

01;03;12

Влияние диффузии на разделение компонентов биологической жидкости при клиновидной дегидратации

© Ю.Ю. Тарасевич,¹ А.К. Аюпова²

¹ Астраханский государственный педагогический университет,
414056 Астрахань, Россия

e-mail: tarasevich@astranet.ru

² ГУ НИИ по изучению лепры,

414000 Астрахань, Россия

e-mail: niil@astmail.astranet.ru

(Поступило в Редакцию 20 августа 2002 г.)

Проведены эксперименты с модельными жидкостями, имитирующими сыворотку крови человека. Предложена модель, которая позволяет объяснить пространственное перераспределение компонентов биологических жидкостей в процессе клиновидной дегидратации — широко применяемом методе медицинской диагностики. Проведены расчеты в рамках этой модели.

Метод клиновидной дегидратации

Клиновидная дегидратация биологических жидкостей находит широкое практическое применение для диагностики различных заболеваний [1]. Метод клиновидной дегидратации состоит в следующем [1]: на обезжиренное предметное стекло, расположенное строго горизонтально, наносится дозатором капля биологической жидкости (сыворотки крови, слюны, тканевой или спинномозговой жидкости и т.п.). Объем капли составляет 10–20 μl . Диаметр капли на предметном стекле 5–7 mm. Средняя толщина около 1 mm. Угол наклона поверхности капли 25–30° [2]. При температуре 20–25° и относительной влажности воздуха 65–70% образец высушивается. Процесс сушки продолжается 18–24 h. Высушенная капля биологической жидкости называется фацией и имеет сложную структуру. Внешний вид фации используется для диагностики широкого круга заболеваний.

К сожалению, на сегодняшний день нет адекватной модели, описывающей процессы, протекающие при клиновидной дегидратации. Нет и понимания того, какие именно физические, химические и биологические процессы приводят к образованию структур, наблюдаемых при клиновидной дегидратации. Например, авторы метода объясняют появление структур „борьбой осмотических и онкотических сил“.

Эксперименты с модельными жидкостями

Сложный состав сыворотки крови и многообразие физико-химических процессов, протекающих в организме, затрудняют решение вопроса о том, какие именно факторы приводят к образованию тех или иных структур, наблюдаемых в методе клиновидной дегидратации. Представляется актуальным проведение исследований на модельных жидкостях простого состава. Использование модельных жидкостей позволяет свести к минимуму

количество существенных факторов, влияющих на структурообразование, а также проводить контролируемое изменение параметров жидкостей.

Сыворотка крови — сложная коллоидная система, на 90% состоящая из воды и на 10% из растворенных веществ, из которых 70% составляют белки, около 10% — неорганические соли и около 20% — низкомолекулярные органические соединения. Исходя из интересов практической лабораторной диагностики, разработано понятие нормы, или нормального состава, крови — диапазон концентраций, не свидетельствующий о заболевании. Так, содержание общего белка в норме составляет 65–85 kg/m^3 [3]. Снижение уровня общего белка (гипопротеинемия) или его высокая концентрация (гиперпротеинемия) в сыворотке крови говорят о развитии патологического процесса.

Чтобы вычленить основные эффекты, протекающие при клиновидной дегидратации, мы использовали модельные жидкости.

Цели исследования: выяснить, возможно ли появление структур при клиновидной дегидратации в жидкостях, близких по составу к плазме крови. В случае положительного ответа на первый вопрос дополнительно выяснить, схожи ли структуры, возникающие в модельных и натуральных жидкостях, и как влияет состав модельных жидкостей на характер образующихся структур.

Исследуемые образцы: 1) водные растворы альбумина в концентрациях от 80 до 120 kg/m^3 ; 2) водно-солевые растворы (0.9% раствор хлорида натрия, альбумин в концентрациях от 80 до 120 kg/m^3).

Клиновидная дегидратация раствора каждой концентрации проводилась дважды. Наблюдалась высокая воспроизводимость результатов. В случае водного раствора альбумина при концентрации раствора 80 kg/m^3 растрескивание образца происходило преимущественно в радиальных направлениях, при больших концентрациях растрескивание носило хаотический характер. Каких-либо иных характерных структур не наблюдалось (рис. 1).

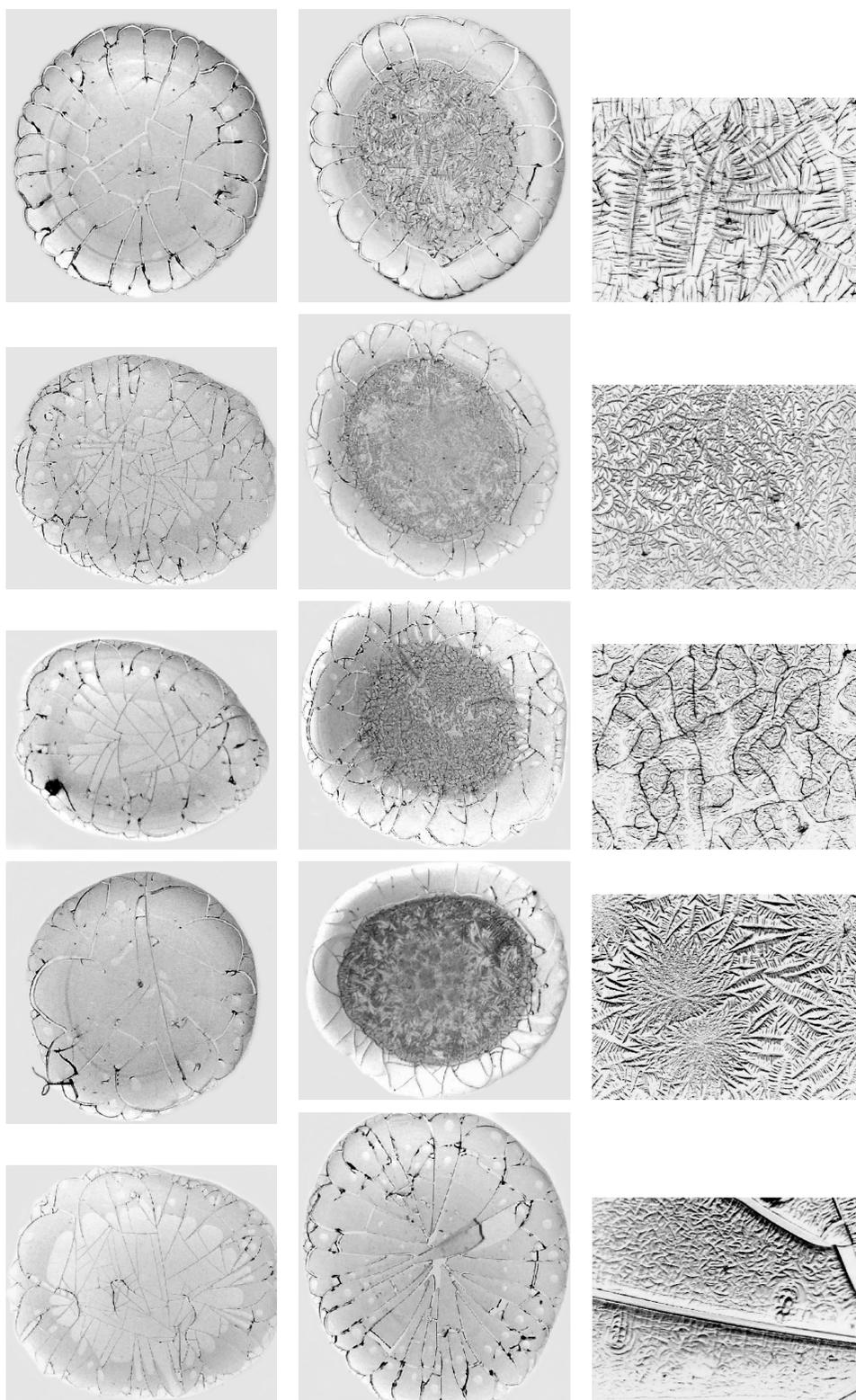


Рис. 1. Левый столбец — фазии водных растворов альбумина. Размер области 5 mm. Центральный столбец — фазии водно-солевых растворов альбумина. Размер области 5 mm. Правый столбец — фрагменты фазии водно-солевых растворов альбумина. Размер области 2 mm. Концентрация альбумина меняется от 80 kg/m^3 в верхнем ряду до 120 kg/m^3 в нижнем с шагом 10 kg/m^3 . Фотографии получены с помощью стереомикроскопа фирмы Leica MZ12.5.

В экспериментах с водно-солевым раствором бычьего альбумина при всех концентрациях наблюдалось радиальное растрескивание. При концентрации белка 12 kg/m^3 трещины достигают центра фации. В фациях четко выделяется краевая зона белковых структур, переходная зона (зона белково-солевых структур) и центральная зона кристаллических структур (рис. 1). Кристаллические структуры испытывают существенные изменения при изменениях концентрации. Так, при концентрации белка 80 kg/m^3 кристаллические структуры имеют форму дендритов с прямыми длинными ветвями 1-го и 2-го порядка. Ветви 3-го порядка выражены слабо. Дендриты разреженные. При концентрации белка 90 kg/m^3 наблюдаются короткие густые дендриты с изогнутыми ветвями. При концентрации 10 kg/m^3 дендритная структура сменяется мелкими кристаллическими цепочками на фоне вторичного растрескивания белковой матрицы. При концентрации 110 kg/m^3 вновь возникают дендритные структуры. При этом появляются плотные дендриты, обладающие центральной симметрией („цветы“). При концентрации 120 kg/m^3 кристаллические структуры становятся мелкими и плотными (рис. 1).

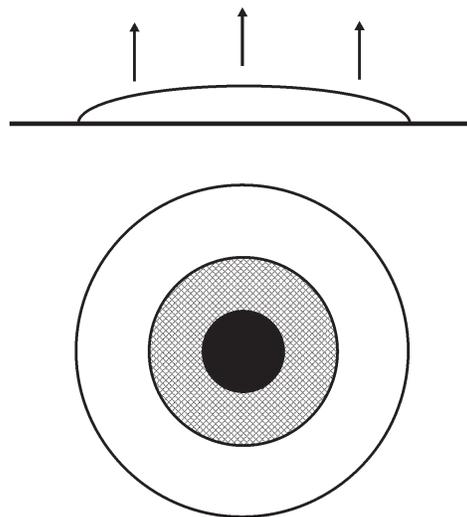


Рис. 2. Капля биологической жидкости на плоскости: в верхней части рисунка — сечение по диаметру, в нижней части — вид сверху. Белым цветом показана область, в которой при высыхании капли накапливается преимущественно белок; черным — область, в которой преимущественно накапливается соль; серым — переходная зона.

Выводы

1. Модельная жидкость, состоящая из водного раствора альбумина, не обладает свойствами сыворотки крови при клиновидной дегидратации; наблюдаемые структуры не имеют сходства со структурами нативной сыворотки в норме.

2. Использование модельной жидкости, состоящей из раствора хлорида натрия и альбумина, обеспечивает воспроизводство непатологических структур, наблюдаемых при клиновидной дегидратации.

3. Наблюдаемые структуры чувствительны к изменению концентрации белка в модельной жидкости, что подтверждает возможность использования клиновидной дегидратации для диагностики гипо- и гиперпротеинемии [4].

4. Фации модельных жидкостей практически неотличимы от фаций нативной сыворотки (рис. 1). Мелкие детали, которые принято считать индикаторами патологических процессов, в фациях модельных жидкостей отсутствовали.

Качественная модель

Одним из основных процессов, протекающих при клиновидной дегидратации, является перераспределение концентраций соли и белка в растворе — белок накапливается на периферии фации, а соль — в центральной ее части. Процесс клиновидной дегидратации завершается растрескиванием белковой составляющей фации и кристаллизацией соли (рис. 1). В норме трещины располагаются регулярно и радиально.

Рассмотрим на качественном уровне процессы, протекающие при клиновидной дегидратации.

Вода испаряется с поверхности капли, вообще говоря, в различных местах с различной скоростью, зависящей от кривизны капли в данном месте. Уменьшение объема воды приводит к росту концентрации соли и белка. Скорость изменения концентрации больше в тех местах, где относительное уменьшение толщины капли больше, т.е. на периферии (рис. 2). Возникающий при этом градиент концентраций приводит к появлению потоков, направленных к центру.

В связи с тем что коэффициент диффузии соли на 2 порядка превышает коэффициент диффузии белка, в центре капли увеличивается относительная концентрация соли. Этот эффект в свою очередь может приводить к вытеснению белка на периферию (кросс-диффузия). Уменьшение объема капли за счет испарения приводит к изменению формы ее поверхности и, следовательно, скорости изменения концентрации компонентов в растворе. При испарении существенной части воды концентрации соли и белка увеличиваются настолько, что это приводит к заметному изменению коэффициентов диффузии. В первую очередь это относится к белку, который испытывает переход золь-гель. При этом переходе коэффициент диффузии белка стремится к нулю. Коэффициент диффузии соли при повышении концентрации белка в растворе тоже понижается [5]. С другой стороны, рост концентрации соли приводит к росту коэффициента диффузии соли [6]. Зависимость хорошо аппроксимируется линейной функцией (рис. 3)

$$D_{11} = 1.094C_1 + 1.17.$$

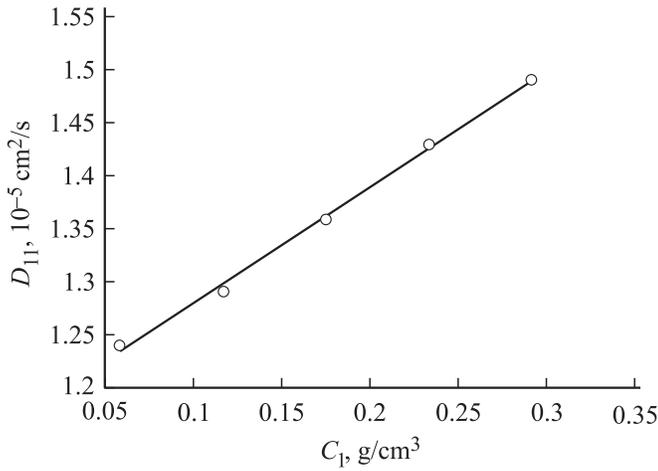


Рис. 3. Результаты аппроксимации по методу наименьших квадратов зависимости коэффициента диффузии поваренной соли в водном растворе от концентрации.

После достижения концентрации насыщения соли в растворе начинается процесс кристаллообразования. Наличие соли в растворе увеличивает время гелеобразования по сравнению с чистым раствором белка. При больших концентрациях соли начинается процесс выпадения белка (высаливание).

Таким образом, при клиновидной дегидратации протекают разнообразные и, что особенно важно, влияющие друг на друга процессы. Явление не только неравновесно, но и существенно нелинейно.

Математическая модель

В рассматриваемой трехкомпонентной системе только 2 потока являются независимыми. В качестве независимых потоков выберем потоки соли и белка. Потоки соли и белка в растворе связаны и определяются уравнением Гиббса–Дюгема

$$j_i = - \sum_{k=1}^{n-1} D_{ik} \nabla C_k,$$

где j — диффузионный поток, D_{ik} — тензорный коэффициент диффузии, причем $D_{ik} = D_{ki}$, C_k — концентрация k -го компонента раствора, n — число компонентов.

Поскольку

$$\frac{\partial C}{\partial t} = - \nabla j,$$

имеем

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = \nabla \sum_{k=1}^{n-1} D_{ik} \nabla C_k.$$

Поскольку толщина капли мала по сравнению с ее диаметром, в первом приближении можно не рассматривать эффекты, связанные с изменением концентрации

по высоте. Тогда система имеет центральную симметрию и целесообразно перейти к полярным координатам

$$\begin{aligned} \frac{\partial C_i}{\partial t} &= \sum_{k=1}^{n-1} \left(D_{ik} \frac{\partial^2 C_k}{\partial r^2} + \frac{D_{ik}}{r} \frac{\partial C_k}{\partial r} + \frac{\partial D_{ik}}{\partial r} \frac{\partial C_k}{\partial r} \right) \\ &= \sum_{k=1}^{n-1} \left(D_{ik} \frac{\partial^2 C_k}{\partial r^2} + \frac{D_{ik}}{r} \frac{\partial C_k}{\partial r} + \frac{\partial D_{ik}}{\partial C_k} \left(\frac{\partial C_k}{\partial r} \right)^2 \right). \end{aligned} \quad (1)$$

Уравнение (1) описывает изменение концентрации в результате диффузии. Кроме того, необходимо учесть изменение концентрации, вызванное испарением воды

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = f(r, t). \quad (2)$$

Вид функции $f(r, t)$ определяется разнообразными факторами: кривизной поверхности в данной точке, коэффициентом поверхностного натяжения и др. В простейшем случае будем полагать, что функция зависит только от расстояния до центра капли и времени. Кроме того, пренебрежем зависимостью коэффициентов диффузии от концентрации.

Такие предположения означают, что мы рассматриваем только начальные стадии процесса испарения, когда концентрации компонентов далеки от насыщения. На более поздних стадиях начинается процесс гелеобразования белка, коэффициент диффузии падает практически до нуля, меняется характер процесса испарения. На еще более поздних стадиях начинается кристаллизация соли и система теряет осевую симметрию.

С учетом сделанных приближений получаем

$$\begin{aligned} \frac{\partial C_1}{\partial t} &= D_{11} \frac{\partial^2 C_1}{\partial r^2} + \frac{D_{11}}{r} \frac{\partial C_1}{\partial r} \\ &\quad + D_{12} \frac{\partial^2 C_2}{\partial r^2} + \frac{D_{12}}{r} \frac{\partial C_2}{\partial r} + f_1(r, t), \\ \frac{\partial C_2}{\partial t} &= D_{11} \frac{\partial^2 C_2}{\partial r^2} + \frac{D_{22}}{r} \frac{\partial C_2}{\partial r} \\ &\quad + D_{12} \frac{\partial^2 C_1}{\partial r^2} + \frac{D_{12}}{r} \frac{\partial C_1}{\partial r} + f_2(r, t). \end{aligned} \quad (3)$$

Представляет интерес вопрос о соотношении между феноменологическими коэффициентами D_{ii} и D_{ij} . В [7] устанавливаются следующие соотношения с учетом принципа взаимности Онзагера $D_{12} = D_{21}$:

$$D_{12}^2 < D_{11} D_{22}, \quad D_{11} > 0, \quad D_{22} > 0.$$

При значениях $D_{11} = 1,5 \cdot 10^{-5}$ см²/с (поваренная соль) и $D_{22} = 7,7 \cdot 10^{-7}$ см²/с (альбумин) [8] имеем $|D_{12}| < 3,4 \cdot 10^{-6}$ см²/с, причем коэффициент может быть как положительным, так и отрицательным.

Вычислительный эксперимент

Исследуем принципиальную возможность возникновения неоднородного распределения вещества в процессе клиновидной дегидратации на примере простейшей модели. Будем считать, что $D_{i,j} = 0$ при $i \neq j$, т.е. компоненты раствора не оказывают влияния друг на друга. Будем рассматривать каплю биологической жидкости как клиновидную в сечении слоя (рис. 4). Максимальная толщина клина — h_0 , угол наклона — α ($\text{tg } \alpha = k$), радиус капли — R .

Будем полагать, что испарение воды происходит равномерно со скоростью v и только с верхней поверхности клина. Тогда уравнение верхней грани клина имеет вид

$$y = h_0 - kr - vt.$$

Боковые поверхности будем полагать непроницаемыми

$$\left. \frac{\partial C(r, t)}{\partial r} \right|_{r=R} = 0.$$

Если пренебречь процессами диффузии, то из закона сохранения вещества

$$C(r, t + dt)y(r, t + dt) = C(r, t)y(r, t)$$

следует, что

$$\frac{\partial C(r, t)}{\partial t} = - \frac{\partial y(r, t)}{\partial t} \frac{C(r, t)}{y(r, t)} = v \frac{C(r, t)}{h_0 - kr - vt}.$$

С учетом диффузионных процессов имеем

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right) + \frac{vC}{h_0 - kr - vt}. \quad (4)$$

Здесь и далее аргументы у функций опущены. Для упрощения дальнейшего рассмотрения приведем уравнение (4) к безразмерному виду заменой переменных

$$\tau = \frac{vt}{h_0}, \quad \xi = 1 - \frac{kr}{h_0}, \quad c = \frac{C}{C_0}.$$

Тогда

$$\frac{\partial c}{\partial \tau} = d \left(\frac{\partial^2 c}{\partial \xi^2} - \frac{1}{\xi - 1} \frac{\partial c}{\partial \xi} \right) + \frac{c}{\xi - \tau}. \quad (5)$$

Здесь

$$d = \frac{Dk^2}{vh_0}.$$

Естественно, что полученное уравнение справедливо только при условии

$$vt \ll h_0 (\tau \ll \xi),$$

так как только в этом случае можно пренебречь зависимостью коэффициента диффузии от концентрации.

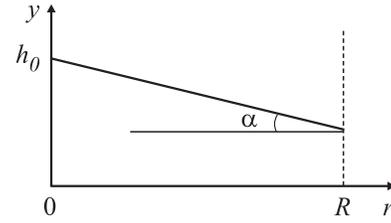


Рис. 4. Модельная форма поверхности капли биологической жидкости.

Тогда $(\xi - \tau)^{-1} \approx (\xi + \tau)/\xi^2$ и уравнение может быть переписано в виде

$$\frac{\partial c}{\partial \tau} = d \left(\frac{\partial^2 c}{\partial \xi^2} + \frac{1}{\xi - 1} \frac{\partial c}{\partial \xi} \right) + c \frac{\xi - \tau}{\xi^2}.$$

Безразмерный коэффициент d приобретает ясный физический смысл, если записать его в виде

$$d = k^2 \frac{D}{h_0^2} \frac{h_0}{v} = k^2 \frac{\tau_{\text{shift}}}{\tau_{\text{diff}}}.$$

Здесь τ_{shift} — характерное время смещения верхней поверхности клина, τ_{diff} — время релаксации (время, в течение которого концентрация вещества меняется в e раз за счет процессов диффузии). Таким образом, коэффициент d определяет, какие из процессов — процессы диффузии или процессы изменения концентрации из-за испарения — преобладают в данном случае.

Оценка параметра d дает для белка величину порядка 0.01, для соли — 1. Таким образом, диффузионные процессы не оказывают существенного влияния на динамику концентрации белка.

В отсутствие диффузии концентрация вещества определяется только процессами испарения. Из уравнения (5) следует, что

$$c = 1 + \ln \frac{\xi}{\xi - \tau} \approx 1 + \frac{\tau}{\xi}.$$

На рис. 5,6 показаны результаты расчетов для соли и белка с учетом и без учета диффузии. Точность рас-

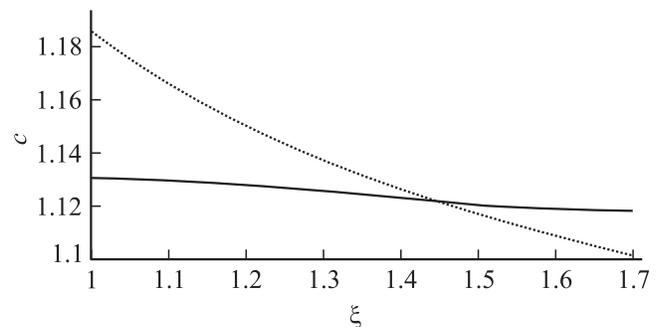


Рис. 5. Результаты расчетов пространственного распределения концентрации соли на начальных стадиях процесса клиновидной дегидратации ($\tau = 0.1568$). Сплошная линия — расчет с учетом диффузии, пунктир — без учета диффузии.

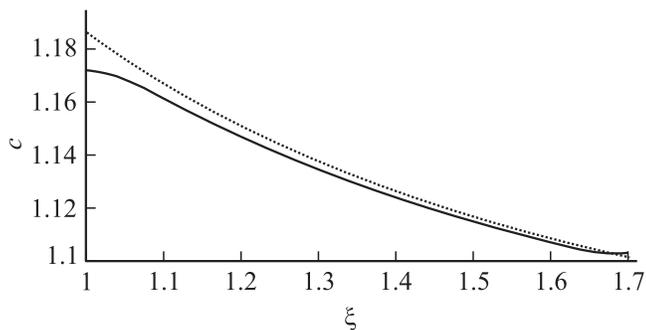


Рис. 6. То же, что на рис. 5, для белка.

четов контролировалась проверкой закона сохранения вещества

$$\int_0^R C(r, t) y(r, t) r dr = \text{const.}$$

Расчеты подтверждают сделанную выше оценку, что в процессе клиновидной дегидратации диффузия не играет определяющей роли в изменении концентрации белка. В то же самое время диффузия в существенной степени сглаживает эффект нарастания концентрации соли к краям капли.

Выводы

Предложенная модель позволяет объяснить пространственное перераспределение компонентов биологических жидкостей в процессе клиновидной дегидратации (рис. 7). В отсутствие диффузии относительная концентрация соли и белка в различных точках пространства оставалась бы постоянной при том, что абсолютная концентрация веществ увеличивается к краям капли.

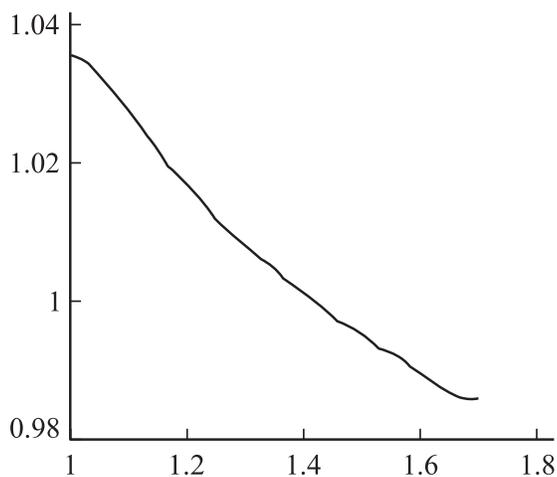


Рис. 7. Изменение относительного содержания соли и белка в растворе по сравнению с первоначальным ($\tau = 0.1568$).

Принципиальная возможность учета эффектов кросс-диффузии и зависимости коэффициентов диффузии от концентрации не была реализована из-за отсутствия экспериментальных данных. Однако неучтенные эффекты могут быть оценены на качественном уровне. Уменьшение коэффициента диффузии белка с ростом его концентрации приведет к уменьшению эффекта диффузионного выравнивания концентрации. Пространственное распределение концентрации белка будет еще ближе к тому, которое получается только с учетом испарения жидкости. Увеличение коэффициента диффузии соли с ростом концентрации приведет к ускорению выравнивания концентрации. Таким образом, учет зависимостей коэффициентов диффузии от концентрации только усиливает эффект, полученный в результате расчета.

Для проведения количественного сравнения результатов моделирования необходимы экспериментальные данные о пространственном распределении концентраций соли и белка в процессе клиновидной дегидратации.

Авторы благодарят В.Ю. Гершанова за плодотворное обсуждение.

Работа выполнена при финансовой поддержке регионального проекта Астраханской области „Исследование процессов самоорганизации в биокристаллических структурах как индикаторов течения микобактериозов“.

Список литературы

- [1] Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Морфология биологических жидкостей человека. М.: Хризостом, 2001. 304 с.
- [2] Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Принципы аутоволновой самоорганизации биологических жидкостей // Вестник Российской академии медицинских наук. № 3. 2000. С. 45–49.
- [3] Справочник лабораторных и функциональных показателей здорового человека. М., 1992.
- [4] Морозова Н.Г., Шатохина С.Н., Шабалин В.Н. // Кристаллографические методы исследований в медицине. Сб. науч. тр. 1-й Всероссийской научно-практической конф. М., 1997. С. 129–131.
- [5] Masaro L., Zhu X.X. // Prog. Polym. Sci. 1999. Vol. 24. P. 731–775.
- [6] Таблицы физических величин. Справочник / Под ред. И.К. Кикоина. М.: Атомиздат, 1976. 1008 с.
- [7] Хаазе Р. Термодинамика необратимых процессов. М.: Мир, 1967.
- [8] Рабинович В.А., Хавин З.Я. Краткий химический справочник / Под ред. А.А. Потехина, А.Е. Ефимова. 3-е изд., перераб. и доп. Л.: Химия, 1991. 432 с.