(u)$ в области, где $V(u)$ близок к V_{cr} . В работе [8] выбрано значение $m = 1.5$. Остальные параметры уравнения (3) известны из литературы (A, B [4], $\tilde{\eta}, y_0$ [16], u_n [4]) либо определяются путем специальных измерений (H, V_n [8]).

Первое слагаемое в формуле (3) описывает влияние на Δt_{er} осмотической зависимости вязкости внутриклеточного раствора гемоглобина в соответствии с уравнениями (1) и (2). Второе слагаемое отражает зависимость Δt_{er} от толщины пристенного зазора, учтенную в наиболее простой форме, на основе отклонения $[V_{cr} - V(u)]$ объема эритроцита от критического значения. Это эквивалентно предположению о том, что толщина зазора всегда равна геометрическому пределу $\Delta_g = r_0 - r_{spc}$, независимо от скорости продвижения эритроцита в канале и механических свойств мембраны. Согласно (3), величина $\Delta t_{er} \rightarrow \infty$ при $V(u) \rightarrow V_{cr}$. Критическая осмолярность среды u_{cr} , ниже которой прохождение эритроцита через канал невозможно в силу геометрических ограничений, определяется уравнением (1) из условия $V(u_{cr}) = V_{cr}$. Связь V_{cr} с площадью поверхности эритроцита S , его формой в этих критических условиях и геометрическими параметрами канала указана в [3, 8]. Критическая форма и соответственно математическая связь различны в зависимости от соотношения длин канала l и втянутого эритроцита h_c , т.е. для “коротких” ($l < h_c$) и “длинных” ($l > h_c$) каналов.

3.2. ЭЛАСТОГИДРОДИНАМИЧЕСКИЙ ПОДХОД

Зависимость (3) достаточно хорошо описывает результаты измерений [4, 8], но не содержит связь коэффициентов a_0, b_0 и m с параметрами эритроцита и условиями фильтрации. В целях более детального анализа динамики процесса прохождения и роли механических свойств мембраны в этом процессе авторами разработана приближенная эластогидродинамическая теория фильтрации эритроцитов [11]. Подробное изложение теории будет дано в отдельной публикации, а здесь описана логическая структура модели и приведены некоторые аналитические результаты. Теория основана на совместном решении уравнений механики для клеточной мембраны и уравнений гидродинамики для вязкой жидкости снаружи (среда ресуспендирования) и внутри (раствор гемоглобина) эритроцита. Для количественного описания динамики процесса нужно знать мгновенную форму эрит-

роцита, которая сама определяется этой динамикой. В такой постановке задача чрезвычайно сложна как в формулировке, так и в решении. Кардинальное упрощение определяющих уравнений и вычислительных процедур достигается за счет априорного выбора геометрического класса форм, которые эритроцит принимает в процессе прохождения. Модельная форма должна сочетать простоту описания с адекватным учетом принципиальных геометрических ограничений на форму реального эритроцита в этом процессе. К таким ограничениям относятся неизменность объема эритроцита и сохранение площади его поверхности при сдвиговых деформациях мембраны. В качестве модели формы втягиваемого эритроцита выбрана фигура с внешней частью в виде круглого диска с плоскими либо сферосегментными торцами, а внутренней – в виде цилиндра с полусферическим передним торцом (модель “пробки”). Форма полностью втянутого в достаточно длинный канал эритроцита предполагается сфероидо-цилиндрической, с полусферическим передним торцом и сферо-сегментным либо сфероидным, в зависимости от величины объема, задним торцом. Модель формы эритроцита на разных стадиях прохождения канала иллюстрирует рис. 2. Радиус цилиндра r_c отличается от радиуса канала на толщину пристенного зазора $\Delta = r_0 - r_c \geq 0$. При условии непрерывности трансформации круглого диска, моделирующего недеформированный эритроцит, в “пробку” и далее – в сфероидо-цилиндр все характерные размеры этих фигур определяются заданными величинами S и V , а также двумя основными переменными модели – длиной цилиндрической части втянутого участка эритроцита h и толщиной пристенного зазора Δ .

Прохождение эритроцита через канал рассматривается как принципиально нестационарный процесс. Для достаточно длинного канала его можно условно разделить на три последовательные стадии – втягивания, скольжения и выхода клетки (рис. 2). Для каждой стадии записываются уравнения равновесия сил внешнего давления, продвигающих эритроцит вместе с заполняющей остальные части канала жидкостью, и сил сопротивления этому продвижению. Силы сопротивления в общем случае включают динамические механические напряжения в деформируемой мембране, сдвиговые напряжения (силы трения) в растворе гемоглобина, перетекающем внутри клетки, силы трения в слое жидкости между стенкой канала и поверхностью клетки, а также силы трения в потоке жидкости на участках канала, не занятых эритроцитом. На стадии втягивания действуют все перечисленные силы сопротивления. Динамическое натяжение мембраны создает тормозящую силу, с которой еще не втянутый участок оболочки клетки действует на ее втянутую часть по окружности, непосредственно охватывающей вход в канал. Эта сила обусловлена сдвиго-

вой упругостью мембранного скелета, характеризуемого модулем упругости μ , а также вязким течением деформируемого липидного бислоя, характеризующего коэффициентом поверхностной вязкости η_s . Формально ее можно записать в виде $F_{dyn}(h, dh/dt) = \pi[\mu C_\mu(h) + 8\eta_s C_\eta(h)(dh/dt)]$, где функции $C_\mu(h)$ и $C_\eta(h)$ описывают зависимость упругой и вязкостной компонент силы от длины втянутой части клетки. В рамках выбранной модели формы эритроцита зависимость $F_{dyn}(h, dh/dt)$ вычисляется точно. Аналогичная проблема возникает и при анализе сопротивления втягиванию, обусловленного перетеканием внутриклеточного раствора гемоглобина. Оно происходит лишь в невтянутой части клетки, поскольку во втянутой части этот раствор движется как целое вместе с оболочкой. Гидродинамическое сопротивление перетеканию пропорционально комбинации L/R^2 характерных длины L и поперечного размера R потока, зависящих от длины втянутой части оболочки. Выбирая радиус канала в качестве масштаба длины, эту комбинацию можно записать как $L/R^2 = C_{hb}(h)/r_0$. В этом случае задача сводится к вычислению функции $C_{hb}(h)$ при заданном изменении формы невтянутого участка эритроцита.

Используя условие мгновенного равновесия сил внешнего давления и перечисленных выше сил сопротивления движению эритроцита и жидкости в канале, можно получить систему двух обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка. Эти уравнения описывают изменение во времени двух основных переменных задачи: координаты окружности переднего торца втягиваемой клетки h , отсчитываемой от входа в канал, и толщины пристенного зазора Δ . На стадии втягивания h есть длина цилиндрической части втянутого участка эритроцита (рис. 2). На стадии скольжения (если длина канала допускает ее наличие) эритроцит имеет форму сфероидо-цилиндра (рис. 2) с практически неизменной длиной цилиндрической части h_c , а функция $h(t)$ определяет его положение в канале. На стадии выхода из канала форма эритроцита, вообще говоря, снова должна изменяться. Однако в типичных условиях измерения эритроцит проходит фильтр за 1–10 мс, в то время как собственное время восстановления формы растянутого эритроцита составляет ~100 мс [1]. Поэтому для большей части диапазона осмотической развертки, за исключением участка в непосредственной близости от критической осмолярности u_{cr} , можно считать, что в процессе выхода из канала эритроцит не успевает изменить форму, приобретенную после втягивания. В этом случае $h(t)$ по-прежнему характеризует положение эритроцита. Численное решение указанной системы уравнений дает зависимости $h(t)$, $\Delta(t)$. Их параметрами являются механические модули мембраны и цитоплазмы эритроцита, геоме-

трические параметры эритроцита и канала, а также физические параметры измерений. Время Δt_{er} прохождения эритроцитом канала определяется условием $h(\Delta t_{er}) = l + h_c$.

Наряду с численным решением системы уравнений для $h(t)$, $\Delta(t)$ и точным вычислением времени прохождения в рамках используемой модели, возможна и аналитическая оценка этого времени на основе квазистационарного приближения для зависимости $\Delta(h)$. В типичных условиях прохождения справедливо $d\Delta/dt \ll dh/dt$. Это позволяет считать приближенно $d\Delta/dt = 0$ в соответствующем дифференциальном уравнении и свести его к алгебраическому. Получаемое уравнение является квадратным относительно функции $\Delta(h)$ и имеет аналитическое решение. Согласно этому решению, на стадии втягивания величина Δ возрастает от весьма малого начального значения Δ_0 , соответствующего плотному прилеганию эритроцита к плоскости фильтра в момент перекрытия входа в канал, до величины $\Delta(h_c)$, соответствующей полностью втянутому эритроциту. На стадии скольжения (в случае $l > h_c$) толщина зазора, рассчитанная в квазистационарном приближении, остается неизменной и равной $\Delta(h_c)$. На стадии выхода из канала функция $\Delta(h)$, рассчитанная в указанном приближении, монотонно убывает от $\Delta(h_c)$ до нуля в момент выхода. Для дальнейшего изложения достаточно привести формулы, описывающие $\Delta(h_c)$. Как отмечено в начале раздела, характер зависимости $\Delta(h)$ резко изменяется в окрестности $\Delta(h) \sim \Delta_g$ из-за возникновения дилатационных натяжений в мембране эритроцита. В связи с этим удобнее дать отдельные формулы для интервала $\Delta(h) < \Delta_g$, где эта зависимость определяется сдвиговыми натяжениями в мембране, и для интервала $\Delta(h) > \Delta_g$, где она определяется дилатационными натяжениями и где толщина зазора практически не отличается от Δ_g . В случае $\Delta(h_c) < \Delta_g$ точное решение имеет вид:

$$\Delta(h_c) = \frac{h_c}{8(l-h_c)} \left(\sqrt{1 + \frac{8(l-h_c)R_0^2 r_0 (P_2 - P_1)}{h_c(R_0^4 + 1)\mu}} - 1 \right), \quad (4)$$

где r_0 – радиус недеформированного эритроцита. Величины Δ , h_c , l и r_0 безразмерны и выражены в единицах радиуса канала r_0 , являющегося размерной величиной.

В случае $\Delta(h_c) > \Delta_g$ достаточно ограничиться приближенным выражением, поскольку сдвиговые натяжения пренебрежимо малы по сравнению с дилатационными:

$$\Delta(h_c) \approx \Delta_g + \frac{3S_0 r_{spc} (P_2 - P_1) r_0}{2(6V - 8\pi r_{spc}^3)K}. \quad (5)$$

Отметим, что в области реально используемых давлений фильтрации до ~ 500 Па второе слагаемое в (5) не превышает 10^{-3} .

Квазистационарное приближение для $\Delta(h)$ позволяет также получить аналитическую оценку длительности Δt_{er} прохождения эритроцитом канала, наряду с ее точным вычислением в рамках решения системы дифференциальных уравнений. Как отмечено выше, на стадии скольжения величина $\Delta(h)$ остается постоянной. Если заменить функцию $\Delta(h)$ на стадиях втягивания и выхода ее средними значениями Δ_1 и Δ_3 соответственно, то для каждой стадии получается интегрируемое аналитически уравнение типа $dh/dt = f(h, \Delta_i)$. Это дает возможность получить аналитические выражения для длительности стадий и для их суммы Δt_{er} . Применительно к достаточно длинным каналам с $l \geq h_c$, где имеется стадия скольжения, такая оценка Δt_{er} имеет вид:^{*}

$$\Delta t_{er} = \frac{h_c(u)}{l} \left[1 - \frac{h_c(u)}{2l} \right] [1 + F(\Delta P)] + \left[1 - \frac{h_c(u)}{l} \right]^2 + \frac{h_c(u)}{l^2} F(\Delta P) \frac{\eta_s}{\eta_b r_0} \bar{C}_\eta + \frac{h_c(u)}{l^2} F(\Delta P) \frac{\eta_{Hb}(u)}{\eta_b} \bar{C}_{Hb} + \frac{h_c(u)^2}{8l^2} \left[\frac{F(\Delta P)}{\Delta_1(u)} + \frac{1}{\Delta_3(u)} \right] + \left(1 - \frac{h_c}{l} \right) \frac{h_c}{4l\Delta_2(u)}, \quad (6)$$

$$F(\Delta P) = \left[1 - \frac{\mu \bar{C}_\mu}{(P_2 - P_1) r_0^2} \right]^{-1}, \quad l \geq h_c$$

Величина Δt_{er} в (6) выражена в единицах $(\Delta t)_b$, величины l , h_c , Δ_{1-3} – в единицах r_0 , величина r_0 и все физические величины – в системных единицах, $\Delta_2 = \Delta(h_c)$. Величины Δ_1 и Δ_3 являются средними значениями толщины пристенного зазора на стадиях втягивания и выхода эритроцита, причем $\Delta_1, \Delta_3 \sim 0.5\Delta(h_c)$. Величины \bar{C}_μ , \bar{C}_{Hb} , \bar{C}_η являются средними значениями соответствующих функций на стадии втягивания, вычисляемыми в рамках описанной модели формы втягиваемого эритроцита. Зависимость $\eta_{Hb}(u)$ описывается формулами (1) и (2).

3.3. ТРИ РЕЖИМА ФИЛЬТРАЦИИ И ЗАВИСИМОСТЬ Δt_{er} ОТ ФИЗИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ

Формула (6) позволяет установить характер зависимости времени фильтрации от механических и геометрических параметров эритроцита и

^{*} Это приближенное выражение используется здесь только для иллюстрации качественных закономерностей. Более подробное изложение теории и вывод аналогичных выражений будут приведены в отдельной публикации.

канала, а также от физических параметров процесса фильтрации – осмолярности и вязкости среды, давления фильтрации, температуры. Слагаемые (6) сгруппированы в соответствии с характером их зависимости от осмолярности. Для первых трех слагаемых она определяется изменением $h_c(u)$ и является достаточно слабой. Следующие три слагаемых имеют сильную осмотическую зависимость. Для первого она обусловлена изменением вязкости раствора гемоглобина $\eta_{Hb}(u)$ в соответствии с формулой (2). Наиболее сильно эта зависимость проявляется в гипертонической области вследствие экспоненциального роста η_{Hb} при повышении концентрации раствора. Для второго и третьего слагаемых этой группы осмотическая зависимость связана с изменением толщины пристенного зазора $\Delta(u)$ из-за осмотического раздувания эритроцита, описываемого уравнением (1). Как отмечено при анализе уравнения (3), величина $\Delta(u)$ фактически ограничена геометрическим пределом $\Delta_g = r_0 - r_{spc}(S, V, r_0)$. При $r_{spc}(S, V, r_0) \rightarrow r_0$ величины $\Delta_{1-3} \sim \Delta_g \rightarrow 0$, следовательно $\Delta t_{er} \rightarrow \infty$. Таким образом, зависимость $\Delta t_{er}(u)$ характеризуется теми же, что и (3) величинами критической осмолярности среды u_{cr} и критического объема клетки V_{cr} . Из формулы для $r_{spc}(S, V)$ (в начале раздела 3) и уравнения (1) можно получить, что $\Delta_g(u) \approx 2[V_{cr} - V(u)]/(S_0 - 4\pi r_0^2) \propto (u - u_{cr})$ при $(V_{cr} - V) \ll V_{cr}$. Согласно (6), это дает оценку $\Delta t_{er}(u) \propto (u - u_{cr})^{-1}$ вблизи u_{cr} . При повышении u от u_{cr} вначале происходит резкое убывание $\Delta t_{er}(u)$ в соответствии с возрастанием $\Delta(u)$ от нуля до конечных значений. При дальнейшем увеличении u ослабевает как рост толщины зазора, так и степень его влияния на изменение Δt_{er} . В то же время на величине Δt_{er} все более сказывается увеличение вязкости внутриклеточного раствора гемоглобина. В результате зависимость $\Delta t_{er}(u)$ проходит через минимум в области нормальной осмолярности и становится возрастающей в гипертонической области.

Характер этого роста и вообще форма кривой $\Delta t_{er}(u)$ во многом зависят от соотношения длин канала и втянутого эритроцита. В соответствии с этим целесообразно различать три режима фильтрации, условно назвав их режимом продавливания через короткое узкое отверстие ($l, r_0 \ll (S/4\pi)^{1/2}$), режимом короткого ($l \sim h_c$) и длинного ($l \gg h_c$) канала. В первом режиме сопротивление фильтрации определяется, главным образом, вязким трением в липидном бислое продавливаемой оболочки и в растворе гемоглобина, перетекающем в еще не втянутом и уже вышедшем объемах эритроцита по обе стороны тонкого фильтра. В этом случае зависимость $\Delta t_{er}(u)$ в гипертонической области практически совпадает с зависимостью $\eta_{Hb}(u)$. Трение о стенки отверстия начинает сказываться лишь при осмолярностях вблизи u_{cr} . В режиме короткого

канала заметный вклад в сопротивление фильтрации во всем диапазоне осмолярности начинает давать трение в пристенном зазоре, толщина которого зависит, в основном, от упругих свойств мембраны эритроцита. Наконец, в режиме длинного канала определяющим фактором гидродинамического сопротивления становится вязкое течение буфера впереди и позади эритроцита. Как показывает (6), в этом случае зависимость $\Delta t_{er}(u)$ в гипертонической области стремится к единице.

Режимы фильтрации различаются также по величине наиболее ярко выраженного параметра осмотической кривой – критической осмолярности u_{cr} . В режимах продавливания через отверстие и короткого (при $l < h_c$) канала критической формой втягиваемого эритроцита является гантелеобразная фигура в виде цилиндра с одинаковыми сферосегментными торцами большего диаметра, выступающими за пределы канала [3]. При $l \geq h_c$ такой формой является сфероцилиндр. При одинаковой площади поверхности этим формам соответствуют разные объемы и, следовательно, разные величины u_{cr} . При $l < h_c$ величина u_{cr} сдвигается в гипотоническую сторону и зависит уже не только от диаметра канала, но и от его длины. Формулы, связывающие объем “гантели” V_{cr} с величинами S, r_0 и l , приведены в [3, 8].

Отметим, что граница $l = h_c$ между режимами короткого и длинного каналов определяется не только длиной канала, но и физическими условиями фильтрации, в частности, осмолярностью среды. Это обусловлено зависимостью h_c от объема эритроцита и толщины пристенного зазора. Так, для $r_0 = 1.55$ мкм, $S = 138$ мкм², $V_n = 91$ мкм³ и $u < 600$ мосМ режим короткого канала реализуется во всем этом диапазоне лишь при $l < 10$ мкм, а режим длинного канала – начиная с $l > 21$ мкм. Для каналов промежуточной длины возможна смена режима фильтрации при увеличении осмолярности, причем и сама возможность, и соответствующее значение осмолярности зависят от давления фильтрации и механических параметров эритроцита. Эти особенности существенны для адекватного описания измеренных осмотических кривых.

Влияние длины канала на форму осмотической кривой иллюстрирует рис. 3. Расчеты $\Delta t_{er}(u)$ выполнены на основе точных уравнений эластогидродинамической модели фильтрации, с использованием зависимостей (1), (2) для $V(u)$, $\eta_{Hb}(u)$ и следующих значений параметров эритроцита и среды при 25°C: $S = 138$ мкм², $V_n = 91$ мкм³, $H = 28.9 \times 10^{-12}$ г [8], $A = 0.589$, $B = 0.411$ [4], $K = 0.450$ Н м⁻¹, $\mu = 6.54 \times 10^{-6}$ Н м⁻¹ [17], $\eta_s = 0.74 \times 10^{-6}$ Н сек м⁻¹ [18], $\eta_b = 0.89$ сП [19], $u_n = 300$ мосМ, $P_2 - P_1 = 15$ мм Н₂О. Кривая 1 соответствует режиму короткого канала $l(h_c)$, кривые 2–4 – режиму

длинного канала. Как показывает сопоставление сплошных и пунктирных кривых, время прохождения эритроцита через короткие каналы ($l \leq h_c$) практически целиком определяется стадией втягивания. Сравнение кривой l с остальными кривыми показывает, что в режиме короткого канала наиболее независимо и отчетливо проявляются два основных механизма формирования осмотической зависимости времени фильтрации: геометрический в гипотонической и вязкостный в гипертонической области. По мере роста l основным фактором, определяющим Δt_{er} , становится вязкое трение в потоке буфера до и после эритроцита. Относительное время $\Delta t_{er}(u)$ в гипертонической области стремится к единице, и второй механизм оказывается замаскированным на этом фоне. Таким образом, режим короткого канала более информативен для диагностических приложений осмо-фильтрационного метода. Отметим, что общее увеличение Δt_{er} при уменьшении l , особенно в режимах короткого канала и продавливания, обусловлено относительным характером Δt_{er} . Время протекания буфера убывает пропорционально l . В противоположность этому, абсолютное время фильтрации эритроцита при каждом значении u стремится к постоянной величине, независимой от l и определяемой перетеканием раствора гемоглобина внутри невтянутой области клетки.

Уравнение (6) позволяет очертить границы применимости феноменологической формулы (3) и выяснить физический смысл ее параметров a_0 , b_0 , m . Первое слагаемое этой формулы соответствует четвертому слагаемому выражения (6), а второе – двум его последним слагаемым. Из этого следует, что коэффициенты a_0 , b_0 должны зависеть от геометрических параметров эритроцита и канала (h_c/l), сдвиговой упругости мембраны, а также давления фильтрации. На основании сделанной выше оценки $\Delta_g(u) \propto [V_{cr} - V(u)]$ можно ожидать, что показатель степени m в (3) должен быть порядка 1. Отметим, что для определения величины V_{cr} по измеренной кривой $\Delta t_{er}(u)$ и формуле (3) конкретная величина m не очень существенна, достаточно условия $m \sim 1-2$. Поэтому формула (3) удобна для практического нахождения V_{cr} . Отметим также, что выражение (3) не содержит слагаемых, слабо зависящих от u и аналогичных первым трем слагаемым (6). Эти слагаемые сильно меняют характер зависимости $\Delta t_{er}(u)$ в гипертонической области по мере увеличения длины канала (рис. 3). Таким образом, феноменологическая формула (3) применима лишь к достаточно тонким фильтрам, где $l \ll h_c$. Фактически, она описывает режим продавливания через отверстие.

Перейдем к анализу зависимости Δt_{er} от двух других физических факторов, определяющих процесс фильтрации – давления фильтрации и вязкости среды ресуспендирования клеток. Зависимость $\Delta t_{er}(\Delta P)$

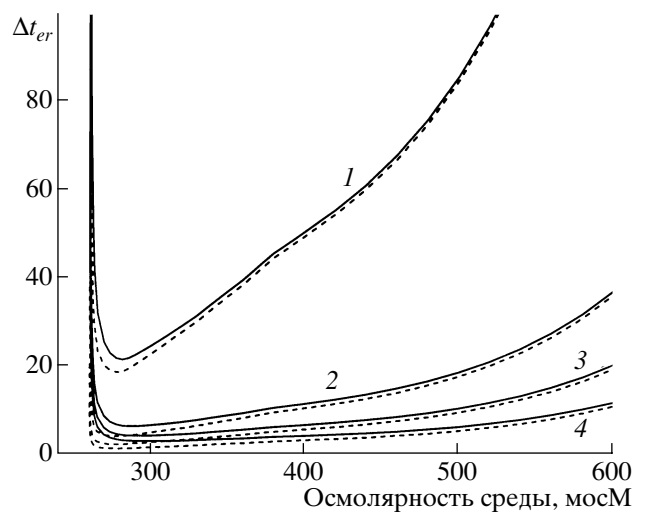


Рис. 3. Осмотические зависимости относительного времени прохождения эритроцита через канал диаметром 3.1 мкм, рассчитанные на основе эластогидродинамической модели для разных длин канала при 25°C: $l = 10$ мкм (1), 22 мкм (2), 30 мкм (3), 40 мкм (4). Штриховой линией показан вклад стадии втягивания эритроцита в канал. $S = 138$ мкм², $V_{300} = 91$ мкм³, остальные параметры указаны в тексте.

характеризуется двумя основными особенностями: минимальным давлением фильтрации ΔP_{min} , ниже которого процесс прохождения эритроцита через канал невозможен ($F(\Delta P) \rightarrow \infty$ в (6)), и монотонным убыванием Δt_{er} с ростом ΔP . Физической причиной, определяющей наличие и величину ΔP_{min} , является натяжение невтянутой части мембраны, препятствующее втягиванию эритроцита. Убывание Δt_{er} с ростом ΔP связано как с уменьшением относительной величины этого сопротивления мембраны (убыванием $F(\Delta P)$ в (6)), так и с ростом Δ при увеличении ΔP , описываемом уравнениями (4), (5).

Зависимость Δt_{er} от вязкости среды η_b является, согласно (6), монотонно убывающей. Это обусловлено изменением соотношения вкладов двух процессов, определяющих гидродинамическое сопротивление канала на стадии втягивания – перетекания раствора гемоглобина в эритроците и движения жидкости впереди эритроцита. По мере роста вязкости среды роль второго процесса возрастает, и относительное время втягивания все больше определяется движением жидкости перед клеткой.

3.4. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ФОРМУ ОСМОТИЧЕСКОЙ КРИВОЙ $\Delta t_{er}(u)$

Температурные изменения осмотической кривой обусловлены изменением вязкости раствора гемоглобина, липидного бислоя и буфера η_{Hb} , η_s и η_b , а также изменением площади S и, в меньшей степени, модуля сдвиговой упругости μ мембраны.

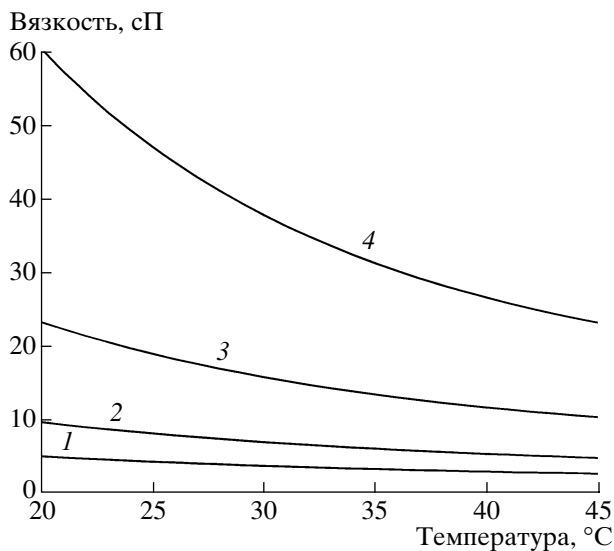


Рис. 4. Температурная зависимость вязкости внутриклеточного раствора гемоглобина при разной осмолярности среды, рассчитанная на основе измерений [15, 21] и формулы Росса-Минтона (2), модифицированной авторами. $u = 220$ мосМ, $Hb = 0.263$ г см⁻³ (1); 300 мосМ и 0.318 г см⁻³ (2); 400 мосМ и 0.373 г см⁻³ (3); 500 мосМ и 0.416 г см⁻³ (4). $V_n = 91$ мкм³, $H = 28.9 \times 10^{-12}$ г. Остальные параметры расчетов указаны в тексте.

Зависимости S , μ и η_s от температуры $t^\circ\text{C}$ в шкале Цельсия измерены для эритроцитов человека в работах [17, 18]: $S(t^\circ\text{C}) = (0.97 + 1.2 \times 10^{-3} \times t^\circ\text{C}) \times S(25^\circ\text{C})$ в интервале $t^\circ\text{C} = 1-50^\circ\text{C}$, $\mu(t^\circ\text{C}) = (8.1228 - 6.3221 \times 10^{-2}(t^\circ\text{C}) \times 10^{-6} \text{ Н м}^{-1}$ в интервале $5-46^\circ\text{C}$, $\eta_s(t^\circ\text{C}) = [2.71162 - 0.10704 \times t^\circ\text{C} + 0.00117 \times (t^\circ\text{C})^2] \times 10^{-6} \text{ Н с м}^{-1}$ в интервале $6-37^\circ\text{C}$. Вязкость буфера η_b несущественно отличается от вязкости чистой воды, описываемой зависимостью $\eta_{\text{H}_2\text{O}}(t^\circ\text{C}) = \exp[-3.608 + 530.281/(126.463 + t^\circ\text{C})]$ сП [19, 20].

Более сложен вопрос о температурно-осмотической зависимости вязкости внутриклеточного раствора гемоглобина $\eta_{Hb}(t^\circ\text{C}, Hb)$. Формальное описание такой зависимости отсутствует. Имеющиеся измерения выполнены *in vitro* для водно-солевых растворов гемоглобина, полученных гемолизом эритроцитов. Отдельно измерена температурная зависимость $\eta_{Hb}(t^\circ\text{C})$ в области $2-45^\circ\text{C}$ при концентрации $Hb = 0.33$ г см⁻³ [21], и концентрационная зависимость $\eta_{Hb}(Hb)$ в диапазоне концентраций Hb до 0.45 г см⁻³ при $t^\circ\text{C} = 37^\circ\text{C}$ (см. ссылки в [15]). Концентрационная зависимость хорошо описывается формулой Росса-Минтона (2), которая, однако, не учитывает явным образом температурную зависимость η_{Hb} . Обработка измерений [21] показывает, что отношение $\eta_{Hb}(t^\circ\text{C})/\eta_{\text{H}_2\text{O}}(t^\circ\text{C})$ существенно зависит от температуры, изменяясь от 13.8 при 2°C до 10.3 при

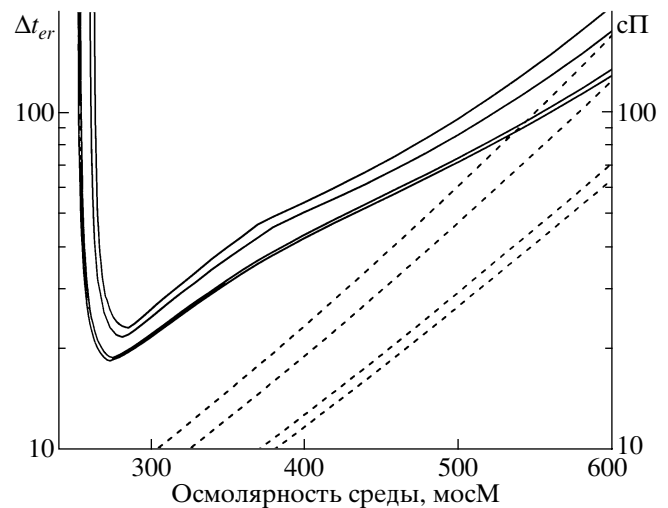


Рис. 5. Осмотические зависимости относительного времени прохождения эритроцита через канал диаметром 3.1 мкм и длиной 10 мкм, рассчитанные на основе эластогидродинамической модели для температур (сверху вниз) 20, 25, 37 и 40°C (две последние кривые почти совпадают). Штриховой линией показаны соответствующие зависимости коэффициента вязкости внутриклеточного раствора гемоглобина, рассчитанные по модифицированной формуле Росса-Минтона (ось ординат – справа). $S = 138$ мкм, $V_{300} = 91$ мкм³, остальные параметры указаны в тексте.

20°C и 8.7 при 40°C . Формально это означает, что характеристическая вязкость $\tilde{\eta}$ и структурный фактор y_0 в уравнении (2) должны зависеть от температуры. В соответствии с природой вязкости естественно предположить, что зависимость $\tilde{\eta}$ является убывающей. Температурную зависимость фактора y_0 , связанного с формой макромолекул в растворе [15, 16], можно считать достаточно слабой в отсутствие фазовых переходов.

Исходя из высказанных соображений, подставим в (2) вместо $\tilde{\eta}$ и y_0 их разложения в ряд по температуре вплоть до квадратичного для $\tilde{\eta}$ и линейного для y_0 слагаемых в окрестности температуры 37°C , для которой в работе [15] определены значения $\tilde{\eta} = 3.6$ см³ г⁻¹ и $y_0 = 0.40$. Полученную формулу сопоставим с температурной зависимостью $\eta_{Hb}(t^\circ\text{C})$, измеренной в работе [21]. Для совпадения величин η_{Hb} , даваемых этими двумя зависимостями при $t^\circ\text{C} = 37^\circ\text{C}$, в формуле (2) необходимо принять при этом $Hb = 0.3231$ г см⁻³ вместо 0.33 г см⁻³. Такое различие укладывается в пределы суммарной погрешности измерений работ [15] и [21]. Аппроксимация измерений [21] формулой (2), модифицированной указанным образом, дает следующую температурную зависимость ее параметров в области $2-45^\circ\text{C}$: $\tilde{\eta}(t^\circ\text{C}) = 3.6 - 5.1607 \times 10^{-3} \times (t^\circ\text{C} - 37) + 1.3994 \times 10^{-4} \times (t^\circ\text{C} - 37)^2$, $y_0(t^\circ\text{C}) = 0.4 - 5.67 \times 10^{-6} \times$

$\times (t^{\circ}\text{C} - 37)$. На рис. 4 показаны зависимости $\eta_{Hb}(t^{\circ}\text{C})$, рассчитанные по формуле (2) с этими параметрами. Для расчетов выбраны концентрации раствора гемоглобина в клетке, характерные для гипотонической области (220 мосМ), нормальной (300 мосМ) и гипертонической области (400 и 500 мосМ) осмолярности среды. Эти расчеты указывают типичные диапазоны изменения вязкости цитоплазмы эритроцитов в температурно-осмотических измерениях.

Обобщение формулы Росса-Минтона для η_{Hb} и использование указанных выше температурных зависимостей остальных параметров эритроцитов позволяет рассчитать осмотические кривые $\Delta t_{er}(u)$ при разных температурах на основе точных уравнений эластогидродинамической модели (рис. 5). В соответствии с аргументами, приведенными при анализе формулы (1), объем эритроцита в рассматриваемом диапазоне $t^{\circ}\text{C} = 20-40^{\circ}\text{C}$ считался независимым от температуры. Остальные параметры расчета составили: $H = 28,9 \times 10^{-12}$ г [8], $A = 0,589$, $B = 0,411$ [4], $K = 0,450$ Н м⁻¹ [17], $u_n = 300$ мосМ, $P_2 - P_1 = 15$ мм Н₂O. Расчет выполнен для режима короткого канала. Функция $C_{Hb}(h)$, описывающая вязкостное сопротивление втягиванию раствора гемоглобина, определена в рассматриваемой модели с точностью до амплитудного множителя, величина которого выбиралась исходя из соответствия форме измеренных зависимостей $\Delta t_{er}(u)$. Расчеты показали, что гипотоническое смещение u_{cr} с ростом температуры обусловлено увеличением площади мембраны, а общее понижение времени фильтрации – уменьшением вязкости раствора гемоглобина и липидного бислоя. Сопоставление зависимостей $\Delta t_{er}(u)$ и $\eta_{Hb}(u)$ на рисунке показывает, что наклон кривых $\Delta t_{er}(u)$ в гипертонической области 350–500 мосМ существенно меньше наклона $\eta_{Hb}(u)$, и лишь в области предельно высоких осмолярностей приближается к нему. Это указывает на достаточно сильное влияние трения в пристенном зазоре на величину Δt_{er} даже в коротких каналах, где основной вклад в Δt_{er} дает стадия втягивания. В то же время форма кривых $\Delta t_{er}(u)$ в гипертонической области достаточно хорошо отражает изменение $\eta_{Hb}(u)$. В частности, она может использоваться для контроля плавности этого изменения.

4. АНАЛИЗ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

Сопоставление измеренных (рис. 1) и рассчитанных (рис. 5) зависимостей $\Delta t_{er}(u)$ показывает, что измерения были выполнены в режиме, близком к режиму продавливания через отверстие. Об этом свидетельствуют существенно меньшие величины u_{cr} для измеренных кривых, соответствующие гантелеобразной предельной форме втягивания эритроцита, а также практическое совпаде-

ние наклонов зависимостей $\Delta t_{er}(u)$ и $\eta_{Hb}(u)$ на рис. 1 во всей гипертонической области свыше ~400 мосМ. Последнее, как показано в предыдущем разделе, означает фактическое отсутствие заметного вклада гидродинамического трения в пристенном зазоре в общую величину Δt_{er} даже на стадии втягивания, что характерно только для режима продавливания. Отсутствием этого вклада объясняются, по-видимому, и в целом существенно меньшие величины измеренных Δt_{er} по сравнению с рассчитанными. Вывод о такой специфике режима фильтрации согласуется с данными о геометрии пор никелевых фильтров, использованных при измерениях, согласно которым при общей толщине фильтра 11 мкм длина собственно цилиндрической части составляла лишь 3,6 мкм.

Как показано в разделе 3.3, для нахождения величин u_{cr} , соответствующих измеренным осмотическим зависимостям, можно использовать феноменологическое уравнение (3). В предположении независимости объема эритроцита от температуры это позволяет по формуле (1) определить для каждой температуры величину критического объема эритроцита $V_{cr} = V(u_{cr})$. При известной геометрии канала и критической формы эритроцита эти величины дают соответствующие значения площади поверхности эритроцита [3, 8]. Такая обработка измеренных кривых $\Delta t_{er}(u)$ показала, что температурная зависимость S , регистрируемая по сдвигу осмотической границы отсечки фильтруемости, соответствует известным данным, полученным методом втягивания в микропипетку [18].

Наклоны измеренных зависимостей $\Delta t_{er}(u)$ в гипертонической области близки к наклонам соответствующих по температуре расчетных зависимостей $\eta_{Hb}(u)$, не предполагающих фазовых переходов в растворе гемоглобина. Поэтому плавность наблюдаемых изменений Δt_{er} как по осмолярности, так и по температуре, приводит к выводу об отсутствии скачкообразных изменений вязкости внутриклеточного раствора гемоглобина в условиях наших измерений. Максимальная величина концентрации Hb в этих условиях достигала, по нашим оценкам, 0,42 г см⁻³.

5. ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Температурно-осмотические исследования фильтруемости эритроцитов являются эффективным инструментом изучения состояния мембранного скелета и внутриклеточного раствора гемоглобина *in situ* в различных условиях. По этой причине они весьма значимы и для медицинской диагностики. Однако развитие таких исследований в значительной мере сдерживалось трудностями теоретического описания и однозначной интерпретации регистрируемых фильтрационных зависимостей. Предложенная в настоящей работе эластогидродинамическая модель фильтруе-

ти впервые дала возможность систематического и детального анализа связей таких зависимостей с конкретными физико-механическими параметрами эритроцитов и условиями измерений. Такой анализ основан на точных в рамках модели количественных расчетах, а в качественном аспекте – на формуле (6) для $\Delta t_{er}(u, \Delta P, t^\circ\text{C})$ и уравнениях (4) и (5) для толщины пристенного зазора. В разделе 3 на этой основе выяснен характер зависимости Δt_{er} от давления фильтрации, а также от осмолярности, вязкости и температуры среды ресуспендирования эритроцитов. Там же проанализирована связь формы зависимостей $\Delta t_{er}(u)$ с геометрией канала, и выделены три существенно различных по физическим условиям режима фильтрации эритроцитов в зависимости от соотношения длин канала и втянутого эритроцита.

Наблюдаемые температурные изменения формы кривой $\Delta t_{er}(u)$ выражаются в гипотоническом сдвиге границы осмотической отсечки фильтруемости и в общем понижении $\Delta t_{er}(u)$ с ростом температуры. Сопоставление измерений и расчетов позволяет заключить, что в температурном интервале 25–40°C сдвиг границы фильтруемости обусловлен увеличением площади клеточной мембраны при практически неизменном объеме эритроцита. Общее понижение $\Delta t_{er}(u)$ обусловлено уменьшением вязкости липидного бислоя и внутриклеточного раствора гемоглобина, а в гипертонической области – главным образом раствора гемоглобина.

Связь формы кривой $\Delta t_{er}(u)$ с формой зависимости $\eta_{Hb}(u, t^\circ\text{C})$ наиболее выражена для режима продавливания через отверстие. Согласно (6), она определяется отношением η_{Hb}/η_b , зависящим от температуры. Характер этой зависимости отражает коллективные свойства ансамбля молекул гемоглобина в растворе, и может служить инструментом изучения этих свойств непосредственно в эритроците. Так, изменение осмолярности среды в пределах 200–600 мосМ и ее температуры в диапазоне 20–45°C позволяет варьировать плотность цитоплазматического раствора гемоглобина в пределах 0,25–0,45 г см⁻³, а его вязкость – от ~5 до ~120 сП (рис. 4, 5) без нарушения функциональной активности клетки. Изменение вязкости таких растворов *in vitro* и в отсутствие фазовых переходов полностью описывается модифицированной в данной работе формулой Росса-Минтона. Однако физико-химическое состояние раствора гемоглобина внутри эритроцита может существенно отличаться от такового *in vitro* при тех же концентрациях. Сопоставление рис. 1 и 5 показывает, что температурное понижение измеренных кривых $\Delta t_{er}(u)$ в гипертонической области заметно меньше, чем рассчитанных с учетом зависимости $\eta_{Hb}(t^\circ\text{C})$ по модифицированной формуле Росса-Минтона. Наблюдаемое расхождение может свидетельствовать о том, что особенностью фи-

зико-химического состояния раствора гемоглобина внутри эритроцита является более слабая зависимость вязкости от температуры. Можно также предположить наличие в эритроцитах физиологического механизма частичной компенсации температурных изменений вязкости цитоплазмы.

Данные температурных измерений [5, 6] коэффициента вязкости растворов, приготовленных на основе лиофильно высушенного гемоглобина, предполагают скачкообразное изменение η_{Hb} в зависимости от концентрации *Hb* при ее увеличении свыше 0,35–0,4 г см⁻³. Такое изменение проявлялось бы наиболее ярко в области комнатных температур и ниже, приводя к ступенькам на кривых $\Delta t_{er}(u)$ в гипертонической области свыше 500 мосМ. В наших экспериментах не обнаружено скачкообразных изменений зависимостей $\Delta t_{er}(u)$, которые, согласно (6), указывали бы на аналогичные изменения η_{Hb} . Этот результат, как и пониженная величина наблюдаемых температурных изменений $\Delta t_{er}(u)$ в гипертонической области, также может быть следствием гомеостатической регуляции вязкости цитоплазмы эритроцита. Проверка такой гипотезы требует целенаправленных экспериментов, в том числе измерений фильтруемости эритроцитов при максимально высокой осмолярности среды.

1. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 02-04-48155-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Evans E.A., Skalak R. Mechanics and Thermodynamics of Biomembranes. Boca Raton, Florida: CRC-Press, 1980. (Русский перевод: Ивенс И., Скейлак Р. Механика и термодинамика биологических мембран. М.: Мир, 1982. 304 с.)
- Stuart J., Nash G.B. // Crit. Rev. in Clin. Labor. Scie. 1990. V. 28. № 1. P. 61–93.
- Атауллаханов Ф.И., Витвицкий В.М., Лисовская И.Л., Тужилова Е.Г. // Биофизика. 1994. Т. 39. № 4. С. 672–680.
- Лисовская И.Л., Атауллаханов Ф.И., Тужилова Е.Г., Витвицкий В.М. // Биофизика. 1994. Т. 39. № 5. С. 864–871.
- Artmann G.M., Kelemen C., Porst D., Buldt G., Chien S. // Biophys. J. 1998. V. 75. № 6. P. 3179–3183.
- Kelemen C., Chien S., Artmann G.M. // Biophys. J. 2001. V. 80. № 6. P. 2622–2630.
- Singh M., Stolz J.F. // Clin. Hemorheology and Microcirculation. 2002. V. 26. № 1. P. 1–7.
- Яковенко Е.Е., Розенберг Ю.М., Колодей С.В., Лисовская И.Л., Атауллаханов Ф.И. // Биол. мембраны. 2001. Т. 18. № 1. С. 16–28.
- Nakamura T., Hasegawa S., Shio H., Uyesaka N. // Blood cells. 1994. V. 20. № 1. P. 151–165.

10. Яковенко Е. Е., Лисовская И. Л., Атауллаханов Ф. И. // Биол. мембраны. 1999. Т. 16. № 3. С. 344–355.
11. Кононенко В. Л., Розенберг Ю. М., Шимкус Я. К., Атауллаханов Ф. И. // Тез. докл. VI Всероссийский конф. по биомеханике “Биомеханика-2002” (Нижний Новгород, 20–24 мая 2002). Нижний Новгород: Издание ИПФ РАН. 2002. С. 47.
12. Linderkamp O., Meiselman H.J. // Blood. 1982. V. 59. № 6. P. 1121–1127.
13. Egginton S., Fisher A.C., Nash G.B. // Clin. Hemorheol. 1992. V. 12. P. 677–687.
14. Lecklin T., Egginton S., Nash G.B. // Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol. 1996. V. 432. P. 753–759.
15. Ross P.D., Minton A.P. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1977. V. 76. № 4. P. 971–976.
16. Tanford C. Physical chemistry of macromolecules. New York, London: John Wiley & Sons, Inc., 1961. 710 p.
17. Waugh R. E., Evans E. A. // Biop. J. 1979. V. 26. № 1. P. 115–131.
18. Hochmuth R. M., Buxbaum K. L., Evans E. A. // Biophys. J. 1980. V. 29. № 1. P. 177–182.
19. Kaye G.W., Laby T.H. Tables of physical and chemical constants. London, New York, Toronto: Longmans, Green & CO, 1959. (Русский перевод: Кэй Д., Лэби Т. Таблицы физических и химических постоянных. М.: Физматгиз, 1962. 248 с.)
20. Reid R.C., Prausnitz J.M., Sherwood T. K. The properties of gases and liquids. New York: McGraw-Hill, Inc. 1977. (Русский перевод: Рид Р., Праусниц Д., Шервуд Т. 1982. Свойства газов и жидкостей. Ленинград: Химия. 592 с.)
- Sung K.-L. P., Chien S. // Chin. J. Physiol. 1992. V. 35. № 2. P. 81–94.

Temperature-Osmotic Dependence of Erythrocytes Filterability

V. L. Kononenko*, J. M. Rozenberg**, J. K. Shimkus*, F. I. Ataulakhanov**

* Emanuel Institute of Biochemical Physics,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; tel: (7-095)-137-83-47; fax: (7-095)-137-41-01; e-mail:
konon@sky.chph.ras.ru;

**National Research Center for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences,
Moscow, Russia; fax: (095) 212-88-70; e-mail: fazli@blood.ru

The osmotic dependences of erythrocytes passage time through the nickel mesh with 3.1 μm diameter, 11 μm length pores are measured for healthy donors at temperatures 25, 37, 40°C for the medium osmolarity range 210–520 mosM. It is shown that the increase of temperature leads to a monotonic shift of the osmotic cut-off boundary of filtration curve to lower osmolarity values, as well as to the general decrease of filtration times. An approximate non-stationary theory of erythrocyte filtration through a long narrow channel is developed. The theory is based on the combined treatment of the equations of mechanical equilibrium of the cell membrane together with hydrodynamics equations for the fluid in a channel and for hemoglobin solution inside the cell. An approximate analytical solution is obtained, which describes the dependence of the transit time on the medium osmolarity, as well as on mechanical, geometric, and physical parameters of the cell, channel, and measuring conditions. Generalization of the Ross-Minton formula for the concentration dependence of viscosity of hemoglobin solution is suggested to describe the temperature effect. Analysis of measurements results using the theory developed showed that the temperature shift of hypotonic cut-off of erythrocytes filterability can be accounted for by the temperature increase of the cell surface area under practically unchanged cell volume. No sudden temperature transitions of viscosity of hemoglobin solution inside the cell, similar to those reported in literature for the similar conditions in vitro, were detected under conditions of the measurements.