

Л. А. АНДРИАНОВ, Г. А. КОЖЕМЯКИН, В. Е. СОЛОБОЕВ,
В. П. ФЕДОСЕЕВ
(Новосибирск)

ЛАЗЕРНЫЙ ЦИТОФОТОМЕТР ПРОТОЧНОГО ТИПА

Необходимость изучения индивидуальных особенностей клеток весьма наглядно проявляется как в медицинских исследованиях в целях цитодиагностики злокачественных новообразований и дифференциального счета форменных элементов крови, так и в биологических экспериментах при изучении фаз клеточного цикла. За последние годы в связи с бурным развитием электронной аппаратуры и лазерной техники значительно возрос интерес к разработке и созданию систем автоматизированного анализа клеток, в основу которых положены методы светорассеяния, светопоглощения и флуоресценции [1—3]. Сейчас можно выделить два главных направления в разработке таких систем. В основе первого направления лежит создание системы сканирования фиксированного на стекле биологического объекта [4]. Второе направление — создание неподвижной системы регистрации и системы прокачки суспензии клеток через очень узкий рабочий объем [5, 6]. Такие системы обладают следующими преимуществами: простотой в подготовке препарата, высокой скоростью счета (до 10^4 кл./с), большой точностью измерения, возможностью поштучного анализа клеток по многим параметрам.

В настоящей работе описывается устройство для автоматизированного анализа клеток, представлены результаты экспериментов по измерению размеров микрочастиц и живых клеток.

Экспериментальная установка состоит из следующих основных частей (рис. 1): источник монохроматического излучения (лазер 1), фокусирующая оптическая система, система регистрации излучения флуоресценции (А, Б) и рассеянного излучения (Г), блок многопараметровой обработки гидрофокусирующей жидкости, проточная камера.

Линейно-поляризованный луч лазера 1 проходит последовательно через поляризатор 2, апертурную диафрагму 3, скрещенные цилиндрические линзы 4 и 5, входное окно проточной камеры 6 и рассеивается на клетках, находящихся в суспензии, движущейся через рабочий объем камеры. Рассеянное клетками излучение выходит через выходное окно под углом 180° к падающему пучку. Оптической системой, состоящей из объективов 7, 9, ловушки основного лазерного пучка 8, диафрагмы 10, рассеянный свет направляется на фотодиод 11. Излучение флуоресценции выходит через два окна в камере в направлениях, ортогональных падающему лучу. Это излучение, прошедшее последовательно через объектив 15, светофильтр 16, объектив 17 и диафрагму 18, регистрируется фотоэлектронным умножителем 19, подключенным к источнику высокого напряжения 20. Сигналы с двух ФЭУ и фотодиода после прохождения предусилителей 21, 12 и усилителей 13, 22 поступают в блок многопараметровой обработки 14. Система прокачки гидрофокусирующей жидкости (см. рис. 1 (23),

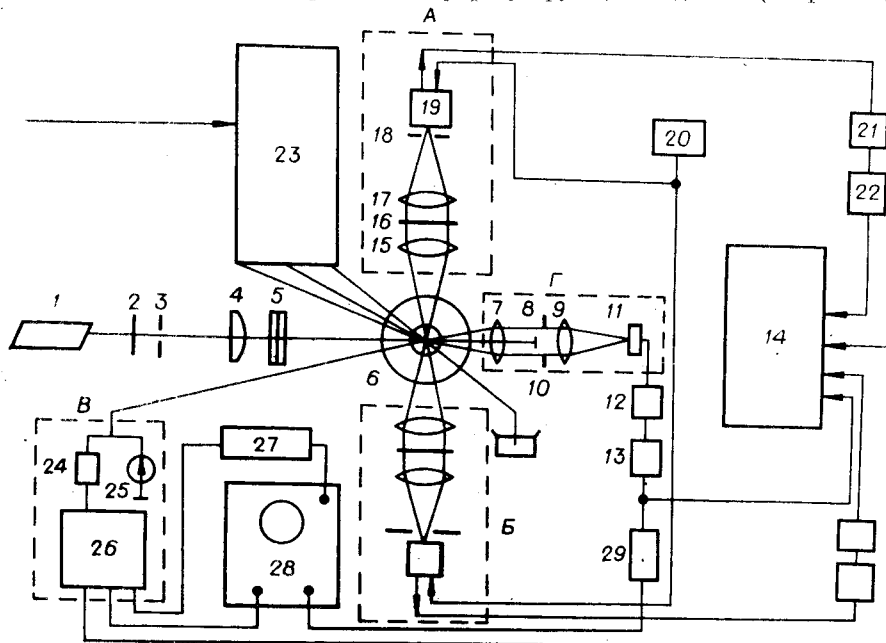


Рис. 1.

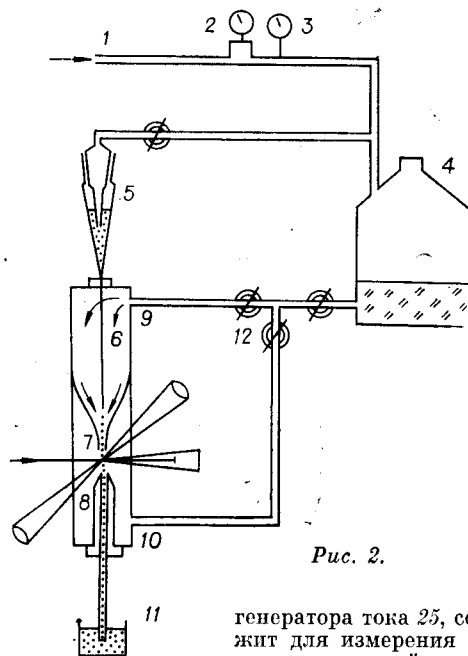


Рис. 2.

подробнее рис. 2) включает кран 1, редуктор 2, образцовый манометр 3, резервуар с гидрофокусирующей жидкостью 4, кювету с суспензией клеток 5, проточную камеру 6. В проточной камере система гидрофокусировки обеспечивает прохождение клеток по оси струи. Взвесь клеток вводится через внутреннее сопло коаксиального соплового устройства. Внутреннее сопло обтекается свободной от клеток оболочкой жидкости. Такая же жидкость подается в рабочий объем 7 камеры. Втягиваясь в сопло 8, она еще больше сужает струю с клетками. Краны 12 регулируют расход жидкости и дают возможность устанавливать нужный диаметр струи с клетками в рабочем объеме камеры. В результате струя с клетками в месте пересечения с лазерным пучком имеет диаметр около 20 мкм. В сопле 8 клетки попадают в кондуктометрический датчик Коултера, а затем выбрасываются на слив 11.

Кондуктометрический датчик Коултера (см. рис. 1, блок В) состоит из генератора тока 25, собственно датчика, предусилителя 24 и служит для измерения объема клеток, проходящих через входное сопло проточной камеры. Сигнал светорассеяния через линню задержки 26 и сигнал коултеровского датчика с усилителя 27 подаются на контрольный осциллограф 28. Благодаря этому можно наблюдать сигналы от одной и той же измеряемой клетки, полученные двумя способами: оптическим и кондуктометрическим. Блок многопараметровой обработки сигналов 14 осуществляет анализ как по одному, так и по двум параметрам. При анализе по одному параметру сигнальные импульсы после усиления поступают на дискриминатор, а затем на многоканальный амплитудный анализатор, который измеряет амплитуду импульса и направляет его в канал памяти, номер которого определяется амплитудой импульса. Таким образом, все импульсы, количество которых зависит от числа прошедших через микроканал частиц, распределяются по каналам блока памяти.

В результате анализа заданной дозы суспензии анализатор дает распределение частиц по размерам, которое может быть выведено на дисплей анализатора, самописец, цифровая печать и перфоратор.

Были проведены эксперименты по регистрации светорассеяния и светоослабления на клетках перевиваемой *in vivo* культуры асцитной опухоли Эрлиха. Характерной особенностью этих клеток является наличие большого ядра, занимающего 90% от всего клеточного объема, и узкой серповидной цитоплазмы. Средний диаметр этих клеток около 11 мкм.

Проводились эксперименты по регистрации как рассеянного (в углах от 0,5 до 2°), так и ослабленного клеткой светового излучения. Во втором случае свет регистрировался в «тени» клетки, т. е. в центре основного пучка, а рассеянное излучение задерживалось диафрагмой.

Распределение клеток по размерам выводилось на дисплей амплитудного анализатора, а затем документировалось с помощью принтера. Кривые распределения, полученные в опытах по регистрации рассеяния (кривая 1) и поглощения (кривая 2), представлены на рис. 3. Там же приводится распределение клеток по размерам, полученное кондуктометрическим методом (кривая 3). По оси абсцисс откладывается размер клеток, выраженный в относительных единицах (каналах), по оси ординат — количество клеток в канале к общему числу клеток в исследуемой дозе суспензии (в процентах). Расчет параметров этих трех распределений проводился по формулам математической статистики. Определялись такие параметры, как математическое ожидание, дисперсия, коэффициент вариации.

Величина математического ожидания (абсцисса, соответствующая максимуму кривой распределения) и дисперсии зависит от величин сигналов на входе анализатора, а величина входных сигналов является функцией коэффициента усиления, мощности лазера, положения и размеров светопринимающей диафрагмы. Так как условия экспериментов для каждого из трех методов различны, то кривые распределения на рис. 3 смещены друг

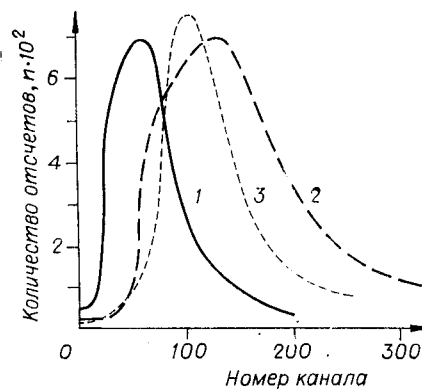


Рис. 3.

Метод	Математическое ожидание, отн. ед.	Дисперсия, отн. ед.	Коэффициент вариации, %
Светорассеяния	62,9	29,3	46,6
Ослабления	125,8	58,9	46,8
Кондуктометрический	105,6	33,8	32,0

относительно друга и их максимумы не совпадают. Заметное отличие формы кривой, полученной кондуктометрическим методом, от кривых, полученных оптическими методами, обусловлено, очевидно, тем, что кондуктометрический датчик измеряет объем клеток, а оптические датчики — их размер. Величина математического ожидания, дисперсии и коэффициента вариации приведена в таблице.

Коэффициент вариации складывается из C_{vr} -распределения и $C_{ва}$ -прибора. Будучи безразмерной величиной, C_{vr} не зависит от условий эксперимента и определяется лишь параметрами самого распределения. $C_{ва}$ -прибор характеризуется условиями эксперимента и конструкцией прибора. Из таблицы видно, что C_v для оптических методов несколько больше, чем C_v для кондуктометрического метода.

Возможность комбинирования микрофлуометрии с анализом рассеянного излучения, реализуемая в описанном фотометре, может быть полезна для одновременного быстрого измерения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ван де Хюлет Г. Рассеяние света малыми частицами.— М.: ИЛ, 1961.
2. Каменев И. В., Кудрявцев М. Б. Модель рассеяния когерентного света на живых клетках.— Автометрия, 1977, № 6.
3. Иваицкий Г. Р., Куниский А. С. Исследование микроструктуры объектов методами когерентной оптики.— М.: Энергия, 1974.
4. Автоматизированный анализ клеточных популяций: Сб. статей/Под ред. Л. А. Андрианова.— Новосибирск: изд. ИАиЭ СО АН СССР, 1978.
5. Стейкempi Дж. А. и др. Новый многопараметровый сепаратор микрочастиц и живых клеток.— Приборы для науч. исслед., 1973, № 9.
6. Маллэни П. Ф., Ван Дилла М. А., Коултер Дж. Р., Дин П. Н. Фотометр для быстрого определения размеров клеток по рассеянию света.— Приборы для науч. исслед., 1969, № 8.

Поступило в редакцию 26 августа 1981 г.

УДК 681.142.621

Н. В. ЛИТВИНОВ, В. И. ПРОКОПЕНКО

(Новосибирск)

АНАЛОГОВОЕ ЗАПОМИНАЮЩЕЕ УСТРОЙСТВО С ПОВЫШЕННЫМ КОЭФФИЦИЕНТОМ РЕЖЕКЦИИ

Создание аналоговых запоминающих устройств (АЗУ) с малыми временами выборки (менее 1 мкс) при достаточно высокой точности (погрешность менее 0,05%) сопряжено с преодолением ряда трудностей*. Так, для сокращения времени выборки необходимо уменьшать значение емкости запоминающего конденсатора, что ограничивается двумя факторами: ухудшением условий хранения (разряд конденсатора паразитными токами) и прямым прохождением изменяющегося входного сигнала через паразитную емкость разомкнутого ключа. Влияние первого фактора удается минимизировать применением операционных усилителей (ОУ) с полевыми транзисторами на входе и охранного эквипотенциального кольца на печатной плате. Значительно сложнее обстоит дело со вторым из указанных факторов. Погрешность в режиме хранения за счет прохождения преобразуемого сигнала на выход АЗУ определяется выражением

$$\delta_n = [C_n / (C_n + C_{п})] \Delta U_x,$$

где ΔU_x — приращение преобразуемого сигнала за время хранения; $C_{п}$ — паразитная емкость разомкнутого ключа; C_n — емкость накопительного конденсатора.

* Касперович А. Н., Литвинов Н. В. О целесообразности использования двухтактных устройств выборки и хранения.— Автометрия, 1973, № 3.