



## Destrukcja erytrocytów pod wpływem naprężeń ścinających

Ryszard Pohorecki<sup>1</sup>, Adam Ryszczyk<sup>1</sup>, Jerzy Bałdyga<sup>1</sup>,  
Tomasz Motyl<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska,  
Warszawa

<sup>2</sup>Wydział Weterynarii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego,  
Warszawa

### Erythrocyte destruction under shear stresses

#### Summary

Erythrocyte destruction in laminar (Couette) flow was investigated. Critical values of the shear stress for ovine erythrocytes from two donors were determined. Large individual differences between erythrocytes from the two donors suggest that individual determination of shear stress resistance for each donor is necessary, and that the determination of shear stress resistance might be of diagnostic value.

#### Key words:

erythrocyte, shear stress.

### 1. Wstęp

Przedstawione tu badania destrukcji erytrocytów pod wpływem naprężeń ścinających w laminarnym polu przepływu (przepływ Couette'a) stanowiły pierwszy etap obszernego programu badań, poświęconego wpływowi naprężeń hydrodynamicznych na komórki żywe (zwierzęce i roślinne). Problem wpływu naprężeń hydrodynamicznych na komórki żywe ma duże znaczenie w biotechnologii. Dotyczy on zarówno procesów przebiegających w bioreaktorach, jak i procesów rozdzielania i oczyszczania

#### Adres do korespondencji

Ryszard Pohorecki,  
Wydział Inżynierii  
Chemicznej i Procesowej,  
Politechnika Warszawska,  
ul. Waryńskiego 1,  
00-645 Warszawa.

nia produktów procesów biologicznych (*down – stream processing*), zwłaszcza takich procesów jak filtracja, wirowanie, mieszanie, transport zawiesin itp.

Badania nad wpływem naprężeń hydrodynamicznych na komórki żywe w przepływie burzliwym, wykorzystujące do interpretacji procesu multifraktałną teorię burzliwości, wymagały uprzedniego określania granicznych naprężeń ścinających w ściśle sprecyzowanych warunkach hydrodynamicznych. Możliwości takie stwarza laminarny przepływ Couette'a. W opisanym tu, pierwszym etapie badań, jako modelowych komórek zwierzęcych użyto erytrocytów owczych.

## 2. Komórki erytrocytów

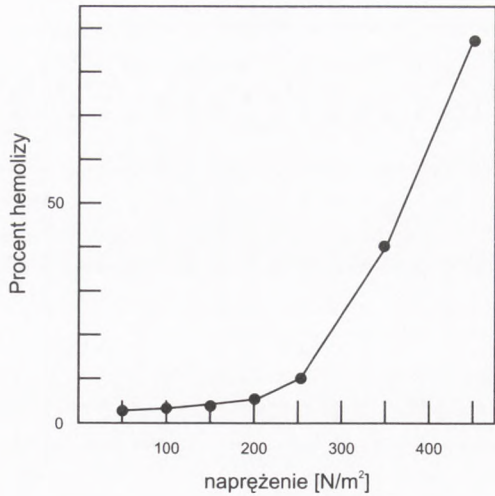
Komórki erytrocytów wykorzystywane są od dawna jako modelowy materiał do badania wielu zjawisk. Decyduje o tym bardzo prosta budowa krwinki czerwonej oraz jej uproszczony metabolizm. Dojrzały erytrocyt ssaka nie posiada, jak wiadomo, wykształconego jądra ani innych organelli. Jądra posiadają erytrocyty ryb i płazów, co związane jest z ewolucyjnym wykształceniem się erytrocytu i jego specjalizacją. Śladem tego są jądra u młodych krwinek czerwonych ssaków, które w czasie rozwoju komórki zanikają jako zbędne do pełnienia przez komórkę wyznaczonych jej funkcji. Funkcje te są o tyle niezwykłe, że komórka wędruje po całym organizmie transportując tlen między płucami a tkankami oraz dwutlenek węgla między tkankami a płucami. Umożliwia jej to bardzo elastyczna budowa. Krwinka czerwona składa się z cienkiej (7 nm) błony elastycznej otaczającej wewnątrz zawierające roztwór hemoglobiny oraz innych związków chemicznych głównie enzymów. Charakterystyczny kształt erytrocytu (dwuwklęsłej soczewki) jest również uwarunkowany jej czynnościami. Taki kształt powoduje, że powierzchnia krwinki jest o ok. 60% większa niż powierzchnia kuli o tej samej objętości. Charakterystyczny jest również metabolizm komórkowy.

Źródłem energii jest głównie glukoza, przy czym jedynie 10% ulega przemianie tlenowej (szlak pentozofosforanów). Resztę stanowi beztlenowa przemiana do kwasu pirogronowego, która jest głównym sposobem pozyskania energii. Komórka zużytkowuje ją głównie na podtrzymanie działania pompy sodowo-potasowej, syntezy glutationu oraz utrzymanie dwuwklęsłego kształtu.

Wspomniane właściwości erytrocytów oraz fakt, że nie posiadają one zdolności do rozmnażania się, w połączeniu z wyjątkową stabilnością i trwałością erytrocytów w odpowiednich buforach, pozwalają wyeliminować efekty towarzyszące wpływowi naprężeń na komórki proliferujące i predestynują tę komórkę do użycia jako komórkę modelową. Na jej przykładzie najłatwiej jest określić czy i jaki efekt destrukcji towarzyszy ścinaniu w warunkach pola laminarnego lub burzliwego.

Badania nad niszczeniem erytrocytów ludzkich prowadzili Sutura i Mehrjardi [1]. Badali oni zachowanie komórek w polu laminarnym i burzliwym w mieszalniku ścinającym, przypominającym wiskozymetr rotacyjny przy zastosowaniu naprężeń hy-





Rys. 1. Procent hemolizy jako funkcja naprężenia [1].

drodynamicznych od 10 do 450 N/m<sup>2</sup>. Dla mieszania laminarnego były to naprężenia laminarne, dla burzliwego zaś – uśrednione w czasie naprężenia Reynoldsa. Stopień destrukcji komórek mierzono na podstawie ilości uwolnionej hemoglobiny. Zaobserwowano, że do wartości naprężeń ok. 250 N/m<sup>2</sup> destrukcja komórek była minimalna. Powyżej tej wartości, stopień hemolizy erytrocytów wzrósł znacznie, by przy wartości 450 N/m<sup>2</sup> osiągnąć nieco ponad 80% (rys. 1). Czas doświadczenia był stały i wynosił 4 min. W czasie doświadczeń zaobserwowano, że erytrocyty przed zniszczeniem ulegały znacznej deformacji, a ich zachowanie przypominało nieco zachowanie kropeł w polu burzliwym. Od normalnego kształtu, podwójnie wklęsłego, przechodziły do kształtów zbliżonych do igieł, a w końcu pękały. Stopień wydłużenia był proporcjonalny do przyłożonego naprężenia. W pracy nie odnotowano specjalnej różnicy pomiędzy działaniem naprężeń laminarnych i burzliwych, chociaż znaczny wzrost destrukcji powyżej wartości naprężeń 250 N/m<sup>2</sup> wiązać się może z przejściem z mieszania laminarnego do burzliwego właśnie w okolicach tej wartości.

Próbie opisu zjawisk zaobserwowanych w pracy [1] podjęli Sutera i Tran Son Tay [2]. Usiłowali oni modelować zjawisko tzw. *tank-treading* polegające na swobodnej rotacji błony komórkowej wokół zawartości komórki w laminarnym polu prędkości. Pod tym względem komórka erytrocytu przypomina kroplę, gdzie zamiast elastycznej błony komórkowej kształt utrzymywany jest za pomocą napięcia powierzchniowego. Autorzy sformułowali dość rozbudowany model oraz przeprowadzili symulację pola prędkości wokół komórki erytrocytu. Wykazali oni, że może wystąpić utrudnienie transportu małych cząstek oraz molekuł (tlenu) do błony erytrocytu oraz migracji do wnętrza.

Problem destrukcji erytrocytów ludzkich występującej w stanach chorobowych spowodowanych zwężeniem naczyń krwionośnych oraz związany z mechanicznymi



urządzeniami znajdującymi się czasowo (jednostki dializujące) lub na stałe (bypassy, sztuczne zastawki) w układzie krwionośnym człowieka poruszono w pracy [3]. Obiektem badań były erythrocyty ludzkie i królicze. Celem było zidentyfikowanie wpływu naprężeń hydrodynamicznych na te komórki. Wartości stosowanych naprężeń zawierały się w zakresie od 100 do 600 N/m<sup>2</sup>, a czas ekspozycji wynosił 2 min. Stwierdzono, że powyżej tego czasu zmiany były niezależne od czasu trwania doświadczenia. Stopień destrukcji erythrocytów mierzono na podstawie ilości uwolnionej hemoglobiny. W badaniach wykazano, że powyżej wartości naprężeń równej 300 N/m<sup>2</sup> zachodzi wzmożone niszczenie komórek erythrocytów ludzkich. Okazało się również, że erythrocyty królicze są nieco mniej wytrzymałe i podlegają destrukcji przy mniejszej wartości naprężeń. Wartość liczbowa tych naprężeń nie została jednak podana. Stwierdzono także, że komórki pochodzące od tego samego gatunku (człowieka) różniły się dla różnych osobników. W innej serii doświadczeń znakowane erythrocyty królika poddane działaniu naprężeń zostały powtórnie wprowadzone do krwiobiegu. Okazało się, że komórki poddane uprzednio działaniu naprężeń przeżywały w organizmie znacznie krócej.

Na pewne cechy upodabniające erythrocyty ludzkie zawieszono w roztworze o lepkości powyżej 60 mPas do kropeł zwrócili uwagę autorzy pracy [4]. Badali oni zachowanie zawiesiny komórek o wysokim hematokrycie (od 10 do 90%) przy mieszaniu laminarnym. Do oznaczania hematokrytu posłużono się elektronicznym licznikiem cząstek Coulter®, a doświadczenia przeprowadzano w wiskozymetrze rotacyjnym. Celem badań było wykazanie, że zawiesina erythrocytów zachowuje się podobnie jak emulsja, a w szczególności lepkość zawiesiny jest funkcją zarówno lepkości fazy ciągłej jak i rozproszonej. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że próby o dużej zawartości hematokrytu dla niewielkich szybkości ścinania miały znacznie wyższą lepkość sięgającą 800 mPas, podczas gdy próby o małej zawartości hematokrytu miały lepkość zbliżoną do lepkości ośrodka (roztwór dekstranu). Dla wyższych wartości szybkości ścinania lepkość wszystkich prób o różnym hematokrycie zbiegała do wartości lepkości ośrodka. Obserwując komórki w czasie ścinania wykazano, że podlegają one podobnym odwracalnym odkształceniom jak krople poddane naprężeniom. Dla wyższych wartości naprężeń erythrocyty przyjmowały kształty wydłużone, zbliżone do igieł. Zachowanie komórek w czasie doświadczenia wyjaśnia reologiczne właściwości krwi, a głównie jej nieniuutonowski charakter, co ma duże znaczenie przy pewnych schorzeniach.

Na lepkosprężyste właściwości erythrocytów wskazują też badania przeprowadzone przez Randa [5]. Próbował on określić wytrzymałość błony komórkowej używając mikropipety, za pomocą której zasysano komórkę aż do jej zniszczenia. Wyznaczone przy użyciu tej techniki wartości modułu Younga dla błony komórkowej zawierały się pomiędzy 10<sup>5</sup> a 10<sup>6</sup> N/m<sup>2</sup>, a rozciągliwość komórki wahała się pomiędzy 8 a 42%.



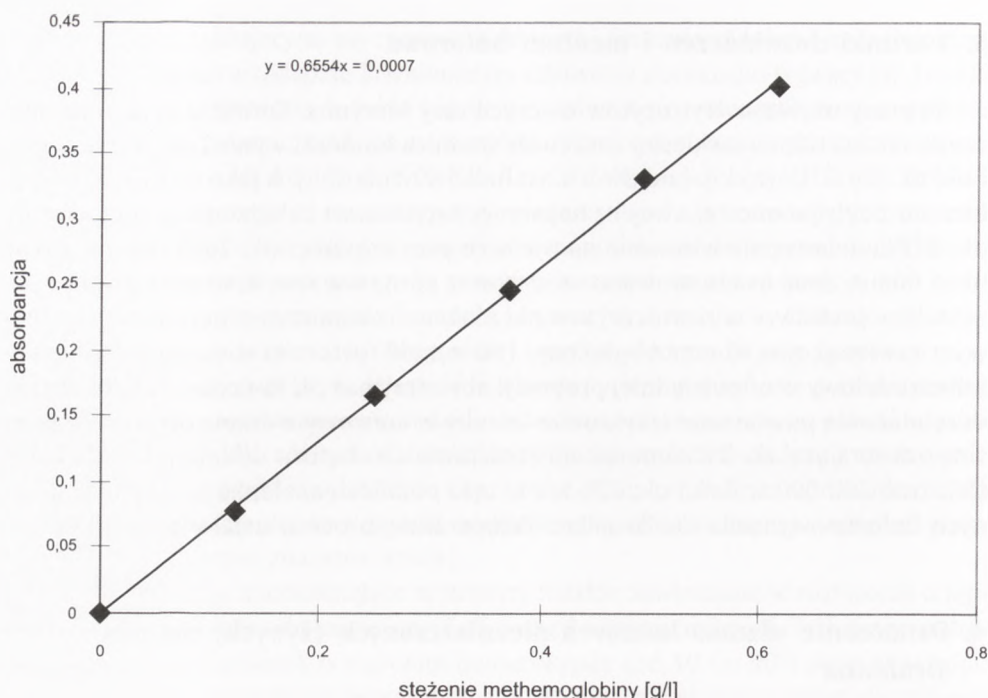
### 3. Warunki doświadczeń i medium buforowe

W pracy używano erytrocytów owczych rasy Merynos. Komórka erytrocytu owczego ma kształt dwuwklęsłej soczewki; średnica komórki wynosi ok. 8  $\mu\text{m}$ , a grubość ok. 3  $\mu\text{m}$ . Użyto krwi od dwóch osobników oznaczonych jako nr 1 i 2. Krew pobierano z żyły jarzmowej owcy na heparynę, natychmiast chłodzono do temperatury ok. 2-3°C, a następnie wirowano na wirówce przy częstości ok. 2000 obr/min przez ok. 5 minut. Znad osadu usuwano osocze oraz górną warstwę krwinek białych, a pozostałe w probówce wirowniczej krwinki płukano izotonicznym buforem fosforanowym zawierającym 10 mmol/l glukozy, 100 mmol/l fosforanu sodu (fosforan jednoni dwuzasadowy w odpowiedniej proporcji aby otrzymać pH końcowe 7,4) [6]. Procedurę płukania powtarzano trzykrotnie tak aby w końcowym etapie otrzymać zawiesinę zawierającą ok. 3% komórek objętościowo. Do buforu dodawano dodatkowo Dekstran 200 000 w ilości ok. 25% w/v w celu podniesienia lepkości. Lepkość badanych buforów wynosiła do 70 mPas. Temperaturę procesu ustalono na 35°C.

### 4. Oznaczanie ułamka komórek niezniszczonych (żywych) metodą Drabkina

W czasie doświadczeń oznaczano ułamek komórek niezniszczonych na podstawie ilości uwolnionej hemoglobiny: pobraną próbkę z mieszalnika ścinającego w ilości ok. 2-3 ml wirowano w wirówce laboratoryjnej przy częstości obrotowej ok. 2000 obr/min przez 5 minut. Ciecz z nad osadu zlewano, a peletkę krwinek zalewano wodą destylowaną do określonej objętości powodując hemolizę. Próbkę powtórnie wirowano w identycznych warunkach w celu sedimentacji resztek krwinek po hemolizie. Z odwirowanej próbki pobierano 1 ml roztworu, mieszano z 2 ml odczynnika Drabkina i oznaczano absorbancję roztworu powstającej cyjanmethemoglobiny za pomocą spektrofotometru Spectronics®. W stosowanym zakresie rozcieńczeń krzywa kalibracji jest linią prostą (rys. 2) w związku z tym ułamek komórek niezniszczonych ustalano na podstawie stosunku absorbancji roztworu badanego oraz próby zerowej czyli:

$$\text{u\lamek kom\oerek niezniszczonych (t)} = \frac{\text{absorbancja w czasie t}}{\text{absorbancja w czasie t = 0}} \quad (1)$$



Rys. 2. Krzywa kalibracyjna stężenia cyjanmethemoglobiny.

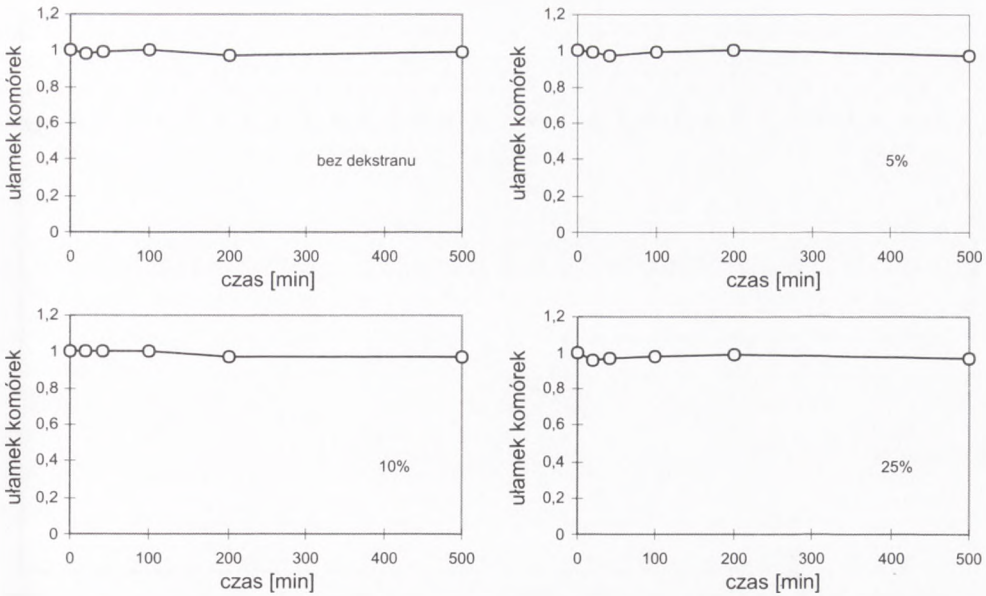
## 5. Liczenie komórek

Oprócz oznaczania pośrednio ułamka komórek niezniszczonych metodą Drabkina prowadzono liczenie komórek w hemocytometrze oraz za pomocą elektronicznego licznika cząstek Coulter Multisizer<sup>®</sup>. Liczenie komórek w liczniku cząstek przeprowadzono wprowadzając niewielką ilość (1 ml) badanej zawiesiny komórek do naczynia roboczego urządzenia zawierającego określoną ilość roztworu izotonicznego. Pozwoliło to uzyskać zarówno rozkłady wielkości jak i stężenia komórek. Wygląd komórek analizowano także pod mikroskopem.

## 6. Wybór środka podnoszącego lepkość badanych zawiesin

W celu umożliwienia powstania dostatecznie dużych naprężeń w mieszalniku laminarnym zaszła konieczność zwiększenia naturalnej lepkości buforu fosforanowego. Znanych jest wiele środków podnoszących lepkość roztworów. W przypadku kultury komórek zwierzęcych środki takie są często składnikiem pożywki i pełnią rolę ochronną przed naprężeniami hydrodynamicznymi, jak to ma miejsce w przy-

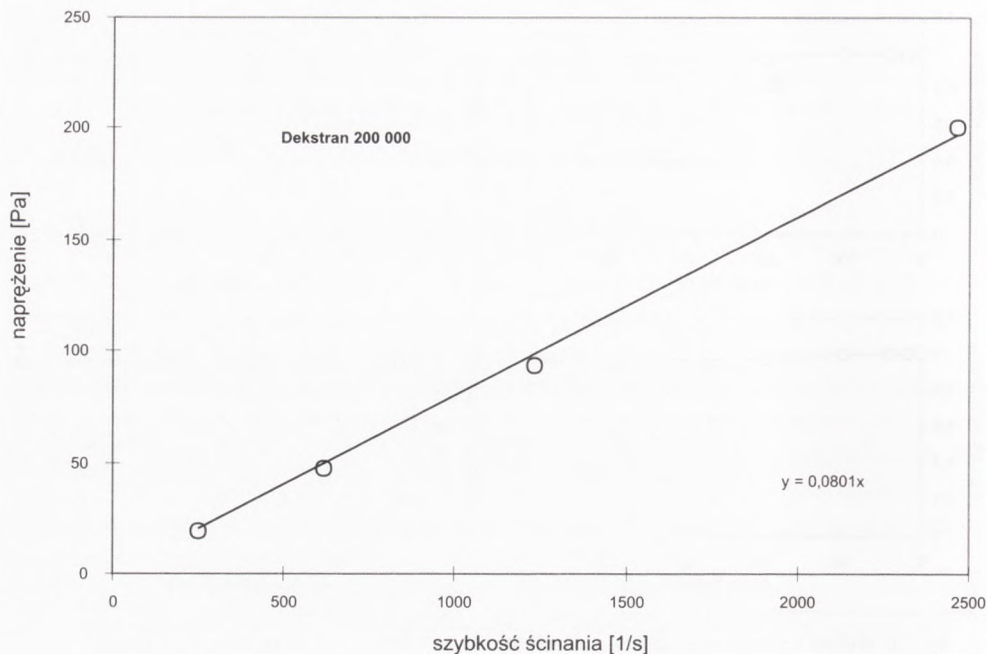




Rys. 3. Wpływ różnych stężeń Dekstranu 200 000 na ułamek komórek niezniszczonych.

padku surowic płodowych (FBS, FCS). Istnieją też specjalne środki handlowe (Pluronic F68) czy glikol polietylenowy używane często w kulturach tkankowych [7]. Jednakże wzrost lepkości spowodowany przez te środki jest niewielki. Inne środki podnoszące lepkość w sposób znaczny mają często nieniutonowski charakter (karboksymetyloceluloza – CMC), a ich wpływ na komórki żywe nie jest do końca zbadany. Substancją często stosowaną zarówno w kulturach zwierzęcych jak i innych jest dekstran. Zastosowaniem dekstranu do hodowli komórek zwierzęcych zajmowali się Croughan i wsp. [8] oraz Lakhota i Papoutsakis [9]. Wykazali oni, że obecność dekstranu w medium hodowlanym ma korzystny wpływ na komórki i nie powoduje ich destrukcji do stężenia ok. 7%. Jednakże powyżej tego stężenia roztwory dekstranu stają się toksyczne dla większości komórek [9].

Najmniejszy niekorzystny efekt wywierał dekstran o masie cząsteczkowej 78 500. W tej pracy posłużono się dekstranem o masie cząsteczkowej 200 000 (produkcji Polfa Kutno). Upřednio zbadano wpływ tego środka na komórki erytrocytów. W tym celu wykonano szereg doświadczeń potwierdzających zupełną nieszkodliwość Dekstranu 200 000 dla komórek erytrocytów. Warto wspomnieć, że roztwory na bazie dekstranu (o mniejszym stężeniu) są substytutami krwi. Wyniki doświadczeń dla różnych stężeń dekstranu przedstawiono na rysunku 3.



Rys. 4. Naprężenie jako funkcja szybkości ścinania dla 25% wodnego roztworu Dekstranu 200 000.

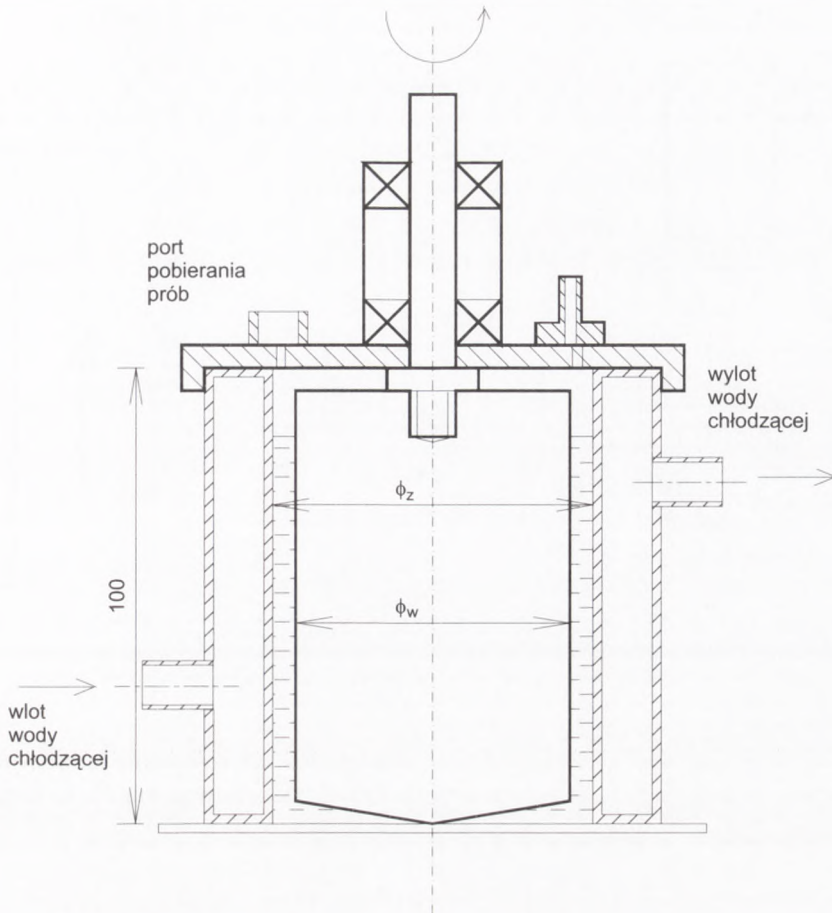
Roztwory wodne dekstranu są cieczami niutonowskimi co przedstawiono na rysunku 4. Predestynuje to Dekstran 200 000 jako doskonały środek podnoszący lepkość w trakcie realizacji obecnych badań.

## 7. Aparatura

Zawiesinę komórek poddawano ścinaniu w mieszalniku ścinającym z przepływem laminarnym Couette'a. Mieszalnik laminarny przedstawiony został na rysunku 5. Jego budowa przypomina budowę wiskozymetru rotacyjnego. Urządzenie składa się z naczynia (cylindra zewnętrznego) wyposażonego w płaszcz termostatujący oraz ruchomego cylindra wewnętrznego umocowanego w pokrywie. W pokrywie znajdują się także dwa króćce służące do pobierania prób (za pomocą długiej igły) oraz podłączenia powietrza sprężonego. Średnica cylindra zewnętrznego wynosi 70 mm, a wewnętrznego 68 mm. Daje to szczelinę o szerokości 1 mm. Szybkość ścinania w aparacie tego typu przedstawia zależność:

$$\gamma = \frac{\pi \phi_w N}{\phi_z - \phi_w}, \quad (2)$$





Rys. 5. Mieszalnik ścinający.

gdzie:  $\phi_z$  i  $\phi_w$  oznaczają odpowiednio średnicę cylindra zewnętrznego i wewnętrznego, a  $N$  częstość obrotową mieszadła.

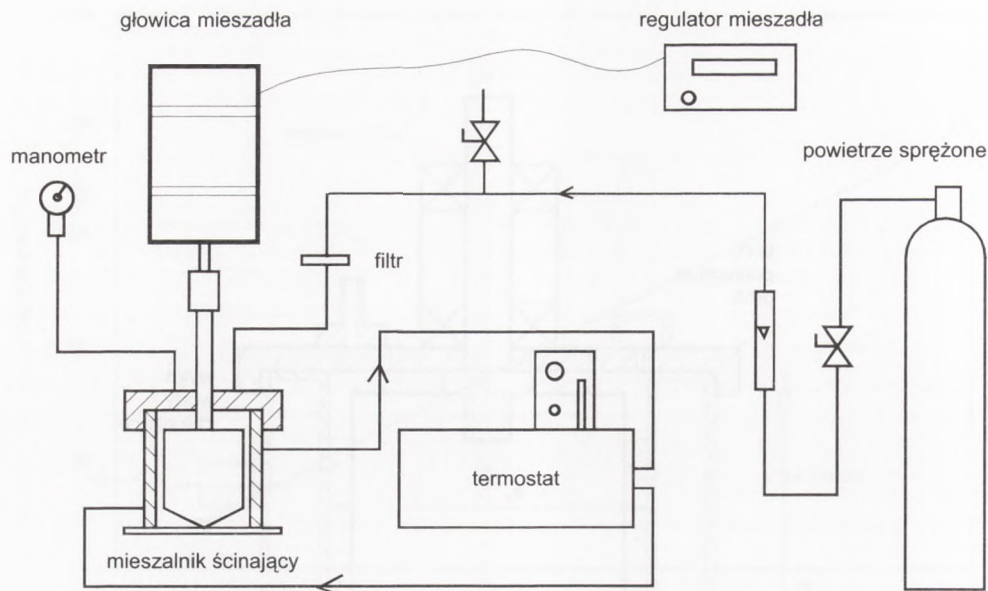
Naprężenie w układzie laminarnym wynosi:

$$\tau = \gamma\mu, \quad (3)$$

gdzie  $\mu$  – lepkość dynamiczna.

Z kolei szybkość dysypacji energii na jednostkę masy wyniesie:

$$\varepsilon = \left( \frac{\pi\phi_w N}{\phi_z - \phi_w} \right)^2 \frac{\mu}{\rho}. \quad (4)$$



Rys. 6. Schemat aparatury stosowanej do badań w przepływie laminarnym.

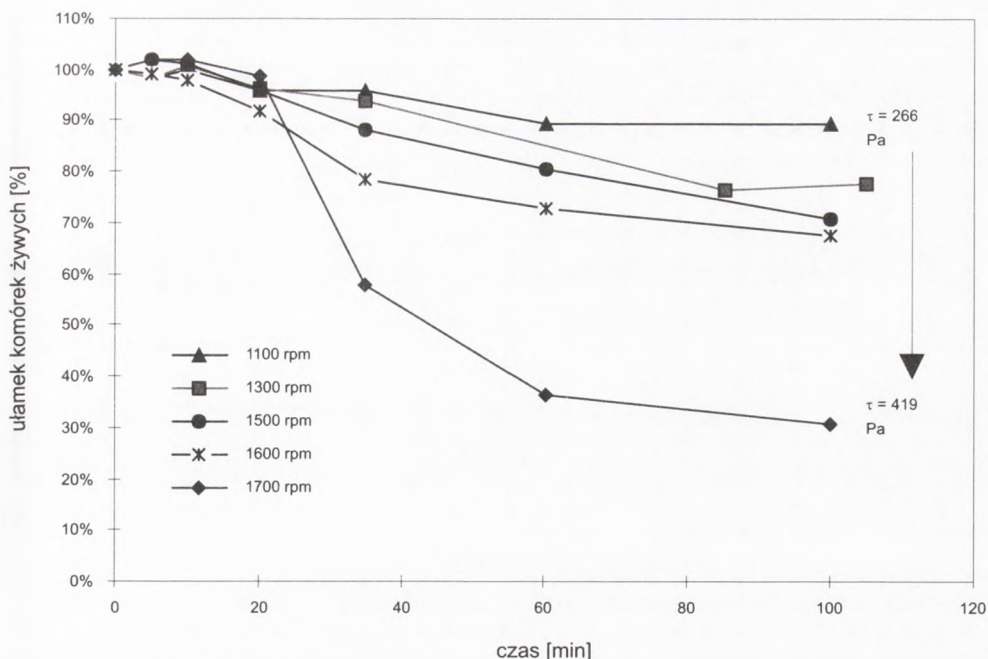
Dla uzyskania pewności, że w układzie występuje czyste ścinanie laminarne i nie pojawiają się wiry Taylora następująca nierówność była sprawdzana dla każdego doświadczenia [10]:

$$\frac{u(\phi_z - \phi_w)\rho}{2\mu} \leq 41,3 \sqrt{\frac{\phi_z}{\phi_z - \phi_w}}, \quad (5)$$

gdzie  $u$  oznacza prędkość obwodową cylindra wewnętrznego.

Schemat układu pomiarowego przedstawiono na rysunku 6. Układ pomiarowy składa się z mieszalnika ścinającego, połączonego przewodami elastycznymi z termostatem zapewniającym utrzymanie stałej temperatury zawiesziny komórkowej znajdującej się wewnątrz mieszalnika oraz napędu mieszadła zapewniającego utrzymanie stałej częstości obrotowej wału, a także pomiar momentu obrotowego. Dodatkowo mieszalnik zasilany jest jałowym powietrzem sprężonym (przez filtr), co pozwala na uzyskanie niewielkiego nadciśnienia wewnątrz zbiornika w celu utrzymania warunków jałowych. Nadciśnienie to może być regulowane zaworem na przewodzie powietrza oraz kontrolowane za pomocą manometru.





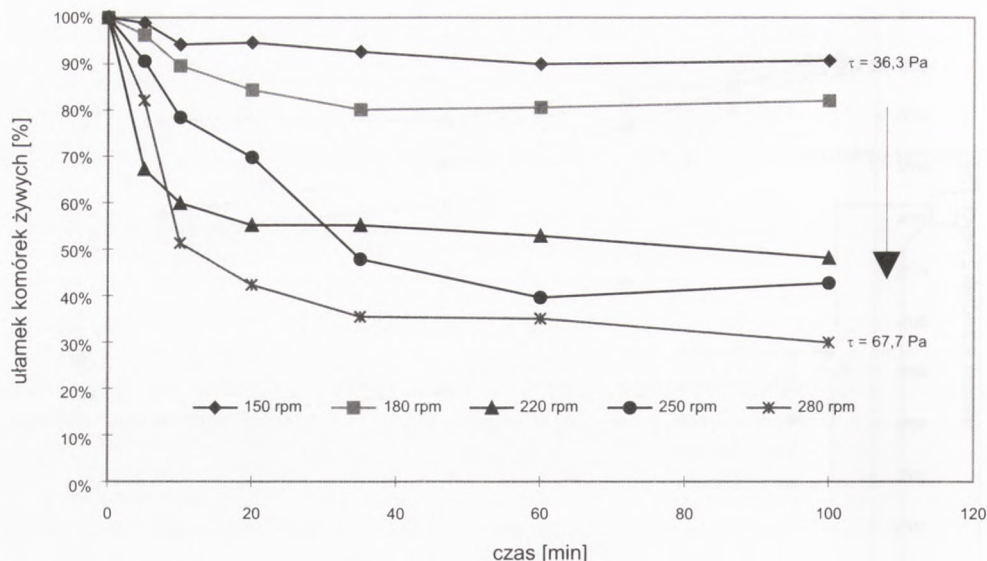
Rys. 7. Zależność ułamka komórek żywych od czasu (dawca nr 1).

## 8. Wyniki

Na rysunkach 7 i 8 przedstawiono wyniki badań wpływu naprężeń laminarnych na erytrocyty pobrane od dwóch różnych dawców. Na rysunkach przedstawione zostały zależności ułamka komórek niezniszczonych (w odniesieniu do erytrocytów komórki niezniszczone utożsamiamy z komórkami żywymi) od czasu. Charakterystyczny jest kształt krzywych. Widać, że po pewnym czasie krzywe te wypłaszczają się, co oznacza, że niezależnie od dalszego działania naprężeń liczba komórek żywych pozostaje niemal stała.

Na rysunku 9 przedstawiono rozkłady ilościowe oraz objętościowe liczby komórek erytrocytów oraz pozostałości po ich ścinaniu uzyskane w elektronicznym liczniku cząstek. W czasie ścinania burzliwego (zob. rys. 9) dochodzi do spadku liczby komórek czego oznaką jest zmniejszenie wielkości piku początkowego oraz powstanie znacznej liczby cząstek o znacznie mniejszej średnicy stanowiących pozostałości po zniszczonych erytrocytach. Jest ich stosunkowo dużo (A), ale zajmują niewielką objętość (B).

Uwagę zwracają znaczne różnice naprężeń powodujących ten sam stopień destrukcji dla obu próbek erytrocytów. W przypadku komórek od dawcy nr 1 naprężenia hydrodynamiczne zawierały się w zakresie od 266 do 419 N/m<sup>2</sup> natomiast



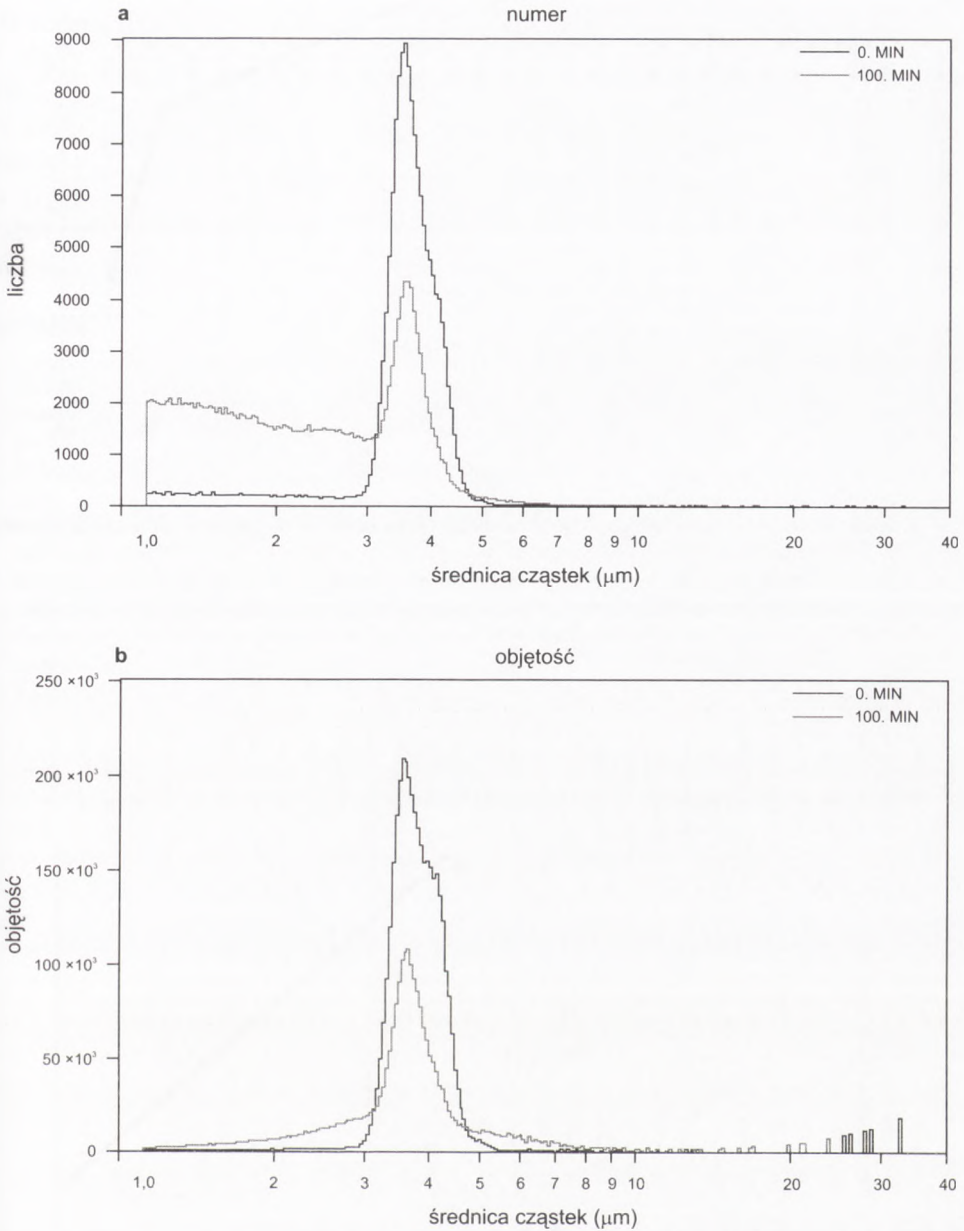
Rys. 8. Zależność ułamka komórek żywych od czasu (dawca nr 2).

w przypadku komórek od dawcy nr 2 wartości te były znacznie niższe i wahały się w zakresie od 36,3 do 67,7 N/m<sup>2</sup>. W miarę wzrostu naprężeń w obu przypadkach liczba komórek niezniszczonych staje się coraz mniejsza. Ustalenie się wartości ułamka komórek żywych na określonym poziomie trwa dość długo (ok. 60 min) w porównaniu z 2-5 min jak to obserwowano w pracach [1,3]. Ponadto w przypadku dawcy nr 1 widać, że komórki jakby bronią się przed destrukcją i przez pewien czas (na początku) ich liczba pozostaje niezmienną. Nie widać tego zupełnie w przypadku erytrocytów dawcy nr 2. Zauważamy natychmiastowy spadek liczby komórek żywych. Tak znaczne różnice w wielkościach naprężeń powodujących podobny stopień destrukcji świadczą o bardzo dużej różnicy w wytrzymałości komórek. Wielkością, która ukaże tę różnicę znacznie wyraźniej jest wartość naprężenia krytycznego, czyli taka wartość, przy której komórki zaczynają pękać.

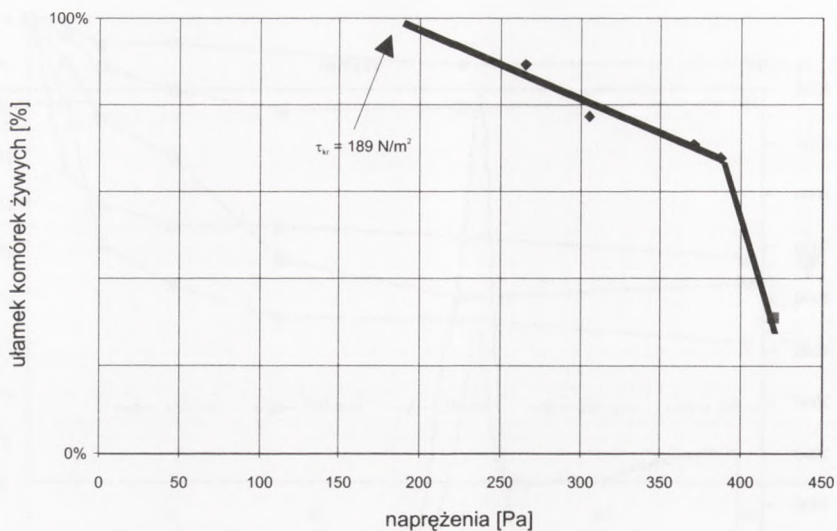
Wartość naprężenia krytycznego otrzymamy ekstrapolując zależność ułamka komórek żywych od wartości naprężeń. Przedstawiono to na rysunkach 10 i 11 (dla czasu 100 minut). Dla przypadku komórek nr 1 otrzymujemy wartość  $\tau_{kr} = 189 \text{ N/m}^2$  natomiast dla przypadku nr 2  $\tau_{kr} = 32 \text{ N/m}^2$ . Jest to różnica bardzo znaczna.

Według informacji dostępnych obecnie w literaturze [1,3] wartość naprężeń krytycznych w układzie laminarnym wynosi 250-300 N/m<sup>2</sup> (dla erytrocytów ludzkich). Wartości uzyskane w tej pracy (32 N/m<sup>2</sup> oraz 189 N/m<sup>2</sup> – erytrocyty owcze) są niższe zwłaszcza jeżeli chodzi o tę pierwszą wartość. Zaskakująca jest również duża rozpiętość tej wartości w obrębie jednego gatunku. Znacznie bliższa średniej war-

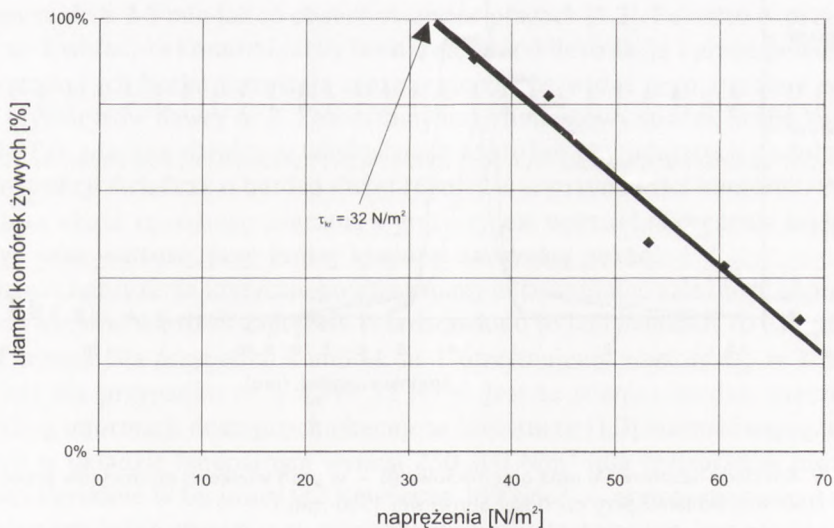




Rys. 9. Rozkłady liczbowe (A) oraz objętościowe (B – w  $\mu\text{m}^3$ ) wielkości erytrocytów przed (0 min) oraz po (100 min) ścinaniu przy częstotliwości obrotowej 1700 rpm.



Rys. 10. Zależność ułamka komórek żywych od naprężeń dla komórek dawcy nr 1 (dla czasu 100 min).



Rys. 11. Zależność ułamka komórek żywych od naprężeń dla komórek dawcy nr 2 (dla czasu 100 min).



tości, jak się wydaje, jest wartość  $189 \text{ N/m}^2$ . Istnieje poważne podejrzenie, że wartość naprężenia krytycznego uzyskana w ścinaniu laminarnym dla dawcy nr 2, równa  $32 \text{ N/m}^2$ , spowodowana może być procesem chorobowym osobnika nr 2 (jak się później okazało po dwóch miesiącach od zakończenia badań osobnik nr 2 zdechł). Być może pomiar naprężenia krytycznego mógłby stanowić metodę diagnostyczną wykrywania schorzeń. Dla dalszych badań istotny jest wniosek, że wartość naprężenia krytycznego dla erytrocytów musi być mierzona każdorazowo dla określonej próbki (określonego dawcy) i nie powinna być przyjmowana na podstawie danych literaturowych.

## Literatura

1. Sutura S. P., Mehrjardi M. H., (1975), *Biophys. J.*, 15, 1-10.
2. Sutura S. P., Tran Son Tay R., (1983), *Biorheology*, 20, 267-282.
3. Nevaril C. G., Lynch E. C., Alfrey C. P., Hellums D., (1968), *J. Lab. Clin. Med.*, 71, 784-790.
4. Schmid H., Wells R., (1969), *Science*, 165, 288-291.
5. Rand R. P., (1964), *Biophys. J.*, 4, 303-316.
6. Dębski B., (1978), *Wpływ chlorku amonowego na przemiany glukozy oraz nukleotydów adeninowych krwinek czerwonych ludzkich oraz owcy*, rozprawa doktorska, SGGW, Warszawa.
7. Michaelis J. D., Petersen J. F., McIntire L. V., Papoutsakis E. T., (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 169-180.
8. Croughan M. S., Sayre E. S., Wang D. I. C., (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 862-872.
9. Lakhota S., Papoutsakis E. T., (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 95-107.
10. Kaye J., Elgar F. C., (1958), *Trans ASME*, 80, 753-761.