



УДК 612.13

© 1998 г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НЕФИЛЬТРУЮЩИХСЯ КЛЕТОК В СУСПЕНЗИИ ЭРИТРОЦИТОВ. МОДИФИКАЦИЯ ФИЛЬТРАЦИОННОГО МЕТОДА

Лисовская И.Л., Шурхина Е.С., Нестеренко В.М.,
Розенберг Ю.М., Атауллаханов Ф.И.

*Гематологический научный центр Российской академии медицинских наук,
125167 Москва, Ново-Зыковский проезд, д. 4а; факс: (095)212-88-70;
электронная почта: Fazli@blood.ru*

Разработан метод, позволяющий с помощью модифицированного фильтрометра Хансса оценивать распределение эритроцитов в суспензиях по их способности проходить через мембранные фильтры со средним диаметром пор около 3 мкм. Если пропустить через такой фильтр небольшой объем исследуемой суспензии эритроцитов с известным количеством клеток n , а затем многократно промывать фильтр буфером, то в конце концов скорость протекания буфера достигнет постоянного значения, величина которого определяется числом необратимо забитых пор. Измерив зависимость количества забитых пор от числа нанесенных на фильтр клеток, можно определить в суспензии процентное содержание Z , % эритроцитов, не способных при данных условиях проходить через поры. Зависимость Z от осмотичности ресуспендирующей среды π представляет собой интегральное распределение эритроцитов в суспензии по величине π_{cr} (осмотичности, при которой эритроцит достигает критического объема V_{cr} , не позволяющего ему пройти через пору из-за геометрических ограничений). Показано, что нормальные эритроциты имеют максимум дифференциального распределения по π_{cr} при $\pi_{cr} = 190\text{--}200$ мосМ, что соответствует отношению площади поверхности клетки к ее изотоническому объему $S/V_{iso} = 1,72\text{--}1,68$ мкм⁻¹. Характер распределения существенно изменится при некоторых патологиях и повреждающих воздействиях. Метод позволяет обнаружить в суспензиях эритроцитов минорные фракции с измененными свойствами, составляющие менее 1% от общего числа клеток.

Высокая деформируемость эритроцитов – необходимое условие осуществления их основной функции: транспорта кислорода к тканям. Большинство методов измерения деформируемости, в частности фильтрационных методов, характеризует усредненные по всей суспензии реологические свойства эритроцитов, не позволяя оценить отдельные, в том числе аномальные субпопуляции. В то же время оценка вклада в реологию крови малых субпопуляций с измененными свойствами является первостепенной задачей клинической гемореологии. Большинство гематологических патологий сопровождается появлением в кровотоке фракций аномальных эритроцитов, например серповидных клеток, акантоцитов, сфероцитов, овалоцитов и т.д., отличающихся по фильтруемости от основной массы клеток [1].

Фильтруемость эритроцитов чаще всего определяют по соотношению скорости и давления при пропускании суспензии клеток через цилиндрические поры мембранных фильтров [2]. При данной концентрации клеток скорость протекания суспензии под действием фиксированного давления, как известно, определяется целым рядом параметров: механическими свойствами мембраны, внутриклеточной вязкостью, а также геометрией клеток [1, 3]. На самом деле ситуация еще сложнее, поскольку клетки в

суспензии не идентичны, а имеют определенное распределение по размерам и другим параметрам [4]. Неодинаковы между собой и поры каждого фильтра [5]. В частности, фильтры Nuclepore с номинальным диаметром пор 3 мкм имеют около 20% перекрывающихся между собой пор [6]. Все это делает интерпретацию результатов фильтрационных измерений деформируемости весьма сложной задачей, для решения которой важно выяснить относительное влияние отдельных факторов на результаты измерений.

Очевидно, что при прочих равных условиях скорость протекания суспензии через фильтр в каждый момент зависит от количества доступных для эритроцитов (не забитых необратимо) пор. Поскольку обычно число пор на фильтре мало по сравнению с количеством пропускаемых через него клеток, наличие даже небольших примесей нефилтрирующихся клеток оказывает значительное влияние на результаты фильтрационных измерений [7, 8, 9]. В настоящее время большинство исследователей предпочитают использовать фильтры с диаметром пор 5 мкм, рассматривая забивку пор как нежелательный побочный эффект [10].

В данной работе именно необратимое забивание пор фильтра эритроцитами при фильтрации суспензий явилось основным предметом исследования.

Ранее нами была предложена математическая модель, описывающая зависимость скорости фильтрации суспензии эритроцитов от осмотичности среды для гомогенной популяции клеток [11]. В этой работе были введены следующие понятия: критический объем эритроцита V_{cr} (минимальное значение объема клетки, начиная с которого эритроцит с определенной площадью поверхности S не может пройти через пору с заданным диаметром и длиной) и критическое значение осмотичности среды u_{cr} , при котором эритроцит достигает объема V_{cr} и перекрывает (забивает) пору.

В настоящей работе описана модификация фильтрационного метода, позволяющая, используя мембранные фильтры со средним диаметром пор 3,1 мкм и варьируя осмотичность ресуспендирующей среды u , определять относительное содержание нефилтрирующихся клеток в суспензии как функцию u , т.е. получать распределение эритроцитов по величине u_{cr} . При этом удастся, в частности, зарегистрировать появление в суспензиях малых субпопуляций с измененными по сравнению с нормой свойствами. Получены кривые распределения эритроцитов по u_{cr} в нормальной крови, в суспензиях эритроцитов, истощенных по АТФ, и в крови больных с некоторыми формами анемии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приготовление суспензий эритроцитов. Суспензии эритроцитов готовили из крови, взятой на гемоконсерванте Глюгицир. Эритроциты осаждали и отмывали дважды физиологическим раствором, каждый раз удаляя надосадочную жидкость и верхний слой осажденных клеток. Третий раз эритроциты отмывали HEPES-буфером (145 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 10 мМ HEPES, pH 7,4, осмотичность 300 мосМ). Затем клетки ресуспендировали в этом же буфере, получая исходные суспензии с гематокритом 40–50%. Для фильтрационных измерений суспензии разбавляли растворами, содержащими 10 мМ HEPES и NaCl в концентрациях, обеспечивающих необходимые значения осмотичности. Концентрацию клеток в суспензиях определяли с помощью гемоанализатора Coulter counter (Франция). Средний клеточный объем определяли путем деления гематокрита на концентрацию клеток.

Обработку эритроцитов глутаровым альдегидом осуществляли следующим образом. К 10 мл 1,0% суспензии эритроцитов в буфере с осмотичностью $u = 200$ мосМ добавляли глутаровый альдегид в конечной концентрации 0,1%, инкубировали 15 мин при комнатной температуре, после чего трижды отмывали клетки десятикратным объемом 0,01 М раствора глицина в этом же буфере.

Истощенные по АТФ эритроциты готовили, инкубируя суспензию отмытых и ресус-

пендированных в изотоническом буфере клеток при 37° в течение 20 ч. Перед измерениями клетки снова отмывали трижды изотоническим буфером.

Все растворы после приготовления фильтровали через фильтры Millipore с диаметром пор 0,22 мкм.

Измерение индекса фильтруемости. Индекс фильтруемости эритроцитов определяли с помощью прибора, представляющего собой нашу модификацию гемореометра Хансса (патент РФ № 2052194). Гидростатическое давление на фильтре равнялось 6 см H₂O. На колонку с суспензией сверху помещали датчик, позволяющий регистрировать время протекания через фильтр фиксированного объема (250 мкл) бесклеточной ресуспендирующей среды (t_{b0}) или суспензии эритроцитов (t_s) с точностью 0,1 с. Использовали мембранные фильтры на основе полиэтилентерфталатной пленки толщиной 7 мкм и средним диаметром пор 3,1 мкм (М-3). Для сравнения использовали также фильтры Nuclepore толщиной 13 мкм и средним диаметром пор 2,4 мкм.

Диаметры пор измеряли с помощью микрометрического устройства на фотографиях, сделанных на сканирующем электронном микроскопе с увеличением в 2000 раз. В качестве калибровки использовали латексовые шарики диаметром 2,01 мкм (фирма "Coultronics", Франция).

Осмотичность растворов определяли с помощью криоскопического осмометра ОМКА 1Ц-01. Все измерения выполняли при комнатной температуре в течение 6 ч после отмывания эритроцитов. Для каждого фильтра, пропуская через него буфер, определяли t_{b0} , затем через этот же фильтр пропускали суспензию эритроцитов с гематокритом 1% и измеряли t_s . Индекс фильтруемости эритроцитов определяли как $F = t_{b0}/t_s - t_{b0}$ [9].

Определение процентного содержания нефилтрирующихся клеток в суспензии эритроцитов. С помощью описанного выше фильтрометра определяли долю нефилтрирующихся клеток в суспензии. Зная величину t_{b0} , можно определить среднее число пор на данном фильтре. Согласно закону Пуазейля, $Q/t_{b0} = N_0 \cdot p \cdot \pi \cdot r^4 / 8 \cdot \mu \cdot h$, где протекающий объем $Q = 250$ мкл, средний радиус поры $r = 1,55$ мкм, толщина фильтра $h = 7$ мкм, гидростатическое давление $p = 6$ см H₂O и вязкость воды при 20°C $\mu = 0,01$ г/см·с. Отсюда $N_0 = 1,7 \cdot 10^6 / t_{b0}$ пор.

Если пропустить через фильтр небольшой объем исследуемой суспензии с известным количеством клеток n , а затем пропустить через этот же фильтр намного больший объем буфера, то можно достигнуть ситуации, когда число занятых пор, а следовательно, и скорость протекания буфера перестанут меняться. Оценив количество пор, оказавшихся при этом занятыми, и зная общее количество клеток, прошедших через фильтр, мы сможем определить, какую долю клеток составляют нефилтрирующиеся эритроциты.

Для этого после пропускания фиксированного объема суспензии с известной концентрацией клеток мы многократно пропускали через этот же фильтр буфер и измеряли последовательно время протекания каждой последующей порции буфера t_{b1} , t_{b2} и т.д. Постоянное значение t_{bf} обычно устанавливается после пропускания через фильтр 3–5 мл буфера. Величина t_{bf} обратно пропорциональна числу свободных пор. Поэтому доля забитых пор R после пропускания через фильтр n эритроцитов определяется как $R = (N_0 - N_f) / N_0 = (t_{bf} - t_{b0}) / t_{bf}$. Затем на этот же фильтр наносили следующую порцию исследуемой суспензии и после многократного пропускания буфера получали новое значение t_{bf} и соответственно новое R . Эту процедуру повторяли несколько раз, добиваясь постепенного перекрытия 40–60% пор каждого фильтра.

Существенно, чтобы во время всех этих процедур фильтр никогда не осушался, т.е. чтобы над ним всегда оставался тонкий слой жидкости. В противном случае результаты искажаются, так как на клетки в порах действует большое дополнительное давление, обусловленное силами поверхностного натяжения.

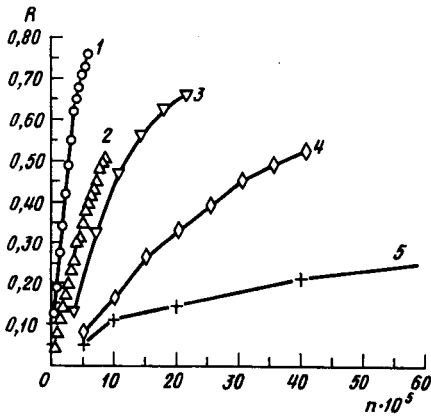


Рис. 1

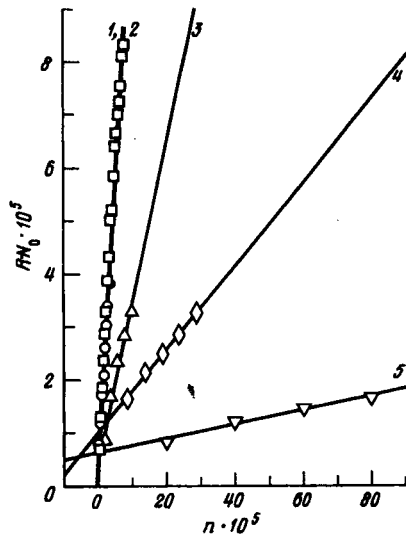


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость относительного содержания забитых пор (R) от количества пропущенных через фильтр эритроцитов (n). 1 – суспензия эритроцитов, обработанных глутаровым альдегидом; 2 – суспензия эритроцитов, обработанных глутаровым альдегидом, фильтр Nuclerore; 3 – суспензия интактных эритроцитов в изотонической среде, содержащая 17,5% эритроцитов, обработанных глутаровым альдегидом; 4 – суспензия интактных эритроцитов в изотонической среде, содержащая 7% эритроцитов, обработанных глутаровым альдегидом; 5 – суспензия интактных эритроцитов в среде с осмотичностью $\mu = 235$ мосМ. Все кривые, кроме 2, получены с помощью фильтров М-3

Рис. 2. Зависимость числа забитых пор ($R \cdot N_0$) от количества пропущенных через фильтр эритроцитов (n). 1 – суспензия эритроцитов, обработанных глутаровым альдегидом ($k = 1,00$); 2 – суспензия эритроцитов, обработанных глутаровым альдегидом, фильтр Nuclerore ($k = 0,98$); 3 – суспензия интактных эритроцитов в изотонической среде, содержащая 29% эритроцитов, обработанных глутаровым альдегидом, ($k = 0,3$); 4 – суспензия интактных эритроцитов в среде с осмотичностью $\mu = 210$ мосМ ($k = 0,08$); 5 – суспензия интактных эритроцитов в среде с осмотичностью $\mu = 231$ мосМ ($k = 0,01$). Все кривые, кроме 2, получены с помощью фильтров М-3

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены кривые зависимости относительного содержания забитых пор на фильтре R от количества нанесенных на фильтр эритроцитов для суспензий с различным содержанием нефилтрующихся клеток. Кривые 1 и 2 получены при пропускании через фильтры М-3 и Nuclerore соответственно суспензий эритроцитов, обработанных глутаровым альдегидом в концентрации 0,1%. Кривые 3 и 4 получены при пропускании через фильтр М-3 суспензий интактных донорских эритроцитов в изотонической среде, содержащих соответственно 17,5 и 7% обработанных глутаровым альдегидом клеток. Кривая 5 соответствует суспензии интактных донорских эритроцитов в гипотонической среде с осмотичностью 235 мосМ.

Все кривые на рис. 1 имеют характерную форму, связанную с наличием на фильтре пор разного диаметра, а также перекрывающихся между собой пор. Начальный участок каждой кривой ($0 < R < 0,1-0,2$) определяется забивкой самых мелких пор и отличается наибольшей крутизной. (Согласно нашим данным, около 10% от среднего начального числа пор на ядерных фильтрах типа М-3 составляют поры, не пропускающие даже нормальные эритроциты).

Основная часть пор со средним для данного типа фильтров диаметром ответственна за линейный участок кривой ($0,2 < R < 0,6$). Затем кривая становится все более пологой, что соответствует забивке пор с наибольшим диаметром и взаимоперекры-

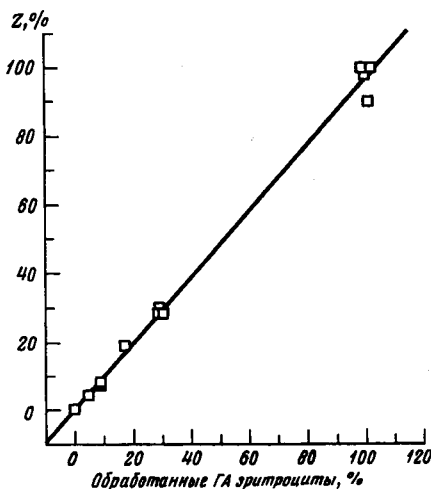


Рис. 3

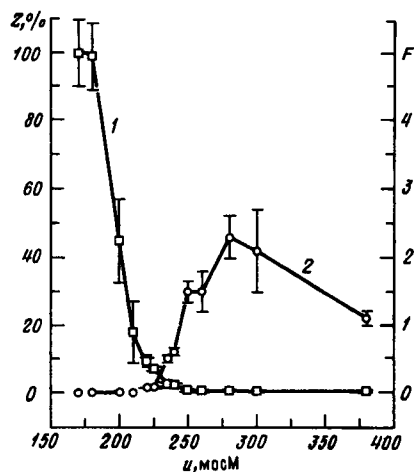


Рис. 4

Рис. 3. Соответствие относительного количества обработанных глутаровым альдегидом (ГА) эритроцитов, добавленных к суспензиям интактных клеток в среде с осмотичностью $u = 310$ мосМ, и измеренного процентного содержания в этих суспензиях нефилтрующихся эритроцитов (Z , %)

Рис. 4. Зависимость процентного содержания нефилтрующихся клеток (Z , %) в суспензиях эритроцитов из крови здоровых доноров (1) и индекса фильтруемости (F) таких суспензий (2) от осмотичности ресуспендирующей среды (u)

вающихся пор. Для определения эффективности забивания пор, имеющих среднее значение диаметра, мы использовали линейный участок кривой зависимости R от n : ($0,2 < R < 0,6$).

Умножая значения R на величину N_0 для каждого фильтра, мы получаем абсолютное количество забитых пор. На рис. 2 представлены линейные участки кривых зависимости $R \cdot N_0$ от количества нанесенных на фильтр эритроцитов. Можно видеть, что при такой нормировке кривые, соответствующие обработанным глутаровым альдегидом суспензиям (рис. 1, кривые 1, 2), оказываются параллельными друг другу (рис. 2, кривые 1, 2), причем тангенс угла наклона этих кривых k равен 1. (Отметим, что исходное количество свободных пор N_0 на фильтре М-3 втрое меньше, чем на фильтре Nuclapore). Таким образом, как и следовало ожидать, обработанные глутаровым альдегидом в гипотонической среде эритроциты полностью перекрывают поры обоих типов фильтров, т.е. суспензия содержит 100% нефилтрующихся клеток. Кривая 3 получена при пропускании через фильтр М-3 ресуспендированных в изотонической среде нормальных интактных эритроцитов с примесью 29% обработанных глутаровым альдегидом клеток.

Остальные кривые на рис. 2 получены при пропускании через фильтры М-3 суспензий нормальных интактных эритроцитов в гипотонических средах. Для каждой кривой указан тангенс угла наклона, равный доле нефилтрующихся при данных условиях клеток в суспензии ($k = Z, \%/100$).

На рис. 3 показано хорошее соответствие между относительным содержанием клеток, обработанных глутаровым альдегидом, в суспензии нормальных интактных эритроцитов и измеренным с помощью описанного выше метода процентным содержанием нефилтрующихся клеток Z , %.

Как известно, фильтруемость эритроцитов снижается при уменьшении осмотичности среды [13]. Это явление, по крайней мере частично, связано с возрастанием доли нефилтрующихся клеток в исследуемой суспензии. В таблице приведены результаты измерения при разных значениях осмотичности (u) процентного содержания нефилтрующихся клеток в суспензиях отмытых эритроцитов из крови 8 здоровых доноров

Процентное содержание нефiltrующихся клеток (Z , %) и индекс фильтруемости (F) при различных значениях осмотичности ресуспендирующей среды (u) в суспензиях эритроцитов из крови 8 здоровых доноров

v	u , мосМ	Z , %	F	v	u , мосМ	Z , %	F
1	170	100	0	6	235	2,5±0,5	0,5±0,06
2	180	100	0	7	250	0,7±0,3	1,5±0,2
3	200	45±12	0	8	260	0,6±0,3	1,5±0,5
4	210	18±9	0	9	300	0,4±0,3	2,1±0,6
5	220	9±1,4	0,06±0,05	10	380	0,4±0,3	1,1±0,05

(Z , %) и индекса фильтруемости этих суспензий (F). Из таблицы видно, что в широком диапазоне u от гипертонических до изотонических значений величина Z изменяется мало и составляет в среднем 0,4%. Этот фоновый уровень Z определяется, очевидно, примесью неотмытых лейкоцитов, агрегатов тромбоцитов и сильно измененных эритроцитов [9]. При дальнейшем снижении осмотичности величина Z все более круто возрастает, достигая вблизи 180 мосМ максимального значения 100%. Сравнивая соответствующие друг другу значения Z и F , можно видеть, что при снижении осмотичности однопроцентная суспензия эритроцитов практически перестает проходить через фильтр, когда доля нефiltrующихся клеток в ней становится больше 2–3%. При этом количество нефiltrующихся клеток, попадающих на фильтр в процессе измерения, приблизительно равно числу пор фильтра N_0 . Приведенные в таблице данные графически представлены на рис. 4 и 5.

На рис. 4 показано, как соотносятся между собой зависимости от осмотичности u индекса фильтруемости F (рис. 4, кривая 2) и полученного предлагаемым нами методом процентного содержания нефiltrующихся клеток Z (кривая 1). Кривая 1, представляющая собой зависимость Z от u , является по определению интегральным распределением эритроцитов в суспензии по величине u_{cr} . Соответствующее дифференциальное распределение показано на рис. 5, где по оси абсцисс отложены значения $u = u_{cr}$, а по оси ординат величина $\gamma(u_v < u < u_{v+1}) = [Z(u_v) - Z(u_{v+1})]/(u_{v+1} - u_v)$. Максимум дифференциального распределения приходится на $u_{cr} = 190-200$ мосМ. Зная u_{cr} для фильтра с известными параметрами и изотонический объем эритроцита V_{iso} , легко определить площадь клеточной поверхности S и соответственно отношение S/V_{iso} [11]. Из приведенных результатов следует, что большая часть эритроцитов в норме (средний объем 90 мкм³ [14]) имеет $S/V_{iso} = 1,72-1,68$ мкм⁻¹, что хорошо согласуется с имеющимися в литературе данными [15]. Полуширина дифференциального распределения по u_{cr} (рис. 5) составляет около 30 мосМ для разных образцов донорской крови. По-видимому, распределение эритроцитов по u_{cr} отражает их распределение по величине отношения S/V_{iso} и аналогично распределению по величине "лизирующей осмотичности", представленному в работе [16]. Однако пока неизвестно, как соотносится распределение эритроцитов в суспензии по u_{cr} с распределением их по объемам и другим параметрам. Характер распределения эритроцитов по u_{cr} изменяется при некоторых патологиях и повреждающих воздействиях. На рис. 6 представлены участки интегральных распределений эритроцитов в крови больного с ксероцитозом (кривая 1) в нормальной донорской крови (кривая 2) и в крови больного, находящегося на гемодиализе в связи с хронической почечной недостаточностью (кривая 3). Сдвиг кривой 1 влево и сдвиг кривой 3 вправо по сравнению с нормальным распределением свидетельствует о значительном увеличении отношения S/V_{iso} эритроцитов при ксероцитозе [17] и о небольшом уменьшении этого отношения у больного с хронической почечной недостаточностью.

На рис. 7 представлены результаты двух опытов с истощенными по АТФ эритроцитами. Отмытые эритроциты инкубировали в HEPES-буфере, не содержащем глю-

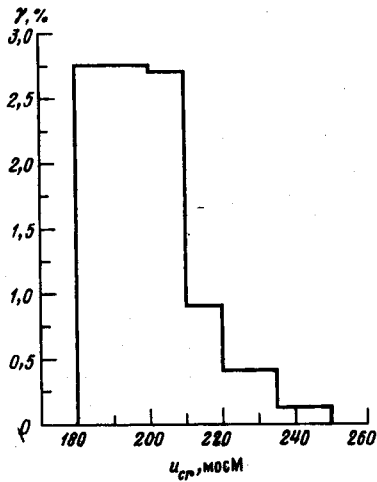


Рис. 5

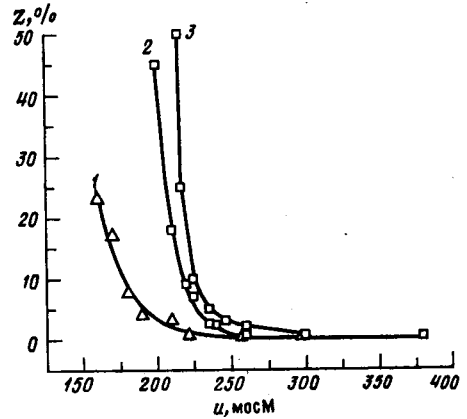


Рис. 6

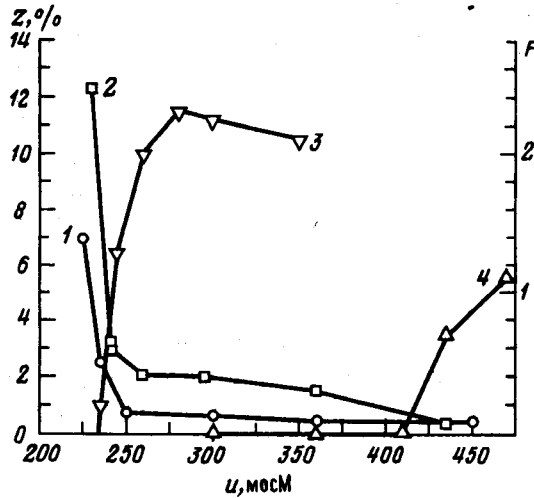


Рис. 7

Рис. 5. Дифференциальное распределение клеток в суспензии эритроцитов из крови здоровых доноров по u_{cp} (пояснение в тексте)

Рис. 6. Влияние осмотичности ресуспандирующей среды (u) на процентное содержание нефилтрующихся клеток (Z , %) в суспензиях эритроцитов из крови: 1 – больного с ксероцитозом; 2 – здорового донора; 3 – больного, находящегося на хроническом гемодиализе в связи с острой почечной недостаточностью

Рис. 7. Влияние осмотичности ресуспандирующей среды (u) на процентное содержание нефилтрующихся клеток (Z , %) (1, 2) и индекс фильтруемости (F) (3, 4) для суспензий эритроцитов из нормальной донорской крови (1, 3) и эритроцитов, истощенных по АТФ (2, 4)

козы, при 37°C в течение 20 ч. После трехкратного отмывания этих эритроцитов в таком же буфере исследовали зависимость Z и F от осмотичности ресуспандирующей среды. Как видно из рис. 7, истощенные по АТФ эритроциты не фильтруются вплоть до $u = 410$ мосМ. Дальнейшее увеличение u приводит к постепенному возрастанию F (кривая 4). Эффект ухудшения фильтруемости в истощенных по АТФ эритроцитах широко известен [18, 19]. Однако авторы, исследовавшие такие эритроциты с помощью анализатора СТГА, не обнаружили их отличия от нормальных по скорости прохождения индивидуальных клеток через поры с диаметром 5 мкм [20]. Сравнивая

приведенные на рис. 7 кривые зависимости Z от u (интегральные распределения по u_{cr}), можно видеть, что большая часть эритроцитов в истощенной по АТФ суспензии не очень сильно отличается по величине S/V_{iso} от нормальных клеток. При этом сильнейший сдвиг вправо кривой фильтруемости (кривая 4) объясняется присутствием в истощенной по АТФ суспензии небольшой фракции (около 2%) сильно измененных клеток, для которых $u_{cr} > 410$ мсМ.

Таким образом, с помощью описанного выше простого метода, используя обычный фильтрометр, можно получить новую информацию о распределении реологических свойств эритроцитов в суспензиях. Метод позволяет обнаружить в суспензиях эритроцитов минорные фракции с измененными свойствами, составляющие доли процента от общего числа клеток. Такая информация может пригодиться непосредственно при проведении клинических исследований, а также может быть использована для интерпретации кинетических фильтрационных кривых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reinhart W.H., Straub P.W. // Clin. Hemorheol. 1988. V. 8. P. 861–876.
2. Stuart J. // J. Clin. Pathol. 1985. V. 38. P. 965–977.
3. Mohandas N., Chasis J.A. // Seminars in Hematology. 1993. V. 30. P. 171–192.
4. Waugh R., Mohandas N., Jackson C., Mueller T., Suzuki T., Dale G.L. // Blood. 1992. V. 79. P. 1351–1358.
5. Gregersen M.I., Bryant C.A., Hammerle W.E., Usami S., Chien S. // Science. 1967. V. 157. P. 825–827.
6. Stuart J., Stone D., Bareford D., Biltov Y. // Clin. Hemorheol. 1985. V. 5. P. 449–461.
7. Skalak R., Soslowky L., Schmalzer E., Impelluso T., Chien S. // Biorheology. 1987. V. 24. P. 35–52.
8. Crawford R.G., Moss R.D., Grumer H.D. // Biorheology. 1987. V. 24. P. 63–76.
9. Brooks D.E., Evans E.A. // Clinical Hemorheology. Applications in Cardiovascular and Hematological disease, diabetes, surgery and gynecology / Ed. Chien S. et al. Dordrecht–Boston–Lancaster, 1987. P. 73–93.
10. Jones J.G., Adams R.A., Evans S.A. // Clin. Hemorheol. 1994. V. 14. P. 149–169.
11. Ataullakhanov F.I., Vitvitskii V.M., Lisovskaya I.L., Tuzhilova Ye.G. // Biophysika. 1994. V. 39. P. 672–680.
12. Evans E.A., Waugh R., Melink L. // Biophys. J. 1976. V. 16. P. 585–595.
13. Reinhart W.H., Chien S. // Amer. J. Physiol. 1985. V. 248. P. C473–479.
14. Bessman J.D. // Blood. 1975. V. 46. P. 369–379.
15. Clark M.R. // Blood Cells. 1989. V. 15. P. 427–439.
16. Lew V.L., Raftos J.E., Sorette M., Bookchin R.M., Mohandas N. // Blood. 1995. V. 86. P. 334–341.
17. Glader B.E., Fortier N., Albala M.M., Nathan D.G. // N. Engl. J. Med. 1974. V. 291. P. 491–496.
18. Weed R.I., Lacelle P.I., Merrill E.W., Craib G., Gregori A., Karch F., Pickens F. // J. Clin. Invest. 1969. V. 48. P. 795–809.
19. Reinhart W.H., Chien S. // Amer. J. Physiol. 1985. V. 248. P. C473–C479.
20. Rendell M., Luu T., Quinlan E., Knox S., Fox M., Kelly S., Kahler K. // Biochim. et Biophys. acta. 1992. V. 1133. P. 293–300.

Поступила в редакцию
13.V.1997

A MODIFICATION OF THE FILTRATION METHOD FOR STUDYING THE CONTENT OF NONFILTERABLE CELLS IN ERYTHROCYTE SUSPENSION

Lisovskaya I.L., Shurkhina E.S., Nesterenko V.M., Rozenberg U.M.,
Ataullakhanov F.I.

National Research Center of Hematology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The results of filtration assays provide estimates of the deformability of erythrocytes averaged over the entire suspension. These assays do not distinguish whether the entire population or only its small fraction exhibits abnormal rheological properties. We developed a simple method using a filtrimeter to determine the percentage of nonfilterable (under given conditions) cells in the erythrocyte suspension. Membrane filters made of a polyethyleneterphtalate film had the mean pore diameter of $3,1 \mu\text{m}$ and the length of cylindrical micropores of $7 \mu\text{m}$. The buffer flow rate t_b depends on the number of free pores in a filter. The plot of the number of pores clogged by nonfilterable cells versus the total number of erythrocytes passed through the filter had a linear portion, whose slope represents the relative content Z of nonfilterable cells in the suspension. We determined Z for various medium osmolalities u . These data were used to derive the distribution of erythrocytes in u_{cr} , the value of u at which an erythrocyte cannot pass through a pore of a given filter because of geometric limitations. The distribution maximum corresponded to 190–200 mosm for erythrocytes from the normal blood. This means that normal erythrocytes have the median values of their surface area and area-to-volume ratio of $155\text{--}151 \mu\text{m}^2$ and $1,72\text{--}1,68 \mu\text{m}^{-1}$, respectively. The half-width of the distribution was approximately 30 mosm. This finding suggests that the normal blood contains a certain fraction of erythrocytes with a decreased area-to-volume ratio. Our results showed that the distribution is altered in various forms of anemia and in ATP-depleted erythrocyte suspensions.