

УДК 612.13

## АНАЛИЗ ФИЛЬТРУЕМОСТИ НЕОДНОРОДНЫХ СУСПЕНЗИЙ ЭРИТРОЦИТОВ

© 2001 г. **Е.Е. Яковенко, Ю.М. Розенберг, С.В. Колодей, И.Л. Лисовская, Ф.И. Атауллаханов**

*Гематологический центр Российской академии медицинских наук,  
123167 Москва, Новозыковский проезд, д. 4а; факс (095) 212-88-70;*

*электронная почта: Fazli@blood.ru*

Поступила в редакцию 16.07.1999 г.

После доработки 15.12.1999 г.

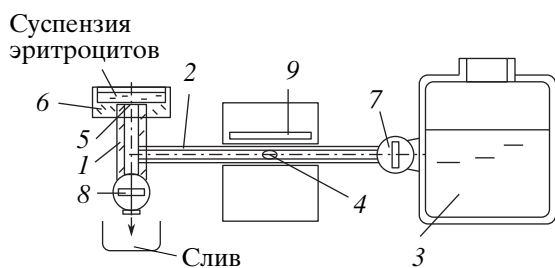
Используя модель прохождения через пору одиночного эритроцита и модель фильтрации неоднородной суспензии, мы рассмотрели зависимость кинетики протекания через фильтр суспензии эритроцитов при постоянном давлении от характера распределения клеток суспензии по параметрам, определяющим их реологические свойства, при различных значениях осмотичности ресуспендирующей среды (в диапазоне от 200 до 550 мосМ). В случае однородной суспензии эритроцитов скорость протекания суспензии быстро (менее чем за 100 мс при гематокрите 5%) достигает стационарного значения. В случае неоднородной суспензии стационарное значение скорости протекания суспензии устанавливается за гораздо большие времена (1–10 с) или не устанавливается вовсе. Показано, что зная поведение зависимости скорости протекания суспензии от времени (фильтрационной кривой) при различных значениях осмотичности ресуспендирующей среды  $u$ , можно получить информацию о характере распределения эритроцитов. Разработанный нами алгоритм обработки фильтрационных кривых позволяет оценить скорость ( $w$ ) прохождения через пору фильтра основной части клеток (клеток центра распределения) и ширину распределения (коэффициент вариации). С помощью математической модели прохождения эритроцита через пору на основании полученной зависимости  $w(u)$  можно количественно оценить площадь поверхности, содержание гемоглобина, коэффициент осмотической чувствительности, объем и параметры, характеризующие влияние вязкости внутриклеточного содержимого и механических свойств эритроцита на  $w$ , для клеток центра распределения. Показано, что имеющиеся экспериментальные данные могут быть объяснены только в предположении, что площадь поверхности, содержание гемоглобина и коэффициент осмотической чувствительности в эритроците положительно скоррелированы.

Известно, что эритроциты в крови характеризуются непрерывными распределениями по площади поверхности, объему, количеству и концентрации гемоглобина [1, 2]. Эти распределения отражают как изначальные различия эритроцитов [2], так и гетерогенность, возникающую в результате старения улиток в кровотоке [1]. Способность эритроцитов проходить через узкие поры определяется отношением площади поверхности к объему, объемом эритроцита, вязкостью внутриклеточного содержимого и механическими свойствами мембраны и клетки в целом [3]. характер распределения эритроцитов по этим параметрам влияет на процесс протекания суспензии эритроцитов через мембранный фильтр [4–7].

Модель, описывающая фильтрацию неоднородной суспензии эритроцитов при постоянном давлении, была представлена в работах [8, 9]. авторы рассматривали суспензию клеток, состоящую из трех однородных субпопуляций: эритроцитов, “быстрых” лейкоцитов (лимфоциты и гранулоциты) и “медленных” (моноциты). Для случая, когда

скорости прохождения через пору и концентрации клеток этих субпопуляций существенно различаются (на 2–3 порядка), был предложен способ распределения этих параметров на основе кривых зависимости от времени скорости протекания суспензии через фильтр [9]. Однако аналитического решения в общем случае, когда на скорости прохождения через пору и концентрации клеток не накладываются ограничения, в цитированных работах не найдено.

В нашей предыдущей работе [10] была использована модель Джонса [8] для описания процесса фильтрации суспензии, состоящей из двух субпопуляций эритроцитов, различающихся по концентрациям и скоростям прохождения через поры фильтра. Было получено аналитическое решение системы уравнений для общего случая. Используя модель прохождения эритроцита через узкий канал [11], мы рассмотрели зависимость кинетики протекания суспензии эритроцитов от соотношения концентраций и реологических характеристик составляющих ее субпопуляций. Было показано,



**Рис. 1.** Схема фильтрометра. 1 – колонка; 2 – измерительная трубка; 3 – бак; 4 – пузырек воздуха; 5 – фильтр; 6 – ячейка; 7 и 8 – краны; 9 – ПЗС-матрица. Пояснения

что исследуя зависимость скорости протекания суспензии от времени, можно определить скорость прохождения через пору эритроцитов субпопуляции с более высокой концентрацией (основной субпопуляции). Скорость прохождения через пору клеток примесной субпопуляции и ее процентное содержание можно определить в случае, когда эта скорость по крайней мере на порядок меньше скорости прохождения через пору клеток основной субпопуляции. При этом оказывается возможным зарегистрировать присутствие в суспензии малой примеси (0,5–1%) плохо фильтрующихся клеток. Кроме того, была рассмотрена зависимость кинетики протекания суспензии, содержащей два типа клеток, от осмотичности ресуспендирующей среды. Исследование этой зависимости позволяет определять для клеток основной субпопуляции площадь поверхности, количество гемоглобина и параметры, характеризующие внутриклеточную вязкость и механические свойства мембраны. В некоторых случаях оказывается возможным оценивать эти параметры для эритроцитов примеси.

В данной работе мы рассматриваем модель фильтрации гетерогенной суспензии эритроцитов, имеющих непрерывное распределение по параметрам, определяющим их реологические свойства. Используя модель прохождения одиночного эритроцита через узкий канал [11], мы модифицировали модель фильтрования неоднородной суспензии [9, 10] для описания кинетики протекания через фильтр суспензии [9, 10] для описания кинетики протекания через фильтр суспензии эритроцитов в зависимости от характера распределения клеток по параметрам. Проведенный анализ показал, что исследование нестационарной кинетики фильтрования неоднородной суспензии эритроцитов при разных значениях осмотичности позволяет определить реологические параметры клеток, соответствующие центру распределения и некоторые характеристики самого распределения.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Кровь здоровых доноров, взятую в день эксперимента на антикоагулянте CPD-A, отмывали два раза в буфере, содержащем 10 мМ HEPES, 5 мМ KCl, 140 мМ NaCl, pH 7,40, осмотичность 300 мосМ (HBS). Верхний слой клеток, обогащенный лейкоцитами и тромбоцитами, удаляли. Третий раз эритроциты отмывали в буфере, содержащем 20 мМ HEPES, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 128 мМ NaCl, 5 мМ глюкозы, 0,2% альбумина, pH 7,40, осмотичность 300 мосМ. Содержание лейкоцитов в суспензии не превышало 1 на 2000 эритроцитов. Клетки, ресуспендированные в этом же буфере при гематокрите  $Hct = 30\text{--}40\%$ , находились при комнатной температуре 20–22°C не более 3 ч. Непосредственно перед измерением клетки ресуспендировали при  $Hct = 5\%$  в HBS с различным содержанием NaCl и соответственно с различной осмотичностью. Фильтрационные измерения для каждого значения осмотичности проводили в термостатированной системе при температуре  $25.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$  через 2 мин после разведения. Перед измерениями все буферные растворы пропускали через фильтры Milipore 0.45 мкм.

Среднее содержание гемоглобина в клетке и средний объем эритроцитов определяли с помощью гематологического автоматического анализатора Cobas Micros (La Roch).

Для проведения данного исследования авторами было разработано устройство (фильтрометр), предназначенное для измерения объема жидкости (буфера или суспензии), протекающей через фильтр при постоянном давлении в диапазоне времен 0,1–12 с с начала фильтрации. Схема фильтрометра представлена на рис. 1. Перед началом измерения заполняли буфером последовательно соединенные друг с другом колонку 1, измерительную трубку 2 и бак 3. В измерительную трубку 2 помещали пузырек воздуха 4, который полностью перекрывал ее просвет. На колонку сверху устанавливали фильтр 5, который фиксировали с помощью ячейки 6. Суспензию наливали в ячейку и поворотом крана 7 запускали фильтрацию. После окончания фильтрации одновременным поворотом кранов 7 и 8 пузырек возвращали в исходное положение. Перепад давления на фильтре в процессе фильтрации обеспечивался разностью уровней жидкости в ячейке и в баке и составлял  $1.50 \pm 0.05$  см H<sub>2</sub>O. Измерение зависимости объема протекшей через фильтр жидкости от времени  $V_{\text{сusp}}(t)$  осуществляли методом оптического сканирования положения пузырька в измерительной трубке при помощи ПЗС – матрицы (9). Частота опроса матрицы составляла 900 Гц, пространственное разрешение составляло 10 точек/мм. Разрешение по объему составляло 0.13 мкл. Полученные значения объема усредняли по 7 последо-

вательным точкам. При этом для полученных значений объема временное разрешение составляло 0.037 с. перед фильтрацией суспензии определяли объемную скорость протекания буфера через фильтр. Эта скорость составляла  $3.88 \pm 0.04$  мкл/с.

В работе использовали любезно предоставленный проф. N. Uyesaka и N7 Kawa (Nippon Medical School) никелевый фильтр [12] толщиной  $11 \pm 0.01$  мкм с порами, диаметр цилиндрической части которых составляет  $3.10 \pm 0.01$  мкм, а длина  $3.65 \pm 0.01$  мкм. Все измерения проводили на одном и том же фильтре, который перед каждым измерением отмывали, используя ультразвуковую обработку [13].

### ОБРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

Согласно модели, предложенной в [10], в случае суспензии, состоящей из нескольких субпопуляций эритроцитов, зависимость скорости ее протекания через фильтр от времени описывается суммой экспонент, число которых равно количеству субпопуляций. В случае непрерывного распределения зависимость скорости протекания от времени перестает быть суммой конечного числа экспонент. Однако в пределах точности эксперимента она хорошо описывается суммой не более, чем трех экспонент (см. формулу (15)). изменение объема во времени может быть представлено комбинацией тех же экспонент и линейной функции от времени. Поэтому экспериментальную зависимость протекшего через фильтр объема суспензии от времени  $V_{\text{susp}}(t)$  мы аппроксимировали, используя программу "Origin", функцией

$$V_{\text{susp}}(t) = (Q_b - A_1 - A_2 - A_3)t - A_1 t_1 \exp\left(-\frac{t}{t_1}\right) - A_2 t_2 \exp\left(-\frac{t}{t_2}\right) - A_3 t_3 \exp\left(-\frac{t}{t_3}\right), \quad (1)$$

где  $Q_b$  – объемная скорость протекания буфера через фильтр.

Относительную скорость прохождения эритроцитов центра распределения через пору фильтра определяли по формуле:

$$\frac{w_c}{w_b} = \frac{Hct \cdot Q_{\text{st}0}}{(Q_b - Q_{\text{st}0} + Hct \cdot Q_{\text{st}0})} \quad (2)$$

где  $w_c$  – объемная скорость прохождения эритроцита через пору фильтра;  $Q_{\text{st}0} = Q_b - A_1$ .

Затем полученную зависимость относительной скорости прохождения эритроцитов через пору от осмотичности среды  $w_c(u)w_b$  аппроксимировали в программе "Origin" в соответствии с моделью, предложенной в [11] (обозначим ее модель I):

$$\frac{w_c}{w_b} = \frac{1}{a_0 \exp\left(\frac{y_1 H u}{f}\right) + \frac{b_0}{\left(V_{\text{cr}} - \frac{H}{H b_0} - \frac{f}{u}\right)^{1.5}}}, \quad (3)$$

где  $y_1 = 0.0036$  л/г;  $H$  – количество гемоглобина в эритроците (масса);  $f$  – коэффициент осмотической чувствительности (параметр в формуле зависимости объема эритроцита  $V$  от осмотичности среды  $u$ :  $V = H/Hb_0 + f/u$  [14]);  $Hb_0 = 694.4$  г/л – предельная концентрация гемоглобина в клетке;  $V_{\text{cr}}$  – критический объем эритроцита (максимальный объем эритроцита с данной площадью поверхности, при котором эритроцит еще способен пройти через пору с заданными геометрическими размерами) (см. вставку на рис. 2);  $a_0, b_0$  – параметры, характеризующие влияние вязкости гемоглобина и механических свойств эритроцита соответственно на скорость прохождения эритроцита через пору.

Значение  $f$  рассчитано по формуле  $f = 300(V - H/Hb_0)$ , где параметры  $V$  и  $H$  были определены с помощью гематологического автоматического анализатора. В результате аппроксимации кривых  $w_c(u)/w_b$  определяли значения критического объема эритроцитов  $V_{\text{cr}}$  и параметров  $a_0$  и  $b_0$ . Значение площади поверхности определяли из формулы, полученной в работе [11]:

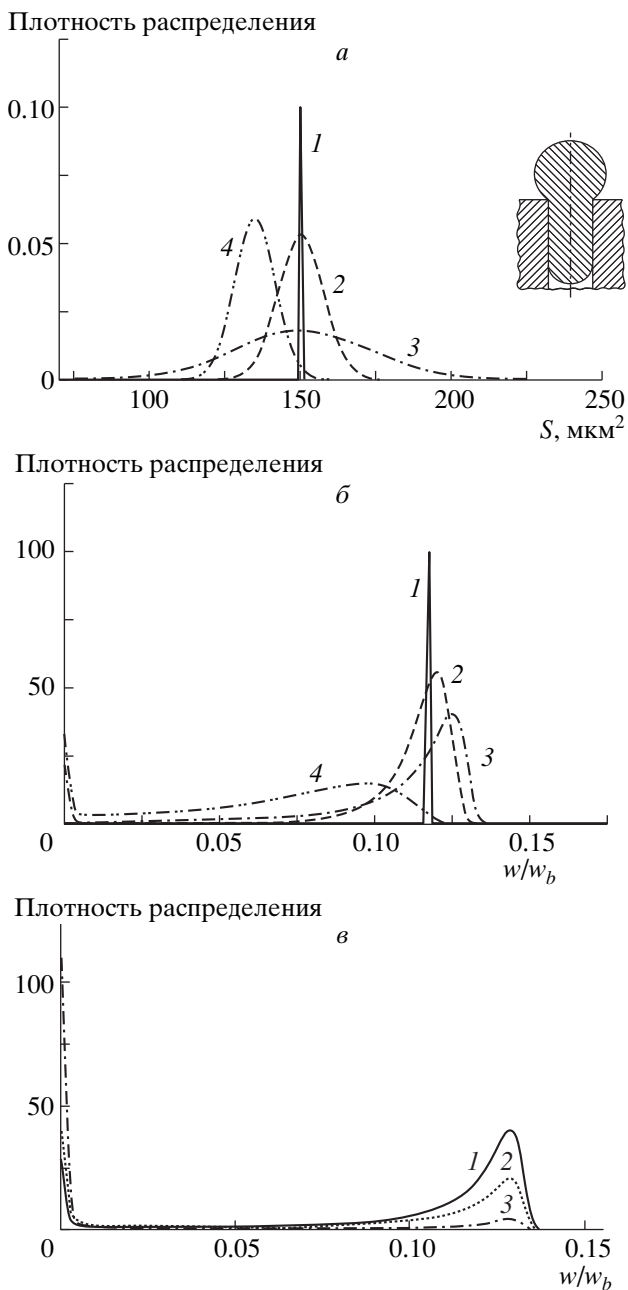
$$V_{\text{cr}} = \frac{dS}{4} - \frac{\pi d^3}{12} \quad \text{если } S < \pi d^2 + \pi dl$$

$$V_{\text{cr}} = \frac{\pi d^2 l}{4} + \frac{(S - \pi dl)^2}{3 \left(8\pi \left(S - \pi d \left(l + \frac{d}{2}\right)\right)\right)^{0.5}} - \frac{\pi d^2 (S - \pi dl)}{6 \left(8\pi \left(S - \pi d \left(l + \frac{d}{2}\right)\right)\right)^{0.5}} + \frac{d^2 \left(8\pi \left(S - \pi d \left(l + \frac{d}{2}\right)\right)\right)^{0.5}}{24}, \quad (4)$$

если  $S > \pi d^2 + \pi dl$ ,

где  $d$  – диаметр поры фильтра;  $l$  – длина поры фильтра.

Полученные параметры клеток центра распределения использовали в дальнейшем для расчета зависимости объемной скорости и объема суспензии, протекшей через фильтр, от времени для различных видов распределений эритроцитов. Ширину распределения эритроцитов по площади поверхности, количеству гемоглобина в клетке и коэффициенту осмотической чувствительности определяли, минимизируя квадратичное отклонение теоретических кривых  $V_{\text{susp}}(t)$  от экспериментальных данных при различных значениях осмотичности среды.



**Рис. 2.** Плотность распределения эритроцитов по площади поверхности  $S$  (а) и по относительной скорости  $w/w_b$  прохождения через пору в суспензии (б) и в фильтре в разные моменты времени от начала фильтрования (в). На вставке представлено схематическое изображение находящегося в поре фильтра эритроцита, объем которого больше критического для данной поры. Здесь и далее диаметр поры  $d = 3,1$  мкм, длина поры  $l = 3,65$  мкм, давление над фильтром  $1,5$  см  $H_2O$ , вязкость буферного раствора  $q = 1 \times 10^7$  г/(мкм с), гематокрит суспензии  $Hct = 5\%$ .  $a_0 = 0,979$ ,  $b_0 = 176$  мкм $^{4,5}$ ,  $H = 29,7 \times 10^{-12}$  г,  $f = 16000$  мкм $^3$  мосМ. Эритроциты имеют нормальное распределение по  $S_c$  параметрами; а, б:  $S_c = 150$  мкм $^2$ ,  $CV_S = 0$  (1),  $S_c = 150$  мкм $^2$ ,  $CV_S = 5\%$  (2),  $S_c = 150$  мкм $^2$ ,  $CV_S = 15\%$  (3),  $S_c = 135$  мкм $^2$ ,  $CV_S = 5\%$  (4). в:  $S_c = 150$  мкм $^2$ ,  $CV_S = 15\%$ ; 1 – в суспензии; 2 – время от начала фильтрования  $t = 50$  мс; 3 – время от начала фильтрования  $t = 300$  мс

## МЕТОДЫ ЧИСЛЕННОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Для проведения численных расчетов была написана программа на языке 'Pascal' (Borland), которая для заданных распределений клеток по площади поверхности, количеству гемоглобина в клетке и коэффициенту осмотической чувствительности позволяла определять объемную скорость протекания суспензии эритроцитов через фильтр и объем протекшей суспензии в зависимости от времени. В качестве разностной схемы решений интегро-дифференциального уравнения (7) относительно плотности распределения числа пор, занятых эритроцитами, использовали простую схему Эйлера [15]. На каждом шаге по времени рассчитывали плотность распределения числа пор, занятых эритроцитами, скорость протекания суспензии через фильтр и объем занятых эритроцитами, скорость протекания суспензии через фильтр и объем протекшей суспензии. Вычисления проводили с автоматическим выбором шага по времени [16]. Независимые распределения эритроцитов по площади поверхности, количеству гемоглобина в клетке и коэффициенту осмотической чувствительности генерировали в пакете Excel.

## МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Кинетика протекания через фильтр неоднородной суспензии эритроцитов. Рассмотрим суспензию, в которой эритроциты распределены по параметрам, определяющим их реологические свойства. Как следует из моделей I, такими параметрами являются площадь поверхности  $S$ , коэффициент  $F$ , количество гемоглобина в клетке  $H$ , коэффициенты  $a_0$  и  $b_0$ , характеризующие влияние вязкости внутриклеточного содержимого и механических свойств эритроцита соответственно на скорость прохождения эритроцита через пору. Пусть выполняются следующие предположения: 1) все поры в фильтре одинаковы; 2) в поре находится не больше одного эритроцита; 3) когда клетка находится в поре, буфер через эту пору не течет, 4) оседание эритроцитов за время протекания суспензии пренебрежимо мало.

Следствием последних двух предположений является то, что гематокрит суспензии над фильтром не меняется. Это можно пояснить следующим образом. Поток суспензии через фильтр можно представить как суперпозицию потоков через одну пору. Поток через нее определяется перепадом давлений, который зависит от высоты столба жидкости над фильтром и не зависит от состояния соседних пор – заняты они эритроцитами или свободны. При этом в столбе суспензии на порой гематокрит не меняется независимо от того, занята пора эритроцитом или свободна.

Модель протекания суспензии эритроцитов была предложена Джонсом и соавт. в работе [9].

Авторы предполагали, что суспензия состоит из трех однородных субпопуляций: эритроцитов, “быстрых” лейкоцитов (лимфоциты и гранулоциты) и “медленных” (моноциты). Если пренебречь скоростью прохождения через пору фильтра эритроцитов и лейкоцитов по сравнению со скоростью протекания буфера, то изменение числа пор, занятых клетками трех различных субпопуляций, в единицу времени описывается уравнениями:

$$\frac{dP_i}{dt} = (T - P_1 - P_2 - P_3)w_b n_i - \frac{1}{t_i} P_i, \quad (5)$$

где  $P_i$  ( $i = 1, 2, 3$ ) – число пор, занятых эритроцитами, “быстрыми” лейкоцитами и моноцитами соответственно;  $T$  – общее число пор на фильтре  $n_i$  ( $i = 1, 3, 5$ ) – число эритроцитов, “быстрых” лейкоцитов и моноцитов в единице объема соответственно;  $w_b$  – объемная скорость протекания буфера через пору;  $t_i$  – время прохождения через ленок пору.

Первое слагаемое в формуле (5) описывает процесс поступления клеток на фильтр. Он пропорционален объемной скорости протекания суспензии через фильтр и числу клеток в единице объема суспензии. Объемная скорость протекания суспензии через фильтр  $Q$  описывается уравнением:

$$Q = (T - P_1 - P_2 - P_3)w_b. \quad (6)$$

Второе слагаемое в формуле (5) соответствует процессу выхода клеток из пор. Он пропорционален числу пор, занятых клетками, и обратно пропорционален времени прохождения клетки через пору.

Мы обобщили модель [9] на случай суспензии эритроцитов, имеющих непрерывное распределение по параметрам, влияющим на скорость прохождения эритроцитов через пору. При этом мы не пренебрегали скоростью прохождения эритроцита через пору по сравнению со скоростью протекания буфера через пору. В этом случае изменение плотности числа пор  $p(x)$  (число пор, занятых клетками с параметрами, лежащими в диапазоне  $(x, x + dx)$ , деленное на  $dx$ ), занятых каждым типом клеток в процессе фильтрации, описывается уравнением:

$$\frac{dp(x)}{dt} = \left( \left( T - \int_{x_0}^{x_n} p(x) dx \right) w_b + \int_{x_0}^{x_n} p(x) w(x) dx \right) \times n(x) - \frac{w(x)}{V(x)} p(x), \quad (7)$$

где  $x$  – параметр, влияющий на скорость прохождения эритроцита через пору, по которому распределены эритроциты. Согласно модели I, этим параметром может быть площадь поверхности, количество гемоглобина в эритроците, коэффициент осмотической чувствительности, параметры  $a_0$  и  $b_0$ . Поскольку эритроциты могут быть распределены по нескольким свойствам, то  $x$  мо-

жет быть векторной величиной. Остальные величины в (7):  $x_0$  и  $x_n$  – минимальное и максимальное значения параметра  $x$  для эритроцитов суспензии;  $w(x)$  – объемная скорость прохождения эритроцита через пору,  $V(x)$  – объем эритроцита;  $n(x)$  – плотность концентрации эритроцитов (число клеток в единице объема с параметрами, лежащими в диапазоне  $(x, x + dx)$ , деленное на  $dx$ ).  $n(x) = \frac{Hct \cdot R(x)}{x_n}$ , где  $R(x)$  – плотность функции

$$\int_{x_0}^{x_n} R(x) V(x) dx$$

распределения эритроцитов суспензии по  $x$ ,  $\int_{x_0}^{x_n} R(x) dx = 1$ .

Первое слагаемое в (7), так же как и в (5), описывает процесс поступления клеток на фильтр, а второе – процесс выхода клеток из фильтра.

Объемная скорость протекания суспензии  $Q$  через фильтр описывается уравнением:

$$Q = \left( T - \int_{x_0}^{x_n} p(x) dx \right) w_b + \int_{x_0}^{x_n} p(x) w(x) dx. \quad (8)$$

Второй интеграл в формуле (8) описывает вклад эритроцитов в скорость протекания суспензии через фильтр.

Если суспензия эритроцитов однородна, т.е. параметр  $x$  имеет одинаковое значение для всех эритроцитов  $x = X$ , сделав замену переменных  $p(x) = P\delta(x - X)$ ,  $n(x) = n\delta(x - X)$ , от уравнений (7) и (8) можно перейти к уравнениям, аналогичным (5) и (6) для дискретного случая. Для однородной суспензии эритроцитов при известных начальных условиях легко получить аналитическое решение уравнения (7) относительно числа пор  $P$ , занятых эритроцитами. Зная число занятых эритроцитами пор, по формуле (8) можно рассчитать скорость протекания суспензии через фильтр. При условии  $P(0) = 0$  в момент времени  $t = 0$  зависимость скорости протекания суспензии от времени описывается формулой:

$$Q(t) = Q_{st0} + A_1 \exp\left(-\frac{t}{t_1}\right), \quad (9)$$

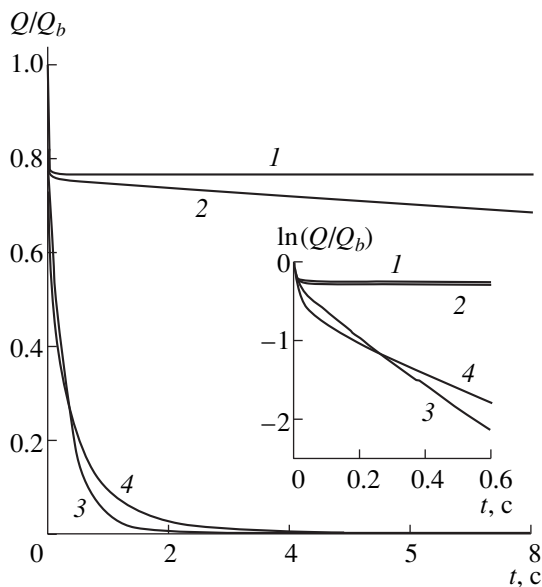
где

$$Q_{st0} = Q_b - A_1, \quad (10)$$

$$A_1 = \frac{Q_b n (w_b - w)}{n(w_b - w) + \frac{w}{V}}, \quad (11)$$

$$t_1 = \frac{1}{n(w_b - w) + \frac{w}{V}}, \quad (12)$$





**Рис. 3.** Кинетические фильтрационные кривые для суспензий эритроцитов, имеющих нормальные распределения по площади поверхности с различными значениями ширины и центра распределения. Нумерация кривых и соответствующие им значения параметров те же, что на рис. 2, а, здесь и далее скорость протекания суспензии через фильтр  $Q$  нормирована на скорость протекания буфера  $Q_b$  через тот же фильтр. На врезке представлена зависимость от времени  $\ln(Q/Q_b)$

где  $Q_b = Tw_b$  – объемная скорость протекания буфера через фильтр;  $n$  – концентрация эритроцитов в суспензии;  $w = w(X)$  – объемная скорость прохождения эритроцита через пору;  $V = V(X)$  – объем эритроцита.

Аналогичное решение уравнения (7) для произвольного вида функции распределения  $R(x)$  не существует. Поэтому мы исследовали численно ситуацию, когда эритроциты имеют нормальное распределение по одному или нескольким параметрам, определяющим их реологические свойства.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Результаты исследования модели протекания неоднородной суспензии через мембранный фильтр.** Связь между распределением клеток по площади поверхности  $S$  с их распределением по скорости прохождения через поры фильтра  $w$ . Нестационарная кинетика фильтрования неоднородной суспензии. Рассмотрим случай, когда ролетки суспензии отличаются друг от друга только по величине площади поверхности  $S$ . Согласно модели I, распределению эритроцитов по  $S$  соответствует некоторое распределение по критическому объему  $V_{cr}$ . Это распределение в свою очередь определяет распределение клеток по скорости их прохождения через поры фильтра  $w$ .

Форма последнего распределения будет отличаться от исходной формы распределения по  $S$ , так как  $w$  зависит от  $S$  нелинейно. Пусть эритроциты распределены по  $S$  в соответствии с распределением Гаусса с центром  $S_c$  и коэффициентом вариации  $CV_S$ , равным отношению среднего квадратического отклонения к центру распределения. В дальнейшем под шириной распределения мы будем понимать коэффициент вариации, выраженный в процентах. По модели I из распределения по  $S$  можно рассчитать плотность распределения  $r$  эритроцитов по  $w$ :  $r(w) = R(S)dS/dw$ . На рис. 2, б показаны распределения по  $w$ , соответствующие распределениям по площади поверхности, имеющим различную ширину. Видно, что уширение распределения по площади поверхности меняет не только ширину, но и форму распределения по  $w$ . Максимум смещается вправо и появляется все больше плохо фильтрующихся клеток. Сдвиг распределения по  $S$  влево приводит к сдвигу и уширению распределения по  $w$  (рис. 2, б, кривая 4).

Зная форму распределения эритроцитов по  $S$ , можно численно решить уравнение (7) и по формуле (8) рассчитать зависимость скорости протекания через фильтр суспензии эритроцитов от времени  $Q(t)$ . Такую зависимость в дальнейшем будем называть кинетической фильтрационной кривой. Кинетические фильтрационные кривые могут быть получены в эксперименте. Поэтому исследование того, какую информацию о распределении клеток можно получить с их помощью, представляет особый интерес.

На рис. 3 представлены кинетические фильтрационные кривые для однородной и неоднородных суспензий для тех же распределений, что изображены на рис. 2, а, при изотонических условиях. При нулевой ширине распределения (что соответствует однородной суспензии) сразу после переходного процесса устанавливается стационарная скорость течения  $Q_{st0}$  (рис. 3, кривая 1). В случае неоднородной суспензии установлению стационарной скорости протекания суспензии предшествует участок медленно спада (рис. 3, кривые 2–4). На этом участке падение  $Q$  тем заметнее, чем больше ширина распределения. При большой ширине распределения, когда в суспензии присутствуют много плохо фильтрующихся клеток, фильтрационная кривая довольно быстро спадает до нуля. В этом случае фильтрационная кривая не описывается одной экспонентой, что хорошо видно в полулогарифмическом масштабе (рис. 3, вставка).

Качество характер фильтрационной кривой для неоднородной суспензии можно объяснить следующим образом. В начальный момент времени через фильтр проходит только буфер, так что скорость протекания суспензии равна скорости

протекания буфера. Вероятность поступления на фильтр клеток центра распределения (основной субпопуляции клеток) больше, чем клеток краев распределения. Поэтому в начале фильтрации суспензии они составляют основную часть клеток в фильтре, и скорость протекания суспензии определяется ими. В системе быстро достигается квазистационарная скорость протекания суспензии  $Q_{st0}$ , величина которой определяется свойствами клеток центра распределения. Влияние клеток, соответствующих краям распределения, на скорость протекания суспензии  $Q$  начинает сказываться позднее. Это влияние тем заметнее, чем больше их содержание в суспензии и чем медленнее они проходят через пору фильтра. На рис. 2, в показаны распределения эритроцитов, находящихся в фильтре, по скорости прохождения через пору для разных моментов времени.

Время установления и величина стационарной скорости протекания суспензии  $Q_{st}$  зависит от гематокрита суспензии и от формы распределения клеток суспензии по скоростям. Если все клетки суспензии проходят через поры (для всех клеток  $w > 0$ ), то устанавливается ненулевая скорость протекания суспензии  $Q_{st} > 0$ . Если же в суспензии есть клетки, для которых  $w = 0$ , то скорость протекания суспензии обязательно упадет до нуля, так как рано или поздно эти клетки забьют все поры фильтра.

Если из эксперимента получена оценка стационарной скорости  $Q_{st0}$  протекания однородной суспензии, состоящей из клеток центра распределения по  $S$ , то из нее можно рассчитать значение скорости прохождения через пору  $w_c$  для этих клеток. Рассмотрим, как получить эту оценку.

Ранее было показано, как это можно сделать для суспензии, состоящей из двух субпопуляций эритроцитов, сильно различающихся по скоростям прохождения через пору и концентрациям ( $w_2 \ll w_1, n_2 \ll n_1$ ) [10]. В этом случае зависимость скорости протекания суспензии от времени описывается суммой двух экспоненциальных функций:

$$Q(t) = Q_b - A_1 - A_2 + A_1 \exp\left(-\frac{t}{t_1}\right) + A_2 \exp\left(-\frac{t}{t_2}\right). \quad (13)$$

Было показано, что параметры первой экспоненты  $A_1, t_1$ , относящиеся к начальному участку фильтрационной кривой, определяются, в первую очередь скоростью прохождения через пору клеток основной субпопуляции  $w_1$  и общей концентрации клеток  $n$ . При этом параметры  $A_1, t_1$  описываются формулами (11) и (12), где  $w = w_1, n = n_1 + n_2$  (в предположении, что объемы эритроцитов двух субпопуляций  $V_1$  и  $V_2$  примерно одинаковы, гематокрит суспензии  $Hct \approx nV_1$ ). В качест-

ве оценки скорости протекания основной субпопуляции  $Q_{st0}$  можно использовать разность  $Q_b - A_1$ . Ошибка определения  $Q_{st0}$  будет зависеть от того, насколько различны две субпопуляции по концентрации и скорости прохождения через пору эритроцитов. Если субпопуляции различаются так, что:  $w_1 = 0.1w_b, w_2 = 0.1w_1, n_2/n_1 = 0,1$ ; и гематокрит суспензии равен 5%, то эта ошибка составляет около 3%. Зная величину  $Q_{st0}$ , мы из формулы (11) можем получить значение относительной скорости прохождения через пору клеток основной субпопуляции  $w_1$ :

$$\frac{w_1}{w_b} = \frac{nV_1(Q_b - A_1)}{A_1 + nV_1(Q_b - A_1)} \approx \frac{Hct \cdot Q_{st0}}{((Q_b - Q_{st0}) + Hct \cdot Q_{st0})}. \quad (14)$$

Ошибка определения величины  $w_1$  при ошибке определения  $Q_{st0}$  3% составляет 6%.

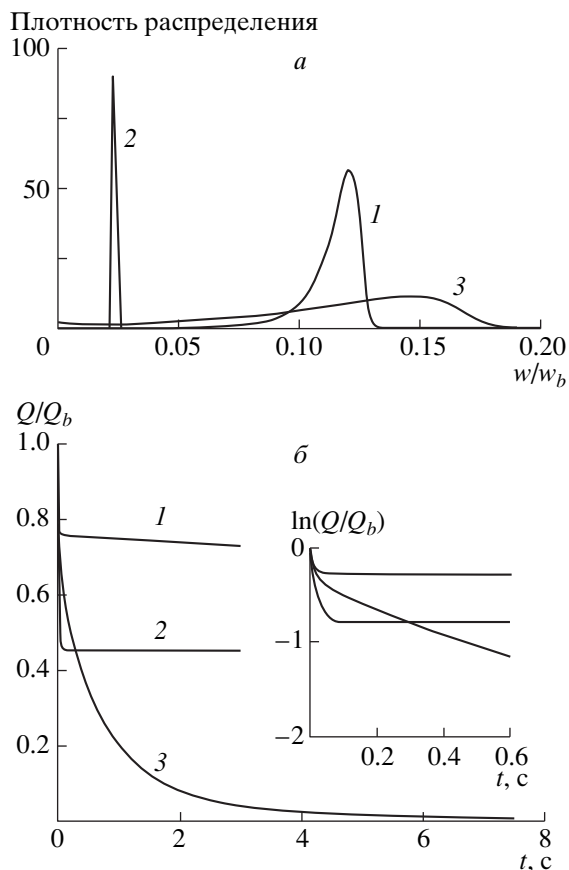
В случае не слишком широких непрерывных распределений скорость  $Q_{st0}$  можно оценить аналогичным образом. В этом случае теоретические фильтрационные кривые достаточно хорошо аппроксимируются суммой не более трех экспоненциальных функций в зависимости от ширины распределения по  $S$ :

$$Q(t) = Q_b - A_1 - A_2 - A_3 + A_1 \exp\left(-\frac{t}{t_1}\right) + A_2 \exp\left(-\frac{t}{t_2}\right) + A_3 \exp\left(-\frac{t}{t_3}\right). \quad (15)$$

Предэкспоненциальный множитель  $A_1$  при первой экспоненте ( $t_1 < t_2 < t_3$ ), как и в предыдущем случае, можно использовать для расчета  $Q_{st0}$ . Причем ошибка определения  $Q_{st0}$  с помощью данного алгоритма будет больше, чем шире распределение эритроцитов по скорости прохождения через пору  $w$ , т.е. чем шире определение по  $S$ . При изотопической осмотичности среды ошибка определения  $Q_{st0}$  составляет около 7% для ширины распределения по  $S$  10% (при гематокрите  $Hct = 5\%$ , давлении над фильтром 1.5 см  $H_2O$ , параметрах поры  $d = 3.1$  мкм,  $t$  (3,65 мкм). Зная  $Q_{st0}$  по формуле (2), аналогичной формуле (14), можно рассчитать относительную скорость эритроцитов центра распределения  $w_c$ . При этом ошибка определения  $w_c$  составляет 15%.

Таким образом, в случае непрерывного распределения эритроцитов по площади поверхности (и соответственно скорости прохождения через пору) можно оценить скорость прохождения через пору для эритроцитов центра распределения.

*Влияние осмотичности и характера распределения эритроцитов по площади поверхности на кинетику фильтрации неоднородной суспен-*



**Рис. 4.** Влияние осмотичности среды  $u$  на характер распределения по относительной скорости  $w/w_b$  прохождения эритроцита через точку (а) и на вид кинетических фильтрационных кривых (б). Значения осмотичности среды  $u$ , мосМ 300 (1) 560 (2) 240 (3). На врезке представлена зависимость от времени  $\ln(Q/Q_b)$ . Нумерация кривых сохранена

*зии эритроцитов.* Рассмотрим, как влияет изменение осмотичности ресуспендирующей среды  $u$  на характер кинетических фильтрационных кривых. Модель I предсказывает, что зависимость скорости прохождения эритроцита через пору  $w$  от осмотичности среды имеет максимум в изотонической области и снижается при увеличении и уменьшении осмотичности. В гипотонической области при некотором критическом значении осмотичности  $u = u_{cr}$  скорость обращается в ноль. Значение критической осмотичности сдвигается влево при увеличении площади поверхности, уменьшении количества гемоглобина в клетке и уменьшении коэффициента осмотической чувствительности. Изменение параметров  $a_0$ ,  $b_0$  не приводит к изменению  $u_{cr}$ .

Пусть эритроциты суспензии имеют нормальное распределение по площади поверхности  $S$  с шириной  $CV_S = 5\%$ . Соответствующее распределение по  $w$  в изотонических условиях (при  $u = 300$  мосМ) показано на рис. 4, а, кривая 1. При изменении  $u$  форма распределения эритроцитов по  $w$

меняется, поскольку будет изменяться объем клеток и вязкость внутриклеточного содержимого. При сильном увеличении осмотичности все клетки начинают проходить через фильтр, и величина  $w$  практически перестает зависеть от  $S$ . При этом распределение сильно сжимаемости (рис. 4, а, кривая 2). Суспензия ведет себя как однородная. Скорость прохождения через пору эритроцитов при этом меньше, чем скорость клеток центра распределения в изотонических условиях. Это связано с ростом вязкости внутриклеточного содержимого при увеличении  $u$ . При уменьшении осмотичности все большая часть клеток будет иметь объем, превышающий критический, и скорость прохождения через пору  $w$ , равную нулю (рис. 4, а, кривая 3).

Судить об изменениях формы распределения по  $w$  можно по форме кинетических фильтрационных кривых (рис. 4, б). Увеличение осмотичности и связанное с этим сильное уменьшение ширины распределения по  $w$  ведет к тому, что величина  $Q$  быстро достигает стационарного значения  $Q_{st}$  и далее не меняется (рис. 4, б, кривая 2). Суспензия фильтруется как однородная (см. рис. 3, кривая 1). Уменьшение осмотичности и как следствие увеличение доли нефилтрирующихся клеток, приводит к быстрому падению  $Q$  до нуля (рис. 4, б кривая 3). Как и на рис. 3, на вставке рис. 4 показано изменение формы фильтрационных кривых в полулогарифмическом масштабе. Мы видим, что при низких значениях осмотичности фильтрационная кривая не описывается одной экспонентой.

Наклон участка медленного спада кинетической фильтрационной кривой возрастает как при увеличении ширины распределения  $CV_S$ , так и при уменьшении площади поверхности клеток, соответствующей центру распределения ( $S_c$ ) (см рис. 3, кривая 4). Поэтому, если кинетическая фильтрационная кривая получена при одном значении осмотичности, то однозначно определить  $CV_S$  не удастся. Для получения информации об этом параметре необходимо получить серию кинетических кривых при разных осмотичностях. Оценив на основании этих кривых  $Q_{st0}$ , мы по формуле (2) сможем перейти к зависимости по модели 1 можно оценить параметры клеток центра распределения, в частности  $S_c$ . Ошибка определения  $S_c$  с помощью данного алгоритма составляет 5% для ширины распределения по  $S$  10%. Зная параметры клеток центра распределения из сопоставления кривых  $Q(t)$ , полученных при разных значениях осмотичности среды, можно оценить и ширину распределения.

*Зависимость вида кинетических фильтрационных кривых от характера распределений эритроцитов по одному из параметров  $H$ ,  $f$ ,  $a_0$ ,  $b_0$ .* Мы рассмотрели, как распределение эритроци-



тов по площади поверхности влияет на кинетические фильтрационные кривые  $Q(t)$ . Распределение эритроцитов по содержанию гемоглобина в клетке  $H$  или по коэффициенту осмотической чувствительности  $f$  также влияет на кинетику фильтрации. Увеличение ширины распределения как по  $H$ , так и по  $f$ , будет приводить к увеличению наклона участка медленного спада кривых  $Q(t)$ .

Согласно модели I изменение параметров  $a_0$  и  $b_0$  не приводит к изменению критической осмотичности  $u_{cr}$  (так как  $u_{cr} = f/V_{cr}/S - H/Hb_0$ ) и слабо влияет на величину  $w$  (при изменении этих параметров в 5 раз величина  $w$  меняется не больше, чем в 2 раза). Поэтому при увеличении ширины распределения по этим параметрам слабо изменяется поведение кинетических фильтрационных кривых  $Q(t)$ : при изменении ширины распределения по этим параметрам до 30% стационарные значения скорости протекания суспензии  $Q_{st}$  изменяются на 0,1%.

*Кинетика фильтрования суспензии эритроцитов, различающихся по нескольким параметрам одновременно.* Если бы эритроциты в суспензии различались только по одному параметру, то исследование нестационарной кинетики фильтрования при различных значениях осмотичности позволило бы определить параметры клеток основной субпопуляции и оценить ширину распределений по этому параметру. Однако известно, что эритроциты различаются по ряду параметров одновременно [1,2]. Рассмотрим, как это отражается на форме кинетических фильтрационных кривых  $Q(t)$ . Пусть клетки суспензии распределены одновременно по трем параметрам: площади поверхности  $S$ , содержанию гемоглобина в клетке  $H$  и коэффициенту осмотической чувствительности  $f$ . Если эти распределения независимы, то для результирующего распределения по  $w$  ширина будет приблизительно равна сумме  $CV_w$  для каждого из независимых распределений. Таким образом, если к распределению эритроцитов по  $S$  добавить независимые распределения по  $f$  и  $H$ , то соответствующее распределение по  $w$  уширится. Поскольку изменение ширины распределения по каждому из параметров  $S$ ,  $H$ ,  $f$  приводит к сходным результатам, то в случае независимости распределений увеличение ширины каждого из них приведут к тем же последствиям, что и в случае распределения по одному параметру: наклон фильтрационных кривых  $Q(t)$  увеличится. Если же распределения по параметрам  $S$ ,  $H$ ,  $f$  не являются независимыми, то результирующее распределение по  $w$  может как уширяться, так и сужаться в зависимости от вида связи этими параметрами.

*Экспериментальное исследование нестационарной кинетики фильтрования суспензии эри-*

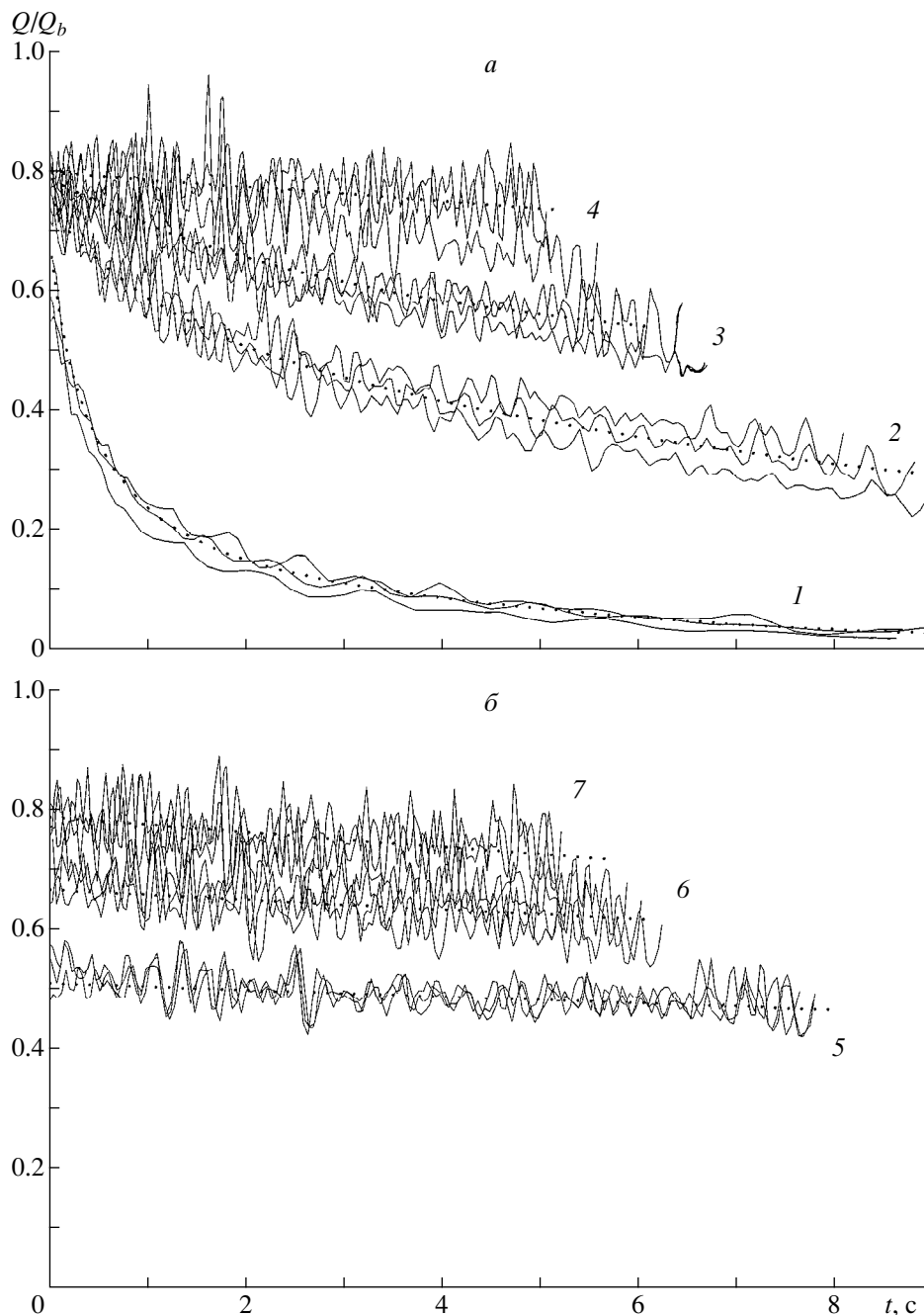
*троцитов.* На рис. 5 представлены типичные кривые зависимости относительной скорости протекания суспензии от времени  $Q(t)/Q_b$ , полученные при различных значениях осмотичности ресуспендирующей среды  $u$  для одного донора численным дифференцированием измеряемой в эксперименте зависимости от времени объема протекшей через фильтр суспензии  $V_{susp}(t)$ . Поведение экспериментальных кривых  $Q(t)/Q_b$  совпадает с предсказаниями модели для неоднородной суспензии эритроцитов. Скорость протекания суспензии уменьшается во времени. Это указывает на неоднородность суспензии нормальных эритроцитов, полученных от здоровых доноров. Скорость уменьшается тем сильнее, чем меньше осмотичность ресуспендирующей среды. По мере возрастания осмотичности наклон фильтрационных кривых уменьшается и в гипертонической области суспензия фильтруется с постоянной скоростью, т.е. как однородная.

На рис. 6 представлена зависимость от осмотичности среды скорости прохождения эритроцитов центра распределения  $w_c(u)/w_b$ , полученная на основании экспериментальных кривых  $Q(t)/Q_b$  (рис. 5). В хорошем согласии с моделью I зависимость  $w_c(u)$  имеет максимум в области изотонической осмотичности и снижается в гипо- и гипертонической областях. Критическая осмотичность для клеток центра распределения составляет около 210 мосМ. Максимальная скорость прохождения через пору этих эритроцитов составляет около 20% от скорости протекания буфера  $w_b$  и достигается при осмотичности ресуспендирующей среды  $u$  около 265 мосМ.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты эксперимента (рис. 5) хорошо согласуются с фильтрационными кривыми, рассчитанными по модели протекания неоднородной суспензии эритроцитов (рис. 4, б). На кривых, соответствующих гипотонической осмотичности, наблюдается медленный спад (рис. 5, а). С ростом осмотичности наклон фильтрационных кривых уменьшается и в гипертонической области суспензия фильтруется с постоянной скоростью (рис. 5, б). Экспериментальные фильтрационные кривые хорошо описываются суммой трех экспонент (13). Результаты такой аппроксимации показаны на рис. 5 пунктирными линиями.

В соответствии с предсказаниями модели I зависимость скорости прохождения от осмотичности среды для клеток центра распределения  $w_c(u)$  имеет максимум в районе изотонической осмотичности (рис. 6). На этом же рисунке приведена теоретическая кривая. Параметры модели получены в результате минимизации отклонения теоретической кривой  $w_c(u)/w_b$  от экспериментальной. На уровне значимости 0.05 по результатам



**Рис. 5.** Кинетические фильтрационные кривые для различных значений осмотичности среды. Пунктиром обозначены аппроксимирующие кривые. Осмотичность среды  $\pi$ , мосМ: 219 (1), 228 (2), 237 (3), 265 (4), 295 (5), 408 (6), 507 (7)

измерений для 5 доноров (3 повтора для каждого) значения параметров для эритроцитов центра распределения составляют:  $S_c = 138 \pm 4 \text{ мкм}^2$ ,  $f_c = 14900 \pm 500 \text{ мкм}^2 \text{ мкм}^3 \text{ мосМ}$ ,  $H_c = 28.9 \pm 1.3 \times 10^{-12} \text{ г}$ ,  $a_{0c} = 0.67 \pm 0.06$ ,  $b_{0c} = 80 \pm 30 \text{ мкм}^{4.5}$ . Значения площади поверхности и количества гемоглобина в эритроците соответствуют известным из литературы [1, 2, 18].

*Анализ распределений эритроцитов по параметрам.* Рассмотрим, какую информацию о фор-

ме распределения эритроцитов по параметрам, определяющим их реологические свойства, и о характере связи между ними можно получить на основе экспериментальных кинетических фильтрационных кривых (рис. 5). Согласно модели I, скорость эритроцита гораздо более чувствительна к изменению площади поверхности  $S$ , количества гемоглобина в клетке  $H$  и коэффициента  $f$ , чем к изменению параметров  $a_0$  и  $b_0$ . Поэтому мы

Теоретические и экспериментальные характеристики распределений эритроцитов по параметрам

Параметр	Среднее		Коэффициент вариации, %				
	Экспериментальные данные	Гипотезы 1-4	Экспериментальные данные	Гипотезы			
				1	2	3	4
$S$ , мкм <sup>2</sup> [1, 17–20]	120–155	138 ± 4	7.4–9	0.6 ± 0.1	8.0 ± 0.8	9.5 ± 0.9	9 ± 1
$H$ , 10 <sup>-12</sup> г [2]	30.3	28.9 ± 1.3	12.5	2.2 ± 0.3	8.0 ± 0.5	10 ± 1	10 ± 1
$f$ , мосМ мкм <sup>3</sup>	–	14900 ± 500	–	3.2 ± 0.1	19 ± 3	8 ± 3	20 ± 4
$w$ , 10 <sup>-5</sup> мкл/с	–	1.42 ± 0.06	–	22 ± 7	50 ± 10	10 ± 3	19 ± 6
$u_{cr}$ , мосМ [7]	185	217 ± 6	5	6 ± 1	5.1 ± 0.6	5.0 ± 0.2	6.2 ± 0.2
$V$ , мкм <sup>3</sup> [1, 2, 18]	90–93	91 ± 3	14–16	3.4 ± 0.3	12 ± 2	9 ± 2	15 ± 3
$S/V$ , мкм <sup>-1</sup> [1, 18]	1.50–1.72	1.52 ± 0.01	3–7.5	4.0 ± 0.3	4.0 ± 0.8	0.4 ± 0.1	6.4 ± 0.7
$H/V$ , 10 <sup>-12</sup> г/мкм <sup>3</sup> [2]	0.327	0.317 ± 0.009	7	1.9 ± 0.1	13 ± 3	2.4 ± 0.8	6 ± 2
[1, 18, 21]				–	?	–	+

Примечание. В столбцах “Экспериментальные данные” указан диапазон значений параметров, приводимый в литературе. В столбцах “Гипотезы 1–4” указано среднее значение и разброс для уровня значимости 0.05 по результатам измерений для 5 доноров (3 повтора для каждого). Значения среднего и коэффициента вариации параметров  $w$ ,  $V$ ,  $S/V$ ,  $H/V$  соответствуют осмотичности ресуспендирующей среды  $u = 300$  мосМ. Экспериментальные значения среднего и ширины распределения параметра  $u_{cr}$  получены для фильтра с диаметром пор  $d = 3.1$  мкм и длиной пор  $l = 7$  мкм [7]. Клетки с меньшей плотностью имеют большую площадь поверхности  $S$ . Знак “+” в этой строке означает, что в рассматриваемом варианте при возрастании  $S$  плотность клеток уменьшается. Знак “?” показывает, что направление изменения  $S$  при уменьшении плотности клеток неопределенно. Знак “–” означает, что при возрастании  $S$  плотность клеток растет.

ограничили наше рассмотрение тремя параметрами  $S$ ,  $H$ ,  $f$ .

Вопрос о том, что распределения эритроцитов по параметрам не являются независимыми, давно обсуждается в литературе [1, 2, 18]. Согласно данным [1, 18] ширина распределения эритроцитов по площади поверхности  $S$  составляет около 7–10%, по объему в изотонических условиях  $V$  14%, по количеству гемоглобина  $H$  – 12,5%. Однако ширина распределения по  $S/V$  составляет не больше 8% [1, 18]. данные работы [2] также указывают на то, что существуют определенные корреляции между параметрами эритроцитов в суспензии: ширина распределения по концентрации гемоглобина составляет 7%. Однако вопрос о том, как именно связаны между собой эти параметры, до сих пор остается нерешенным.

Рассмотрим, как описываются экспериментальные фильтрационные кривые при различных предположениях о характере связи между параметрами  $S$ ,  $G$ ,  $f$ . Мы рассмотрели 4 гипотезы; 1) распределения эритроцитов по  $S$ ,  $H$ ,  $f$  независимы; 2) распределения эритроцитов по  $S$ ,  $H$  независимы, а  $f$  зависит от  $S$  и  $H$ ; 3)  $f$  и  $H$  линейно зависят от  $S$ ; 4)  $H$  зависит линейно от  $S$ , а  $f$  зависит линейно от  $H$  и нелинейно от  $S$ . В таблице приведены данные, касающиеся распределений эритроцитов по различным параметрам, рассчитанные на основании этих гипотез и полученные другими авторами.

1. Распределения эритроцитов по  $S$ ,  $H$ ,  $f$  независимы. В этом случае экспериментальные филь-

трационные кривые хорошо описываются нашей моделью при  $CV_S = 0,6$ ,  $CV_H = 2,2$ ,  $CV_f = 3,2\%$ . Полученные значения  $CV_S$  и  $CV_H$  значительно (в несколько раз) меньше значений ширины распределений, измеренных в работах [1, 2, 18] (см. графу “экспериментальные данные” в таблице). Полученные противоречия результатов аппрокси-

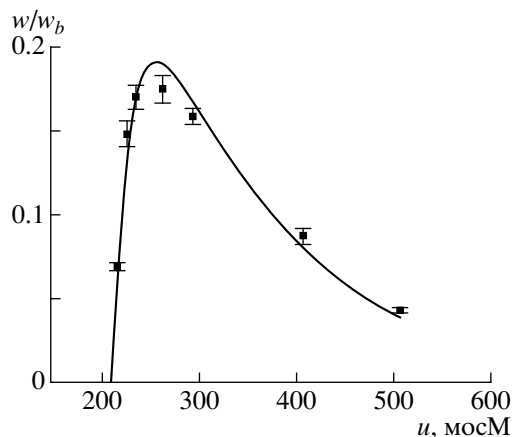


Рис. 6. Относительная скорость  $w_c/w_b$  прохождения через пору фильтра эритроцитов центра распределения, рассчитанная для разных значений осмотичности среды  $u$  по экспериментальным кинетическим фильтрационным кривым. Точками изображены экспериментальные значения. Теоретическая кривая  $w_c(u)/w_b$  получена по модели I с параметрами:  $H_c = 30.7 \times 10^{-12}$  г,  $f_c = 14960$  мкм<sup>2</sup> мосМ,  $a_0 = 0.66$ ,  $b_0 = 44$  мкм<sup>4,5</sup>,  $S_c = 143$  мкм<sup>2</sup>

мации экспериментальных фильтрационных кривых и данных других авторов, касающихся ширины распределения по  $S$  и  $H$ , указывают на то, что в эритроцитах распределения по каким-то из параметров  $S$ ,  $H$ ,  $f$  связаны между собой. Если предположить, что эритроциты распределены только по площади поверхности, то экспериментальные фильтрационные кривые описываются нашей моделью при  $CV_S = 1,6\%$ .

2. Предположим, что в популяции независимо распределены площадь поверхности и содержание гемоглобина, а коэффициент осмотической чувствительности  $f$  линейно зависит от этих параметров:  $f = \alpha + \beta S + \gamma H$ . Это означает, что содержание гемоглобина в эритроцитах с одинаковой площадью поверхности варьирует так же, как и в субпопуляции с другой площадью. Коэффициент осмотической чувствительности является функцией метаболического состояния клетки, и можно предположить, что клетка изменяет свое состояние в соответствии с изменением площади поверхности и содержания гемоглобина. В рамках данной гипотезы удается с хорошей точностью описать фильтрационные кривые, если  $\alpha = -23200$  мкм<sup>3</sup> мосМ;  $\beta = 270$  мкм мосМ;  $\gamma = 3 \times 10^{13}$  мкм<sup>3</sup> мосМ/г.

Хорошее согласие с экспериментальными данными [1, 2, 7, 18] наблюдается для большинства параметров клетки (см. таблицу, гипотеза 2), однако распределение по концентрации гемоглобина получается почти в 2 раза шире, а распределение по количеству гемоглобина в 1,5 раза уже, чем это следует из данных [2].

3. Теперь предположим, что независимо распределенной величиной является только площадь поверхности эритроцитов, а остальные параметры клетки ( $f$  и  $H$ ) однозначно связаны с ней линейными соотношениями вида:  $f = \alpha_1 + \beta_1 S$ ,  $H = \alpha_2 + \beta_2 S$ . По сути такой вариант означает одномерное распределение клеток по параметрам. Эта гипотеза является вариантом гипотезы, предложенной в работе [2]. Авторы предположили, что на ранних стадиях созревания, когда эритроциты имеют шарообразную форму, концентрация гемоглобина в них примерно одинакова, так что эритроцитам с большей поверхностью соответствует большее содержание гемоглобина. В процессе созревания объем клеток уменьшается при неизменном количестве гемоглобина и площади поверхности. Согласно модели I такое предположение приводит к сильным изменениям формы распределения эритроцитов по  $w$  в сравнении со случаем, когда эритроциты распределены по одному параметру  $S$  или  $Y$ , а остальные параметры имеют одинаковые значения во всех клетках. Коэффициенты, связывающие между собой  $S$ ,  $H$  и  $f$ , можно выбрать так, что распределение эритроцитов по  $w$  становится уже и более симметрично относительно центра. Хорошего опи-

сания экспериментальных фильтрационных кривых можно достигнуть при ширине распределения по  $S$  около 10% (соответствующее, распределение по  $H$  имеет ширину 10%), если  $\alpha_1 = 2350$  мкм<sup>3</sup> мосМ;  $\beta_1 = 91$  мкм мосМ;  $\alpha_2 = -1.5 \times 10^{-12}$  г;  $\beta_2 = 0.22 \times 10^{-12}$  г-мкм<sup>2</sup> (см. таблицу, гипотеза 3).

Значения  $CV$  хорошо согласуются со значениями ширины распределений по площади поверхности и содержанию гемоглобина в эритроцитах, полученными в работах [1, 2, 18]. Однако рассмотренный линейный вид связи приводит к тому, что концентрация гемоглобина во всех эритроцитах популяции изменяется незначительно, что противоречит эксперименту. Помимо этого при возрастании площади поверхности в данном рассмотрении плотность гемоглобина в клетке также возрастает, что противоречит данным [1, 3]. Ширина распределения эритроцитов по отношению  $S/V$  и концентрации гемоглобина в данном случае также получается значительно меньше в работах [1, 2, 18].

Мы рассмотрели выше несколько вариантов линейной связи между параметрами эритроцитов, но они не привели к согласованию со всей совокупностью экспериментальных данных.

4. Оказалось, что хорошее согласие с экспериментом дает следующая гипотеза. Как и в предыдущем случае, независимо распределенной величиной является только площадь поверхности эритроцитов и содержание гемоглобина в клетке зависит от нее линейно. При этом коэффициент осмотической чувствительности  $f$  нелинейно зависит от  $S$  и линейно от  $H$ .

$$f = u_{\text{кр}} \left( V_{\text{кр}}(S) - \frac{H_c}{Hb_0} \right) + \beta_1 (H - H_c), \quad (16)$$

где зависимость  $V_{\text{кр}}(S)$  является описывается формулой (4). Формула (16) означает, что, если все клетки имеют одинаковое содержание гемоглобина  $H = H_c$ , то критическая осмотичность  $u_{\text{кр}}$  не зависит от  $S$  и равна  $u_{\text{кр}}$ . Действительно, связь между критическим объемом и коэффициентом осмотической чувствительности задается формулой  $V_{\text{кр}} = \frac{H}{Hb_0} + \frac{f}{u_{\text{кр}}}$  ([11]) и при  $H = H_c$  из формулы (16) следует, что

$$u_{\text{кр}}(S) = \frac{u_{\text{кр}} \left( V_{\text{кр}}(S) - \frac{H_c}{Hb_0} \right)}{V_{\text{кр}}(S) - \frac{H_c}{Hb_0}} = u_{\text{кр}}.$$

Распределение по  $u_{\text{кр}}$  являлось бы дельта-функцией, если бы  $H$  было одинаково для всех клеток суспензии. Предположение о том, что  $H$  является линейной функцией  $S$ , приводит к уширению распределения по  $u_{\text{кр}}$ . Таким образом, мы приходим к модели:

$$f = \alpha_1 + u_{\text{crc}} V_{\text{cr}}(S) + \beta_1 H$$

$$H = \alpha_2 + \beta_2 S,$$

где  $\alpha_1 = -u_{\text{crc}} H_c / H_{b0} - \beta_1 H_c$ . Эта модель хорошо описывает все экспериментальные данные (таблица, гипотеза 4), если  $\alpha_1 = -9300 \text{ мкм}^3 \text{ мосМ}$ ;  $\beta_1 = 1 \times 10^{13} \text{ мкм}^3 \text{ мосМ/гя}$   $\alpha_2 = -3.1 \times 10^{-12} \text{ г}$ ;  $\beta_2 = 0.23 \times 10^{-12} \text{ г-мкм}^2$ ,

В результате проведенного анализа мы пришли к модели, которая согласуется достаточно хорошо со всеми имеющимися экспериментальными данными – кинетическими фильтрационными кривыми и результатами измерений параметров распределений эритроцитов. Наверное, это описание является не единственным возможным, и можно определить другие виды взаимосвязей между параметрами клеток, приводящие к подобному результату. Однако проведенный анализ показал, что параметры клеток связаны между собой таким образом, что достаточно широкие распределения по параметрам – площади поверхности, содержанию гемоглобина, коэффициенту осмотической чувствительности и объему приводят к относительно узким распределениям эритроцитов по фильтруемости. Это означает наличие некоторого метаболического контроля, который для клеток разных размеров обеспечивает такое соответствие этих параметров друг другу, когда все клетки достаточно хорошо проходят через узкие капилляры, что имеет важное функциональное значение.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Waugh R., Mohandas N, Jackson C., Mueller T., Suzuki T., Dale G.L. // Blood. 1992. V. 79. P. 1351–1358.
2. Lew V.L., Raftos J.E., Sorette M., Bookchim R.M., Mohandas N. // Blood. 1995. V. 86. P. 334–341.
3. Chien S. // The Red Blood Cell. New York: Academic, 1975. P. 1031–1133.
4. Stuart J. // Clin. Hemorheology. 1992. V. 12. P. 203–216.
5. Goebel K.M., Lanser K.G. // Biomed. Biochim. acta. 1983. V. 42. P. 102–106.
6. Reinhart W.H., Straub P.W. // Clin. Hemorheology. 1988. V. 8. P. 861–876.
7. Lisovskaya I.L., Shurkhina E.S., Nesterenko V.M., Rozenberg Y.M., Ataullakhanov F.I. // Bioheology. 1998. V. 35. P. 141–153.
8. Jones J.G., Holland B.M., Humphrys J., Quew R., Wardrop C.A.J. // Brit. J. Haematology. 1984. V. 57. P. 457–466.
9. Jones J.G., Adams R.A., Evans S.-A. // Clin. Hemorheology. 1994. V. 14. P. 149–169.
10. Яковенко Е.Е., Лисовская И.Л., Аталлаханов Ф.И. // Биол. мембраны. 1999. Т. 16. С. 364–374.
11. Аталлаханов Ф.И., Витвицкий В.М., Лисовская И.Л., Тужилова Е.Г. // Биофизика. 1994. Т. 39. С. 672–680.
12. Anegawa T., Shio H., Yasuda Y., Fujimoto N., Kameyama M. // Clin. Hemorheology. 1987. V. 7. P. 803–810.
13. Bio Y.Y., Stuart J. // Clin. Hemorheology. 1985. V. 5. P. 437–448.
14. Freedman J., Hoffman J.H. // J. Gen. Physiol. 1979. V. 74. P. 157–185.
15. Hairer E., Norsett S.P., Wanner G. // In: Solving ordinary differential equations I. Nonstiff problems. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 1990. P. 132–134.
16. Hairer E., Norsett S.P., Wanner G. // Solving ordinary differential equations I. Nonstiff problems. Berlin; Heidelberg; New York: Springer-Verlag 1990. P. 164–169.
17. Nash G.B., Wyard S.J. // Biorheology. 1980. V. 17. P. 479–484.
18. Linderkamp J., Meiselman H.J., Blood. 1982. V. 59. P. 1121–1127.
19. Meier W., Kucerca W., Lerche D., Baumler H. // Stud. Biophys. 1983. V. 93. P. 101–109.
20. Clark M.R. // Blood Cells. 1989. V. 15. P. 427–439.
21. Greenwalt T.J., Lau F.O. // Brit. J. Haematol. 1978. V. 39. P. 545–550.

## Analysis of Filtration Kinetics of Heterogeneous Erythrocyte Suspensions

E.E. Yakovenko, Y.M. Rozenberg, I.L. Lisovskaya, F.I. Ataullakhanov

National Research Centre for Hematology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow.

Using the model of the passage of a single erythrocyte a narrow channel and the model of heterogeneous suspension filtration, we considered the dependence of filtration kinetics of such suspensions at constant pressure on the parameters influencing their rheological characteristics various osmolarities of a suspending medium (ranging from 200 to 550 mosM). In case of the uniform suspension, the filtration rate reaches its stationary value quickly (for less than 100 ms). In case of the heterogeneous suspension, the filtration rate becomes stationary in larger intervals of time (1–10 s) or does not become stationary at all. It was shown that the dependence of the suspension filtration rates in time (filtration curves) at various medium osmolarities (u) might be helpful in obtaining the information about the shape of erythrocyte distribution. We developed the algorithm of processing the filtration curves which allows us to estimate the rate of passage through a pore (w) for erythrocyte of the distribution centre and the coefficient of deviation of the distribution. The mathematical model which describes the way w depends on u makes it possible to estimate the surface area, the coefficient of osmotic sensitivity, the volume, the hemoglobin content in the erythrocyte, as well parameters, reflecting the influence of membrane rigidity and intracellular viscosity on w (for the cells of the distribution center). It is shown that the presented experimental data can be explained only if we suggest that the surface area, the coefficient of osmotic sensitivity, and the hemoglobin of the erythrocyte are positively correlated.