

Л. А. АНДРИАНОВ, М. А. АХМАМЕТЬЕВ,  
 П. Я. БЕЛОУСОВ, Ю. Г. КИРИЛЛОВ, А. М. ОСТАПЕНКО,  
 С. Н. РЕМЕСЛЕННИКОВА, Э. А. ТАЛНЫКИН

(Новосибирск)

## АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ СИСТЕМА С УПРАВЛЕНИЕМ И ОБРАБОТКОЙ НА БАЗЕ ЭВМ НР2116В ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ДИНАМИКИ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ МОНОСЛОЯ ЖИВЫХ КЛЕТОК

Различные модификации методов флюоресцентного анализа давно и широко применяются в биологических и медицинских исследованиях [1]. Существующая аппаратура для измерения интенсивности флюоресценции клеток позволяет регистрировать сигнал от отдельных клеток [2] или группы клеток [3] в поле зрения микроскопа с обязательным визуальным контролем измеряемого объекта. Необходимость визуального контроля связана с выраженной гетерогенностью даже таких «равномерных» объектов, как монослойная культура ткани. При автоматизации такого рода измерений визуальный контроль остается «узким местом», не позволяя организовать систему измерения «on line». Кроме того, оператор не может менять объекты или поля зрения с частотой более 2—3 в минуту и, как правило, вносит в измерения трудно учитываемую субъективную ошибку.

В настоящем сообщении описана система, обеспечивающая автоматическую регистрацию флюоресценции клеток монослойной культуры ткани (9 образцов по  $10^4$ — $10^5$  клеток) и слежение за динамикой флюоресценции с интервалами времени порядка минуты, что достаточно для изучения процессов флуохромирования живых клеток.

В основу разработки системы были положены следующие соображения: сохранение условий жизнедеятельности клеток монослоя во время проведения эксперимента; разделение моментов введения вещества в питательную среду и начала воздействия на клетки; введение полной автоматизации в процесс исследования динамики возбужденной флюоресценции монослоя клеток; обеспечение возможности параллельного исследования девяти образцов; проведение статистически представительных измерений флюоресценции монослоя клеток; быстрое выполнение обработки и вывода на дисплей результатов измерения с целью их наблюдения в темпе эксперимента; уменьшение дозы облучения клеток возбуждающим светом; обеспечение программного задания условий эксперимента (время начала и конца эксперимента, интервал между циклами измерения, исходные данные для обработки результатов измерения); окончательный вывод экспериментальных данных на цифропечать и перфоратор.

Входная часть и упрощенная блок-схема системы приведены на рис. 1 и 2. Система состоит из измерительного преобразователя, заключенного в термостатированный корпус ТК, гелий-кадмиевого лазера Л, светоделительной пластинки СП, блока стабилизации БС, аналого-цифрового преобразователя АЦП-15, блока управления БУ и серийных внешних устройств: электронной вычислительной машины ЭВМ типа НР2116В, телетайпа ТТ, визуализатора данных ВД, ВМ-96, термостата ТС, высоковольтных источников питания ВИП<sub>1</sub> и ВИП<sub>2</sub>, низковольтных источников питания НИП.

Измерительный преобразователь включает в себя неподвижное зеркало НЗ вращающееся зеркало ВЗ, приводимое в движение двига-

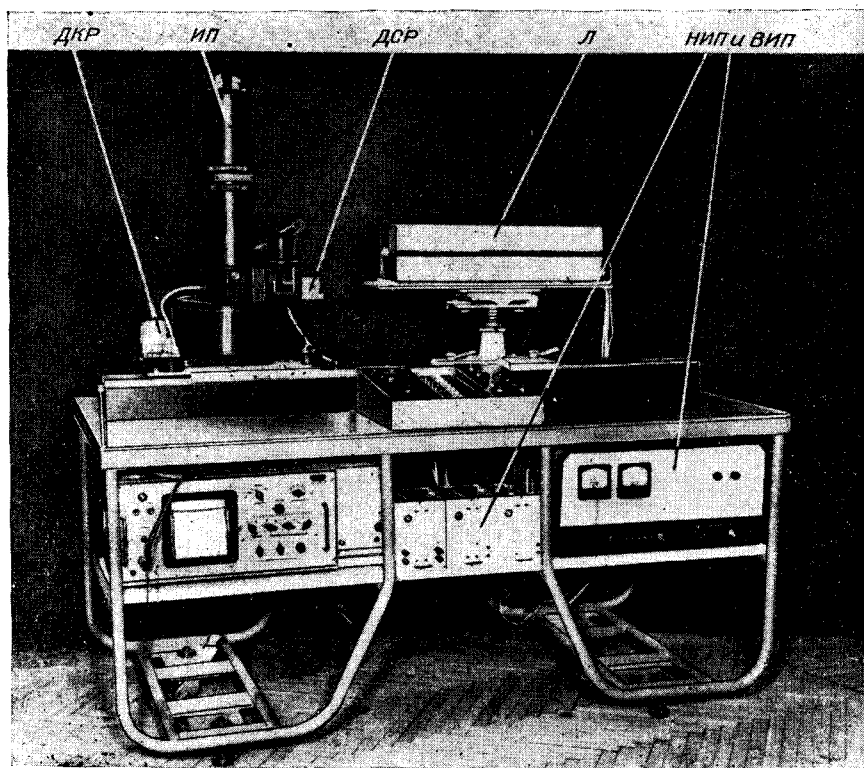


Рис. 1. Входная часть системы.

телем строчной развертки ДСР, фокусирующую линзу ФЛ, диафрагму Д, кювету с образцовым люминесцирующим элементом  $K_0$ , интерференционный фильтр ИФ, фотоэлектронный умножитель типа ФЭУ-24, усилитель У, кюветы с исследуемыми клетками  $K_1—K_9$ , транспортирующий диск ТД, приводимый в действие двигателем кадровой развертки ДКР, устройство переворачивания кювет на время установки в позицию измерения и два механически управляемых контакта, один из которых  $МК_1$  определяет начало и конец измерения флуоресценции каждого образца (монослоя клеток), а другой  $МК_2$ —конец цикла измерения всех 10 кювет.

При работе в соответствии с программой ЭВМ запускает сканирующее устройство (двигатели ДСР и ДКР), в результате чего на вход АЦП начинают поступать импульсы напряжения, мгновенное значение которых соответствует мгновенному значению интенсивности флуоресценции того участка монослоя клеток, который в данный момент возбуждается лучом лазера.

Принцип сканирования поясняется на рис. 3. Строчная развертка осуществляется вращением зеркала ВЗ, перемещающего луч лазера по траектории ТЛ, а кадровая развертка — перемещением кюветы транспортирующим диском. Длина строки ( $l=8$  мм) задается диафрагмой Д, а величина кадра ( $h=12$  мм) — механическим контактом  $МК_1$ , который определяет моменты начала  $n$  и конца  $k$  измерения. В момент  $n$  ЭВМ осуществляется запуск АЦП и подпрограммы считывания данных, а в момент  $k$  — останов АЦП и запуск подпрограммы обработки данных. Выбранная скорость сканирования (время сканирования по строке 0,5 мс, а по кадру 1,5 с) обеспечивает получение примерно 30 строк в кадре. Так как время преобразования используемого АЦП составляет 50 мкс, то с кадра считывается около трехсот 11-разрядных двоичных

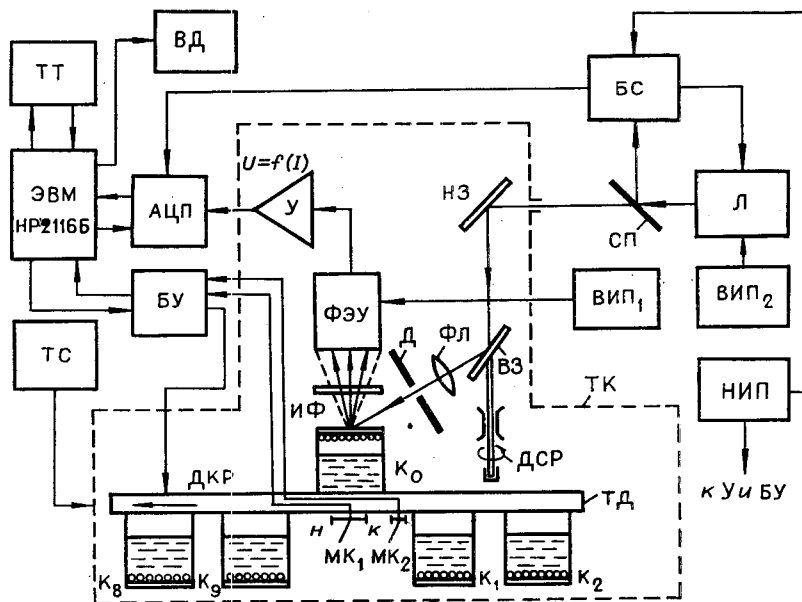


Рис. 2. Упрощенная блок-схема установки.

чисел. На основе полученного массива чисел ЭВМ в соответствии с алгоритмом обработки данных вычисляет среднее значение флюоресценции монослоя клеток и записывает его в ячейку памяти, адрес которой определяется номером исследуемой кюветы (кодом счетчика кювет, входящего в блок БУ) и порядковым номером цикла измерения. Всего под результаты исследования в памяти ЭВМ зарезервировано 500 ячеек на каждую кювету.

Результаты, записанные в памяти ЭВМ, непрерывно выводятся на двухлучевой визуализатор данных ВД в виде, представленном на рис. 4. Один луч визуализатора (см. рис. 4, а) используется для вывода обработанных данных измерения (средних значений флюоресценции монослоя клеток) на 10 участках (по числу кювет  $K_0 \div K_9$ ) по 50 точек на каждую кювету (в соответствии с максимальным числом циклов исследования  $N_{\max}$ ). Второй луч визуализатора (см. рис. 4, б) используется для вывода текущих результатов измерения с исследуемой кюветы; при этом сначала высвечиваются результаты непосредственно после считывания с кюветы, а затем — результаты первой стадии обработки (значения, отличающиеся менее чем на  $\pm 10\%$  от среднего значения, вычисленного на основе всех считанных результатов). Информация со второго луча используется для настройки и контроля системы.

Аналогичным образом проводится измерение флюоресценции клеток остальных кювет. Цикл измерения заканчивается в момент срабатывания контакта  $MK_2$ , когда ячейка  $K_0$  вновь приходит на измерительную позицию. На измерительной позиции осуществляется переворачивание кювет и отделение монослоя клеток от основной массы среды. Это практически исключает влияние на результат измерения флюоресценции флуорохрома, содержащегося в среде.

Время исследования 10 кювет составляет 50 с, а время

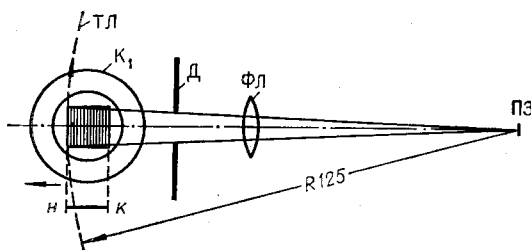


Рис. 3. Схема сканирования.

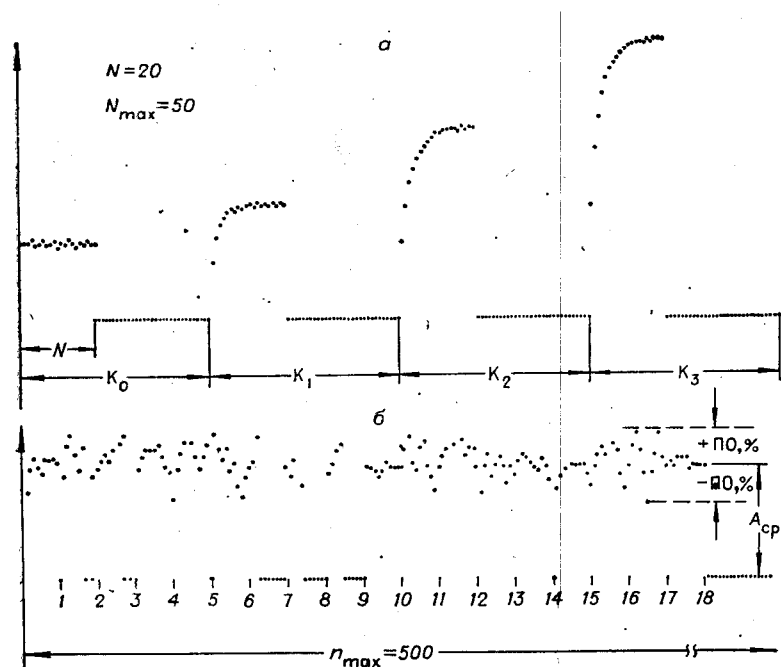


Рис. 4. Результаты измерения, представленные на экране визуализатора данных:

а — обработанные результаты измерения для всех кювет; б — текущие результаты измерения для одной кюветы;  $N$ ,  $N_{\max}$  — пройденное и максимальное числа циклов измерения;  $K_0$ — $K_3$  — участки экрана, отведенные для каждой из кювет;  $A_{\text{ср}}$  — обработанный результат измерения;  $\pm 10\%$  — параметр обработки;  $1 \div 18$  — номера строк развертки;  $n_{\max}$  — максимальное число отсчетов с одной кюветы.

цикла повторения исследований может задаваться от одной минуты и выше (до 24 часов); при этом ЭВМ после исследования в течение 50 с 10 кювет выключает сканирующее устройство и ждет окончания заданного в исходных данных на эксперимент времени цикла. По истечении времени цикла программа работы повторяется. Окончание эксперимента в целом задается количеством циклов и завершается выводом данных на цифропечать или перфоратор.

Особенностью 11-разрядного АЦП-15 [4] является то, что он может работать в двух режимах: измерения абсолютных значений напряжений и измерения отношения сигнального напряжения к опорному напряжению. Последняя особенность использована нами для уменьшения влияния нестабильности интенсивности луча гелий-кадмиевого лазера на погрешность измерения. Для этого часть света луча лазера с помощью светоделительной пластинки СП направляется в блок стабилизации и с помощью фотодиода преобразуется в медленно меняющееся напряжение, которое после усиления подается на опорный вход АЦП-15. Кроме того, напряжение, снятое с фотодиода, после усиления используется в качестве управляющего сигнала для непосредственной стабилизации среднего значения интенсивности луча лазера посредством изменения температуры элемента испарения кадмия в лазере. Такая двойная стабилизация позволила примерно на порядок снизить погрешность, обусловленную медленными изменениями интенсивности лазера.

В качестве источника возбуждающего света использовался гелий-кадмиевый лазер, разработанный в ИАЭ СО АН СССР. Лазер работал в непрерывном режиме с длиной волны 0,4416 мкм. Полуфокальный резонатор лазера длиной 0,5 м обеспечивал колебания типа  $TEM_{00q}$ .

Мощность излучения лазера составляла в среднем 10 мВт при диаметре светового пучка  $\sim 1,5$  мм и расходимости  $\sim 15'$ .

В основу программного обеспечения эксперимента положена операционная система ПОСП-72 [5], которая позволяет планировать эксперимент в реальном масштабе времени. Рассмотрим кратко назначение и способы активизации основных программных модулей, управляющих ходом эксперимента.

Вначале с помощью директивы *BIO*, *H*, *M*,  $\Delta H$ ,  $\Delta M$ , *ПО*, *П*, *DATA* (где *BIO* — имя директивы; *H*, *M* — часы и минуты начала первого цикла эксперимента;  $\Delta H$ ,  $\Delta M$  — часы и минуты интервала между циклами; *ПО* — параметр для программы обработки результатов измерения; *П* — порог для считывания с АЦП; *DATA* — имя программы обработки), набираемой на системном терминале ТТ, запускается программный модуль «Настройщик».

«Настройщик» в соответствии с директивой устанавливает исходные параметры для работы других программных модулей и включает в список приоритетных модуль «Часы». Когда подходит время запуска первого (следующего) цикла измерения, модуль «Часы» запускает устройство сканирования и счетчик кювет в блоке управления и выводит себя из приоритетного списка.

Далее по прерыванию от сигнала «Начало кюветы» активизируется модуль «Сбор», который запускает АЦП и считывает в памяти ЭВМ результаты измерения, превышающие порог *П*. Частота считывания результатов измерения (запуска АЦП) составляет 20 кГц, а задержка между появлением сигнала «Начало кюветы» и первым запуском АЦП — 100 мкс.

По сигналу «Конец кюветы» запускается программа обработки данных *DATA*, которая сводится к вычислению среднего значения на основе накопленных результатов измерения, исключению из них значений, величина которых отличается от среднего более чем на *ПО* %, и повторному вычислению среднего значения на основе оставшихся значений. Полученное повторное среднее значение  $A_{ср}$  записывается в память ЭВМ в виде двумерного массива  $M(K_i, N_i)$ , где  $K_i$  — номер исследуемой кюветы,  $N_i$  — номер цикла.

После этого проверяется номер кюветы. Если кювета не последняя, то в соответствии с программой вновь разрешается прерывание по сигналу «Начало кюветы». Если же кювета последняя, то устанавливается

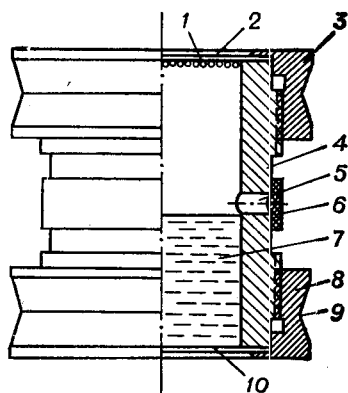


Рис. 5. Конструкция кюветы: 1 — монослой клеток; 2 — верхнее покровное стекло; 3 — верхняя крышка; 4 — корпус кюветы; 5 — отверстие для заполнения; 6 — резиновый жгут; 7 — питательная среда; 8 — нижняя крышка; 9 — выемка для фиксации кюветы в гнезде; 10 — нижнее покровное стекло.

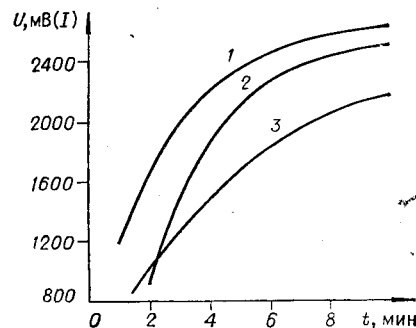


Рис. 6. Результаты экспериментов: 1 — при концентрациях ЦАМФ  $5 \cdot 10^{-6}$  г/л и АО  $1 \cdot 10^{-6}$  г/л; 2 — при концентрациях ЦАМФ  $1 \cdot 10^{-6}$  г/л и АО  $1 \cdot 10^{-6}$  г/л; 3 — при концентрации АО  $1 \cdot 10^{-6}$  г/л.

Концентрация исследуемых компонентов, г/л		Время, мин																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10										
АО	ЦАМФ	$\bar{M}$	$\sigma^2_{\bar{M}}$	$\bar{M}$	$\sigma^2_{\bar{M}}$	$\bar{M}$	$\sigma^2_{\bar{M}}$	$\bar{M}$	$\sigma^2_{\bar{M}}$	$\bar{M}$	$\sigma^2_{\bar{M}}$	$\bar{M}$	$\sigma^2_{\bar{M}}$	$\bar{M}$	$\sigma^2_{\bar{M}}$						
$1 \cdot 10^{-6}$	—	891	116	978	125	1201	402	1530	445	1699	466	1799	533	2055	335	1999	450	2137	283	2202	290
$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$	—	—	916	—	1277	422	1844	455	2152	356	2286	308	2356	320	2436	278	2497	284	2519	277
$1 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	1029	134	1438	387	2032	305	2274	207	2358	178	2457	778	2538	173	2597	187	2618	222	2647	191

время начала следующего цикла и модуль «Часы» включается в список приоритетных. В конце последнего цикла измерения прерывание запрещается и запускается программа вывода результатов измерения на цифрочек (или перфоратор).

В процессе эксперимента операционная система ПОСП-72 обеспечивает непрерывное высвечивание на экране визуализатора как результатов измерения, так и результатов обработки, позволяя тем самым наблюдать за ходом эксперимента в темпе эксперимента (см. рис. 4).

Для проведения экспериментов клетки монослойной культуры выращивались в специальных тефлоновых камерах (рис. 5) на круглых покровных стеклах. Непосредственно перед экспериментом (5—10 мин) стекла с клетками перемонтировались на место верхнего стекла в аналогичные по конструкции эбонитовые камеры, которые предварительно наполовину заполнялись средой с исследуемыми веществами. Контакт клеток с исследуемой средой осуществлялся в момент переворачивания кювет при установке их на транспортирующий диск системы.

После окончания эксперимента целостность монослоя контролировалась визуально на инвертированном микроскопе.

В качестве примера приведем данные изучения влияния 3'5'-циклического аденозинмонофосфата (ЦАМФ) на динамику проникновения в клетки *L*-штамма [6] акридинового оранжевого (АО). Результаты приведены на рис. 6, на котором кривая 3 — «контроль» — отражает динамику изменения флюоресценции монослоя в первые 10 мин после контакта клеток со средой, содержащей  $1 \cdot 10^{-6}$  г/л акридинового оранжевого, кривые 1 и 2 показывают динамику флюоресценции клеток после добавления к среде, содержащей ту же концентрацию АО —  $1 \cdot 10^{-6}$  г/л (2) и  $5 \cdot 10^{-6}$  г/л (1) 3'5'-циклического аденозинмонофосфата. Каждая кривая получена усреднением данных для 9 образцов, стандартные отклонения составляют менее 30 единиц шкалы ординат для каждой экспериментальной точки (см. таблицу).

Приведенные на рис. 6 и в таблице данные показывают, что ЦАМФ существенно увеличивает проницаемость мембраны для АО. При этом наблюдается прямая зависимость эффекта от концентрации ЦАМФ.

Судя по скорости развития изменений, наблюдаемую разницу в проницаемости для АО поверхностной мембраны клеток можно объяснить, скорее всего, непосредственным взаимодействием ЦАМФ со структурными компонентами мембраны без участия ферментных систем, расположенных внутри клетки. На наш взгляд, некоторые из многочисленных регуляторных функций ЦАМФ [7], возможно, осуществляются за счет изменений мембранной проницаемости, одним из доказательств этого утверждения можно считать полученные нами данные. Применение описываемой системы для изучения динамики флуорохромирования позволяет наблюдать функциональные сдвиги в проницаемости поверхностной оболочки клетки.

Описываемая установка и методика эксперимента могут быть применены не только для изучения динамики флуорохромирования, но и для изучения метаболизма веществ, обладающих флюоресценцией, например, полициклических ароматических канцерогенных углеводородов, спектр флюоресценции которых меняется в процессе метаболизма [3]. Такие эксперименты должны продолжаться 10—20 ч, и в этом случае представляется рациональным включение установки, подобной вышеописанной, в магистральную модульную систему типа САМАС.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. С. Ю. Юденфренд. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. М., «Медицина», 1967.
2. L. L. Wheelless, G. F. Bahr, G. L. Wied, S. F. Patten. Computerized Cytofluorimetric Research System.— In: Automated Cell Identification and Cell Sorting. Edited by G. L. Wied and G. F. Bahr. New York and London, Academic Press, 1970.
3. Т. Л. Дутова, О. Ю. Иванова, Л. А. Андрианов. Микроспектрофлуорометрическое исследование изменения концентрации бенз ( $\alpha$ ) пирена в монослойной культуре фибробластов при культивировании их в среде, содержащей бенз ( $\alpha$ ) пирен.— Цитология, 1969, т. 11, с. 512—517.
4. В. А. Алексеев, В. А. Беломестных, В. Н. Вьюхин, А. Н. Касперович, Ю. А. Попов, В. И. Солоненко. Многоточечная быстродействующая цифровая система сбора и хранения информации.— Автометрия, 1971, № 4.
5. С. М. Казаков, Э. А. Талцыкин. Программное обеспечение машинного комплекса обработки экспериментальных данных.— В кн.: Тезисы Всесоюзной конференции «Системы автоматизации научных исследований». Рига, 1973.
6. K. K. Sanford, W. R. Earle and G. D. Likely. The Growth in Vitro of Single Isolated Tissue Cells.— J. Nat. Cancer Inst., 1948, v. 9, p. 229—246.
7. J. Pasten, R. L. Perlman. Cyclic AMP in Metabolism.— Nature, 1971, v. 229, N 5.

*Поступила в редакцию 30 августа 1974 г.*