

АКУСТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЗИКА

УДК 577.3

ДЕФОРМАЦИИ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН ПРИ УЛЬТРАЗВУКОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ И ЛОКАЛЬНЫЙ КРИТЕРИЙ ИХ РАЗРУШЕНИЯ

М. А. Илюхина, Ю. Н. Маков

(кафедра акустики)

E-mail: yuri@makov.phys.msu.ru

Дана классификация возможных механизмов акустического воздействия на клетки. Решение модельной задачи о воздействии плоской ультразвуковой волны на сферическую биомембрану и анализ возникающей деформации обосновывают локальную значимость критерия разрушения мембраны при превышении допустимого увеличения ее площади.

Различные задачи, решаемые сегодня в медицине с помощью ультразвука (УЗ), ориентированы на проявление тех или иных эффектов при его воздействии на биоструктуры. Большинство имеющихся работ посвящено результатам УЗ-воздействия на макроуровне, т.е. на отдельные органы и участки биотканей [1, 2]. Однако в последнее время все большее внимание уделяется эффектам воздействия УЗ на отдельные клетки как на элементарные, самостоятельно функционирующие структурные составляющие [3, 4]. Например, весьма перспективной является возможность изменения УЗ-воздействием проницаемости клеточных мембран за счет активации и образования новых мембранных пор (сонопорация [4]) для «прицельного» внедрения в клетки лекарственных препаратов или необходимых генов. Многочисленные экспериментальные исследования по УЗ-воздействию на клеточном уровне характеризуются большим разбросом в используемых режимах и параметрах (частота, интенсивность УЗ) и соответственно в наблюдаемых эффектах, что затрудняет установление причинно-следственных связей и прогнозирование дальнейших результатов. Поэтому нами предпринята попытка систематизации имеющихся данных по акустическому воздействию на клетки (рис. 1).

В зависимости от выбранных параметров акустического излучения можно с разным результатом воздействовать на процессы жизнедеятельности клетки или вызывать ее разрушение. УЗ-воздействие происходит за счет нетепловых (акустомеханических) факторов, кавитации и тепловых эффектов при поглощении УЗ в биоткани. Систематизация и взаимосвязь основных механизмов акустического воздействия на клетки и биомембраны отражена в предложенной нами схеме (рис. 2).

При изучении и практическом использовании тех или иных эффектов УЗ-воздействия определяющее значение имеет возможность или невозможность разрушения клеточных биомембран. В качестве критерия разрушения часто используется расчетное

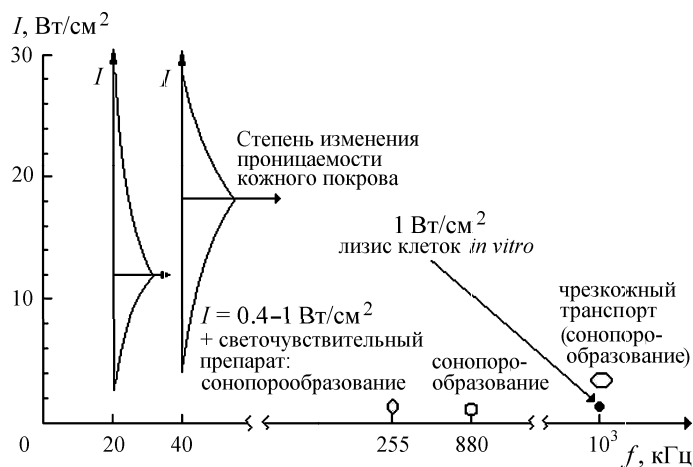


Рис. 1. Параметры ультразвука и эффекты, наблюдаемые при его воздействии

превышение допустимого относительного изменения в 3–5% общей площади клеточной мембраны при внешнем воздействии [5, 6]. Однако такой широко используемый интегральный критерий может приводить к неверным прогнозным оценкам и выводам при определенных типах внешних воздействий. Продемонстрируем это на примере расчета эффекта воздействия плоской УЗ-волны, падающей на находящуюся в жидкости и заполненную жидкостью сферическую оболочку радиуса R с толщиной $h \ll R$ (рис. 3), что является моделью воздействия УЗ на клеточную мембрану. При этом вязкостью внешней и внутренней жидкостей (содержимое клетки и межклеточная субстанция) и материала оболочки (липидного бислоя) будем пренебрегать. На основе анализа этой задачи обоснуем необходимость введения более точного дифференциального критерия разрушения на основе локальных изменений площади биомембраны.

Вариационный принцип Гамильтона, использование сферической системы координат и симметрия задачи по углу φ приводят к следующим уравнениям

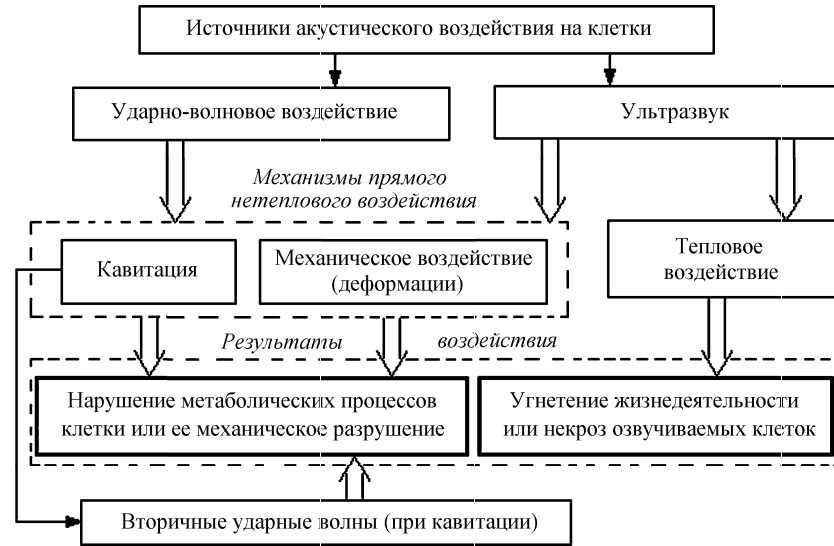


Рис. 2. Факторы акустического воздействия

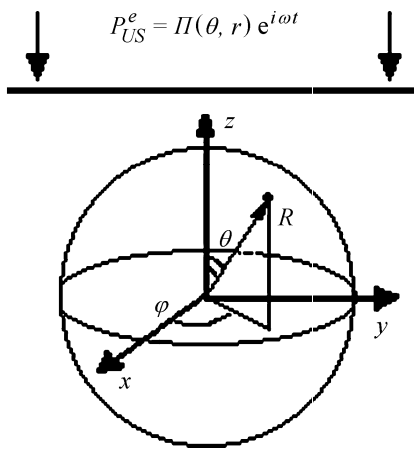


Рис. 3. Геометрия модельной задачи по воздействию плоской гармонической волны на мембрану

движения элементов тонкой упругой оболочки [7, 8]:

$$\frac{1-\nu^2}{E} \rho_s R^2 \frac{\partial^2 u}{\partial t^2} L_{uu} u + L_{uw} w + = 0, \quad (1)$$

$$\frac{1-\nu^2}{E} \rho_s R^2 \frac{\partial^2 w}{\partial t^2} + L_{wu} u + L_{ww} w = \frac{1-\nu^2}{Eh} R^2 \delta f, \quad (2)$$

где δf — возможная внешняя сила, действующая в радиальном направлении на единицу площади мембраны, u и w — меридиональная (тангенциальная) и радиальная компоненты вектора смещения элемента оболочки. Входящие в систему (1), (2) дифференциальные операторы имеют вид $e = \frac{1}{12} (h/R)^2$ и $\eta = \cos \theta$,

$$L_{uu} = -(1+e) \left\{ (1-\eta^2)^{1/2} \frac{d^2}{d\eta^2} (1-\eta^2)^{1/2} + (1-\nu) \right\},$$

$$L_{uw} = (1-\eta^2)^{1/2} \left\{ [e(1-\nu) - (1+\nu)] \frac{d}{d\eta} + e \frac{d}{d\eta} \Delta \right\},$$

$$L_{ww} = e\Delta^2 + e(1-\nu)\Delta + 2(1+\nu),$$

$$L_{wu} = - \left\{ [e(1-\nu) - (1+\nu)] \frac{d}{d\eta} (1-\eta^2)^{1/2} + e \frac{d}{d\eta} \Delta \frac{d}{d\eta} (1-\eta^2)^{1/2} \right\},$$

$\Delta = \frac{d}{d\eta} (1-\eta^2) \frac{d}{d\eta}$ — оператор Лапласа. В уравнениях (1), (2) будем использовать характерные для клетки параметры: плотность мембраны $\rho_s = 0.8$ г/см³, модуль Юнга $E = 7 \cdot 10^3$ Н/см², коэффициент Пуассона $\nu = 0.49$, толщина мембраны $h = 6$ нм, средний радиус клетки $R = 15$ мкм.

В силу гармонической временной зависимости положим: $\delta f = \delta F e^{i\omega t}$, $u = U(\eta) e^{i\omega t}$. Для определения внешней силы δf , обусловленной УЗ-воздействием падающей плоской волны, удобно ввести потенциалы скоростей φ^e и φ^i во внешней и внутренней (по отношению к сферической мембране) областях жидкости соответственно, причем в силу временной гармонической зависимости $\varphi^{i,e} = \Phi^{i,e}(r, \theta) e^{i\omega t}$. Так как потенциалы скоростей являются решениями волнового уравнения в сферической (для данной задачи) системе координат с нулевой асимптотикой в начале координат для φ^i и условием излучения на бесконечности для φ^e , то это приводит к представлению:

$$\begin{aligned} \Phi^i &= \sum_{n=0}^{\infty} B_n j_n(k^i r) P_n(\eta), \\ \Phi^e &= \sum_{n=0}^{\infty} A_n h_n^{(2)}(k^e r) P_n(\eta), \end{aligned} \quad (3)$$

где $P_n(\eta)$ — полином Лежандра порядка n , j_n — сферическая функция Бесселя порядка n , $h_n^{(2)}$ — сферическая функция Ганкеля второго рода порядка n , $k^{i,e} = \omega/c^{i,e}$ — волновые числа во внешней и внутренней среде соответственно. Связь «собственных» давлений $p^{i,e}$ во внутренней и внешней жидкостях с соответствующими потенциалами скоростей $\varphi^{i,e}$ для рассматриваемых гармонических

процессов дает соотношения

$$p^{i,e} = -i\omega\rho^{i,e}\varphi^{i,e}(r, \theta). \quad (4)$$

Если за счет внешнего УЗ-воздействия во внешней жидкости создается гармонически изменяемое давление $p_{US}^e = \Pi(\theta, r)e^{i\omega t}$, то амплитуда силы, действующей на единицу площади оболочки в радиальном направлении, выражается (с учетом (4)) следующим образом:

$$\delta F = -i\omega(\rho^i\Phi^i(\theta, R) - \rho^e\Phi^e(\theta, R)) - \Pi(\theta, R).$$

Разложим $w(\theta, t)$, $u(\theta, t)$ и $\Pi(\theta, r)$ в ряд по полиномам Лежандра:

$$\begin{aligned} W(\eta) &= \sum_{n=0}^{\infty} W_n P_n(\eta), \\ U(\eta) &= \sum_{n=1}^{\infty} U_n (1 - \eta^2)^{1/2} \frac{dP_n(\eta)}{d\eta}, \\ \Pi(r, \eta) &= \sum_{n=0}^{\infty} \Pi_n(r) P_n(\eta), \end{aligned} \quad (5)$$

где $\Pi_n = \frac{2n+1}{2} \int_{-1}^1 \Pi(\eta, r) P_n(\eta) d\eta$, W_n и U_n — неизвестные коэффициенты рядов. Коэффициенты A_n и B_n в (3) найдем из граничных условий: радиальное смещение частиц внутренней жидкости ($s^i = \frac{1}{i\omega} \frac{\partial \Phi^i(r, \eta)}{\partial r} |_{r=R} e^{i\omega t}$) и внешней жидкости ($s^e = \frac{1}{i\omega} \frac{\partial \Phi_{tot}^e(r, \eta)}{\partial r} |_{r=R} e^{i\omega t}$), прилегающих к оболочке, должны быть равны радиальному смещению элемента мембраны $w = W e^{i\omega t}$. Здесь $\Phi_{tot}^e(r, \theta, t) = \sum_{n=0}^{\infty} [i\Pi_n(r)/(\rho^e\omega) P_n(r) + A_n h_n^{(2)}(k^e R)] P_n(\eta)$ — амплитуда потенциала скорости внешней жидкости, являющегося суперпозицией двух потенциалов: φ^e и слагаемого, обусловленного присутствием гармонической волны, явное выражение для которого можно получить, используя связь потенциала скорости и давления ультразвуковой волны p_{US}^e , аналогичную (4). Отсюда получаем следующие граничные условия:

$$\begin{aligned} B_n &= i \frac{c^i}{j_n'(k^i R)} W_n, \\ A_n &= i \frac{c^e}{h_n^{(2)'}(k^e R)} W_n - i \frac{b_n}{\rho^e \omega k^e h_n^{(2)'}(k^e R)}, \end{aligned} \quad (6)$$

где $b_n = (2n + 1)/2 \int_{-1}^1 (\partial \Pi(r, \eta)/\partial r) |_{r=R} P_n(\eta) d\eta$, $h_n^{(2)'}(k^e R) = (dh_n^{(2)}(z)/dz) |_{z=k^e R}$.

Подставляя в уравнения движения (1), (2) выражения для компонент смещения и силы δf с учетом разложений (3), (5) и действуя входящими в (1), (2) дифференциальными операторами, приходим к неоднородной системе $2n$ уравнений относительно W_n , U_n и A_n , B_n . Граничные условия (6) позволяют исключить из полученных уравнений A_n и B_n и свести задачу к системе уравнений относительно

неизвестных коэффициентов W_n и U_n при известных внешних силах:

$$\begin{aligned} & - [\Omega^2 + (1 + e)(1 - \nu - \lambda_n)] U_n + \\ & + [e(1 - \nu - \lambda_n) - (1 + \nu)] W_n = 0, \\ & \lambda_n [e(\nu + \lambda_n - 1) + (1 + \nu)] U_n + \\ & + \left[\Omega^2 - \lambda_n e(\lambda_n + \nu - 1) - 2(1 + \nu) + \right. \\ & \left. + \omega \frac{1 - \nu^2}{Eh} R^2 \left(\rho^i c^i \frac{j_n(k^i R)}{j_n'(k^i R)} - \rho^e c^e \frac{h_n^{(2)}(k^e R)}{h_n^{(2)'}(k^e R)} \right) \right] W_n = \\ & = \frac{1 - \nu^2}{Eh} R^2 \left(\Pi_n - \frac{h_n^{(2)}(k^e R) b_n}{h_n^{(2)'}(k^e R) k^e} \right), \end{aligned} \quad (7)$$

где $\Omega^2 = \omega^2 R^2 \rho_s (1 - \nu^2)/E$ — безразмерная частота.

Конкретизируем выражение для $\Pi(\theta, r)$. Как уже отмечалось выше, в задаче рассматривается оболочка, на которую падает плоская гармоническая волна с постоянной амплитудой (рис. 3). Амплитудное воздействие по нормали к этой оболочке (давление) будет зависеть от сферических координат θ и r :

$$\Pi = \Pi_0 e^{i[\omega t - k^e(R - r \cos \theta)]}. \quad (8)$$

После разложения $\Pi(\theta, r)$ в (8) по полиномам Лежандра подставляем коэффициенты Π_n в определяющую систему (7). Уравнения движения (7) решались численно с помощью программы, написанной в Matlab 6.0. Разложения W и U по полиномам Лежандра с коэффициентами, определяемыми системой (7), являются сходящимися рядами, которые можно оборвать начиная с $n = 50$ без существенного искажения получаемых результатов. С помощью найденных W_n и U_n можно определить смещения (см. (5)) элементов сферы в каждой точке поверхности и получить представление о деформации изначально сферической поверхности мембраны под действием УЗ-волны. На рис. 4 изображен полученный вид деформированной поверхности мембраны (с увеличенным пространственным масштабом для наглядности) при воздействии плоской гармонической УЗ-волны с частотой 500 кГц при интенсивности $I = 10$ Вт/см². Из этого рисунка видна различная степень деформации мембраны при разных углах θ . Также анализ показывает зависи-

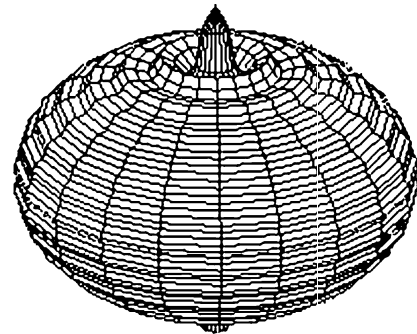


Рис. 4. Поверхность мембраны, деформированная под действием ультразвука ($f = 500$ кГц)

мость степени деформации мембраны от частоты падающей волны.

Рассмотрим количественные характеристики изменения площади изначально сферической мембраны при ее деформации под воздействием УЗ-волны. Оценим относительное изменение общей площади деформированной поверхности мембраны, т. е. найдем характеристику, лежащую в основе используемого критерия разрушения биомембран. Введем следующие обозначения: $\bar{R} = R_b + w$, $R_b = R + w_0$ — средний радиус по углам θ и φ , R — радиус недеформированной сферы, $w_0 = W_0 e^{i\omega t}$ — радиальное смещение, определяемое нулевой гармоникой, $w(\eta, t) = e^{i\omega t} \sum_{n=1}^{\infty} W_n P_n(\eta)$ — радиальные смещения частиц без нулевой моды относительно сферы радиусом R_b . Таким образом, u и w описывают отклонения от поверхности сферы (рис. 5). В соответствии с известными формулами дифференциальной геометрии [9] элемент площади деформированной поверхности с учетом квадратичных слагаемых представим в виде

$$dS = R_b^2 \left(1 + \frac{1}{R_b} \frac{\partial u}{\partial \theta} + \frac{u}{R_b} \operatorname{ctg} \theta + 2 \frac{w}{R_b} + \frac{1}{2} \frac{u^2}{R_b^2} + \frac{1}{2R_b^2} \left(\frac{\partial w}{\partial \theta} \right)^2 + \frac{w}{R_b^2} \frac{\partial u}{\partial \theta} + \frac{1}{R_b} \frac{u}{R_b} \frac{\partial u}{\partial \theta} \operatorname{ctg} \theta + \frac{w}{R_b} \frac{u}{R_b} \operatorname{ctg} \theta + \left(\frac{w}{R_b} \right)^2 \right) \sin \theta d\theta d\varphi. \quad (9)$$

Если при интегрировании по поверхности для вычисления всей площади оболочки использовать только линеаризованный вариант выражения (9), получим результат $S = 4\pi R_b^2$, который отражает изменение площади за счет общего симметричного раздувания и сжатия сферы. Так как $W_0 \ll R$ и $W_0 \ll W_n$ при $n < 30$, то основной интерес представляет изменение площади мембраны за счет образования «складок» на ее поверхности (см. рис. 4) на фоне мелкомасштабного общего расширения-сжатия. Это изменение определяется квадратичными слагаемыми в (9). Для упрощения дальнейших вычислений отметим, что из (7) следует $U_n/W_n \approx 1\lambda_n$ при $n \geq 3$, поэтому можно полагать $u(\theta) = 0$. Используя это приближение и разложение (5) для W в выражении (9), получим простое выражение для площади деформированной мембраны:

$$S = 4\pi R_b^2 + 2\pi e^{2i\omega t} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n^2 + n + 2}{2n + 1} W_n^2.$$

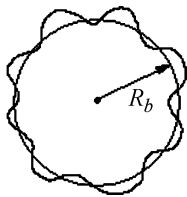


Рис. 5. Искажение сферической формы мембраны относительно среднего радиуса R_b

Рассчитанное на основе вышеприведенных формул максимальное относительное изменение общей площади поверхности мембраны $\beta = 100\% \cdot (S - S_0)/S_0$ (S_0 и S — площадь недеформированной и деформированной поверхностей соответственно) в используемом диапазоне частот (500 кГц–2 МГц) при интенсивности падающей волны 10 Вт/см^2 не превысило десятых долей процента, что значительно ниже порогового значения 3–5%, используемого в качестве критерия разрушения биомембран. В то же время эксперименты показывают [10], что волны такой интенсивности разрушают клеточные мембраны. Для устранения этого противоречия примем во внимание неоднородную степень деформации мембраны (см. рис. 4) при рассматриваемом УЗ-воздействии и определим локальные относительные изменения площади элемента поверхности сферы в зависимости от его местоположения по углу θ . Ограничиваясь линейными по w/R_0 и u/R_0 слагаемыми в (9) и подставляя сюда разложения (5) для w и u , приходим к следующему выражению для максимального относительного изменения элемента площади:

$$(dS - dS_0)/dS_0 = 1/R \sum_{n=1}^{\infty} P_n(\eta) (\lambda_n U_n + 2W_n) + 2W_0/R, \quad (10)$$

где $dS_0 = R^2 \sin \theta d\theta d\varphi$ и dS — элементы площади до и после деформации соответственно. В выражении (10) R_b заменен на R , поскольку $W_0 \ll R$. В (10) ряд описывает относительное изменение элементарной площадки, связанное с образованием на деформированной сферической поверхности складок (локальные максимумы и минимумы), второе — изменение площадки, вызванное увеличением радиуса сферы, т. е. эффект общего раздувания-сжатия сферы. Вычисленная зависимость относительного изменения элемента поверхности $\alpha = 100\% \cdot (dS - dS_0)/dS_0$ от угла приведена на рис. 6, откуда видно, что изменение площади элементов, на которые ультразвуковая волна падает практически перпендикулярно,

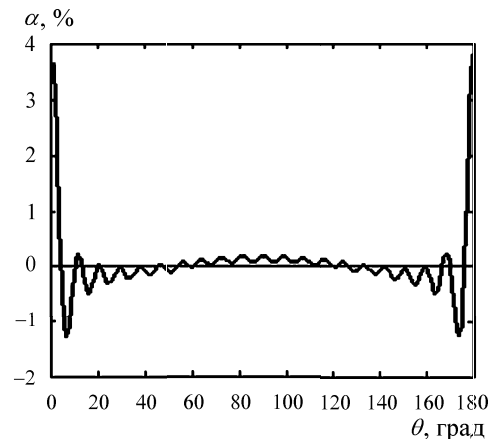


Рис. 6. График зависимости максимального относительного изменения элемента площади мембраны α от угла θ . Частота $f = 500 \text{ кГц}$

составляет единицы процентов и может превышать критическое значение, что показывает возможный разрыв мембраны в этих областях. Построение формы деформированной сферы (рис. 4), где проявляется существенная «складчатость» в этих же областях, подтверждает реальность такого разрыва.

Основной вклад в изменение dS в (10) дают слагаемые, стоящие в ряду. Из этого можно заключить, что значительные изменения размеров dS связаны с присутствием складок, обусловленных суперпозицией гармоник. В то же время суммарное изменение S составляет доли процента. Это можно обосновать математически, вычисляя вышеприведенные интегралы, которые показывают, что на изменение всей площади сферы будут влиять слагаемые второго порядка малости, дающие несущественный вклад.

Таким образом, анализ деформации клеточной мембраны в результате воздействия на нее плоской гармонической УЗ-волной достаточно большой интенсивности (10 Вт/см^2) показал, что относительное изменение общей площади всей мембраны в результате этого процесса составляет доли процента и значительно меньше общепринятого и используемого в настоящее время порогового значения (3–5%) для разрушения биомембран. В то же время эксперименты показывают безусловное разрушение биомембран при таких интенсивностях УЗ [10]. Определенное в работе α для отдельных участков мембраны, где деформации максимальны (рис. 4), превышает указанные 3–5%, т.е. критерий разрушения выполняется локально и соответствует реальному экспериментальному исходу — разрушению

биомембран при данных условиях. Отсюда следует вывод, что для прогноза возможных разрушений биомембран под действием внешних факторов, приводящих к деформациям и соответствующему увеличению площади мембран, более точным и правильным является локальный (дифференциальный) критерий на относительное изменение площади отдельных элементов их деформированной поверхности.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 04-02-17009).

Литература

1. *Arefiev A., Prat F., Chapelon J.* et al. // *Ultrasound Med. Biol.* 1998. **24**, N 7. P. 1033.
2. *Tarantal A.F., Canfield D.R.* // *Ultrasound Med. Biol.* 1994. **20**, N 1. P. 65.
3. *Guzman H.R., Nguyen D., McNamara A.* et al. // *J. Pharm. Sci.* 2002. **91**, N 7. P. 1693.
4. *Pepe J., Rincon M., Wu J.* // *Acoustics Research Letters Online.* 2004. **5**, N 2. P. 62.
5. *Иванс И., Скейлак Р.* Механика и термодинамика биологических мембран. М., 1982.
6. *Lokhandwalla M., Sturtevant B.* // *Phys. Med. Biol.* 2001. **46**. P. 1.
7. *Sabih H.* // *JASA.* 1966. **40**, N 4. P. 342.
8. *Kuorung Wu* // *JASA.* 1994. **95**, N 6. P. 3300.
9. *Новиков С.П., Фоменко А.Т.* Элементы дифференциальной геометрии и топологии. М., 1987.
10. *Kenneth R.R., Rooney J.A.* // *Biophys. J.* 1978. **23**. P. 33.

Поступила в редакцию
20.09.04