

Pokroky matematiky, fyziky a astronomie

Angela Ottová

Ku biomechanice bunčových membrán

Pokroky matematiky, fyziky a astronomie, Vol. 32 (1987), No. 3, 146--153

Persistent URL: <http://dml.cz/dmlcz/139897>

Terms of use:

© Jednota českých matematiků a fyziků, 1987

Institute of Mathematics of the Academy of Sciences of the Czech Republic provides access to digitized documents strictly for personal use. Each copy of any part of this document must contain these *Terms of use*.



This paper has been digitized, optimized for electronic delivery and stamped with digital signature within the project *DML-CZ: The Czech Digital Mathematics Library* <http://project.dml.cz>

Ku biomechanike bunkových membrán

Angela Ottová, Bratislava

1. Úvod

Biomechanika je najstaršia oblasť biofyziky. Predmetom jej výskumu je vplyv mechanických zákonov na biologické systémy a odpoveď týchto systémov na mechanické vplyvy prostredia. Nie je preto žiadnym prekvapením skutočnosť, že biomechanické vedecké práce patria do raného obdobia histórie vedy, lebo aj mechanika charakterizuje prvú fázu vývoja fyziky. Biomechanika je úzko spätá s fyziológiou a anatómiou a spolu s týmito vedami sa aj v minulosti vyvíjala [1, 5, 9, 13].

Podobne, ako to platí pre iné vedné disciplíny, podnietili rozvoj biomechaniky najmä dva činitele: tvorivá zvedavosť – zdravá túžba po novom poznaní a účelový výskum, podmienený spoločenskými potrebami. Tieto dve tendencie, ktoré sa vzájomne dopĺňajú, možno v biomechanike zreteľne pozorovať. V tejto súvislosti treba spomenúť výskum kĺbového mechanizmu zvierat, pohyb hmyzu, štúdiom mechaniky pohybu červov a veľa ďalších štúdií z oblasti dynamiky pohybu v živočíšnej ríši a statiky zvierat a rastlín. Tieto práce mali v minulosti veľký význam pre rozvoj biomechaniky. V poslednom období sa zaraďujú do výskumu v oblasti biomechaniky také úlohy, ktoré sú úzko späté s biomedicínskou problematikou a ďalšími výskumnými smermi orientovanými na biologické prostredie. V tejto súvislosti treba spomenúť prudký rozvoj hemoreológie a výskum biomateriálov pre medicínsku techniku [2, 10, 12]. V neposlednej miere sa biomechanika zaslúžila aj o rozvoj telovýchovného lekárstva.

V minulosti, najmä v období 60. rokov došlo k rozvoju bioniky, s čím súvisí uplatňovanie biologických konštrukčných princípov v technickej praxi. Slovo bionika vzniklo spojením slov „biológia“ a „technika“ na kongrese v Dayton (USA) v roku 1960 a predstavuje realizáciu pradávejnej snahy ľudstva pri technických konštrukciách hľadať vzory v prírode. Rozvoj bioniky podnietil okrem iného aj vývoj mechaniky lietania a plávania, ako aj niektoré základné úvahy o biostatike. Biomechanika nie je len „mechanika pre biológiu a medicínu“, ale je uplatnením zákonitostí tejto fyzikálnej disciplíny na všetky procesy prebiehajúce v živých systémoch, so všetkými ich zvláštnosťami. Treba vychádzať zo skutočnosti, že funkčné štruktúry biologického systému podliehajú evolučnému optimalizačnému procesu, ktorý sa zásadne líši od optimalizácie v technických vedách. Konštruktér navrhne na základe technických parametrov a vedomostí určité zariadenie, prepočíta a teoreticky overí jeho funkčnosť a nechá ho postaviť. I keď skúsenosti získané pri prvom modeli možno uplatniť na konštrukciu vylepšeného typu zariadenia, predsa je počet spätnoväzbových prepojení zanedbateľne malý v porovnaní s reprodukčnými cyklami biologických systémov. V živých systémoch prebieha pomocou variácie a selekcie priblíženie sa optimálnej hodnote v nepredstaviteľne veľkom počte generácií. Tento biologický optimalizačný proces je neporovnateľne pomalší než

technický optimalizačný proces. Na rozdiel od vývoja technických zariadení a prístrojov sa tzv. dcérska generácia v biológii neučí zo skúseností rodičovskej generácie, ale len mierne modifikuje niektoré jej vlastnosti. Z hľadiska biomechaniky sú prekvapivé konštrukčné riešenia výsledkom evolučného optimalizačného procesu v živej prírode. Biologické druhy, o ktorých náhodnosti možno diskutovať, podliehali v jednotlivých geologických obdobiach optimalizačnému procesu, samozrejme za predpokladu, že sa ich životné podmienky nezmenili rýchlejšie, než sa mohlo realizovať prispôsobenie sa týmto faktorom prostredia.

Zvláštnosťou biomechaniky rastlín a zvierat sú ďalej aj hierarchické funkčné štruktúry biologického systému. Existujú vzájomné funkčné príčinnosti, ktoré siahajú od molekulárnej úrovne až po úroveň celého organizmu a niekedy ešte ďalej. Ku komplexu týchto otázok patrí napr. zaťaženie kostrového systému živočíchov na základe špecifickej konštrukcie kosti, ďalej je to problematika adaptácie červených krviniek podmienkam kvného riečišťa na základe špeciálnych viskoelastických vlastností krviniek, ktoré sú dané molekulárnym zložením bunkovej membrány [6, 8], a mnohé ďalšie. Biomechanika vyžaduje štúdium skúmaného objektu – určitej biologickej štruktúry, a to z hľadiska jeho postavenia v biologickom systéme ako celku [3, 4, 6, 7, 8, 11].

Hierarchická štruktúra živého organizmu má ešte jeden ďalší fyzikálny dôsledok. Zatiaľ čo v mechanike kontinua sú definované fenomenologické vlastnosti, ktoré možno odvodiť zo štatistického rozdelenia častíc, v biologických systémoch sa uplatňujú molekulárne organizačné princípy, ktoré sa neriadia zákonitosťami mechaniky kontinua. Mechanické vlastnosti bunkovej membrány nemožno odvodiť z vlastností rozhrania zloženého zo zmesi lipidov a bielkovín, ale ich možno vyjadriť ako lokálne veličiny, ktorých veľkosť v študovanom mieste je daná funkčne podmieneným laterálnym pohybom membránových zložiek. Všetky vymenované vlastnosti biologických systémov vedú k ďalšej zvláštnosti biofyzikálneho výskumu, ktorá sa uplatňuje v biomechanike: je to problematika použitia fenomenologických veličín v závislosti od voľby veľkosti biologických podsystemov. Oprávnenie použitia týchto parametrov sa týka najmä viskozity, pružnosti biologických materiálov, ale aj nemechanických parametrov, ako sú dielektrická konštanta, koncentrácia, teplota a ďalšie.

V ďalšom sa pokúsime priblížiť niektoré aspekty biomechaniky membrán, vychádzajúc z vlastných pokusov s červenými krvinkami [6, 8, 11].

2. Mechanika bunkových membrán

2.1. Viskoelastické vlastnosti bunkovej membrány

Pri biomechanickej analýze bunkovej membrány možno jasne vyčleniť hranice mechaniky kontinua, keď sa hovorí o takých parametroch, ako sú modul pružnosti v ťahu, viskozita, alebo keď sa zavedú pojmy ako neutrálna plocha pri ohýbaní materiálu. Tieto parametre možno v mechanike bunkových membrán považovať za efektívne veličiny, ktoré sú per definitionem závislé od nameraného efektu, t. j. od použitej meracej metódy.

Na základe už diskutovanej molekulárnej štruktúry bunkových membrán možno

kvalitatívne výpovede o ich mechanických vlastnostiach zhrnúť do nasledovných, nami navrhnutých téz [6, 8, 11]:

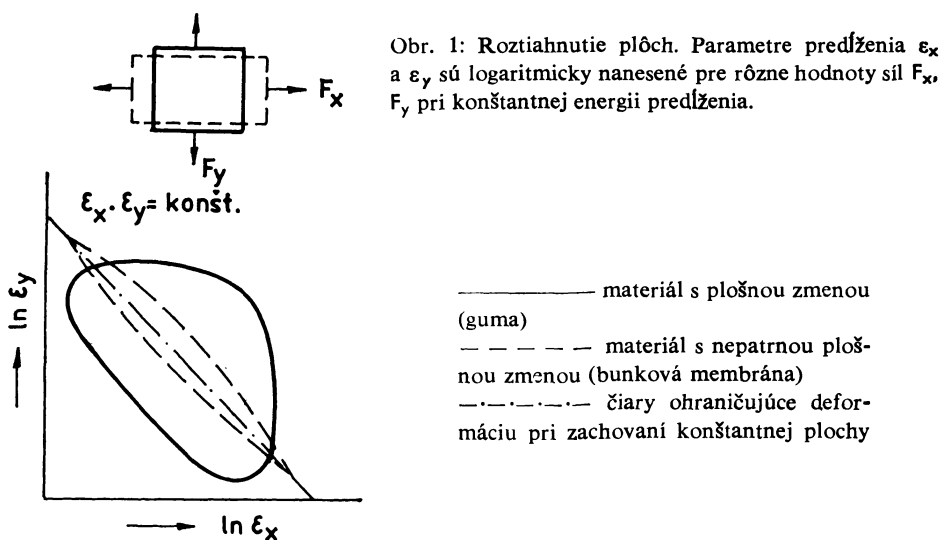
- Hrúbku membrány (6–10 nm) nemožno takmer vôbec ovplyvniť pri mechanickom zaťažení membrány. Hrúbka závisí od molekulárneho zloženia membrány a fázového stavu lipidov.
- Vzájomnú vzdialenosť membránových molekúl a ich individuálny povrch určujú elektrostatické a Van der Waalove sily. Tieto sily možno špecificky ovplyvniť prostredím, v ktorom membrána existuje. Priebeh vzájomných interakcií pri konštantnej teplote sa viac podobá typu pružných deformácií ocele než kaučuku.
- Rôzne membránové molekuly, ale najmä lipidy možno v hrubom priblížení aproximovať pomocou valcov alebo kuželov, pričom na vrchole kužela možno umiestniť polárnu hlavičku alebo tzv. lipofilnú chvostikovú časť molekuly. Úsek membrány, ktorý sa skladá hlavne z kužeľovitých typov molekúl, sa vyznačuje tzv. „aktívnym“ zakrivením, t. j. bez napätia. Membránové zakrivenie si možno predstaviť i na základe zmeny plošného povrchu jednej z dvoch membránových monovrstiev, analogicky bimetalickému efektu („bilayer-couples“-model) [11].
- Zmena priestorového rozloženia jednotlivých typov membránových molekúl podmieňuje deformáciu membrány šmykom, pričom sa zachováva konštantný objem vnútorného prostredia uzatvoreného membránou, ak ide o uzavreté membránové štruktúry, ale zároveň aj konštantný povrch membrány [6, 8]. Tento proces je do určitej miery brzdený tzv. cytoskeletálnym systémom, ktorý predstavuje akúsi cytoplazmatickú podpornú kostru membrány.

Meranie mechanických vlastností bunkovej membrány siaha od použitia molekulárnych metód až k fenomenologickým pokusom zmeny tvaru buniek pri pôsobení určitého napätia. Napr. signály elektrónovej spinovej rezonancie (ESR-metóda) spinových značkovaných molekúl alebo rôzne fluorescenčné merania poskytujú informácie o rotačných difúzných koeficientoch týchto molekúl v membránach. Pomocou týchto koeficientov možno s určitým priblížením vypočítať viskozitu a fluiditu študovanej membrány. Ešte stále existuje pochybnosť o tom, či značkované molekuly skutočne poskytujú charakteristické signály esenciálnych membránových molekúl a či snímané signály nepredstavujú určité špecifické membránové oblasti, napr. oblasti najvyššej fluidity, v ktorých sa membránové sondy prednostne zabudovávajú. V tejto súvislosti vzniká otázka o fenomenologickom význame nameraných parametrov membrán. Výsledky získané rôznymi fyzikálnymi metódami potvrdzujú základné postuláty, ktoré boli odvodené na základe poznatkov o štruktúre biologických membrán. Bunková membrána je takmer nerozťažiteľná na rozdiel od membrány gummy, ktorá na účet svojej hrúbky pri prísnej konštantnosti ňou uzavretého objemu dokáže zväčšiť svoj povrch pri izotropickom rozťahovaní. Tento proces je graficky znázornený na obr. 1. Rôzne meracie metódy poskytujú rôzne výsledky. Metódou nasávania ľudských červených krviniek možno získať pre modul pružnosti membrány hodnoty v intervale $7,3 \cdot 10^5$ až $3,0 \cdot 10^7 \text{ N} \cdot \text{m}^{-2}$, zatiaľ čo merania zaťaženia krviniek prúdením dávajú podľa literatúry [3, 4, 6] pre modul pružnosti hodnoty rádovo $10^3 \text{ N} \cdot \text{m}^{-2}$. Odhad modulu pružnosti membrány z fyzikálneho hľadiska vzhľadom na molekulárnu membránovú štruktúru je rádovo $10^8 \text{ N} \cdot \text{m}^{-2}$. Tieto rozdiely

názorne demonštrujú zložitú definíciu mechanických parametrov supramolekulárnych štruktúr a v neposlednej miere aj ich merania.

Výsledky závisia od spôsobu a miery membránového zaťaženia počas merania [3, 6, 10, 11, 12]. Okrem toho je aj fyziologický stav bunky počas pokusu dôležitým faktorom, na ktorý nemožno zabúdať, ako sme sa presvedčili vo vlastných pokusoch s ľudskými červenými krvinkami [6, 8, 11].

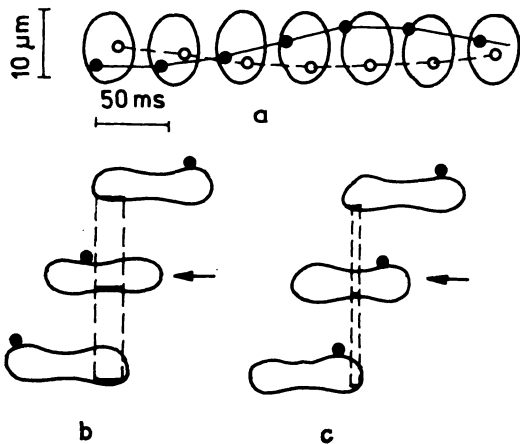
Hranica pretrhnutia membrány je veľmi nízka. Za normálnych fyziologických podmienok „in vivo“ môže dôjsť len k 0,01%nému rozťahnutiu membránovej plochy. Membrána sa trhá pri plošnom rozťahnutí pod 2% [6, 8, 11]. Membránu možno napnúť na hranicu prasknutia pomocou vnútorného tlaku, ktorý je nižší než 100 Pa. Tento tlak možno dosiahnuť osmotickým rozdielom tlakov asi $4 \cdot 10^{-5}$ osmol. $\text{dm}^{-3}/1$ osmol. dm^{-3} zodpovedá osmotickému tlaku ideálneho roztoku nedisociovej látky pri koncentrácii 1 mol. dm^{-3} [5].



Zmeny v osmotickej regulácii kompenzuje bunka len zmenou svojho tvaru, a nie membránovým rozťahovaním. Na druhej strane stabilizáciu bunky voči osmotickým zmenám možno dosiahnuť určitými prísadami v kultúrnych médiách pri pestovaní tkanivových kultúr [5].

Relatívne názornú deformáciu šmykom možno demonštrovať na ľudských červených krvinkách. V prúdiacom prostredí s rýchlostným gradientom možno pozorovať pomocou viditeľných membránových značiek (napr. tzv. Heinzových teliesok) rotačný pohyb membrány okolo bunky [3, 4]. Tento proces sa výstižne nazýva „fenomén tankovej reťaze“ (obr. 2a). Ako vidno z obrázka, tento proces sa realizuje pri bikonkávnom sploštenom tvare čeri venej krvinky. Aj u krvinky, ktorá je fixovaná na pevnom podklade, možno tento fenomén potvrdiť. Keď je fixačná plocha dostatočne veľká, valí sa bunka s pevným bodom pri miernom bočnom prúdení a zostáva v dosiahnutej polohe i po odstránení sily. Ak je fixačná plocha veľmi malá, dokonca bodová, membrána ju doslov-

ne „obtečie“. Schopnosť prešmykavania membrány závisí od jej fyziologického stavu, ako sme sa presvedčili aj v našich pokusoch [3, 4, 5, 6, 11] (obr. 2b, c).



Obr. 2. Šmykové presúvacie membrány ľudských červených krviniek pri zachovaní konštantného povrchu.

a Fenomén „tankovej reťaze“ — pohyb na membránu fixovaných Heinzových teliesok (●) ako membránovej značky vo vzťahu ku voľnému Heinzovmu teliesku (○) v červenej krvinke nachádzajúcej sa v prúdiacom prostredí s určitým rýchlostným gradientom. Obrázky predstavujú sériu postupne za sebou nasledujúcich situácií (prekreslené podľa [4]). b, c Membránový pohyb zviditeľnený pomocou laserom indukovaného, označeného bodu na bunkách s rôznou fixačnou plochou na pevnej podložke pri dočasnom prúdení (→) (prekreslené podľa [3]).

2.2. Membránová mechanika a tvar bunky

Moderné teórie tekutej mozaikovej štruktúry bunkovej membrány a jej dynamiky, ktoré sú podmienené i zložkami cytoskeletálneho systému, vytvárajú komplikovaný obraz membránovej mechaniky [5, 6, 8, 11, 13]. Na obr. 3 sú schematicky znázornené možné mechanizmy aktívnej, t. j. bunkou riadenej membránovej deformácie. Tieto koncepcie nepredstavujú alternatívne hypotézy, ale nadobúdajú platnosť pri rôznych procesoch. Môžu sa dokonca vyskytovať i vo vzájomných kombináciách. Považovať cytoskeletálnu koncepciu za analógiu pohybu sústavy sval – kosť (sval predstavuje cytoskelet, kosť predstavuje membránu) je určite nerealistické. Na druhej strane bol jednoznačne dokázaný vplyv cytoskeletálneho systému na mozaikovú štruktúru bunkovej membrány, ktorý sa môže odohrávať na základe mechanizmov na obr. 3b, c.

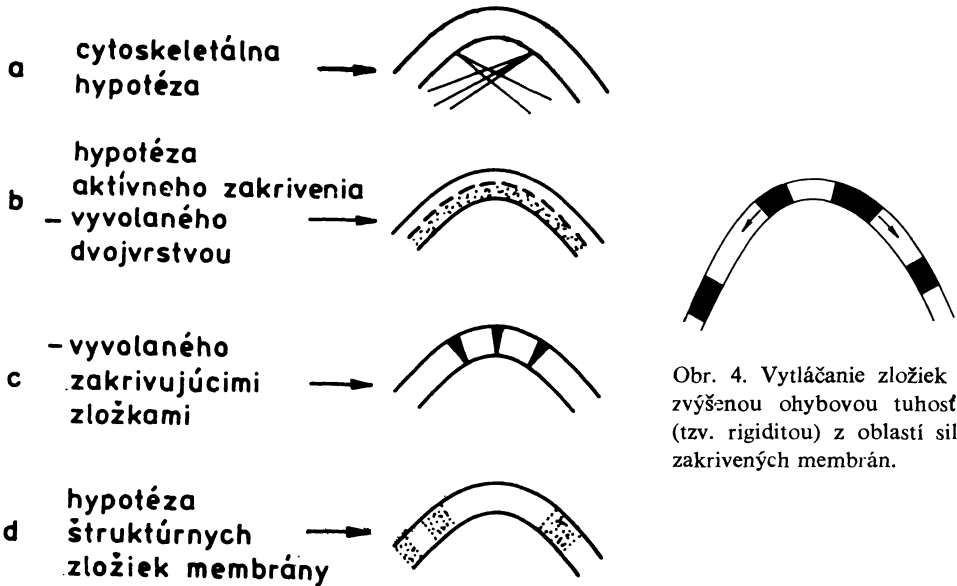
Bližšie rozoberieme nami navrhnutú koncepciu tuhých štruktúrnych zložiek membrány [6, 8, 11]. Ak predpokladáme, že membránový element s plochou A má modul ohýbania D_1 a je lokalizovaný v membráne s modulom ohýbania D_0 , potom možno vypočítať zmenu energie ΔE , ktorá je daná rozdielom energie ohýbania tohto elementu v oblasti so zakrivením K a v oblasti rovinatej membránovej plochy podľa vzťahu

$$(1) \quad \Delta E = \frac{AD_0}{2} \left(1 - \frac{D_0}{D_1} \right) K^2 .$$

Vo všeobecnosti veličina D vyjadruje energiu ohýbania pôvodne rovinatej plochy vzhľadom ku zakriveniu K . U ľudských červených krviniek dosahuje hodnotu 10^{-18} až 10^{-19} J.

Tuhé (rigidné) plošné elementy s modulom ohýbania $D_1 > D_0$ budú vytláčané z oblasti silného membránového zakrivenia $\Delta E > 0$ — obr. 4. Vo všeobecnosti možno

povedať na základe výsledkov našich pokusov [6, 8, 11], že difúziou sa vytvára štatisticky rovnomerné rozdelenie membránových zložiek v zmiešaných fázach. Tomu zodpovedá aj ich rozdelenie na ploche membránovej mozaiky za predpokladu, že tieto zložky nemajú zníženú pohyblivosť v dôsledku cytoskeletálneho systému. Posun membránovej zložky možno predpokladať len v takých prípadoch, keď je rozdiel energie ΔE väčší ako stredná energia fonónov $k_B T$ (kde k_B je Boltzmannova konštanta, T je teplota). Rovnica (1) vyjadruje vo všeobecnosti ΔE ako funkciu modulu ohýbania D , veľkosti plochy A a zakrivenia K . V oblasti špicatých výbežkov echinocytov (jedna z foriem červených krviniek), ktoré majú priemer asi 50 nm, t. j. $K = 4 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$, dosiahne už častica s priemerom 20 nm hodnotu $\Delta E > k_B T$, a bude teda efektívne vytlačená z oblasti silného zakrivenia (obr. 4 a obr. 5). V membránovej oblasti, ktorá sa vyznačuje priemerom zakrivenia 2 μm , t. j. $K = 10^6 \text{ m}^{-1}$, musí mať tuhý (rigidný) membránový útvar priemer rádovo aspoň v mikrometroch, aby bola splnená podmienka $\Delta E > k_B T$. Keď sa takýto útvar rozpadne, zmenší sa priemer, čím $\Delta E < k_B T$ bude pod kritickou hodnotou a zložky pôvodného rigidného útvaru sa štatisticky rovnomerne rozložia po celej membránovej ploche, nezávisle od membránového zakrivenia [6, 8, 11].



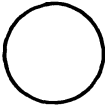

Obr. 4. Vytlačanie zložiek so zvýšenou ohybovou tuhosťou (tzv. rigiditou) z oblastí silne zakrivených membrán.

Obr. 3: Možné mechanizmy aktívnej membránovej deformácie.

Možno predpokladať, že vzájomné vzťahy medzi membránovým zložením a membránovým zakrivením ovplyvňujú procesy tvorby tenkých bunkových vyliacéní, tzv. spikúl, ktoré majú význam pri bunkovom kontakte. Keď predpokladáme, že zakrivením podmienená separácia plošných fáz spätne vedie k vytvoreniu ohybove labilných membránových oblastí, môžeme postulovať vznik mechanických nestabilit, ktoré podmieňujú vyliacenie časti bunkovej membrány smerom von. V tomto procese zohráva

cytoskeletálny systém úlohu regulátora plošnej mozaiky alebo úlohu ohybového stabilizátora membránových oblastí s rôznou tuhosťou (rigiditou). V súčasnosti, v experimentálnej praxi overujeme platnosť týchto pracovných hypotéz [6, 8, 11].

Zaujímavým problémom membránovej dynamiky je geometrický tvar červených krviniek, ktorých polymorfizmus je znázornený na obr. 5. Na rozdiel od gumovej lopty, ktorá pri zmenšení objemu zmení svoj tvar z guľovej formy na monokonkávnu pohárikovitú formu zvanú stomatocyt, ľudská červená krvinka nadobúda za fyziologických podmienok spontánne bikonkávnu formu zvanú diskocyt [6]. Tento geometrický tvar sa vyznačuje minimálnou energiou ohýbania za predpokladu homogénnych membránových štruktúr, ako sme vypočítali z výsledkov vlastných pokusov [8, 11]. Zložitejší výklad vyžaduje reverzibilná zmena tvaru krvinky na echinocyt (tzv. morská hviezdica) alebo stomatocyt. V súčasnosti existujú dva pracovné modely, ktoré vysvetľujú tieto

	<p>guľový tvar v hypotonických roztokoch</p>
 <p>echinocyt diskocyt stomatocyt</p>	<p>spontánne zmeny tvarov vo fyziolog. roztokoch</p>
<p>A B C D E</p>	<p>zmena tvarov vonkajšími silami</p>

Obr. 5: Polymorfizmus ľudských červených krviniek.

- A – vretenovitý tvar vyvolaný strižnou silou,
- B – valcový tvar v úzkych kapilárach,
- C – rozťahnutý tvar vyvolaný tangenciálnym trecím napätím pri bodovej fixácii na podložke,
- D – polygonálny tvar pri najtesnejšom uložení krviniek v sedimente,
- E – mikrosferulácia pri zohriatí nad 49 °C.

zmeny tvaru [11]. Na základe nerovnomerného rozdelenia membránových domén s rôznym stupňom tuhosti (rigidity) možno formulovať hypotézu tzv. rigidného modelu („rigidity-pattern“ model) [11]. Alternatívny model tvorí koncepcia tzv. dvojvrstvového spojenia („bilayer-couples“ model). Táto hypotéza vysvetľuje dynamiku spomínaných troch tvarov červených krviniek pomocou zakrivenia, pričom dochádza k rozdielnemu rozťahnutiu plochy vnútornej a vonkajšej membránovej monovrstvy (v rámci prípustnej hranice <2%). Tieto dve monovrstvy vytvárajú spoločne membránovú dvojvrstvu. Je to jav podobný bimetalickému efektu [11].

3. Záver

V súčasnosti sa venuje problematike mechaniky biologických membrán značná pozornosť v celosvetovom meradle, lebo je to jeden z hlavných smerov biofyzikálneho výskumu na molekulárnej a bunkovej úrovni. V predloženej práci sme diskutovali výsledky našich pokusov a pracovných hypotéz z oblasti biomechaniky ľudských červených krviniek.

Literatúra

- [1] BLJUMENFELD, L. A.: *Problemy biologičeskoj fiziki*. Nauka, Moskva 1974, 335 s.
- [2] BRANEMARK, P. J., BAGGE, U.: *Intravaskular rheology of erythrocytes in man*. Blood Cells, Vol. 3, 1977, s. 11—24.
- [3] BULL, B.: *Red cell biconcavity and cell deformation*. In: BESSIS, M., WEED, R. J., LEBLOND, P. F.: *Red cell shape*. Springer-Verlag, New York 1973, 115—124.
- [4] FISCHER, TH., SCHMID-SCHÖNBEIN, H.: *Tank tread motion of red cell membranes in viscometric flow*. Blood Cells, Vol. 3, 1977, s. 351—365.
- [5] GLASER, R.: *Einführung in die Biophysik*. 2. Auflage, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1976, s. 74—76, s. 165—173 a s. 281—289.
- [6] GLASER, R., LEITMANNOVÁ, A.: *Mathematical modelling of shape-transformation of human erythrocytes*. Acta biol. med. germ., Vol. 36, 1977, s. 859—869.
- [7] GUTTENBERG, H. von: *Lehrbuch der allgemeinen Botanik*. 6. neubearbeitete Auflage, Akademie-Verlag, Berlin 1963.
- [8] LEITMANNOVÁ, A., GLASER, R.: *Mathematical modelling of human echinocytes and the membrane bending of discocytes, stomatocytes and echinocytes*. Studia biophysica, Vol. 64, 1977, s. 123—141.
- [9] RASHEVSKY, N.: *Mathematical biophysics-Physico-mathematical foundation in biology*. Dover Publ. Inc., New York 1960.
- [10] SCHNECK, D. J. (Hrsg.): *Biofluid mechanics*. Plenum Press, New York 1980.
- [11] SVETINA, S., OTTOVÁ-LEITMANNOVÁ, A., GLASER, R.: *Membrane bending energy in relation to bilayer couples concept of red blood cell shape transformations*. J. Theor. Biol., Vol. 94, 1982, s. 13—23.
- [12] TALBOT, L., BERGER, S. A.: *Fluid-mechanical aspects of the human circulation*. American Scientist, Vol. 62, 1974, s. 671—682.
- [13] VOLKENŠTEJN, M. V.: *Biofizika*. Nauka, Moskva 1981, 575s.