

Определение модуля сдвига мембран эритроцитов, находящихся в суспензии

UDC 612.117.2

Ye.A. GORDIENKO, A.F. TODRIN*, A.I. OSETSKY, L.I. POPIVNIENKO

Determination of Shear Modulus of Erythrocyte Membranes in Suspension

Описаны динамический метод и устройство, предложен алгоритм расчета среднего модуля мембран эритроцитов, находящихся в суспензии и протекающих через плоский канал. Представлены экспериментальные данные значений модуля сдвига мембран эритроцитов в зависимости от температуры и сроков гипотермического хранения крови.

Ключевые слова: модуль сдвига, клеточная суспензия, мембрана эритроцита, плоский канал.

Описані динамічний метод і пристрій, а також запропоновано алгоритм розрахунку середнього модуля зсуву мембран еритроцитів, які знаходяться в суспензії та протікають крізь плоский канал. Наведено експериментальні дані значень модуля зсуву мембран еритроцитів в залежності від температури і строків гіпотермічного зберігання крові.

Ключові слова: модуль зсуву, клітинна суспензія, мембрана еритроцита, плоский канал.

A dynamic method and a device are described; an algorithm for calculation of the average shear modulus of membranes of suspended erythrocytes flowing through a flat canal is suggested. Experimental data on erythrocyte membrane shear modulus depending on temperature and terms of hypothermic storage of blood are presented.

Key words: shear modulus, cell suspension, erythrocyte membrane, flat canal.

В настоящее время реологические характеристики крови (вязкость, агрегация эритроцитов, их деформация и др.) являются предметом специальных исследований, задача которых – выяснение и трактовка особенностей физико-химических свойств крови, определяющих структуру кровотока. Одним из основных реологических свойств является деформируемость клеток, которая определяется модулями упругости клеточных мембран.

Существует несколько методов определения модулей упругости мембран эритроцитов, позволяющих получить численные их значения (и множество методов, которые показывают только качественную картину). Наиболее точные, на наш взгляд, статические методы: втягивание клетки или ее части в микрокапилляр, сжатие клетки между двумя плоскими поверхностями и др. [2]. Для этих методов развита теоретическая база и отработана методика постановки эксперимента. Однако данные методы чрезвычайно трудоемки, требуют высокой квалификации персонала и позволяют обработать ограниченное количество клеток в образце за реальный промежуток времени. Поэтому их трудно внедрить в клиническую практику.

В этом плане более перспективны так называемые динамические методы. К ним относятся

At present time the blood flow rheological characteristics (viscosity, erythrocyte aggregation, their deformability *etc.*) are a subject of special research, the challenges of which are clarification and interpretation of peculiarities of blood physical-chemical properties determining blood flow structure. Cell deformability, which is determined by cell membrane elasticity modulus, is one of the main rheological properties.

There are few methods for determination of erythrocyte membrane elasticity modulus, which allow obtaining its numeric values (and a lot of methods, which show a qualitative pattern only). The most precise ones, to our mind, are statistical techniques: pulling-in of a cell or its part into a capillary, compression of a cell between two flat surfaces *etc.* [2]. A theoretical basis has been elaborated for these methods, and principles of experimental procedures have been worked through. However the given methods are extremely labor-consuming, require a highly-qualified staff and allow processing a limited quantity of cells in a sample within a real period of time. That is why they are difficult to apply in clinical practice.

In this aspect so-called dynamical methods are more promising. Methods of forcing cell suspensions through capillaries or through close-meshed array belong to them [3, 10, 11]. These methods allow processing a very big quantity of cells *per* one exper-

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-38-71, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта:
todrin@mail.ru

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3871, fax: +380 57 373 3084, e-mail: todrin@mail.ru

методы продавливания суспензии клеток через капилляры или мелкоячеистую решетку [3, 10, 11]. Эти методы позволяют обработать в одном эксперименте очень большое количество клеток за относительно короткий промежуток времени. Однако они имеют ряд существенных недостатков. Так, несмотря на хорошо разработанную теорию [3], продавливание суспензии клеток через круглый капилляр, диаметр которого меньше размера клетки, трудно осуществить экспериментально, поскольку из-за очень малого проходного сечения эти капилляры быстро закупориваются, что не позволяет исследовать относительно большие объемы суспензии. Мелкоячеистые решетки обладают достаточно большим проходным сечением, состоящим из множества мелких каналов, поэтому в ходе эксперимента оно может постепенно уменьшаться из-за закупорки отдельных каналов.

Мы предлагаем динамический метод определения модуля сдвига мембран эритроцитов, суспензия которых продавливается через плоский щелевой капилляр при известном перепаде давления и скорости течения в капилляре. Проходное сечение канала получается относительно большим при очень малой высоте щели, поэтому данный метод объединяет в себе преимущества методов продавливания через круглый капилляр и мелкоячеистые решетки. К тому же по взаимодействию клетки с поверхностью канала предлагаемый метод подобен методу сжатия клетки между двумя плоскостями, что позволяет использовать известную формулу [2] для расчета модуля сдвига после некоторой ее модификации.

Цель работы – разработка метода и устройства для определения среднего модуля сдвига мембран эритроцитов, находящихся в суспензии, при протекании суспензии клеток через плоский канал.

Материалы и методы

В экспериментах использовали эритроциты, полученные из венозной крови здоровых доноров. Для удаления плазмы, лейкоцитов и других форменных элементов с помощью центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин кровь трехкратно отмывали в изотоническом физиологическом растворе (0,15 М NaCl + 5 μ М фосфатного буфера) с pH 7,4. Для получения необходимого показателя гематокрита эритроциты после снятия надосадочной жидкости разбавляли изотоническим физиологическим раствором на фосфатном буфере. В экспериментах применяли суспензии эритроцитов с показателем гематокрита $10 \pm 1,5\%$. Исследовали эритроциты крови, которая хранилась при температуре 4°C в течение 3 и 9 суток.

Для изготовления капилляров используются стальные инъекционные иглы с внутренним диа-

риментом в течение относительно короткого периода времени. Несмотря на то, что они имеют ряд серьезных недостатков. Так, например, несмотря на хорошо разработанную теорию [3] forcing cell suspensions through a round capillary, the diameter of which is less than the cell size, is difficult to perform experimentally, since such capillaries are clogged quickly because of the small open flow area, which prevents studying relatively large volumes of suspensions. Close-meshed arrays have the open flow area that is big enough and consist of many minute canals, that is why it can reduce gradually due to clogging individual canals during the experiment.

We suggest a dynamical method for the determination of shear modulus of erythrocyte membranes, which is based on forcing suspensions through a flat slit capillary under a certain pressure differential and flow velocity in the capillary. The open flow area proves to be big enough when the slit height being very little, so this method combines advantages of methods of forcing through round capillaries and close-meshed arrays. Besides, by cell-canal surface interactions the method suggested is similar to methods of compression of cells between two surfaces, which allows using the known formula [2], after it had been modified, for calculation of shear modulus.

The aim of the work is development of a method and a device for the determination of the average shear modulus of erythrocyte membranes in suspension when the suspension is flowing through a flat canal.

Materials and methods

Erythrocytes isolated from healthy donors' vein blood were used in the experiments. To remove plasma, leukocytes and other blood corpuscles blood was washed out three times in isotonic physiological solution (0.15 M NaCl + 5 μ M phosphate buffer) with pH 7.4 by centrifuging at 3,000 rpm for 10 min. After the supernatants had been collected, erythrocytes were diluted with physiological solution on phosphate buffer to get a desired hematocrit value. The erythrocyte suspensions with hematocrit $10 \pm 1.5\%$ were used in the experiments. Erythrocytes from blood stored at 4°C for 3 and 9 days were studied.

Steel injection needles with the inner diameter 0.5 mm and the wall thickness 0.1 mm were used to manufacture capillaries. The needles are pinched between two flat surfaces under a fixed force to get a gap of the necessary size. In that way a flat slit canal (a capillary), the main discriminating size of which (the slit height) is less than the erythrocyte size, is shaped.

Capillaries with the slit height b within the range of 2.2–3.2 mm, width, w , 0.8–0.9 mm and length, L , 2mm were applied in the experiments. The slit height above-mentioned had been chosen in such a way as to guarantee membrane deformation of an erythrocyte passing between the capillary walls, since at high shear

метром 0,5 мм и толщиной стенки 0,1 мм, которые пережимаются между двумя плоскими поверхностями при нормированном усилии для получения зазора (щели) необходимого размера. Таким путем получается плоский щелевой канал (капилляр), основной характеристический размер которого (высота щели) будет меньше размера эритроцита. Схема канала представлена на рис. 1. Способ измерения размеров капилляров описан в [4].

В экспериментах применяли капилляры с высотой щели b в интервале 2,2–3,2 мкм, шириной w 0,8–0,9 мм и длиной $L = 2$ мм. Указанная высота щели была выбрана таким образом, чтобы гарантировать деформацию мембраны эритроцита, проходящего между стенками капилляра, поскольку при высоких скоростях сдвига эритроцит в потоке имеет форму вытянутого эллипсоида вращения, малая ось которого равна 3,65 мкм (для эритроцита среднего размера: площадь поверхности $S_0 = 129,95$ мкм², объем $V_0 = 97,91$ мкм³ [9]), и при указанной высоте щели клетка обязательно будет деформироваться.

Исследования проводили на устройстве, разработанном в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины совместно с НПФ “Криокон” (г. Харьков). Схема устройства приведена на рис. 2.

Устройство работает следующим образом. В полость 4 ячейки 1 помещают суспензию клеток при включенной заранее системе термостабилизации 10, после чего устанавливают капилляр 2. Затем включают электродвигатель 9, который перемещает поршень 8, подавая рабочую жидкость (водный раствор этилового спирта, позволяющий работать при температурах ниже 0°C) из цилиндра 7 в полость, расположенную ниже гибкой мембраны 3 по трубопроводу 5. Рабочая жидкость прогибает мембрану 3, имеющую специальную форму, в полость 4, выталкивая из нее клеточную суспензию через капилляр 2. При этом в рабочей жидкости будет повышаться давление до тех пор, пока мембрана 3 не прогнется и суспензия не потечет через капилляр 2 с постоянной скоростью. Измеряя с помощью датчика 6 давление в рабочей жидкости (с учетом заранее определенного давления, необходимого для прогиба мембраны 3 при данной температуре), можно рассчитать напряжение сдвига. Зная скорость движения поршня 8, площадь его поперечного сечения и площадь поперечного сечения капилляра, легко определить скорость сдвига при течении суспензии. Объем ячейки для биообъекта – 0,1 см³. Общий объем рабочей жидкости – 30 см³. Более подробное описание устройства и его работы приведено в работе [6].

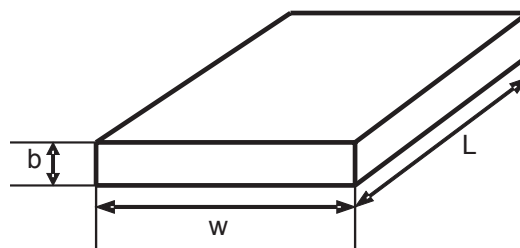


Рис. 1. Схема плоского щелевого канала.

Fig. 1. The scheme of a flat slit canal.

rates the erythrocyte in flow has a shape of the oblong ellipsoid of revolution, the minor axis of which is 3.65 μm (for the erythrocyte of the average size: the surface area $S_0 = 129.95$ μm², the volume $V_0 = 97.91$ μm³ [9]), so under the indicated value of the slit height a cell is bound to become deformed.

The experiments were carried out on the device, which had been designed by Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of National Academy of Sciences of Ukraine in association with SPC “Cryokon” (Kharkov). The scheme of the device is presented in Fig. 2.

The device functions in the following way. After starting the thermostabilization system 10 the cell suspension is placed in cavity 4 of chamber 1 and the capillary 2 is installed. Then electric motor 9 is brought into operation and moves piston 8, which load the power fluid (water solution of ethanol, which allows

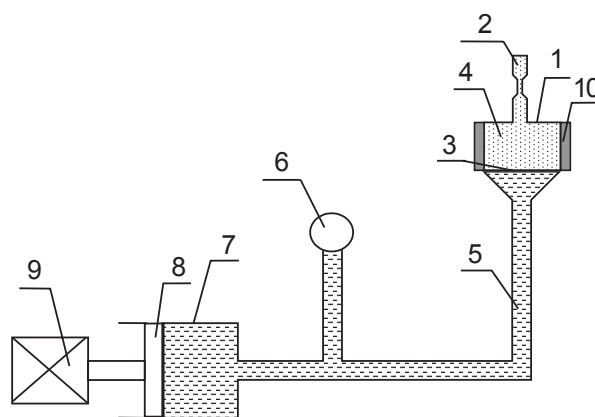


Рис. 2. Схема устройства для исследования модуля сдвига мембран эритроцитов: 1 – ячейка для биообъекта; 2 – капилляр; 3 – гибкая мембрана; 4 – исследуемая суспензия (биообъект); 5 – трубопровод; 6 – датчик давления; 7 – цилиндр с рабочей жидкостью; 8 – поршень; 9 – электродвигатель; 10 – система термостабилизации.

Fig. 2. The scheme of the device for studying shear modulus of erythrocyte membranes: 1 – chamber for the bioobject; 2 – capillary; 3 – flexible membrane; 4 – the suspension studied (bioobject); 5 – pipe connection; 6 – pressure gauge; 7 – cylinder with power fluid; 8 – piston; 9 – electric motor; 10 – thermostabilization system.

Результаты и обсуждение

Напряжение сдвига τ в узком плоском канале есть отношение силы F , действующей на боковую поверхность канала, отнесенной к удвоенной площади S_{cm} этой поверхности [8],

$$\tau = F/(2S_{cm}). \quad (1)$$

Если известны перепад давления ΔP вдоль канала, по которому протекает суспензия, и размеры канала, то сила F определяется из соотношения:

$$F = \Delta P S_0,$$

где $S_0 = w/b$ – площадь проходного сечения канала.

Площадь одной стороны боковой поверхности канала:

$$S_{cm} = wL.$$

Подставляя эти соотношения в уравнение (1), получаем выражение для определения напряжения сдвига при течении суспензии в плоском канале:

$$\tau_{cyc} = \frac{\Delta P b}{2L}. \quad (2)$$

Это уравнение совпадает с уравнением, приведенным в [8].

Чтобы учесть напряжение сдвига, создаваемое течением только собственно клеток, необходимо вычесть напряжение сдвига τ_{en} , создаваемое при течении внеклеточной среды:

$$\tau_{кл} = \tau_{cyc} - \tau_{en}. \quad (3)$$

Напряжение сдвига, создаваемое при течении внеклеточного раствора, можно определить, зная вязкость внеклеточного раствора (μ_{en}) при данной температуре и скорость сдвига при течении суспензии.

В работе [8] приведено уравнение для определения вязкости суспензии, протекающей через щелевой капилляр (плоский канал):

$$\mu_{cyc} = \frac{\Delta P w b^3}{12 Q L}, \quad (4)$$

где Q – объемный расход суспензии.

Исходя из того, что $\mu_{cyc} = \tau_{cyc}/\gamma_{cyc}$ и с учетом уравнения (2), легко определить скорость сдвига суспензии в канале:

$$\gamma_{cyc} = \frac{6Q}{wb^2}. \quad (5)$$

Поскольку внеклеточная среда должна двигаться со средней скоростью, равной средней ско-

functioning at temperatures below 0°C) from cylinder 7 through pipe connection 5 into the cavity located below flexible membrane 3. The power fluid inflects membrane 3, which is of special shape, into cavity 4 pushing the cell suspension through capillary 2 from it. During this process the pressure in the power fluid will increase until membrane 3 is inflected and the cell suspension flows through capillary 2 with a constant velocity. Shear stress can be calculated by measuring pressure in the power fluid with the help of gauge 6 (taking into account the pressure value determined in advance, which is necessary for inflexion of membrane 3 at a certain temperature). Knowing the movement speed of piston 8, its cross section area and cross section area of the capillary one can determine shear rate easily when the suspension flows. The chamber volume for the bioobject is 0.1 cm³. The total volume of the power fluid is 30 cm³. The more detailed description of this device and its functioning is specified in the work [6].

Results and discussion

Shear stress τ in a narrow flat canal is the ratio of the force F affecting the canal side surface to the duplicated area S_{sd} of this surface [8],

$$\tau = F/(2S_{sd}). \quad (1)$$

If the pressure differential ΔP along the canal, through which the suspension flows, and its dimensions are known, the force F is calculated from the relation:

$$F = \Delta P S_0,$$

where $S_0 = w/b$ is the open flow area of the canal.

The area of one side of the canal side surface:

$$S_{sd} = wL.$$

Inserting these relations in equation (1) we get the formula for the determination of shear stress under the suspension flow in the flat canal:

$$\tau_{sus} = \frac{\Delta P b}{2L}. \quad (2)$$

This equation coincides with the equation given in [8].

To take into account the shear stress originating from the cell flow one should subtract shear stress τ_{ex} originating from the extracellular medium flow:

$$\tau_{cell} = \tau_{sus} - \tau_{ex}. \quad (3)$$

The shear stress originating from the extracellular solution flow can be calculated if extracellular solution

рости течения всей суспензии, напряжение сдвига при течении внеклеточной среды

$$\tau_{\text{вн}} = \mu_{\text{вн}} \gamma_{\text{сус}}$$

Поскольку толщина мембраны эритроцита равна $(3-5) \times 10^{-9}$ м и составляет меньше 10% радиуса кривизны клетки, Ивенс И. и Скейлак Р. [2] рекомендуют рассматривать условия равновесия сил при помощи уравнений теории тонких оболочек, т. е. силы, приложенные к эритроциту, уравновешиваются силами, действующими в плоскости оболочки, а именно натяжениями. Изгибающие моменты дают вклад второго порядка малости и в данном случае могут не рассматриваться. В той же работе приводится формула для расчета силы F , необходимой для сплющивания клетки между двумя плоскими поверхностями при известном модуле упругости клеточной мембраны $F \sim f(\bar{T})$, где \bar{T} – изотропное натяжение мембраны. Таким образом, в качестве модуля упругости рассматривается модуль изотропного натяжения мембраны, а модулем сдвига пренебрегают из-за его малой величины.

Мы предполагаем, что у эритроцитов, проходящих через щелевой капилляр, мембрана натянута, но еще не подвержена изотропному растяжению. Это подтверждается тем, что в сдвиговом потоке пороговое значение напряжения сдвига (при воздействии от нескольких секунд до минут) находится в диапазоне 100–500 Па [16]. В наших экспериментах напряжение сдвига не превышало 20 Па, т. е. мембрана клетки не может быть растянута. Поэтому в формуле для расчета силы при сжатии клетки между двумя плоскими поверхностями [2] изотропное натяжение можно заменить на натяжение сдвига, т. е.

$$F = \frac{2\pi R_0 R_i^2 T_s}{R_0^2 - R_i^2} \quad (6)$$

В данном случае форма сплющенной клетки рассматривается в виде диска. При этом R_0 – радиус клетки по экватору; R_i – радиус пятна контакта клетки с поверхностью; T_s – натяжение сдвига мембраны клетки.

Однако, если заметить, что $2\pi R_0$ является периметром P_e сплющенной клетки по экватору, а

$$\frac{R_i^2}{R_0^2 - R_i^2}$$

равнозначно отношению площадей

$$\frac{S_{\text{кк}}}{S_e - S_{\text{кк}}}$$

viscosity (μ_{ex}) at the given temperature and shear rate under the suspension flow are known.

The equation for the determination of viscosity of the suspension flowing through the slit capillary (flat canal) is formulated in [8]:

$$\mu_{\text{sus}} = \frac{\Delta P w b^3}{12 Q L}, \quad (4)$$

where Q is volume flow rate.

From the fact that $\mu_{\text{sus}} = \tau_{\text{sus}} / \gamma_{\text{sus}}$ and in view of the equation (2) shear rate of the suspension in the canal can be calculated easily:

$$\gamma_{\text{sus}} = \frac{6Q}{wb^2} \quad (5)$$

Since the extracellular medium is supposed to move with the average velocity equal to the flow average velocity of the whole suspension, shear stress under the extracellular medium flow is

$$\tau_{\text{ex}} = \mu_{\text{ex}} \gamma_{\text{sus}}$$

Since erythrocyte membrane thickness is $(3-5) \times 10^{-9}$ m, which is much less than 10% from the radius of curvature of a cell, Evans and Skalack [2] recommend to consider the forces' equilibrium conditions using the equations of the theory of thin shells, which specify that the forces applied on the erythrocyte are counterbalanced by the forces exerting in the shell plane, viz. tensions. Bending forces make a contribution of second order of vanishing, so they can be neglected in this case. The authors gave also the formula for calculating the force, F , necessary for compressing a cell between two flat surfaces with the known cell membrane elasticity modulus: $F \sim f(\bar{T})$, where \bar{T} is isotropic tension of membrane. Thus, modulus of membrane isotropic tension is considered as elasticity modulus, and shear modulus is neglected because of its minor value

We assume that in erythrocytes passing through the slit capillary the membranes are strained, but not undergone isotropic extension. This is confirmed by that fact that in shear flow the threshold level of shear stress (under impact lasting from several seconds to minutes) is within the range of 100–500 Pa [16]. In our experiments the shear stress did not exceed 20 Pa, i. e. the cell membrane could not be extended. That is why in the formula for calculating a force during compressing a cell between two flat surfaces [2] isotropic tension can be replaced by shear tension, i. e.

$$F = \frac{2\pi R_0 R_i^2 T_s}{R_0^2 - R_i^2} \quad (6)$$

где S_{kc} – площадь контакта клетки со стенкой, S_e – площадь клетки по экватору, то можно распространить этот результат на любую форму клетки, зажатой между двумя поверхностями. Исходя из этого уравнение (6) может быть представлено в виде:

$$F_{kc} = \frac{P_e T_s S_{kc}}{S_e - S_{kc}}, \quad (7)$$

где F_{kc} – сила взаимодействия клетки со стенкой.

Силу взаимодействия клетки со стенкой можно определить из соотношения:

$$F_{kc} = 2\tau_{кл} S_{kc} \quad (8)$$

Натяжение сдвига определяется уравнением [2]:

$$T_s = \frac{M}{2\lambda_1^2 \lambda_2^2} |\lambda_1^2 - \lambda_2^2|, \quad (9)$$

где M – модуль сдвига мембраны эритроцита; λ_1 и λ_2 – относительные удлинения мембраны в экваториальной и меридиональной плоскостях соответственно.

Для определения удлинений мембраны необходимо знать форму эритроцита в потоке. Известно, что при движении в микрокапиллярной системе эритроциты принимают парашютообразную форму [14]. Можно предположить, как и в работе [1], что на подходе к щели эритроциты имеют форму (рис. 3), которая имитирует форму парашюта.

При объеме эритроцита $V_0 = 97,91 \text{ мкм}^3$ и площади поверхности $S_0 = 129,95 \text{ мкм}^2$ радиус клетки $R_0 = 3,216 \text{ мкм}$ [1].

После вхождения в щель клетка меняет форму. Форма, которую принимает клетка в щелевом канале под воздействием внешних сил и упругости мембраны, также не известна. Однако, поскольку модуль упругости мембраны является неизвестной искомой величиной, формой клетки придется задаться. Исходя из того, что при высоких скоростях сдвига эритроциты в потоке принимают форму эллипсоида вращения [15], а в наших экспериментах скорости сдвига имеют порядок 10^4 – 10^5 с^{-1} , то была принята форма клетки в виде эллипса (рис. 4).

Для определения полуосей a и c эллипса пятна контакта клетки с поверхностью канала (рис. 4) необходимо решить систему уравнений, определяющих площадь и объем такой клетки:

$$\begin{cases} S_0 = 2\pi ac + \frac{\pi b}{2} P_\kappa + b(P_e - P_\kappa); \\ V_0 = \pi abc + \frac{\pi b^2}{8} P_\kappa + \frac{b^2}{6} (P_e - P_\kappa), \end{cases} \quad (10)$$

In this case the shape of a flattened cell is considered as a disc. Herewith R_0 is cell equator radius; R_i is radius of the cell-surface contact spot; T_s is shear tension of cell membrane.

However if one notes that $2\pi R_0$ is the equator perimeter of a flattened cell, and

$$\frac{R_i^2}{R_0^2 - R_i^2}$$

is equivalent to the area relation

$$\frac{S_{cw}}{S_e - S_{cw}},$$

where S_{cw} – cell-wall contact area; S_e – cell equator area, this result can be extrapolated for cells of any shape, compressed between two surfaces. On this basis the equation (6) can be transformed into:

$$F_{cw} = \frac{P_e T_s S_{cw}}{S_e - S_{cw}}, \quad (7)$$

where F_{cw} – cell-wall interaction force.

The cell-wall interaction force can be calculated from the relation:

$$F_{cw} = 2\tau_{cell} S_{cw}. \quad (8)$$

The shear tension is determined by the equation [2]:

$$T_s = \frac{M}{2\lambda_1^2 \lambda_2^2} |\lambda_1^2 - \lambda_2^2|, \quad (9)$$

where M is shear modulus of erythrocyte membrane; λ_1 and λ_2 are relative elongation of membrane in the equatorial and meridional planes, correspondingly.

It is necessary to know the shape of erythrocyte in flow to determine membrane elongations. It is known that while moving in a microcapillary system erythrocytes take a parachute-like shape [14]. One can assume as well as in the work [1] that erythrocytes approaching the slit are of the shape that imitates a parachute.

When the erythrocyte volume V_0 is $97.91 \text{ }\mu\text{m}^3$ and the surface area S_0 is $129.95 \text{ }\mu\text{m}^2$, the cell radius R_0 is $3.216 \text{ }\mu\text{m}$ [1].

After a cell has entered the slit, its shape changes. The shape, which the cell takes in the slit canal under the influence of outer forces and membrane elasticity, is unknown. However, as the membrane elasticity modulus is an unknown desired quantity, the cell shape has to be specified. From the fact that at high shear rates erythrocytes in flow take a shape of the ellipsoid of revolution [15], and in our experiments shear rates are within the range of 10^4 – 10^5 sec^{-1} , an ellipsoid-like shape of the cell was accepted (Fig. 4).

To define the semiaxes a and c of the ellipsoid of the cell-canal surface contact spot one need to solve the combined equations determining the area and volume of this cell:

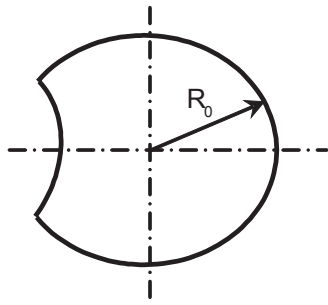


Рис.3. Форма клетки на подходе к щели.
Fig. 3. The shape of a cell approaching the slit.

где P_κ – периметр пятна контакта:

$$P_\kappa = 4a + (2p - 4)c \quad (a > c),$$

периметр клетки по экватору:

$$P_e = 4(a + b/2) + (2p - 4)(c + b/2).$$

Решая систему уравнений (10), получаем уравнение для большой полуоси эллипса пятна контакта a :

$$a = \frac{12V_0 - 3bS_0 + b^2(P_e - P_\kappa)}{6\pi bc},$$

малая полуось c определяется из уравнения:

$$\frac{1}{\pi} \left[\frac{V_0}{b} + S_0 - \frac{7}{6}b(P_e - P_\kappa) \right] = 3ac + \frac{5}{8}bP_\kappa,$$

которое решается численно.

Тогда относительное удлинение в экваториальной плоскости:

$$\lambda_1 = \frac{P_e}{2\pi R_0},$$

а поскольку растяжение сдвигом происходит без изменения площади поверхности [2], то относительное удлинение в меридиональной плоскости λ_2 находится из уравнения:

$$\lambda_1 \lambda_2 = 1.$$

Площадь контакта клетки со стенкой

$$S_{\text{кc}} = \pi ac,$$

а площадь клетки в экваториальной плоскости

$$S_e = \pi(a + b/2)(c + b/2).$$

Подставляя в уравнение (8) формулу (3) и приравнявая его к уравнению (7), получаем соотно-

$$\begin{cases} S_0 = 2\pi ac + \frac{\pi b}{2}P_c + b(P_e - P_c); \\ V_0 = \pi abc + \frac{\pi b^2}{8}P_c + \frac{b^2}{6}(P_e - P_c), \end{cases} \quad (10)$$

where a and c are major and minor semiaxes of the ellipsoid of the cell-canal surface contact spot; P_c – perimeter of the contact spot:

$$P_c = 4a + (2p - 4)c \quad (a > c),$$

and the equator perimeter of the cell is:

$$P_e = 4(a + b/2) + (2p - 4)(c + b/2).$$

Having solved the combined equations (10) we get the equation for the major semiaxis a of the contact spot ellipsoid:

$$a = \frac{12V_0 - 3bS_0 + b^2(P_e - P_c)}{6\pi bc},$$

and the minor semiaxis is determined from the equation:

$$\frac{1}{\pi} \left[\frac{V_0}{b} + S_0 - \frac{7}{6}b(P_e - P_c) \right] = 3ac + \frac{5}{8}bP_c,$$

which is solved numerically.

Then the relative elongation in the equator plane is:

$$\lambda_1 = \frac{P_e}{2\pi R_0},$$

and as extension by shear occurs without the surface area changes [2], the relative elongation in the meridional plane λ_2 is found from the equation:

$$\lambda_1 \lambda_2 = 1.$$

The cell-wall contact area is

$$S_{\text{cw}} = \pi ac,$$

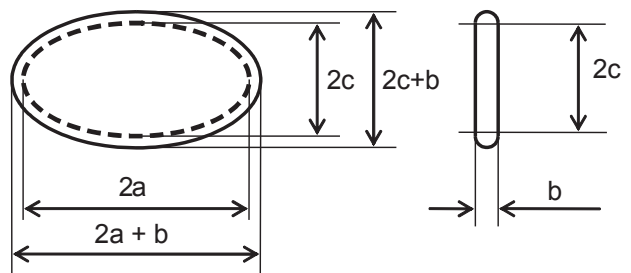


Рис. 4 Форма клетки при движении в щели.
Fig. 4. The shape of a cell moving in the slit.

шение для определения натяжения сдвига мембраны клетки при течении суспензии клеток через плоскую щель:

$$T_s = \frac{2(S_e - S_{kc})}{P_e} (\tau_{cyc} - \tau_{en}) \quad (11)$$

Приравнявая уравнения (9) и (11), получаем уравнение для определения модуля сдвига мембраны эритроцита:

$$M = \frac{4\lambda_1^2 \lambda_2^2 (S_e - S_{kc})}{P_e |\lambda_1^2 - \lambda_2^2|} (\tau_{cyc} - \tau_{en}).$$

В экспериментах использовали суспензии эритроцитов с разными показателями гематокритов ($10 \pm 1,5\%$). Однако изменение гематокрита приводит к изменению напряжения сдвига. Чтобы не доводить гематокрит до заданной величины и не проводить его дополнительные измерения, можно воспользоваться зависимостью для приведения модуля сдвига к заданной величине гематокрита, что даст очень незначительное отклонение величины модуля сдвига. В работе [5] показано, что напряжение сдвига для суспензий с различным гематокритом можно привести к напряжению сдвига τ_{cyc} при гематокрите H_{cyc} с помощью следующего соотношения:

$$\tau_{cyc} = \tau_i (H_{cyc}/H_i)^{0,4956},$$

где τ_i – напряжение сдвига при измеренном показателе гематокрита H_i .

Мы приводили все измерения к показателю гематокрита 10%.

Были проведены эксперименты по определению модуля сдвига мембран эритроцитов, находящихся в суспензии, в зависимости от температуры и сроков гипотермического хранения крови.

На рис. 5 приведены результаты экспериментов по определению модуля сдвига мембран эритроцитов крови здоровых доноров в изотоническом физиологическом растворе (гематокрит 10%) в зависимости от температуры и сроков гипотермического хранения крови.

Из [2] известно, что при 20°C величина модуля сдвига мембран эритроцитов находится в пределах $(4-7) \times 10^{-6}$ Н/м. В наших экспериментах при той же температуре и после 3-х суток хранения крови получена средняя величина модуля сдвига мембран эритроцитов, находящихся в суспензии, порядка $7,7 \times 10^{-6}$ Н/м.

Что касается формы кривых (рис. 5), то она тоже вполне удовлетворительно согласуется с ли-

and the area of the cell in the equatorial plane is

$$S_e = \pi(a+b/2)(c+b/2).$$

Inserting formula (3) in equation (8) and equating the latter to equation (7) we get the relation for the determination of the cell membrane shear tension under the cell suspension flow through the flat slit:

$$T_s = \frac{2(S_e - S_{cw})}{P_e} (\tau_{sus} - \tau_{ex}) \quad (11)$$

Equating equations (9) and (11) we get the equation for the determination the erythrocyte membrane shear modulus:

$$M = \frac{4\lambda_1^2 \lambda_2^2 (S_e - S_{cw})}{P_e |\lambda_1^2 - \lambda_2^2|} (\tau_{sus} - \tau_{ex}).$$

Erythrocyte suspensions with different hematocrit values ($10 \pm 1.5\%$) were used in the experiments. However the hematocrit changes lead to shear tension changes. Instead of changing the hematocrit to a desired value and its additional measurement one can use a functional dependence for reduction of the shear modulus to a desired hematocrit, which gives only an insignificant fluctuation in shear modulus values. It was shown in [5] that the shear tension for suspensions with different hematocrit values can be reduced to the shear tension τ_{sus} with the hematocrit H_{sus} using the following relation:

$$\tau_{sus} = \tau_i (H_{sus}/H_i)^{0,4956},$$

where τ_i is shear tension at the measured hematocrit H_i .

We reduced all the measurements to the hematocrit value of 10%.

The experiments on determining the erythrocyte membrane shear modulus in suspensions depending on blood hypothermic storage temperatures and terms were carried out.

The results of the experiments on determining the membrane shear modulus for erythrocytes from healthy donors' blood in isotonic physiological solution (hematocrit of 10%) depending on blood hypothermic storage temperatures and terms are presented in Fig. 5.

It is known from [2] that at 20°C the erythrocyte membrane shear modulus values are within the range of $(4-7) \times 10^{-6}$ N/m. In our experiments at the same temperature after 3 day storage of blood the average value of the suspended erythrocyte membrane shear modulus was 7.7×10^{-6} N/m.

As for the curves shape (Fig. 5) it is consistent with the literature data quite satisfactory. For example,

тературными данными. Так, Williamson J.R. с соавт. [15] и Ravov A.J. с соавт. [12] отмечают, что при повышении температуры деформируемость мембран эритроцитов увеличивается, достигая максимума при 25°C, после чего начинает уменьшаться. Эти данные подтверждаются и в работе [13], где показано, что индекс удлинения эритроцитов в сдвиговом потоке (один из показателей модуля сдвига клеточной мембраны) возрастает при повышении температуры от 4 до 21,5°C и немного уменьшается при ее увеличении от 25 до 37°C. В наших экспериментах значение модуля сдвига мембран эритроцитов уменьшалось с $9,76 \times 10^{-6}$ Н/м при 10°C до $7,5 \times 10^{-6}$ Н/м при 25°C, а затем немного повышалось до $7,92 \times 10^{-6}$ Н/м при 36°C (для эритроцитов крови, хранившейся в течение 3-х суток). Для эритроцитов из крови, которая хранилась в течение 9 суток, наблюдается аналогичная картина изменения величины модуля сдвига: при 10°C – $14,4 \times 10^{-6}$ Н/м, при 25°C – $11,92 \times 10^{-6}$ Н/м и при 36°C – $12,83 \times 10^{-6}$ Н/м.

Кроме того, имеет место заметное повышение значений модулей сдвига мембран эритроцитов при увеличении сроков гипотермического хранения крови, что также соответствует результатам, полученным Card R.T. и др. [7]. Следовательно, определение этого параметра может служить одним из показателей оценки качества консервированной крови, предназначенной для трансфузии.

Таким образом, можно утверждать, что предложенные метод и устройство, могут быть использованы для определения среднего модуля сдвига мембран всех эритроцитов, находящихся в суспензии.

Выводы

1. Получена средняя величина модуля сдвига мембран эритроцитов, суспендированных в изотоническом физиологическом растворе, $M = 7,7 \times 10^{-6}$ Н/м (температура 20°C), что очень близко к величине модуля сдвига мембран нормальных эритроцитов, приведенных в литературе [2].

2. Форма кривой зависимости среднего модуля сдвига мембран эритроцитов, находящихся в суспензии, соответствует данным литературы [12, 13, 15].

3. Величина модуля сдвига мембран эритроцитов возрастает с увеличением сроков гипотермического хранения крови, что также соответствует известным литературным данным [7].

4. Предлагаемый нами метод продавливания клеточной суспензии через плоский капилляр для измерения среднего модуля сдвига мембран эритроцитов, находящихся в суспензии, может быть использован для научных и медицинских целей.

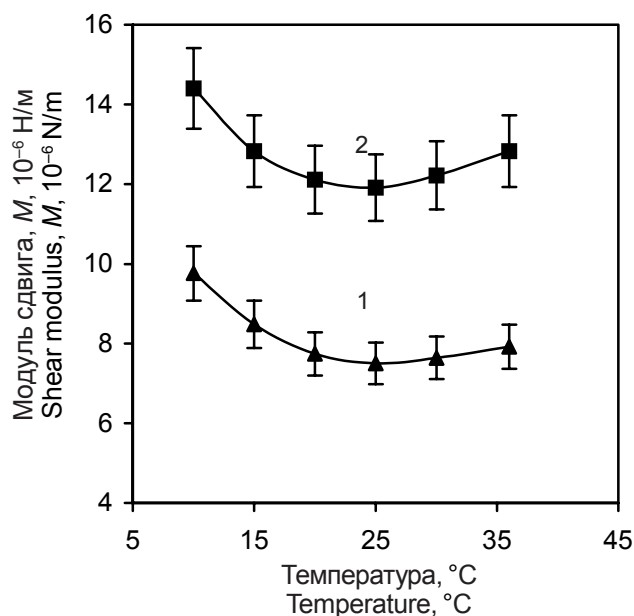


Рис. 5. Зависимость модуля сдвига мембран эритроцитов от температуры и сроков хранения. 1 – 3-е суток; 2 – 9 суток.

Fig. 5. The dependence of the erythrocyte membrane shear modulus on blood hypothermic storage temperatures and terms. 1 – 3 days; 2 – 9 days.

Williamson *et al.* [15] and Ravov *et al.* [12] note that the erythrocyte membrane deformability enhances with increase in temperature reaching the maximum level at 25°C, afterwards it starts declining. These data are also confirmed by [13], in which it was shown that the index of erythrocyte elongation in shear flow (one of the parameters of the cell membrane shear modulus) enhanced when temperature increased from 4 to 21.5°C and declined slightly when temperature increased from 25 to 37°C. In our experiments the erythrocyte membrane shear modulus declined from 9.76×10^{-6} N/m at 10°C to 7.5×10^{-6} N/m at 25°C and then enhanced slightly to 7.92×10^{-6} N/m at 36°C (for the erythrocytes from blood stored for 3 days). For the erythrocytes from blood stored for 9 days a similar profile of the shear modulus changes was observed: at 10°C – 14.4×10^{-6} N/m, at 25°C – 11.92×10^{-6} N/m and at 36°C – 12.83×10^{-6} N/m.

Besides there is a conspicuous rise in the erythrocyte membrane shear modulus with the prolongation of blood hypothermic storage, which also corresponds to the results obtained by Card *et al.* [7]. Consequently the determination of this parameter can serve as an index of quality evaluation of preserved blood designated for transfusion.

Thus we can assert that the method and device suggested can be applied for the determination of the average shear modulus of membranes of all the erythrocytes in the suspension.

Литература

1. *Гардаш Л.И., Гордиенко Е.А.* Изменение формы эритроцита человека при продавливании через цилиндрический микрокапилляр // *Биофиз. вісник.*– 1999, Вип. 3 (1).– С. 88–91.
2. *Ивенс И., Скейлак Р.* Механика и термодинамика биологических мембран.– М.: Мир, 1982.– 304 с.
3. *Попівненко Л.І.* Розробка методу та вимірювання модуля зсуву мембран еритроцитів: Автореф. дис. ... канд. фіз.-мат. наук.– Харків, 2000.– 20 с.
4. *Тодрин А.Ф.* Влияние гематокрита на вязкость суспензии эритроцитов в капиллярном вискозиметре при малых размерах капилляров // *Пробл. криобиологии.*– 2005.– Т. 15, N1.– С. 14–19.
5. *Тодрин А.Ф., Усачев В.В., Тимофеева Е.В.* Зависимость напряжения сдвига от гематокрита при протекании суспензии эритроцитов через узкие плоские каналы // *Пробл. криобиологии.*– 2006.– Т. 16, N1.– С. 56–59.
6. *Пат. № 23596А України, МПК G 01 N 33/49, G 01 N 27/100.* Спосіб визначення деформуємості клітин та пристрій для його здійснення / О.І. Осецький, О.Ф. Тодрін. Заявл. 26.05.97; Опубл. 31.08.98. Бюл. №4.
7. *Card R.T., Mahandas N., Perkin H.A., Shohet S.B.* Deformability of stored red blood cells. Relationship to degree of packing // *Transfusion.*– 1982.– Vol. 22, N2.– P. 96–101.
8. *Chan T., Jafrin M.Y., Seshardi V., McKey C.* Flow of red blood cell suspensions through narrow two-dimensional channels // *Biorheology.* – 1982.– Vol. 19, N1–2.– P. 253–267.
9. *Fung Y.C., Winston C.O., Tsang W.C.O., Pacitucci P.* High resolution data on the geometry of the red blood cells // *Biorheology.*– 1998.– Vol. 35, N2.– P. 369–385.
10. *Koutsoris D., Hams M., Skalak R.* Determination of erythrocytes transit times through a 5 mm “nucleopores” filter // *Biorheology.*– 1983.– Vol. 20, N6.– P. 779–787.
11. *Leblond P.F., Coubombe L.* The measurement of erythrocyte deformability using micropore membranes. A sensitive technique with clinical application // *J. Lab. Clin. Med.*– 1979.– Vol. 94, N1.– P. 134–144.
12. *Ravov A.J., Hochmuth P.H.* Effect of heat treatments on the elasticity of human erythrocyte membrane // *Biophys. J.*– 1975.– Vol. 15, N11.– P. 1095–1100.
13. *Singh M., Stoltz J.F.* Influence of temperature variation from 50 to 37°C on aggregation and deformability of erythrocytes // *Clinical hemorheology and microcirculation.*– 2002.– Vol. 26, N1.– P. 1–7.
14. *Suzuki Y., Tateishi N., Soutani M., Maeda N.* Deformation of erythrocytes in microvessels and glass capillaries: effects of erythrocyte deformability // *Microcirculation.*– 1996.– Vol. 3, N1.– P. 49–57.
15. *Williamson J.R., Shanahan M.O., Hochmuth P.H.* The influence of temperature on red cell deformability // *Blood.*– 1975.– Vol. 40, N4.– P. 611–624.
16. *Zhao R., Antaki J.F., Naik T. et al.* Microscopic investigation of erythrocyte deformation dynamics // *Biorheology.*– 2006.– Vol. 43, N6.– P. 747–765.

Поступила 13.10.2009
Рецензент Н.М. Шнакова

Conclusions

1. The average value of the shear modulus of membranes of the erythrocytes suspended in isotonic physiological solution, $M = 7.7 \times 10^{-6} \text{ N/m}$ (temperature of 20°C) is obtained, which is very close to the normal erythrocyte membrane shear modulus indicated in [2].

2. The curve shape of the dependence of the average shear modulus of the erythrocytes membranes in suspension corresponds to the data in [12, 13, 15].

3. The erythrocyte membrane shear modulus enhances with the prolongation of blood hypothermic storage, which also corresponds to the results in [7].

We suggest the method of forcing cell suspensions through flat capillaries for the determination of the average shear modulus of the erythrocytes membranes in suspension, which can be used for scientific and medical purposes.

References

1. *Gardash L.I., Gordiyenko Ye.A.* Changes of the human erythrocyte shape when it is forced through a cylinder capillary // *Biophysical Bulletin.*– 1999.– Issue 3(1).– P. 88–91.
2. *Evans I., Skalack R.* Mechanics and thermodynamics of biological membranes.– Moscow: Mir, 1982.– 304 p.
3. *Popivnenko L.I.* Elaboration of the method of the determination of the erythrocyte membrane shear modulus: Author's abstract of the thesis of Candidate of Physical-Mathematical Sciences.– Kharkiv, 2001.– 20 p.
4. *Todrin A.F.* Hematocrit effect on viscosity of erythrocyte suspension in a capillary viscosimeter at small sizes of capillaries // *Problems of Cryobiology.*– 2005.– Vol. 15, N1.– P. 14–19.
5. *Todrin A.F., Usachev V.V., Timofeyeva Ye.V.* Dependence of shift tension on hematocrit during erythrocyte suspension flowing through narrow channels // *Problems of Cryobiology.*– 2006.– Vol. 16, N1.– P. 56–59.
6. *Patent of Ukraine N23596A, IPC G01N33/49, G01N27/+100.* A method for determination of the cell deformability and a device for its implementation / O.I. Osetskyy, O.F. Todrin.– Filed in: 05.26.97. Published in: 08.31.98. Bul. N4.
7. *Card R.T., Mahandas N., Perkin H.A., Shohet S.B.* Deformability of stored red blood cells. Relationship to degree of packing // *Transfusion.*– 1982.– Vol. 22, N2.– P. 96–101.
8. *Chan T., Jafrin M.Y., Seshardi V., McKey C.* Flow of red blood cell suspensions through narrow two-dimensional channels // *Biorheology.* – 1982.– Vol. 19, N1–2.– P. 253–267.
9. *Fung Y.C., Winston C.O., Tsang W.C.O., Pacitucci P.* High resolution data on the geometry of the red blood cells // *Biorheology.*– 1998.– Vol. 35, N2.– P. 369–385.
10. *Koutsoris D., Hams M., Skalak R.* Determination of erythrocytes transit times through a 5 mm “nucleopores” filter // *Biorheology.*– 1983.– Vol. 20, N6.– P. 779–787.
11. *Leblond P.F., Coubombe L.* The measurement of erythrocyte deformability using micropore membranes. A sensitive technique with clinical application // *J. Lab. Clin. Med.*– 1979.– Vol. 94, N1.– P. 134–144.
12. *Ravov A.J., Hochmuth P.H.* Effect of heat treatments on the elasticity of human erythrocyte membrane // *Biophys. J.*– 1975.– Vol. 15, N11.– P. 1095–1100.
13. *Singh M., Stoltz J.F.* Influence of temperature variation from 50 to 37°C on aggregation and deformability of erythrocytes // *Clinical hemorheology and microcirculation.*– 2002.– Vol. 26, N1.– P. 1–7.

14. Suzuki Y., Tateishi N., Soutani M., Maeda N. Deformation of erythrocytes in microvessels and glass capillaries: effects of erythrocyte deformability // *Microcirculation*.– 1996.– Vol. 3, N1.– P. 49–57.
15. Williamson J.R., Shanahan M.O., Hochmuth P.H. The influence of temperature on red cell deformability // *Blood*.– 1975.– Vol. 40, N4.– P. 611–624.
16. Zhao R., Antaki J.F., Naik T. et al. Microscopic investigation of erythrocyte deformation dynamics // *Biorheology*.– 2006.– Vol. 43, N6.– P. 747–765.

Accepted in 13.10.2009