



УДК 612.13

© 1999 г.

МАТЕМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ГЕОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ И МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ НА ФИЛЬТРУЕМОСТЬ НЕОДНОРОДНЫХ СУСПЕНЗИЙ

Яковенко Е.Е., Лисовская И.Л.* , Атауллаханов Ф.И.*

*Московский государственный университет им М.В. Ломоносова, физический факультет,
119899 Москва, Воробьевы горы;*

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

Обсуждены подходы к решению задачи определения характера распределения клеток в суспензии по скоростям прохождения через пору фильтра из зависимости от времени скорости протекания разбавленной суспензии эритроцитов через мембранный фильтр. В работе рассмотрен случай, когда суспензия состоит из двух субпопуляций эритроцитов, различающихся по одному параметру. Используя модель прохождения одиночного эритроцита через капилляр и модель фильтрации неоднородной суспензии, мы рассмотрели зависимость кинетики протекания суспензии эритроцитов от соотношения численности и от реологических характеристик составляющих ее субпопуляций. Показано, что исследуя зависимость скорости протекания суспензии от времени, можно определить скорость фильтрования клеток основной субпопуляции, скорость фильтрования клеток примеси и их процентное содержание в случае, когда скорость фильтрования клеток примеси по крайней мере на порядок меньше скорости фильтрования клеток основной субпопуляции. При этом оказывается возможным зарегистрировать присутствие в суспензии примеси плохо фильтрующихся клеток в 0,5–1%. Добавление к данной постановке эксперимента развертки по осмотичности даёт возможность определять для клеток основной субпопуляции площадь поверхности эритроцита, "внутриклеточную вязкость" и механические характеристики мембраны и в некоторых случаях оценивать эти параметры для клеток примеси.

Способность эритроцита проходить по узким капиллярам играет важную роль для выполнения ими транспортной функции. Поэтому исследование фильтруемости эритроцитов имеет важное диагностическое значение. Установлено, что многие патологические состояния сопровождаются появлением в крови аномальных эритроцитов, отличающихся от основной популяции клеток фильтруемостью [1]. Для диагностики и изучения свойств эритроцитов наиболее удобными и информативными являются фильтрационные методы. В настоящее время одним из основных способов оценки фильтруемости эритроцитов является измерение скорости протекания разбавленных суспензий отмывых эритроцитов через мембранные фильтры с цилиндрическими порами, диаметр которых близок к диаметру капилляров в микроциркуляции (3–5 мкм). Наиболее воспроизводимые результаты получаются при использовании фильтрометров, основанных на измерении времени вытекания небольших объемов суспензии эритроцитов (около 50–100 мкл) под действием силы тяжести [2]. Фильтруемость суспензии обычно определяют как $F = Ht \cdot t_b / (t_s - t_b)$, где t_b и t_s – время протекания через фильтр ресуспендирующей среды (буфера) и исследуемой суспензии, соответственно; Ht – гематокрит суспензии.

Интерпретация результатов подобных измерений встречает значительные трудности. Прежде всего это связано с гетерогенностью исследуемых суспензий. Если бы суспензия эритроцитов состояла из идентичных клеток, то фильтрационный метод, основанный на измерении времени прохождения через фильтр фиксированного объема суспензии, позволил бы оценивать скорость прохождения отдельного эритроцита через пору фильтра. Проводя измерения при разных осмотичностях ресуспендирующей среды (развертка по осмотичности), можно было бы определять отношение площади поверхности к объему клетки, "внутриклеточную вязкость" и механические характеристики мембраны клетки [3]. Однако реальные суспензии эритроцитов всегда неоднородны и содержат клетки, различающиеся по многим параметрам, в том числе по геометрическим размерам и плотности [4]. Если эритроциты в суспензии распределены по некоторому признаку, скорости их прохождения через поры могут быть различными. При этом нельзя считать, что результаты, полученные с помощью фильтрации фиксированного объема суспензии, характеризуют некую "среднюю" клетку, т.е. эритроциты, составляющие основную часть суспензии. На самом деле, скорость суспензии определяется в первую очередь медленными, "плохими" эритроцитами [5]. Дело заключается в том, что при стандартных условиях фильтрационных исследований ($Ht > 1\%$, пропускаемый объем суспензии 50–250 мкл) число эритроцитов, попадающих на фильтр в процессе одного измерения, намного (почти на 2 порядка) больше, чем число пор на фильтре. Поэтому время протекания через фильтр заданного объема суспензии, содержащей малую примесь плохо фильтрующихся клеток, может значительно отличаться от времени протекания гомогенной суспензии.

Можно изменить постановку фильтрационного эксперимента и вместо однократного измерения времени протекания фиксированного объема суспензии измерять с достаточным разрешением зависимость скорости протекания суспензии эритроцитов от времени (фильтрационную кривую). В начальный период протекания суспензии, когда почти все поры свободны, через фильтр проходят клетки основной субпопуляции (именно потому, что их намного больше, чем остальных). Поэтому на данном участке скорость протекания суспензии определяется скоростью клеток основной субпопуляции, т.е. "средних" клеток. Возможно, зная скорость суспензии на начальных этапах протекания, мы сможем оценить скорость "средней" клетки.

Целью нашей работы является исследование влияния распределения клеток суспензии по скоростям прохождения через пору мембранного фильтра на процесс протекания суспензии через фильтр. В данной работе с помощью математического моделирования мы исследовали простейший случай, когда суспензия эритроцитов содержит клетки двух типов. Используя модель прохождения одиночного эритроцита через капилляр [3] и модель фильтрации неоднородной суспензии [6, 7], мы рассмотрели зависимость кинетики протекания суспензии эритроцитов от соотношения численности и от реологических характеристик составляющих ее субпопуляций. Этот анализ позволил сформулировать постановку эксперимента для получения информации о характере распределения клеток в реальной суспензии по скоростям прохождения через фильтр и определения параметров отдельных типов клеток, определяющих их деформируемость.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Математическая модель динамики протекания через фильтр суспензии, состоящей из двух типов клеток. Рассмотрим простейший случай суспензии, состоящей из двух различных субпопуляций. Пусть выполняются следующие предположения: а) все поры в фильтре одинаковы; б) когда клетка находится в поре, буфер через эту пору не течет; следствием данного предположения является то, что гематокрит суспензии (отношение суммарного объема клеток к объему суспензии) над фильтром не меняется; в) в поре в любой момент времени находится не больше одной клетки; г) скорость клетки в поре постоянна; д) скорость прохождения клеток через пору много меньше скорости протекания буфера.

Скорость протекания суспензии эритроцитов через фильтр определяется процессами поступления клеток на фильтр и высвобождения клеток из пор мембраны. Скорость поступления клеток на фильтр зависит как от скорости суспензии в целом, так и от концентрации клеток. Скорость выхода клеток из фильтра зависит от числа пор, занятых клетками, и скорости прохождения клетки через пору. Стационарное значение числа клеток, находящихся в порах фильтра, достигается, когда скорость поступления клеток на фильтр (число клеток, поступивших на фильтр в единицу времени) равна скорости выхода клеток из фильтра (число клеток, покинувших фильтр в единицу времени).

Скорость изменения числа пор, занятых каждым типом клеток в процессе фильтрации, описывается следующими уравнениями:

$$\begin{aligned} dP_1/dt &= (T - P_1 - P_2)n_1w_b - w_1/V_1P_1, \\ dP_2/dt &= (T - P_1 - P_2)n_2w_b - w_2/V_2P_2, \end{aligned} \quad (1)$$

где T – общее число пор на фильтре; P_1, P_2 – число пор, занятых эритроцитами основной и малой субпопуляции соответственно; n_1, n_2 – концентрация каждого типа клеток в суспензии; w_b – объемная скорость протекания буфера через пору (в данном случае скорость протекания буфера и скорость прохождения эритроцита через пору удобнее измерять как объем буфера или эритроцита, прошедший через пору в единицу времени); w_1, w_2 – объемная скорость прохождения через пору клеток первой и второй субпопуляции соответственно; V_1, V_2 – объем клеток первой и второй субпопуляции соответственно.

Объемная скорость протекания суспензии через фильтр описывается уравнением

$$Q = (T - P_1 - P_2)w_b. \quad (2)$$

Эти уравнения были получены в работах [6, 7]. Легко получить аналитическое решение для данной модели в общем случае. При этом зависимость объемной скорости протекания суспензии от времени имеет вид:

$$Q(t) = Q_{st} + A_1 \exp(-t/t_1) + A_2 \exp(-t/t_2), \quad (3)$$

где $Q_{st} = Tw_b - A_1 - A_2$.

$$A_1 = (k_1 + k_0)(k_2 + k_0)/(2k_0)t_1Tw_b$$

$$A_2 = -(k_1 - k_0)(k_2 - k_0)/(2k_0)t_2Tw_b$$

$$t_1 = 1/(k_3 + k_0)$$

$$t_2 = 1/(k_3 - k_0)$$

$$k_0 = (0,25(n_1w_b + n_2w_b + w_1/V_1 + w_2/V_2)^2 - (n_1w_bw_2/V_2 + n_2w_bw_1/V_1 + w_1/V_1w_2/V_2))^{1/2}$$

$$k_1 = 0,5(n_1w_b + n_2w_b + w_1/V_1 - w_2/V_2)$$

$$k_2 = 0,5(n_1w_b + n_2w_b - w_1/V_1 + w_2/V_2)$$

$$k_3 = 0,5(n_1w_b + n_2w_b + w_1/V_1 + w_2/V_2).$$

Зависимость скорости прохождения клетки через пору фильтра от геометрических и механических параметров эритроцитов. В работе [3] была предложена теория, в которой рассматривается прохождение одиночного эритроцита через пору. Эта теория связывает геометрические и механические свойства эритроцита со скоростью его прохождения через пору. С помощью модели для гомогенной суспензии эритроцитов было показано, что, зная зависимость скорости эритроцита w от осмотичности среды u , можно оценить некоторые геометрические и механические параметры эритроцита. Коротко рассмотрим основные результаты данной работы.

При данной площади поверхности эритроцит может пройти через пору, когда его объем меньше некоторого критического значения V_{cr} . Значение критического объема

связано как с размерами поры фильтра, так и с геометрическими параметрами эритроцита. В случае достаточно широкой поры эритроцит дисковидной формы может пройти через нее, свернувшись в трубочку или слегка сплющиваясь [8]. Увеличение объема эритроцита при фиксированной площади поверхности приведет к тому, что эритроцит начнет целиком заполнять объем поры. Вначале рассмотрим случай, когда объем эритроцита больше объема поры, так что эритроцит помещается в поре частично. Эритроцит перестанет проходить через пору, когда свободные от контакта со стенками поры участки мембраны станут сферическими поверхностями. Наименьший при данной площади поверхности объем, при котором эритроцит не может пройти через пору (т.е. критический объем), соответствует форме гантели, образованной частью эритроцита, находящейся в поре, и двумя сферами с равными диаметрами, которые образованы по обе стороны фильтра. Этот критический объем будет тем больше, чем больше площадь поверхности клетки и чем больше диаметр поры [3].

Если пора достаточно длинная, так что эритроцит помещается в канале целиком, его критический объем будет соответствовать форме цилиндра, ограниченного полусферами. Тем не менее все рассуждения относительно зависимости критического объема эритроцита от площади поверхности клетки и геометрических параметров поры остаются верны.

Ранее было показано [9], что при изменении осмотичности среды эритроцит ведет себя как осмометр. При этом зависимость объема эритроцита от осмотичности описывается формулой $V = H/Hb_0 + fu$, где H – количество гемоглобина в клетке; Hb_0 – максимально возможная концентрация гемоглобина в клетке; f – коэффициент осмотической чувствительности, характеризующий чувствительность объема эритроцита к изменению осмотичности.

Значение осмотичности, при котором клетка достигает критического объема, было названо критической осмотичностью u_{cr} . При осмотичности, меньшей критической для данного эритроцита, эритроцит не будет проходить через пору – его скорость будет равняться 0. При увеличении осмотичности объем эритроцита будет уменьшаться. При осмотичности среды, большей критической, эритроцит начнет проходить через пору. Чем меньше объем эритроцита по сравнению с критическим, тем меньшую роль в прохождении эритроцита через пору будут играть геометрические характеристики клетки. Вязкость внутриклеточного содержимого также зависит от осмотичности среды. По мере возрастания осмотичности и соответствующего уменьшения объема эритроцита увеличивается внутриклеточная концентрация гемоглобина. Это приводит к возрастанию вязкости внутриклеточного содержимого, которая растет экспоненциально при увеличении концентрации гемоглобина в клетке [10]. При увеличении вязкости внутриклеточного содержимого по мере возрастания осмотичности эритроцит будет медленнее проходить через пору. Таким образом, при изменении осмотичности среды влияние соответствующих изменений объема и вязкости на скорость прохождения эритроцита через пору w будут противоположны. Зависимость w от осмотичности среды имеет колоколообразный вид и описывается формулой:

$$w = w_b / (a_0 \exp(y_1 H u / f) + b_0 (V_{cr} - H / H b_0 - f u)^{1.5}), \quad (4)$$

где $y_1 = 3,6 \cdot 10^{12}$ мкм³/г; $H b_0 = 0,694 \cdot 10^{-12}$ г/мкм³; a_0 – коэффициент, характеризующий влияние вязкости внутриклеточного содержимого на скорость клетки; b_0 – коэффициент, характеризующий жесткость клетки или ее мембраны [3].

При заданных длине и диаметре поры критический объем однозначно связан с площадью поверхности клетки. Чем больше площадь поверхности, тем больше критический объем клетки, тем меньше критическая осмотичность (рис. 1, а). К уменьшению критической осмотичности приводят также уменьшение количества гемоглобина в клетке и уменьшение коэффициента осмотической чувствительности f . Изменение величины коэффициента a_0 не влияет на критическую осмотичность. Его увеличение приводит к уменьшению скорости эритроцита преимущественно в гипер-

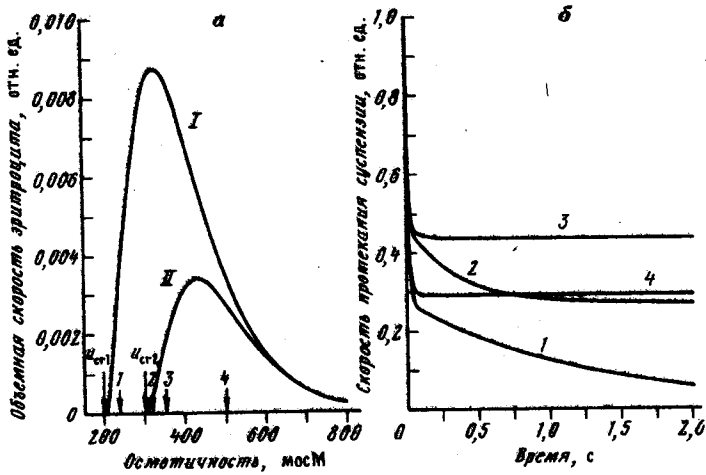


Рис. 1. Фильтруемость суспензии, состоящей из двух субпопуляций клеток, различающихся площадью поверхности, через фильтр толщиной 10 мкм с диаметром пор 3 мкм. Суспензия содержит 95% клеток, имеющих площадь поверхности $S_1 = 155 \text{ мкм}^2$, и 5% клеток, имеющих площадь поверхности $S_2 = 130 \text{ мкм}^2$.

a – зависимость от осмотичности объемной скорости прохождения одиночного эритроцита основной субпопуляции (I) и примеси (II). Значения скорости эритроцита нормированы на объемную скорость протекания буферного раствора через пору. Зависимость рассчитана по формуле (4), где $H = 33 \cdot 10^{-12} \text{ г}$, $f = 13 \text{ осМ} \cdot \text{мкм}^3$, $a_0 = 2,63$, $b_0 = 7,24 \cdot 10^3 \text{ мкм}^{4,5}$ для обеих субпопуляций эритроцитов.

б – кинетика скорости протекания суспензии эритроцитов при различных осмотичностях. Значения скорости протекания суспензии нормированы на объемную скорость протекания буферного раствора через тот же фильтр. Давление над фильтром 6 см H_2O $5,9 \cdot 10^{-1} \text{ г}/(\text{мкм} \cdot \text{с}^2)$. Вязкость буферного раствора $\eta = 7 \cdot 10^{-7} \text{ г}/(\text{мкм} \cdot \text{с})$. Гематокрит суспензии $Ht = 1\%$. Осмотичность буферного раствора, мосМ: 240 (1), 310 (2), 350 (3), 500 (4). Эти осмотичности указаны на рис. 1, *a* стрелками с номерами, соответствующими номерам кривых на рис. 1, *б*

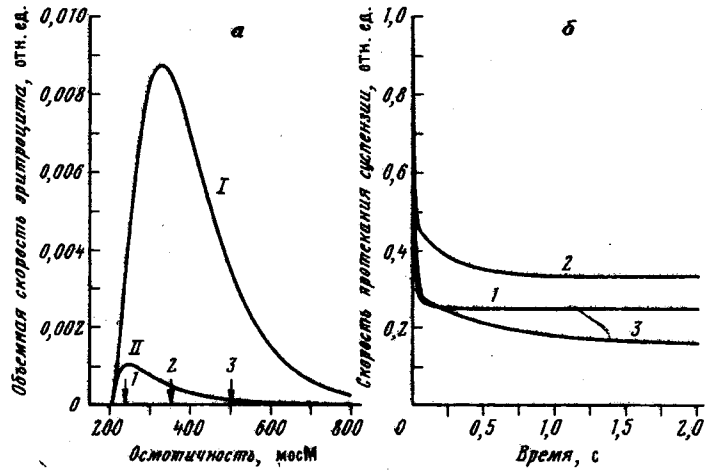


Рис. 2. Фильтруемость суспензии, состоящей из двух субпопуляций клеток, имеющих разные коэффициенты a_0 (вязкость внутриклеточного содержимого). Суспензия содержит 95% клеток, характеризующихся коэффициентом $a_{01} = 2,63$, и 5% клеток, характеризующихся коэффициентом $a_{02} = 78,9$. Нормировка, параметры фильтра, условия фильтрования те же, что на рис. 1.

a – зависимость от осмотичности объемной скорости прохождения одиночного эритроцита основной субпопуляции (I) и примеси (II), $S = 155 \text{ мкм}^2$, $H = 33 \cdot 10^{-12} \text{ г}$, $f = 13 \text{ осМ} \cdot \text{мкм}^3$, $b_0 = 7,24 \cdot 10^3 \text{ мкм}^{4,5}$ для обеих субпопуляций эритроцитов.

б – кинетика скорости протекания суспензии эритроцитов при различных осмотичностях. Осмотичность буферного раствора, мосМ: 240 (1), 350 (2), 500 (3). Эти осмотичности указаны на рис. 2, *a* стрелками с номерами, соответствующими номерам кривых на рис. 2, *б*

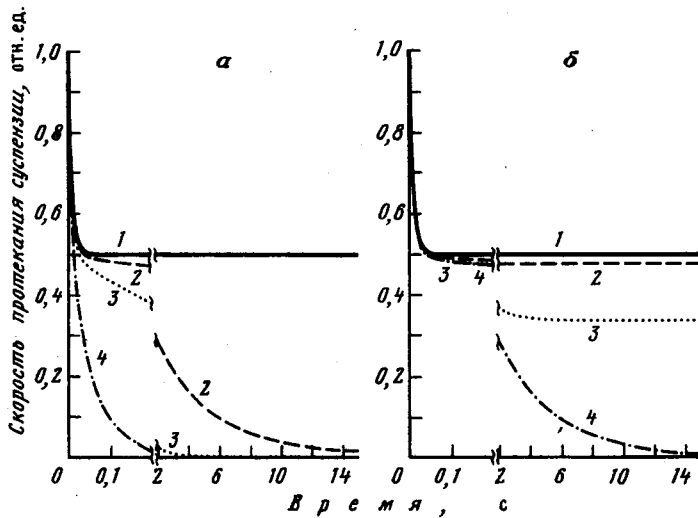


Рис. 3. Кинетика скорости протекания суспензии, состоящей из двух типов клеток, для различного содержания плохо фильтрующихся клеток (а) и для различных значений скорости плохо фильтрующихся клеток (б). Нормировка, параметры фильтра, условия фильтрования те же, что на рис. 1. Скорость эритроцита хорошо фильтрующейся субпопуляции $w_1 = 0,01 \cdot w_b$. Изотонический объем эритроцитов плохо и хорошо фильтрующихся субпопуляций $V_1 = V_2 = 90 \text{ мкм}^3$. а – отношение скоростей плохо фильтрующихся и хорошо фильтрующихся клеток $w_1/w_2 = 0,0001$; доля плохо фильтрующихся клеток в суспензии, %: 0 (1), 1 (2), 5 (3), 50 (4). б – доля плохо фильтрующихся клеток в суспензии 1%; скорость плохо фильтрующихся клеток w_2 : w_1 (1), $0,1 \cdot w_1$ (2), $0,01 \cdot w_1$ (3), 0 (4)

тонической области (рис. 2, а). Изменение коэффициента b_0 также не меняет критическую осмотичность. Однако его увеличение вызывает уменьшение скорости эритроцита преимущественно в гипотонической области.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика протекания через фильтр суспензии, состоящей из двух типов клеток.

Когда суспензия состоит из двух типов клеток, скорость ее протекания описывается двумя экспоненциальными функциями. Рассмотрим, как меняется зависимость скорости суспензии от времени для двух субпопуляций. Пусть первая субпопуляция – основная, хорошо фильтрующаяся, а вторая – малая, плохо фильтрующаяся ($w_1 > w_2$, $n_1 > n_2$). Коэффициенты A_1 , t_1 характеризуют быстро затухающую составляющую скорости суспензии, A_2 , t_2 – медленно затухающую. На рис. 3, а изображена зависимость скорости протекания суспензии от времени для суспензий, содержащих разное количество плохо фильтрующихся клеток. Видно, что даже когда содержание "плохих" клеток возрастает до 50%, начальный участок фильтрационной кривой изменяется незначительно. При этом основные отличия в форме кривой проявляются на участке медленного спада: при увеличении содержания "плохих" клеток падение скорости на этом участке увеличивается, а время установления стационарной скорости протекания суспензии уменьшается. На рис. 3, б показано, как меняется зависимость скорости протекания суспензии от времени при изменении скорости плохо фильтрующихся клеток. Как и в предыдущем случае, начальный участок фильтрационной кривой практически не меняется. Основные изменения происходят на участке медленного спада. При уменьшении скорости плохо фильтрующихся клеток снижение скорости суспензии на этом участке больше. При этом время установления стационарной скорости протекания суспензии возрастает. Из рис. 3 видно, что коэффициенты A_1 , t_1 в первую очередь определяются свойствами хорошо фильтрующейся основной суб-

популяции клеток, а коэффициенты A_2 , t_2 — плохо фильтрующейся малой субпопуляции клеток. Действительно, в некоторых случаях этот результат очевиден. Например, при $w_2 \ll w_1$, $n_2 \ll n_1$ из формулы (3) мы получаем:

$$A_1 = Tw_b n w_b / (n w_b + w_1 / V_1),$$

$$A_2 = Tw_b (n_2 w_b w_1 / V_1 - w_2^2 / V_2^2) (w_1 / V_1) / [(n w_b + w_1 / V_1) (n w_b w_2 / V_2 + n_2 w_b w_1 / V_1 + (w_1 / V_1) (w_2 / V_2))],$$

$$t_1 = 1 / (n w_b + w_1 / V_1),$$

$$t_2 = (n w_b + w_1 / V_1) / [n w_b w_2 / V_2 + n_2 w_b w_1 / V_1 + (w_1 / V_1) (w_2 / V_2)], \quad (5)$$

где $n = n_1 + n_2$ — общая концентрация клеток в суспензии.

Качественно характер фильтрационной кривой для суспензии, состоящей из двух субпопуляций, может быть объяснен следующим образом. В начальный момент времени через фильтр проходит только буфер, так что скорость суспензии равна скорости буфера. Если клеток плохо фильтрующейся субпопуляции мало, то сначала на фильтр поступают клетки основной субпопуляции. В системе устанавливается квазистационарная скорость протекания суспензии, определяющаяся клетками основной субпопуляции. Скорость суспензии при этом меньше скорости буфера на величину A_1 . Величина A_1 будет тем больше, чем меньше скорость w_1 клеток основной субпопуляции (см. формулу (5)). (По нашим оценкам, основанным на результатах работ [11, 12], скорость прохождения через пору 3 мкм фильтра основной субпопуляции эритроцитов нормальной крови при физиологических условиях составляет около одной сотой скорости протекания буфера.) При скорости клеток основной субпопуляции $w_1 = 0,01 w_b$ и гематокрите суспензии $Ht = 1\%$ величина A_1 составляет примерно половину скорости протекания буфера через фильтр. В этом случае при давлении над фильтром 6 см H_2O характерное время t_1 установления квазистационарной скорости протекания суспензии равняется примерно 10 мс. Клетки малой субпопуляции начинают занимать поры фильтра позже клеток основной субпопуляции. Время установления стационарного состояния относительно числа пор, занятых этими "плохими" клетками, зависит от скорости w_2 их прохождения через пору и их концентрации n_2 . Характерное время t_2 установления этого стационарного состояния будет тем больше, чем меньше скорость клеток данного типа и чем меньше их концентрация. Величина A_2 также зависит от скорости и концентрации плохо фильтрующихся клеток. При w_2 не равном 0 величина A_2 будет тем больше, чем меньше скорость этих клеток и чем больше их концентрация: если $w_2 = 0,0001 w_b$, то при $n_2 = 0,05 n$ величина A_2 составляет 10% от скорости протекания буфера через фильтр. Характерное время t_2 выхода на стационар составит 0,5 с. При $n_2 = 0,005 n$ величина A_2 равна 1% от скорости протекания буфера через фильтр, а время t_2 увеличивается до 1,4 с. При этом стационарная скорость протекания суспензии отлична от нуля. Если же скорость "плохих" клеток w_2 равна 0, то скорость протекания суспензии обязательно упадет до 0 — "плохие" клетки забьют все поры фильтра независимо от концентрации этих клеток. Для случая, когда скорость "плохих" клеток $w_2 = 0$ и $n_2 = 0,05 n$, характерное время переходного процесса t_2 приблизительно равно 0,7 с. При $n_2 = 0,005 n$ это время увеличивается до 7 с.

Если скорости "хороших" и "плохих" клеток w_1 и w_2 близки между собой (одного порядка), то коэффициент A_2 близок к 0 (рис. 4). При равных скоростях клеток зависимость скорости протекания суспензии от времени (кривая $Q(t)$ описывается одной экспонентой $Q = Q_{st} + A_1 \exp(-t/t_1)$). Если же w_1 и w_2 отличаются значительно (больше, чем на порядок), то коэффициент A_2 существенно отличен от 0, и на фильтрационной кривой $Q(t)$ появляется участок медленного спада.

Рис. 4. Зависимость от скорости эритроцита плохо фильтрующейся субпопуляции значений предэкспоненциальных множителей в формуле, описывающей скорость протекания суспензии, состоящей из двух типов клеток. Нормировка, параметры фильтра, условия фильтрования те же, что на рис. 1. Скорость эритроцита хорошо фильтрующейся субпопуляции $w_1 = 0,01 \cdot w_b$. Изотонический объем эритроцитов плохо и хорошо фильтрующихся субпопуляций $V_1 = V_2 = 90 \text{ мкм}^3$. Доля плохо фильтрующихся клеток в суспензии 5%

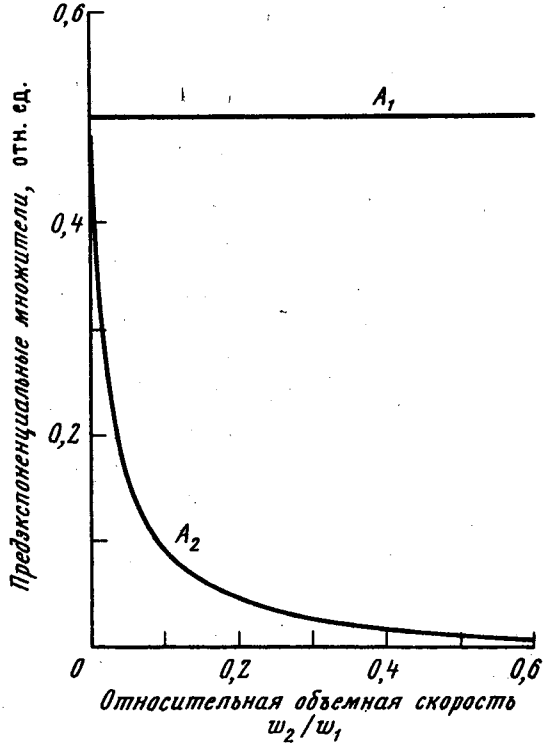


Рис. 4

Рис. 5. Зависимости от осмотичности предэкспоненциальных множителей (а) и характерных времен (б) в формуле, описывающей скорость протекания суспензии, состоящей из двух типов клеток. Все параметры суспензии и нормировка те же, что и на рис. 1

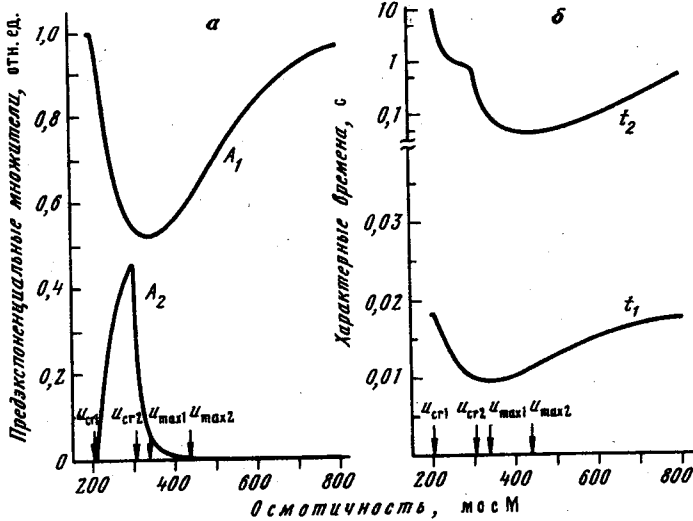


Рис. 5

Независимо от того, как сильно отличаются скорости "хороших" и "плохих" клеток w_1 и w_2 , зная значение A_1 , мы можем приблизительно найти отношение скорости клеток основной субпопуляции w_1 к их объему V_1 (см. формулу (5)):

$$w_1/V_1 = n \times w_b \times (T \times w_b - A_1)/A_1, \tag{6}$$

где n – общее количество клеток суспензии в единице объема.

Отношением скорости к объему пользоваться удобнее – оно представляется естественной нормировкой для скорости. Оно показывает количество клеток, прошедших через пору за 1 с.

В случае, когда неизвестен начальный участок фильтрационной кривой, мы можем оценить скорость w_1 для клеток основной субпопуляции следующим образом. После затухания "быстрой" экспоненты (для гематокрита $Ht = 1\%$ и скорости клетки $w_1 \sim 0,01 w_b$ это соответствует временам порядка 30 мс) кривая описывается уравнением:

$$Q(t) = Q_1 - A_2 + A_2 \exp(-t/t_2), \quad (7)$$

где Q_1 – стационарная скорость протекания однородной суспензии эритроцитов, состоящей только из основных клеток. При этом $A_1 = Tw_b - Q_1$. Тогда из формулы (6) получим отношение скорости w_1 клетки основной субпопуляции к ее объему V_1 .

Если после затухания "быстрой" экспоненты различим участок медленного спада (A_2 не равно 0), то мы можем подбором параметров найти A_2 и t_2 . При этом в предположении, что концентрация "плохих" клеток n_2 много меньше концентрации клеток в суспензии n , можно найти скорость w_2 "плохих" клеток и их концентрацию n_2 . Если же на этих временах скорость протекания суспензии уже достигла стационарного значения, то можно считать суспензию однородной: $n_2 = 0$.

В принципе оценку скорости w_1 клеток основной субпопуляции мы можем получить и в случае, когда суспензия содержит большее число субпопуляций. При этом участок медленного спада фильтрационной кривой не описывается одной экспонентой. Тем не менее при экстраполяции участка кривой $Q(t)$ на временах 70–200 мс к нулевому моменту времени, мы получим оценку величины скорости суспензии, состоящей из клеток основной субпопуляции Q_1 .

Основной итог проведенного анализа состоит в том, что имея информацию о поведении кривой на временах порядка 100 мс (превышающих время установления квазистационарной скорости протекания основной субпопуляции), мы всегда можем оценить по крайней мере скорость клеток основной субпопуляции.

Возможность определения геометрических и механических параметров эритроцитов по кривым зависимости от времени скорости протекания суспензии, состоящей из двух типов клеток. Вернемся к рассмотрению случая, когда клетки двух субпопуляций в суспензии отличаются по одному параметру – площади поверхности клетки. Скорость w_1 клеток с большей площадью поверхности (обозначим их как "хорошие" клетки) будет больше скорости w_2 клеток, имеющих меньшую площадь поверхности ("плохие" клетки). Клетки этих двух субпопуляций характеризуются различными значениями критической осмотичности: u_{cr1} и u_{cr2} соответственно ($u_{cr1} < u_{cr2}$). Пусть концентрация "плохих" клеток меньше концентрации "хороших" ($n_2 < n_1$). Поскольку существует обратная зависимость параметров A_1, t_1 от скорости основных клеток, то при увеличении осмотичности от u_{cr1} значения этих параметров проходят через минимум (рис. 5). Для обоих параметров этот минимум достигается в окрестности осмотичности u_{max1} , при которой скорость "хороших" клеток максимальна. Это означает, что при данной осмотичности квазистационарная скорость протекания "хороших" клеток устанавливается быстрее, чем при других осмотичностях, а квазистационарная скорость протекания всей суспензии максимальна. Второй предэкспоненциальный коэффициент A_2 заметно отличен от 0, когда скорости клеток значительно различаются, поэтому он появляется на участке между u_{cr1} и u_{cr2} и быстро падает до 0 при увеличении осмотичности выше u_{cr2} (см. рис. 5, а). Параметр t_2 определяется свойствами субпопуляции "плохих" клеток и достигает минимума в районе осмотичности u_{max2} , при которой скорость "плохих" клеток максимальна (см. рис. 5, б).

Изменение параметров A_1, t_1, A_2, t_2 при различных значениях осмотичности определяет зависимость от осмотичности характера фильтрационных кривых (см. рис. 1, б). Из рисунка видно, что при $u_{cr1} < u < u_{cr2}$ (кривые 1, 2) на фильтрационной кривой наблюдается выраженный участок медленного спада. По мере того как скорости клеток сближаются при увеличении u , медленный участок исчезает, и зависимость $Q(t)$ выглядит как одна экспонента (кривые 3, 4). Таким образом, с помощью осмотической развертки можно обнаружить присутствие "плохих" клеток в суспензии в области значений осмотичности $u_{cr1} < u < u_{cr2}$.

Мы рассмотрели случай, когда две субпопуляции клеток в суспензии различаются по площади поверхности эритроцитов в предположении, что остальные характеристики (H, f, a_0, b_0) одинаковы. Для клеток, различающихся только по количеству гемоглобина или только по коэффициенту осмотической чувствительности f , медленный участок на фильтрационной кривой также будет появляться в гипотонической области. Для клеток, различающихся по коэффициентам a_0 (см. рис. 2, б) или b_0 , этот участок будет появляться в гипотонической и гипертонической областях.

Возможность обнаружить различия в параметрах клеток зависит от точности измерений, от разрешения по времени и шага по осмотичности. Анализ влияния точности измерительной аппаратуры естественнее было бы делать для какого-либо конкретного прибора. Однако мы такой возможностью не располагаем. Поэтому выберем достаточно произвольно эти параметры с целью проиллюстрировать влияние точности измерений на результаты.

Примем точность эксперимента равной 5%, шаг по времени 5 мс, шаг по осмотичности 20 мосМ. При шаге по осмотичности в 20 мосМ мы можем определять примерно 5% различия в площади поверхности эритроцитов S . Для 25% различия в количестве гемоглобина на клетку H различие в их критических осмотичностях составляет 25 мосМ. При шаге по осмотичности в 20 мосМ мы сможем обнаружить наличие "плохих" клеток. При шаге по осмотичности в 20 мосМ мы можем определять примерно 10% различия в значениях коэффициента осмотической чувствительности f . Характер фильтрационных кривых мало чувствителен к изменению параметров a_0 и b_0 . При точности эксперимента в 5% мы сможем увидеть наличие второй субпопуляции клеток тогда, когда коэффициенты a_0 или b_0 для клеток разных субпопуляций различаются в 50 раз. Но если эти различия есть, мы их обнаружим в более широком интервале осмотичностей, охватывающем гипо- и гипертоническую области.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ модели показал, что исследуя зависимость скорости протекания суспензии от времени, можно определить скорость фильтрования основной субпопуляции клеток, скорость фильтрования примеси и ее процентное содержание. Это можно сделать с достаточной точностью, если клетки "плохой" субпопуляции фильтруются в десять и более раз хуже, чем клетки "хорошей" субпопуляции. При этом метод оказывается довольно чувствительным и может зарегистрировать примесь плохо фильтрующихся клеток в 0,5–1%. Скорость прохождения через пору фильтра клеток основной субпопуляции можно определить и в случае, когда "плохие" клетки гетерогенны и фильтруются с разными скоростями. Единственное условие состоит в том, что все они при этом должны фильтроваться в 10 и более раз хуже, чем клетки основной субпопуляции.

Существование в суспензии двух субпопуляций клеток, значительно различающихся по механическим и геометрическим параметрам, влияющим на фильтруемость, не всегда проявляется в характере протекания суспензии через фильтр. Однако если получить фильтрационные кривые при разных осмотичностях, то всегда можно найти такую область значений осмотичности, где мы сможем обнаружить различия в ско-

рости фильтрования клеток, т.е. обнаружить присутствие в суспензии примеси клеток, отличных от основной субпопуляции.

Пусть в результате эксперимента мы получили, что при некоторых значениях осмотичности фильтрационная кривая может быть описана двумя экспонентами, а при некоторых одной. Если в гипотонической области кривая описывается двумя экспонентами, а в гипертонической одной экспонентой, то существуют три возможности (в предположении, что клетки суспензии отличаются по одному параметру): клетки различны по площади поверхности S , по количеству гемоглобина на клетку H или по коэффициенту осмотической чувствительности f . В случае, если две экспоненты появляются на непрерывном участке, захватывающем гипо- и гипертоническую область, мы можем сказать, что клетки различаются или по коэффициенту a_0 или по коэффициенту b_0 .

Приведенные результаты были получены для случая, когда суспензия состоит из двух субпопуляций эритроцитов, различающихся по одному параметру. На самом деле эритроциты в крови имеют непрерывное распределение по ряду параметров: объему, площади поверхности, плотности, причем эти параметры взаимозависимы [4, 13, 14]. При некоторых патологиях в крови появляются небольшие (~ 1%) примеси сильно измененных, плохо фильтрующихся эритроцитов [1]. Поэтому требуется специальное рассмотрение вопроса о том, как повлияет наличие непрерывных распределений на приведенные выше результаты.

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. Атауллаханов Ф.И., Витвицкий В.М., Лисовская И.Л., Тужилова Е.Г. // Биофизика. 1993. V. 39. P. 672–680.
4. Waugh R., Mohandas N., Jackson C., Mueller T., Suzuki T., Dale G.L. // Blood. 1992. V. 79. P. 1351–1358.
5. Brooks D.E., Evans E.A. // Clinical Hemorheology: Applications in Cardiovascular and Hematological Disease, Diabetes, Surgery and Gynecology / Ed. Chien S., Dormandy J., Ernst E., Matrai A. Dordrecht–Boston–Lancaster, 1987. P. 79–93.
6. Jones J.G., Holland B.M., Humphrys J., Wardrop C.A. // Brit. J. Haematol. 1985. V. 59. P. 541–546.
7. Adams R.A., Evans S.A., Jones J.G. // Biorheology. 1994. V. 31. P. 603–615.
8. Reinhart W.H., Yuang C., Vayo M., Norwich G., Chien S., Skalak R. // Biorheology. 1991. V. 28. P. 537–544.
9. Freedman J., Hoffman J.N. // J. Gen. Physiol. 1979. V. 74. P. 157–161.
10. Ross P.D., Minton A.P. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1977. V. 75. P. 971–973.
11. Лисовская И.Л., Атауллаханов Ф.И., Тужилова Е.Г., Витвицкий В.М. // Биофизика. 1993. V. 39. P. 864–871.
12. Nakamura T., Hasegawa S., Shio H., Uyesaka N. // Blood cells. 1994. V. 20. P. 151–165.
13. Lindercamp J., Meiselman H.J. // Blood. 1982. V. 59. P. 1121–1127.
14. Lew V.L., Raftos J.E., Sorette M., Bookchin R.M., Mohandas N. // Blood. 1995. V. 86. P. 334–341.

Поступила в редакцию
25.II.1998
после доработки
3.VI.1998

**MATHEMATICAL ANALYSIS OF THE EFFECTS OF GEOMETRIC
PARAMETERS AND MECHANICAL PROPERTIES
OF ERYTHROCYTES ON THE FILTERABILITY
OF NONUNIFORM SUSPENSIONS**

Iakovenko E.E., Lisovskaya I.L.*, Ataulakhanov F.I.*

Department of Physics, Lomonosov Moscow State University, 119899 Moscow, Russia;

** National Research Centre for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences,
125167 Moscow, Russia*

Approaches to determination of the shape of erythrocytes distribution in rates of their passage through pores (3μ in diameter) of a membrane filter by processing the data on changes in the flow rates of erythrocyte suspensions with time (filtration curves) are discussed. We considered the case when the suspension consisted of two subpopulations of erythrocytes differing by a single parameter. Using the model describing the erythrocyte passage through a pore and the model describing filtration of a nonuniform suspension, we analyzed how filtration kinetics of such suspensions depends on the relative contents of the subpopulations and their rheological characteristics. It was shown that the filtration rate of the major subpopulation, the filtration rate of the minor abnormal subpopulation, and their relative contents could be determined from analysis of filtration curves. It can be done in the case when the filtration rate of cells of the minor subpopulation is at least by an order of magnitude lower than the filtration rate of cells of the major subpopulation. Thus we can register the presence of a minor subpopulation in the range of 0.5–1%. If filtration curves are recorded at various osmolalities, their analysis makes it possible to determine the surface area, intracellular viscosity, and membrane rigidity of cells of the major subpopulation and, in certain cases, these parameters for cells of the minor subpopulation.