

МОДЕЛИРОВАНИЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТА¹

© 2013 Ю.С. Нагорнов² И.В. Жилияев³

В статье предложена модель эритроцита для расчета морфофункциональных свойств. Модель представляет эритроцит в виде однородного упругого тела с упругостью, зависящей от расстояния до центра симметрии эритроцита. Данные для моделирования взяты из экспериментального исследования, в котором были применены метод атомно-силовой микроскопии (измерение упругости мембраны эритроцитов и морфологии) и метод Культера. В разработанной модели упругость мембраны изменялась в зависимости от расстояния до центра в пределах 1–1,6 кПа. Расчет упругих свойств выполнен двумя методами — методом конечных элементов и методом оптимизации. В рамках модели получена зависимость морфологии эритроцита от давления на мембрану. Разница давлений на мембрану эритроцита менялась в диапазоне 0,5–2 кПа.

Ключевые слова: модель эритроцита, атомно-силовая микроскопия, геометрические характеристики эритроцита, моделирование упругих свойств.

Введение

Моделирование в биологии применяется достаточно часто, хотя области исследования математического аппарата до сих пор крайне ограничены. В основном это статистические методы, применяемые к полученным экспериментальным данным. Однако встречаются работы с развитием статистических методов, где используются аппроксимации или применяются корреляционные зависимости. Компьютерное моделирование в медицине также используется для восстановления изображения по данным томографии или ультразвуковых исследований. Теория упругости применяется в медицине исключительно для расчета биомеханических изделий и медицинских приборов с целью лечения переломов и похожих заболеваний. До сих пор теория упругости не применялась к клеткам и биологическим объектам микронного масштаба, поскольку информации об организации материи на этом

¹Работа выполнена при поддержке ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009–2013 годы (соглашение № 14.В37.21.0228).

²Нагорнов Юрий Сергеевич (nagornovys@yandex.ru), научно-исследовательская часть Тольяттинского государственного университета, 445667, Российская Федерация, г. Тольятти, ул. Белорусская, 146.

³Жилияев Игорь Витальевич (Zhilyaev@mail.com), кафедра математического моделирования Южного федерального университета, 344006, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. Б. Садовая, 105/42.

уровне собрано мало. Несмотря на то что перечисленные методы составляют лишь малую часть математического аппарата, практически только они используются в биологии и медицине.

В настоящей работе делается попытка применения теории упругости, метода оптимизации (минимизации функционала) с компьютерным подбором параметров модели при помощи генетического алгоритма к моделированию морфофункциональных свойств эритроцита. Модель эритроцита необходима для того, чтобы дать ответы на фундаментальные вопросы: почему эритроцит приобретает форму двояковогнутого диска при условии однородности содержимого эритроцита? Какие факторы влияют на форму эритроцита и его упругие свойства? Перед построением модели необходимо привести основные известные биологические и медицинские характеристики эритроцитов. Эритроциты — высокоспециализированные клетки крови, выполняющие газотранспортную функцию переноса кислорода из легких к органам и тканям, а диоксида углерода — в обратном направлении. Зрелые эритроциты человека лишены ядра и органелл и имеют форму двояковогнутого диска с максимально высоким отношением площади к объему, что обеспечивает наиболее оптимальный газообмен. Общая площадь поверхности эритроцитов взрослого человека составляет $3\ 800\ \text{м}^2$. Особая форма эритроцитов увеличивает их диффузионную поверхность с одновременным уменьшением диффузного расстояния. Особенности цитоскелета и строения клеточной мембраны двояковогнутых эритроцитов позволяют им претерпевать значительные деформации при прохождении через узкие изогнутые капилляры с последующим восстановлением формы.

При старении и в случае изменения формы пластичность эритроцитов уменьшается. Так, пластичность существенно снижена у сфероцитов (при гемолитической желтухе), серповидных эритроцитов (при серповидноклеточной анемии), микроцитов (при железодефицитной анемии), макроцитов (при B_{12} -фолиеводефицитной анемии), что является одной из причин задержки и разрушения таких эритроцитов в ретикулярной ткани селезенки. Транспорт кислорода обеспечивается гемоглобином, на долю которого приходится около 98 % массы белков цитоплазмы эритроцитов. Кроме того, форма красных кровяных клеток зависит от осмотического давления в эритроцитах и в плазме крови, а также от состояния цитоскелета мембраны эритроцитов, влияющего на упругие свойства оболочек красных кровяных телец. Известно, что содержание белков в эритроцитах выше, а низкомолекулярных веществ ниже, чем в плазме. Осмотическое давление, создаваемое высокой внутриклеточной концентрацией белков в эритроцитах, в значительной степени компенсируется малой концентрацией низкомолекулярных веществ [1].

В последнее время наиболее интересные и полные экспериментальные данные о структуре эритроцита и строении цитоскелета были получены методами атомно-силовой микроскопии (АСМ) [2–4]. Наиболее интересные данные атомно-силовой микроскопии о мембране эритроцита были получены в работах [5–7], где указывалось, что коэффициент упругости (коэффициент ригидности или модуль Юнга) мембраны эритроцитов в норме равен $1,4\text{--}1,7\ \text{кПа}$ [5], при этом по данным другой работы [6] ригидность в центре и на краю эритроцита отличается на 25–40 %. Прямое наблюдение методами АСМ тонкой структуры филаментной сети мембраны эритроцита позволила определить размер ее ячеек в диапазоне 50–70 нм [7]. Несмотря на то что в методе мазка происходит высыхание эритроцита на воздухе и он теряет свой объем более чем в 2 раза, пропорции основных геометрических

характеристик сохраняются [3; 4; 8; 9]. Необходимо также отметить, что моделирование упругих и морфологических свойств эритроцитов становится возможным благодаря появлению новых экспериментальных данных, полученных атомно-силовой микроскопией и методом Культера.

1. Атомно-силовая микроскопия эритроцитов и метод Культера

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) в изучении биологических объектов приобретает все большее значение, поскольку позволяет не только в трехмерном виде анализировать морфологию клеток, но и получать дополнительную информацию об их функциональном состоянии. Применяя различные режимы АСМ, можно измерять ригидность или упругость, вязкость, адгезию и другие свойства мембран клеток [4]. Работа АСМ-микроскопа основана на измерении сил взаимодействия кантилевера и поверхности клеток. Перемещаясь относительно поверхности и реагируя на силовое взаимодействие, АСМ регистрирует ее рельеф. На основании прибора укреплен цилиндр, в котором находится сканер из пьезоэлектрической керамики, изменяющей свои размеры при приложении электрического поля. В верхней части цилиндра крепится исследуемый образец, который сканер может перемещать в трех взаимно перпендикулярных направлениях. В горизонтальной плоскости образец сканируется по строкам: пройдя одну, он смещается на следующую строчку [7]. В зависимости от типа взаимодействия АСМ может работать в одном из нескольких режимов. Исследование биологических образцов происходит в основном в полуконтактном режиме, который отличается тем, что производит минимальное механическое воздействие на образец и, соответственно, белковые структуры.

Кондуктометрический метод Культера основан на измерении амплитуды электрического сигнала при прохождении одиночной клеткой измерительного канала, т. е. этот метод также проводит измерение над одной клеткой, собирая информацию в памяти компьютера и определяя интегральные значения. Для определения среднего объема эритроцитов строится гистограмма. Для этого система прибора умножает число эритроцитов в каждом измерительном канале на размер эритроцитов, проходящих данный канал, затем суммирует полученные значения для всех каналов между 36 фл и 360 фл, делит сумму на общее число эритроцитов между 36 фл и 360 фл, умножает полученное значение на калибровочную константу и выражает MCV в фемтолитрах. Кроме объема, с помощью метода Культера можно определить и другие морфофункциональные характеристики циркулирующего пула эритроцитов: их число, уровни гемоглобина и гематокрита, среднее содержание и среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците.

Для получения информации о взаимосвязи морфологии с упругими свойствами мембраны и осмотическим давлением внутри и вне эритроцитов с помощью атомно-силовой микроскопии исследован мазок крови больной бронхиальной астмой, в котором были обнаружены эритроциты с нормальной и измененной формами. На рис. 1 представлен скан эритроцитов пациентки С., у которой была диагностирована смешанная бронхиальная астма с тяжелым неконтролируемым течением, диффузный пневмосклероз и хроническая дыхательная недостаточность II степени. На скане видны эритроциты с нормальной формой, а также большое

количество морфологически измененных эритроцитов с отсутствием вогнутости мембраны и другими морфологическими изменениями.

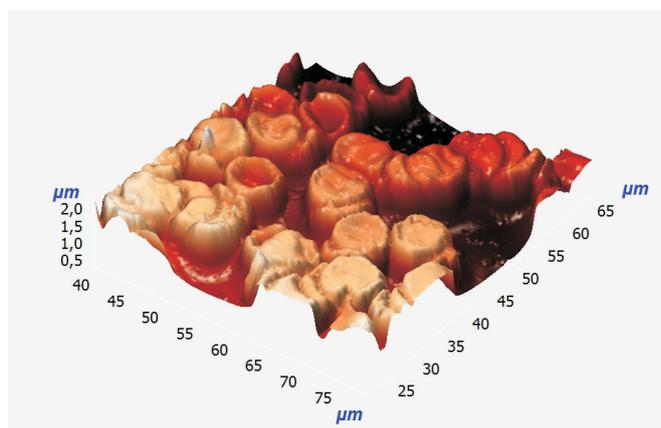


Рис. 1. Скан размером 40×40 мкм² мазка крови больной бронхиальной астмой

Для анализа взаимосвязи морфологии и упругих свойств эритроцитов было проведено исследование разрезов эритроцитов через их центр вдоль линий симметрии. Полученные разрезы представлены на рис. 2. Определяя геометрические характеристики разрезов эритроцитов, мы обратили внимание на то, что высота и ширина нормальных по форме двояковогнутых эритроцитов составляют $0,6\text{--}0,8$ мкм и 8 мкм соответственно. У морфологически измененных эритроцитов при отсутствии впадин эти величины составили $0,8\text{--}1,1$ мкм и $8\text{--}10$ мкм соответственно. Таким образом, данные эритроциты изменили свою форму и увеличились в размерах. Эти данные согласуются с результатами исследования методом Культера морфофункциональных характеристик эритроцитов у больных бронхиальной астмой. В частности, авторами выявлено, что в ответ на снижение оксигенации крови из-за персистирующего воспаления дыхательных путей и возникающей бронхиальной обструкции компенсаторно увеличивается объем эритроцитов в сочетании с ростом уровня гематокрита. Однако отдача кислорода в ткани при этом замедляется [10].

Средний объем эритроцитов, измеренный методом Культера, составил у обсуждаемой больной С. 97 фемтолитров или 97 мкм³. Методом атомно-силовой микроскопии был рассчитаны объемы эритроцитов, находящихся в воздушной среде. Объем эритроцита, представленного на рис. 2, а, составил 34 мкм³, а на рис. 2, б и в — 38 и 46 мкм³ соответственно. Объем морфологически измененных эритроцитов оказался примерно на $12\text{--}35\%$ больше объема двояковогнутых эритроцитов нормальной формы из-за наличия у них впадины. Таким образом, при высыхании объем эритроцитов уменьшился примерно в $2\text{--}3$ раза, сохранив при этом исходные соотношения основных геометрических характеристик, что позволяет, по мнению ряда авторов, с успехом использовать метод атомно-силовой микроскопии для оценки морфологии красных клеток крови [9].

В работе [5] была показана корреляция между толщиной клеток крови и содержанием в них гемоглобина, что связывалось с разрушением мембраны эритроцитов при различных состояниях и методах подготовки к измерениям. При этом во многих работах [3; 8; 9], описывающих результаты морфологических измерений на воздухе методами АСМ, изменение объема эритроцитов связывается с процессами

трансформации их плотности из-за высыхания и механического влияния кантилевера на эритроцит. Причем степень влияния в контактном режиме измерения существенно выше, чем в полуконтактном. Измерения, приведенные на рис. 1 и 2, были проведены нами в полуконтактном режиме для исключения указанных механических влияний на мембрану.

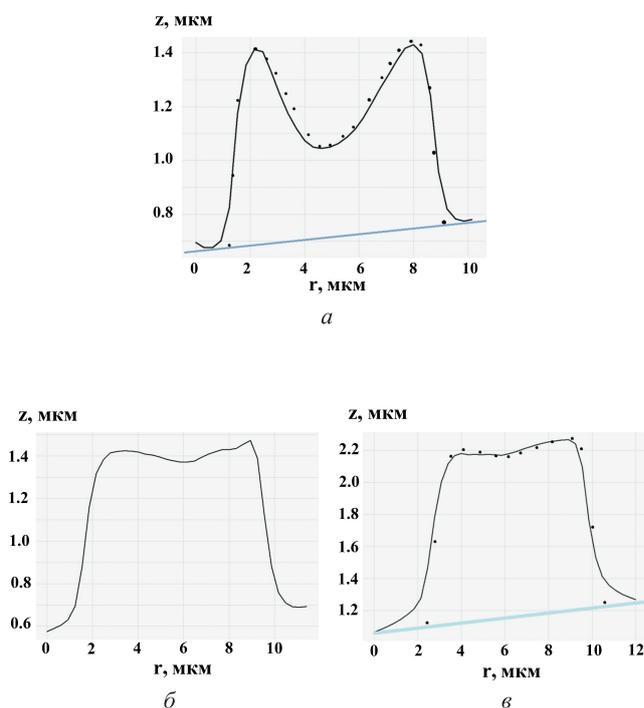


Рис. 2. Разрез эритроцитов со скана на рис. 1:

a — эритроцит в норме, *б* и *в* — эритроциты с измененной морфологией. Линиями обозначены экспериментальные данные АСМ, точками — результаты расчета в рамках простой механической модели для разных давлений: *a* — $P=2000$ Па, *б* — $P=500$ Па. Линия под графиком *в* показывает уровень наклона образца при измерении

Полученные с помощью атомно-силовой микроскопии клеток крови экспериментальные данные позволили нам построить простую механическую модель эритроцитов, основанную на анализе состояния упругости мембраны для косвенной оценки факторов, в том числе осмотического давления в эритроцитах, влияющих на их морфологию.

2. Простая механическая модель эритроцита

В первом приближении в модели было учтено только влияние упругости мембраны на форму и состояние эритроцита, что в дальнейшем позволило добавить в модель дополнительные элементы и учесть другие влияния. Основопологающим в разработанной модели явилось то, что влияние упругих свойств мембраны эритроцита, зависящее от состояния ее цитоскелета и осмотического давления как в

самом эритроците, так и в плазме крови, рассматривалось в качестве одного из ведущих факторов изменения его формы. Переходя в цилиндрические координаты, мы ввели оси симметрии в геометрическую модель эритроцита. Горизонтальную ось обозначили буквой r , а вертикальную — буквой z . Для решения задачи методом конечных элементов ввели область ее определения, которая обладает аксиальной симметрией относительно оси z . На рис. 3, *a* показано радиальное сечение эритроцита, при этом полная форма получается поворотом на 360° вокруг оси z и отражением в горизонтальной плоскости. Для задания начальных данных были взяты максимальные значения: исходный радиус эритроцита $R=4,0$ мкм и толщина $h=2,0$ мкм. По данным работы [5] коэффициент упругости (коэффициент ригидности или модуль Юнга) мембраны эритроцитов в норме равен $1,4-1,7$ кПа, при этом в работах [2; 6] указывается, что ригидность в центре и на краю эритроцита отличается на $25-40\%$. С целью учета этого экспериментального факта в модель была введена зависимость модуля Юнга по формуле:

$$E = E_0 \left[2 - \exp \left(-\frac{r}{R} \right)^2 \right],$$

где масштабный множитель $E_0=1000$ Па.

Модуль Юнга при удалении от оси плавно нарастал от 1000 Па до 1632 Па. Данное изменение модуля Юнга обеспечило плавность контура эритроцита в деформированном состоянии при линейном изменении модуля с возникновением резкого угла по отношению к оси. Коэффициент Пуассона был равен $\nu=0,33$, при этом давление на стенки эритроцита варьировалось от 0,1 до 2 кПа. Было проведено моделирование морфологии эритроцитов методом конечных элементов при различных давлениях, действующих на мембрану. Начальная форма эритроцита без внешнего давления представлена на рис. 3, *a*, сетка конечных элементов показана на рис. 3, *б*. При этом начальный размер формы эритроцита был равен 2 и 8 мкм по осям z и r соответственно. Далее модель эритроцита нагрузили внешним давлением от 500 до 2000 Па. При расчетах предполагалось, что давление P приложено однородно по всей поверхности эритроцита, так что изменение морфологии связано только с внутренними характеристиками эритроцита, которые заложены в модель.

На рис. 3, *в* и *г* показано изменение морфологии эритроцитов в зависимости от роста давления на мембрану. Видно, что при приложении небольших давлений (рис. 3, *в*), сравнимых с величиной упругости мембраны, форма эритроцита практически не изменяется и близка к начальной форме (рис. 3, *a*). Данная форма характерна для эритроцитов с нарушенными функциями обмена веществ и, соответственно, с низкой разницей давлений внутри и вне мембраны эритроцита (рис. 2, *б* и *в*).

3. Метод оптимизации функционала при определении морфофункциональных характеристик эритроцита

На втором этапе модель эритроцита решено усложнить и выполнить расчет не только его морфологии, но и упругих свойств мембраны с использованием метода оптимизации. Для этого на основе имеющихся данных о линейных размерах и

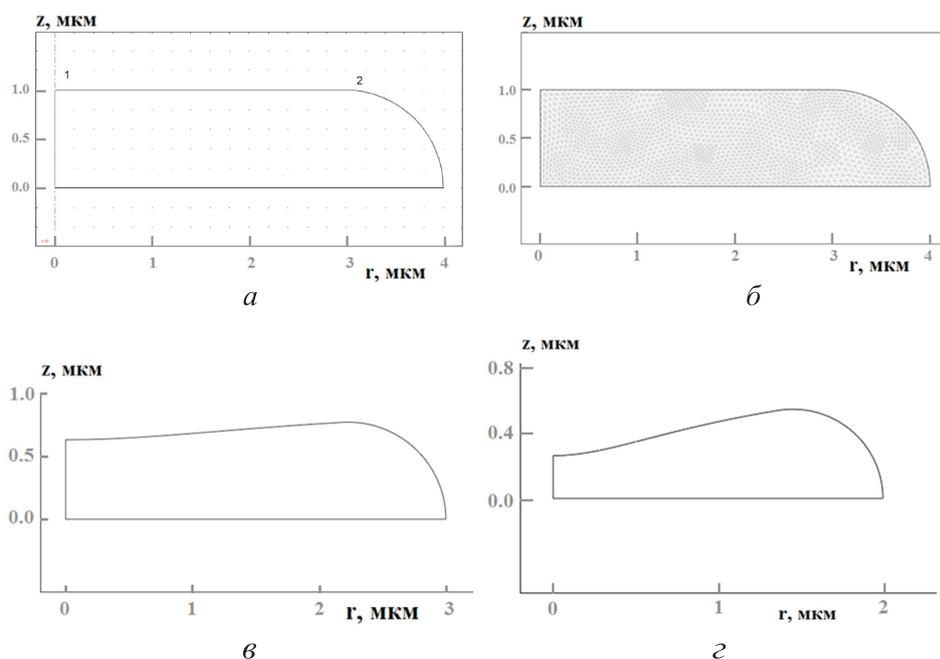


Рис. 3. Геометрическая модель эритроцита:
 а — недеформированная геометрия эритроцита с размерами 1 на 4 мкм. Цифры 1 и 2 обозначают место измерения смещения эритроцита относительно начального положения; б — сетка конечных элементов; в — изменение морфологии эритроцита при приложении внешнего давления величиной 1000 Па. Эритроцит с размерами 0,8 на 3 мкм; г — морфология эритроцита при приложении внешнего давления величиной 2000 Па. Эритроцит с размерами 0,6 на 2 мкм

физических константах эритроцита была построена осесимметричная конечно-элементная модель в пакете Comsol Multiphysics (рис. 4). Данный пакет моделирования решает системы нелинейных дифференциальных уравнений в частных производных методом конечных элементов в одном, двух и трех измерениях. В модели геометрия эритроцита задается фигурой вращения в цилиндрических координатах вокруг прямой, где ось r является осью абсцисс, а ось z — ординат. Верхняя граница области представляет собой три последовательно соединенные кривые Безье третьего порядка, каждая из которых представлена в виде:

$$\mathbf{B}(t) = (1 - t)^3 \mathbf{P}_0 + 3t(1 - t)^2 \mathbf{P}_1 + 3t^2(1 - t) \mathbf{P}_2 + t^3 \mathbf{P}_3, \quad t \in [0, 1],$$

где \mathbf{P}_0 , \mathbf{P}_1 , \mathbf{P}_2 и \mathbf{P}_3 — опорные точки, задающие координаты и направление кривой, а параметр t задает координаты точек на кривой.

Точки, определяющие кривые Безье, задаются по-разному. Некоторые точки имеют две степени свободы и перемещаются в двух независимых направлениях, некоторые — только в одном направлении. Направления перемещения точек в процессе оптимизации показано на рис. 4 стрелочками, координаты точек под номерами 5 и 8, показанных в виде крестиков, алгебраически определяются из соседних точек для того, чтобы геометрия поверхности была гладкой. Кроме этого на свободные перемещения точек накладываются естественные ограничения,

предупреждающие наложение точек друг на друга и создание пересекающихся граней.

Плотность эритроцита в модели задается равной плотности крови, т. е. $\rho=10^3$ кг/м³. Поскольку жесткость в центре и на краю эритроцита отличается [2; 6], модуль упругости в модели задается функцией от координаты абсцисс:

$$E_{mod}(r) = \frac{a(5 \cdot 10^{-6} - r)^3 + 3br(5 \cdot 10^{-6} - r)^2 + 3cr^2(5 \cdot 10^{-6} - r) + dr^3}{1,25 \cdot 10^{-16}},$$

где параметры a и d задаются таким образом, чтобы ограничить перепад значений функции в пределах от 1,0 до 1,6 кПа для значений $r = [0; 4 \cdot 10^{-6}]$, а параметры b и c определяют изгибы кривой. Кривая является также достаточно гладкой, чтобы при расчете исключить появление изломов поверхности, обусловленных упругостью.

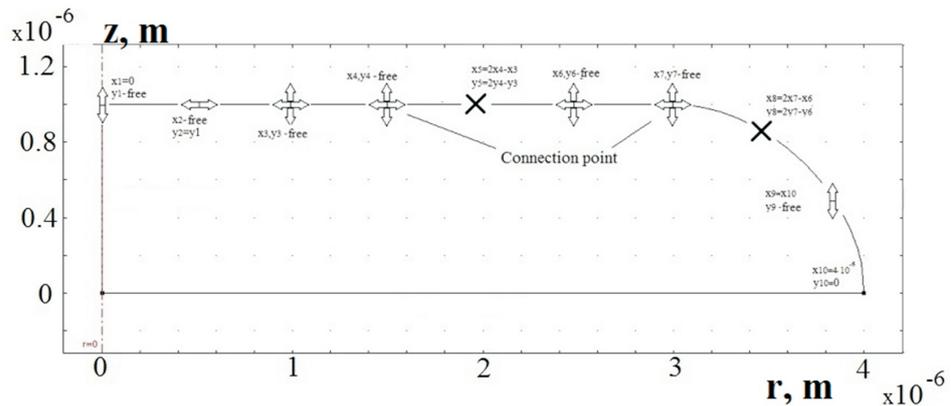


Рис. 4. Геометрия модели эритроцита, заданной в цилиндрических координатах последовательно соединенными кривыми Безье

Расчет формы и упругих свойств при заданных параметрах производился по следующему алгоритму:

Шаг 1. Описанная модель решается модулем Stress-Strain программного пакета Comsol Multiphysics.

Шаг 2. Экспорт полученной конечно-элементной модели в среду Matlab с использованием скрипта.

Шаг 3. Расчет функционала оптимизации в среде Matlab по формуле:

$$F = \frac{V}{S} W,$$

где V — объем фигуры вращения, S — ее площадь, W — интеграл по объему потенциальной энергии деформации, который рассчитывается считая что сжатие происходит по линейному закону.

Шаг 4. Оценка функционала и выбранных параметров с точки зрения минимальной потенциальной энергии деформации и наибольшего соотношения площади фигуры к ее объему. Таким образом, отбираются параметры, при которых F принимает минимальное значение.

Шаг 5. Запуск модуля OptimTool пакета Matlab для генерации следующего поколения параметров оптимизации.

Шаг 6. Возврат к шагу 1, если не выполнены условия остановки алгоритма.

На первых шагах алгоритма определяются механические напряжения и деформации тела, его линейные размеры, а также его внутренняя потенциальная энергия деформации. На верхнюю границу эритроцита действует равномерно распределенное давление, величина которого задается параметром, в нашем случае изменяемом в диапазоне от 500 до 2000 Па. Для автоматического запуска алгоритма расчета в среде Comsol Multiphysics конечно-элементная модель экспортируется в программную среду Matlab в виде скрипта. Экспорт обусловлен необходимостью непосредственного доступа к координатам ряда точек кривых Безье для возможного изменения формы расчетной области, а также возможностями оптимизационных модулей Matlab.

На третьем и четвертом шагах алгоритма происходит оценивание функционала модели с точки зрения минимальной потенциальной энергии деформации и наибольшего соотношения площади фигуры к ее объему. На пятом и шестом шагах происходит расчет функционала и его оценка с точки зрения эффективности выбранных параметров. При этом в модуле OptimTool пакета Matlab происходит генерация новых поколений путем скрещивания наиболее эффективных популяций предыдущего поколения. В случае, если число поколений превысило наперед заданную величину, алгоритм останавливается. Выбор числа поколений определяется из соображений эффективности расчета и их сложности. Расчет производился при помощи генетического алгоритма до тех пор, пока изменения в следующем поколении в функционале F не стали менее 2–3 %. Как правило, для этого было необходимо более 5 поколений с числом популяции 50–100 в каждом.

На рис. 5 представлена зависимость модуля упругости E_{mod} мембраны от расстояния до центра эритроцита, построенная по оптимизированным параметрам b и c . Видно, что зависимость имеет два участка – до 2 мкм резкое увеличение модуля и после 2 мкм плавное увеличение, что может быть связано с морфологией эритроцита, представленной на рис. 6.

Из рис. 6 и 7 видно, что расчетная форма близка к форме эритроцита как по размерам в длину (6–7 мкм) и высоту (2–2,5 мкм), так и по морфологии. Несколько отличий можно увидеть в расчетной форме эритроцита. Так, участок в районе 2,2–2,4 мкм (3–3,2 мкм для контура) имеет перегиб, не связанный с упругими характеристиками мембраны. Для проверки наличия этого перегиба были проведены дополнительные расчеты, и количество поколений увеличено в 5–10 раз для различных давлений. Как показал расчет, во всех случаях перегиб оставался.

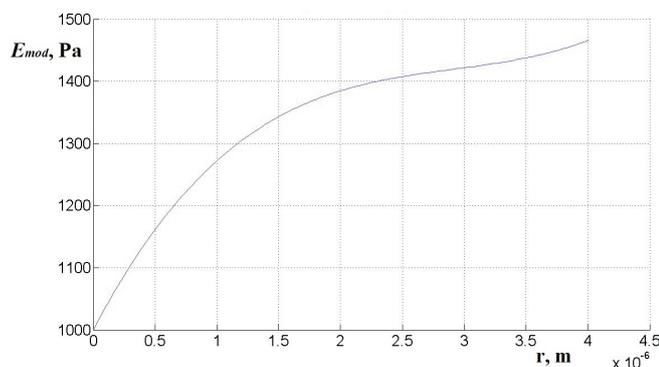


Рис. 5. Зависимость модуля упругости мембраны от расстояния до центра эритроцита

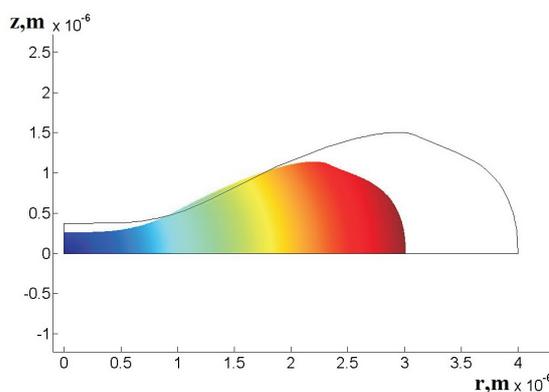


Рис. 6. Морфология эритроцита в соответствии с расчетами по оптимизации в отсутствие давления (контур) и при давлении 2000 Па (заливка)

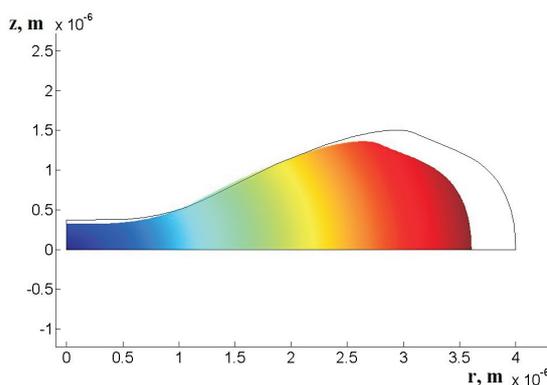


Рис. 7. Морфология эритроцита в соответствии с расчетами по оптимизации в отсутствие давления (контур) и при давлении 500 Па (заливка)

4. Сравнение расчетных данных с данными атомно-силовой микроскопии

Для объяснения феномена возникновения перегиба на краю эритроцита необходимо обратиться за результатами работы [7], в которой изучалось влияние вирионов гриппа на тонкую структуру мембраны эритроцитов или спектриновый мембранный скелет. В частности, оказалось, что воздействие вирусов влияет на мембрану эритроцитов и происходит размытие мембранного скелета. В результате появляются кластеры, регулярно наблюдающиеся на краю эритроцитов, взаимодействовавших с вирионами и не наблюдающиеся на нативных клетках (рис. 8). Авторы работы [7] не могут указать причины появления кластеров, однако их можно соотнести с нашими результатами и связать с перегибом в районе 2,2–2,4 мкм (рис. 6) и 2,6–2,8 мкм (рис. 7), если предположить, что кластеры существуют в эритроцитах в любом состоянии, но наиболее явно проявляются только при воздействии вирусов. Таким образом, косвенно можно соотнести результаты расчета с экспериментальными данными атомно-силовой микроскопии.

Наибольший интерес представляет сравнение расчета морфологии с данными атомно-силовой микроскопии для клеток в различных состояниях. Необходимо от-

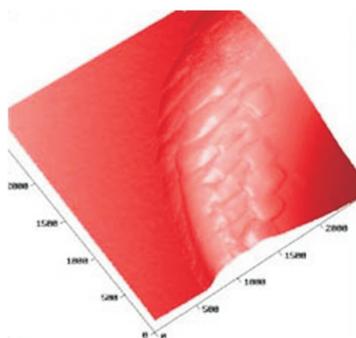


Рис. 8. Строение края мембраны эритроцитов на АСМ сканах. Кластеры на краю эритроцитов, взаимодействовавших с вирионами гриппа. Размер скана 2,5 на 2,5 мкм.

Рисунок взят из работы [7]

метить, что кривая упругости, взятая в простой механической модели, по форме и абсолютным значениям достаточно близка к форме упругости, полученной методом оптимизации. Кроме этого отметим, что расчеты морфологии по разным моделям практически совпадают для эритроцитов с нормальной морфологией. Исключение составляют эритроциты с измененной морфологией, которые в рамках модели оптимизации не описываются, так как имеют не оптимальную форму и соответственно нарушения в работе мембраны. Именно поэтому сравнение экспериментальных данных АСМ и расчетных будем проводить в рамках простой механической модели, для чего сделаем несколько важных замечаний.

Сравнение форм эритроцитов по данным атомно-силовой микроскопии и модели, представленных на рис. 2 и 3, необходимо проводить с учетом изменения формы при осаждении эритроцита на подложку. Действительно, эритроцит в модели и в физическом растворе является полностью симметричным объектом. При осаждении на подложку возникают несколько эффектов, изменяющих форму эритроцита. Во-первых, это прилипание мембраны эритроцита на подложку и связанное с этим «растекание» с удлинением формы. Во-вторых, впадины эритроцита сверху и снизу по причине прилипания к поверхности подложки превращаются в одну впадину с глубиной, равной сумме двух впадин эритроцита, не осажженного на подложку. В-третьих, происходит высыхание эритроцита при исследовании методом мазка, как в нашем случае, что влияет на объем эритроцита и уменьшение его толщины в 2–3 раза. С учетом сделанных замечаний проведено сравнение морфологии эритроцитов, полученной в расчетах и при измерении методами АСМ. На рис. 2, а представлен эритроцит в норме, имеющий глубину впадины 0,3–0,4 мкм, диаметр 7–8 мкм и ширину 0,7 мкм. Данной форме соответствует модель эритроцита, представленная на рис. 3, г с глубиной впадины, равной 0,52 мкм, диаметром 4 мкм, шириной 1,06 мкм. Поскольку модель не учитывает процессы адгезии и прилипания эритроцита к поверхности, происходящие при измерении методами АСМ, данные в расчетах отличаются от данных АСМ. Если представить, что за счет прилипания эритроцит, сохраняя свой объем, вытянется, значения его толщины и глубины впадины должны соответственно уменьшиться. Поскольку в модели не могут быть учтены процессы изменения объема из-за высыхания, проведем нормировку данных, а только потом их сравнение. Для этого были приведены к одним единицам ширина и толщина эритроцитов, затем расчетные данные были пересчитаны с учетом изменения высоты из-за сложения двух впадин (умноже-

нием на два) и наложены на экспериментальные данные по АСМ (рис. 2). При расчетах также учитывался наклон образца при измерениях, что выражалось в добавке к теоретическим значениям значений прямой, описывающей наклон. При этом для нормальной формы эритроцита в модели была взята разница давлений внутри и снаружи эритроцита, равная 2000 Па (рис. 2, а), а для измененной формы эта величина составила 500 Па (рис. 2, в). Видно, что с учетом нормировки расчет совпадает с экспериментальными данными.

Необходимо сделать несколько замечаний по модели и сравнению полученных данных. Модель эритроцита исходит только из предположения о зависимости упругости мембраны от расстояния до центра. При этом мембрана эритроцита выполняет функцию регулятора ионных каналов и содержания ионов калия и других веществ в эритроците, таким образом, меняя величину осмотического давления внутри. Содержание гемоглобина в эритроците также влияет на величину онкотического давления и состояния мембраны и морфологии эритроцита. Поэтому разница давлений в модели эритроцита отражает эти величины в совокупности. Однако у эритроцитов на воздухе при измерении методами АСМ величина осмотического давления должна существенно уменьшиться, а величина онкотического давления остаться без изменений. Именно поэтому величина разницы давлений внутри и вне мембраны в модели эритроцита, равная 2 кПа, близка к онкотическому давлению (0,03–0,04 атм или 3–4 кПа) крови.

Предположение о зависимости упругости мембраны от расстояния до центра, положенное в основу модели, имеет, с одной стороны, экспериментальное подтверждение в ряде работ по атомно-силовой микроскопии [2; 6], с другой стороны, имеет важное следствие. Поскольку модель косвенно подтверждает наличие изменений упругости по поверхности мембраны, возникает естественный вопрос, чем обусловлена эта зависимость упругости. Учитывая, что цитоскелет мембраны эритроцитов состоит из филаментной сети, образованной белком спектрина, а также то, что за упругие свойства мембраны в основном отвечает связующий белок полосы 3, данные моделирования свидетельствуют в пользу следующего предположения.

В центре мембраны эритроцита упругие свойства эритроцита примерно в 1,5 раза меньше, чем на краю, что может быть обусловлено меньшей концентрацией белка полосы 3, а также более разряженной, по сравнению с краем эритроцита, сеткой цитоскелета. Атомно-силовая микроскопия позволяет определять тонкую структуру цитоскелета мембраны [7], по данным которой структура состоит из ячеек с размерами 50–70 нм. Сложность определения рельефа такого масштаба на биологических объектах до сих пор не позволила определить степень изменения тонкой структуры по поверхности мембраны. Таким образом, в рамках дальнейшего развития модели, с одной стороны, стоит задача определения изменений тонкой структуры мембраны по поверхности эритроцита с удалением от его центра, с другой стороны, определение изменений концентрации белка полосы 3.

Заключение

В статье предложена модель эритроцита, позволяющая рассчитать упругие свойства и оценить его морфологию. Модель представляет эритроцит в виде однородного упругого тела с упругостью, зависящей от расстояния до центра симметрии эритроцита. Расчет упругих свойств выполнен двумя независимыми методами — методом конечных элементов и методом оптимизации. В рамках механиче-

ской модели получена зависимость морфологии эритроцита от разницы давлений на мембрану, которая менялась в диапазоне 500–2000 Па, что позволило оценить значение факторов, влияющих на форму эритроцитов. Проведено сравнение расчетных данных с данными атомно-силовой микроскопии, что позволило сделать вывод о состоятельности модели и ее развитии за счет добавления новых составляющих. Модель также позволяет сделать косвенные оценки разницы давлений внутри и вне мембраны эритроцитов, связав ее с онкотическим давлением. Кроме этого, модель позволяет предположить изменение тонкой структуры цитоскелета в зависимости от расстояния до центра эритроцита, что может быть связано с концентрацией белка полосы 3 или с размерами ячеек филаментной сети.

Авторы благодарят к.ф.-м.н., доцента П.Е. Дышловенко за помощь в проведении расчетов, а также д.м.н., профессора В.В. Гноевых за полезное обсуждение и помощь в проведении экспериментальных исследований методами атомно-силовой микроскопии и Культера.

Литература

- [1] Физиология крови: метод. пособие к практическим занятиям по нормальной физиологии / С.Б. Данияров [и др.] Бишкек: Изд-во Кыргызско-Российского Славянского университета, 2000. 54 с.
- [2] Дрозд Е.С., Чижик С.А., Константинова Е.Э. Атомно-силовая микроскопия структурно-механических свойств мембран эритроцитов // Российский журнал биомеханики. 2009. Т. 13. № 4(46). С. 22–30.
- [3] Nowakowski R., Luckham P. Imaging the surface details of red blood cells with atomic force microscopy // Surface and Interface Analysis. 2002. V. 33. I. 2. P. 118–121.
- [4] Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy / I. Dulinska [et al.] // J Biochem Biophys Methods. 2006. V. 66(1–3). P. 1–11.
- [5] Влияние фемтосекундного лазерного излучения на эритроциты IN VITRO / Д.Р. Арсланова [и др.] // Лазерная медицина. 2011. Т. 15. № 2. С. 215.
- [6] Гущина Ю.Ю., С.Н. Плескова, М.Б. Звонкова Исследование различий морфологических параметров клеток крови человека методом сканирующей зондовой микроскопии // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2005. № 1. С. 48–53.
- [7] Zaitsev B.N., Durymanov A.G., Generalov V.M. Atomic force microscopy of the interaction of erythrocyte membrane and virus particles // Proc. Intern. Workshop "Scanning Probe Microscopy-2002". Nizhny Novgorod, 2002. P. 211–213.
- [8] Correlation of atomic force microscopy and Raman micro-spectroscopy to study the effects of ex vivo treatment procedures on human red blood cells / M. Asghari-Khiavi [et al.] // Analyst. 2010. V. 135. P. 525–530.
- [9] O'Reilly M., McDonnell L., O'Mullane J. Quantification of red blood cells using atomic force microscopy // Ultramicroscopy. 2001. V. 86(1–2). P. 107–112.
- [10] Гноевых В.В. Бронхиальная астма и табакокурение // Medline. ru. 2011. Т. 12. Сер.: Пульмонология. С. 261–289.

Поступила в редакцию 23/V/2013;
в окончательном варианте — 21/X/2013.

SIMULATION OF MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF ERYTHROCYTE MEMBRANE

© 2013 Yu.S. Nagornov⁴ I.V. Zhilyaev⁵

The paper presents a model for the calculation of morphofunctional erythrocyte properties. The model represents the erythrocyte as a homogeneous elastic body with elastic depending on the distance to the center of symmetry of the erythrocyte. The data for modeling were taken from the experimental study, which were used by atomic force microscopy (measuring the elasticity of the membrane of erythrocytes and morphology) and the Coulter method. In the developed model, the elasticity of the membrane to change depending on the distance to the center within 1–1,6 kPa. The calculation of the elastic properties is made by two methods - finite element analysis and optimization methods. In the model the dependence of erythrocyte morphology on the membrane pressure was obtained. Pressure difference across the erythrocyte membrane varied in the range of 0,5–2 kPa.

Key words: model of the erythrocyte, atomic force microscopy, the geometric characteristics of the erythrocyte, modeling of the elastic properties.

Paper received 23/V/2013.

Paper accepted 21/X/2013.

⁴Nagornov Yuriy Sergeevich (nagornovys@yandex.ru), research department of Tolyatti State University, Tolyatti, 445667, Russian Federation.

⁵Zhilyaev Igor Vitalievich (Zhilyaev@mail.com), the Dept. Mathematical Modelling Southern Federal University, Rostov-on-Don, 344006, Russian Federation.