

О. П. ФЕДОРОВА, Ю. П. ЧЕРНОВ

(Новосибирск)

СТАБИЛЬНОСТЬ И КОНТРОЛЬ АППАРАТУРЫ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЙ ОБЪЕМОВ МИКРОЧАСТИЦ

Введение. В настоящее время в СССР и за рубежом, наряду с классическими способами определения размеров микрочастиц (световой и электронный микроскопы), применяются системы измерения объемов одиночных частиц с датчиками Коултера [1—4]. При попадании частицы в микроотверстие мембраны такого датчика в цепи электродов, задающих ток в электролите через микроотверстие, возникают импульсы напряжения, пропорциональные объемам частиц, которые усиливаются и поступают на многоканальный амплитудный анализатор. В результате на анализаторе накапливаются импульсы, отражающие распределение частиц по объемам.

Стабильность кондуктометрической системы является непременным условием надежности результатов измерений. Значение этого фактора возрастает, когда исследователь приступает к проведению сравнительных измерений. Однако в известной нам литературе вопросы, касающиеся стабильности и контроля кондуктометрических систем, не затронуты или рассмотрены неполно [5—16]. Как правило, ограничиваются применением низкоомных предварительных усилителей, которые в сочетании с генератором постоянного тока в цепи датчика позволяют добиться независимости сигнала датчика от проводимости электролита [6, 9, 15]. Схемы с генератором постоянного напряжения в цепи датчика приведены в работе [16]. Вопросы, связанные со стабильностью системы, в ней не затронуты, однако они частично исследованы в работе [13]. Для контроля стабильности обычно используется простой прием: калибровка аппаратуры в абсолютных единицах с помощью частиц стандартного объема (латексы, фиксированные эритроциты) перед началом и в конце серии измерений. При этом результаты измерений не обрабатываются, если калибровка за период измерений существенно изменилась [5—8].

Выяснение факторов, влияющих на стабильность показаний кондуктометрической системы, в совокупности с изучением условий измерений объектов как биологической, так и небиологической природы позволяет установить необходимые условия стабильной работы аппаратуры, что представляет несомненный интерес в плане проведения сравнительных измерений в экспериментах.

В работе проводится анализ факторов, влияющих на сигнал датчика кондуктометрической системы, рассмотрены оптимальные режимы измерения (в смысле стабильности показаний) и необходимые средства контроля системы. На базе кондуктометрической системы, созданной в лаборатории, исследованы условия измерений объемов частиц монодисперсных суспензий и эритроцитов периферической крови крыс, при которых обеспечивается высокая воспроизводимость результатов эксперимента. Это позволяет свести к минимуму ошибки, возникающие при сравнительных измерениях объемов микрочастиц с помощью кондуктометрических систем.

Анализ входных цепей датчика. Рассмотрим параметры, влияющие на сигнал датчика при попадании частицы в отверстие в режиме постоянного напряжения источника питания U (рис. 1). Режим постоянного напряжения предпочтителен с точки зрения получения более высоких соотношений сигнал/шум по сравнению с режимом, предполагающим использование для питания датчика генератора тока на активном элементе (транзисторе). Амплитуда сигнала датчика на выходе при слабой

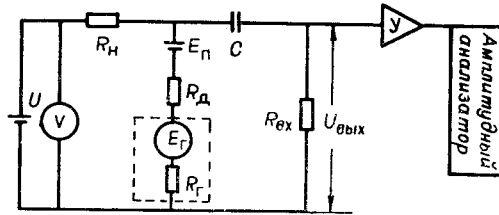


Рис. 1.

поляризации электродов $E_n \ll U$ (см. рис. 1) приведена в работе [13]:

$$\delta U_{\text{вых}}(p) = pCR_{\text{вх}}U[R_n\Delta R_d/(R_n + R_d)][R_n + R_d + pC \times (R_nR_{\text{вх}} + R_dR_{\text{вх}} + R_dR_n)]^{-1}, \quad (1)$$

где ΔR_d — изменение сопротивления датчика R_d при попадании частицы, $R_{\text{вх}}$ и R_n — входное сопротивление усилителя и сопротивление нагрузки в цепи датчика соответственно, C — разделительная емкость, а $p = j\omega$. Полагая, что на нижней частоте ω_n спектра импульса $\min(R_n, R_d) \gg (C\omega_n)^{-1}$, и учитывая поляризацию электродов, сигнал на выходе можно представить в виде

$$\delta U_{\text{вых}} = (U - E_n)(\Delta R_d/R_d)(1/(n+1))(n/(1+n+nR_d/R_{\text{вх}})), \quad (2)$$

где $n = R_n/R_d$.

Отметим следующие режимы работы датчика: согласованный режим, когда амплитуда импульса достигает своего максимального значения при $n_n = (1 + R_d/R_{\text{вх}})^{-1/2}$, и режим постоянного тока при $n \gg 1$ (аналогичен режиму с генератором тока на активном элементе), когда

$$\delta U_{\text{вых}} = I_d \Delta R_d n / (1 + n + nR_d/R_{\text{вх}}), \quad (3)$$

так как $U - E_n = I_d R_d (1 + n)$.

Определим условия для режимов с наименьшим влиянием проводимости электролита Σ на сигнал датчика. Выражение (2) обладает экстремумом по $R_d(\Sigma)$, который достигается при $n_d = (1 + R_n/R_{\text{вх}})^{1/2}$. В окрестности экстремума амплитуда импульса не зависит от изменения сопротивления датчика $\delta R_d(\Sigma)$ с точностью до члена второго порядка малости $O(\delta R_d/R_d)$. В случае высокого входного сопротивления $R_{\text{вх}} \gg \max(R_n, R_d)$ согласованный режим совпадает с экстремумом $n_d \approx 1$, достигая оптимальной стабильности (экстремальный вариант режима).

В режиме постоянного тока, наоборот, рационально применение схем с низким входным сопротивлением $R_{\text{вх}} \ll R_d$. При этом амплитуда сигнала датчика с высокой степенью точности не зависит от проводимости среды

$$\delta U_{\text{вых}} = I_d R_{\text{вх}} (\Delta R_d/R_d) (1 + R_{\text{вх}}/R_d + \dots), \quad (4)$$

поскольку амплитуда сигнала связана линейно с R_d [17]:

$$\Delta R_d = ((2 - 2k)/(2 + k))f(V_q/V_d)R_d[1 + (2/3)(d^3/D^2L) + \dots], \quad (5)$$

где d и V_q — диаметр и объем частицы; D и V_d — диаметр и эффективный объем отверстия датчика; L — эффективная длина отверстия; f — фактор формы частицы; k — отношение проводимости частицы к проводимости электролита. В случае непроводящей или слабопроводящей частицы ($k \ll 1$) член $\Delta R_d/R_d$ не зависит от проводимости среды. Так пивелируется в большей или меньшей степени эффект влияния проводимости электролита на сигнал датчика.

Перечислим основные причины проявления нестабильности кондуктометрических систем, которые ведут к ошибкам в измерениях, и укажем пути и способы их устранения. Из формулы (2) следует, что сигнал датчика определяется напряжением источника питания U , поляризацией электродов E_n и сопротивлением датчика R_d . Всякое изменение этих параметров приводит к сдвигам позиций распределений импульсов сиг-

налов по шкале экрана многоканального амплитудного анализатора. Получение стабильного напряжения U не представляет трудности и достигается применением источника стабилизированного напряжения в цепи питания датчика. Изменением поляризации электродов δE_n при измерениях в случае применения достаточно высокого напряжения источника питания датчика по сравнению с напряжением поляризации $U \gg E_n$ можно пренебречь (так как обычно $\delta E_n \ll E_n$). Устранить нестабильность сопротивления датчика несколько сложнее, поскольку оно определяется проводимостью электролита и геометрическими размерами отверстия. Нестабильность R_d проявляется при изменении проводимости электролита в зависимости от дрейфа температуры или ионной силы растворов, засорения отверстия либо при нарушении герметичности датчика. Датчик представляет пластинку из диэлектрика с микроотверстием, соединенных цепей, рассмотренных ранее.

Возможные изменения напряжения источника питания в цепи датчика и его сопротивления требуют соответствующего контроля кондуктометрической системы в процессе измерений. Наиболее простым способом контроля функционирования аппаратуры считается измерение латексов — полистироловых частиц монодисперсной суспензии [2, 18]. Однако многократное повторение операций текущего контроля с помощью латексов — довольно утомительная процедура. Перспективным в плане слежения за стабильностью измерений представляется нам электронный контроль, позволяющий без особых усилий оперативно осуществлять многократный контроль аппаратуры в процессе измерений. Достигается это посредством применения так называемого электронного калибратора [18] (или генератора стабилизированных импульсов) в цепи датчика. Амплитуда импульсов E_r электронного калибратора на выходе при условии, что $R_r \ll 1/w_n C \ll \min(R_d, R_n)$ (см. рис. 1), где R_r — внутреннее сопротивление калибратора, зависит от сопротивления датчика:

$$\delta U_{\text{вых}} = E_r [1 + R_d/R_n + R_d/R_{\text{вх}}]^{-1}. \quad (6)$$

При постоянных значениях E_r , R_n и $R_{\text{вх}}$ изменения сигнала на выходе связаны с изменениями сопротивления датчика, что приводит к сдвигам спектров импульсов калибратора по шкале анализатора. Электронный калибратор позволяет также осуществлять контроль стабильности всего электронного тракта системы. Для этого необходимо лишь вместо датчика включить в цепь сопротивление эквивалентной величины. Завершает контроль измерительной системы вольтметр, контролирующий напряжение источника питания в цепи датчика (рис. 2).

Экспериментальная часть. Согласованный режим работы датчика в экстремальном варианте и электронный контроль опробованы на аппаратуре, которая не имела принципиальных отличий от варианта, описанного в работе [14], за исключением режима входных цепей и предварительного усилителя. Согласованный режим при постоянном напряжении выбран с целью получения максимального соотношения между сигналом и шумом датчика. В качестве предварительного усилителя взят малошумящий усилитель с высоким входным сопротивлением $R_{\text{вх}} > > 0,5$ мОм. Накопления спектров сигналов датчика осуществлялись с по-

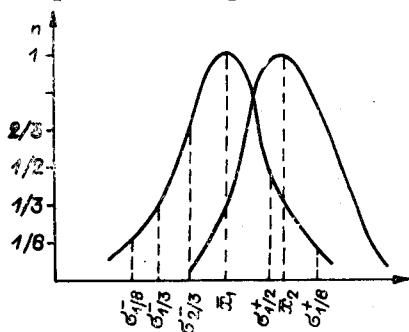


Рис. 2.

Таблица 1

Концентрация, част./мл	$\bar{x}_{\text{лат}}$	$\sigma_{2/3}^*$	$\sigma_{2/3}^+$	$\sigma_{1/2}^-$	$\sigma_{1/2}^+$	$\sigma_{1/3}^-$	$\sigma_{1/3}^+$	$\sigma_{1/6}^-$	$\sigma_{1/6}^+$
$2,5 \cdot 10^4$	78,5	71,5	85	69	87,5	64,5	91,5	56	—
$5 \cdot 10^4$	80	72,5	87	70	89	65,5	92	58	—
$10 \cdot 10^4$	82	75	88,5	72,5	91,5	67,5	95	59	—
$15 \cdot 10^5$	83,5	76,5	90	73,5	92	68,5	96,5	61	—

* Здесь и далее $\sigma_{i/h}^-$ и $\sigma_{i/h}^+$ — номера каналов на шкале анализатора, где горизонталь на уровне i/h пересекает кривую распределения объемов частиц (см. рис. 2). Прочерк означает, что кривая распределения вышла за пределы шкалы.

мощью 100-канального амплитудного анализатора. Датчик представлял пластинку из рубина с микроотверстием диаметром $D = 70$ мкм и длиной 150 мкм, герметично вплавленную в стеклянную пробирку. Электроды датчика изготовлены из платины ($E_{\text{п}} \approx 1,5$ В). В качестве электролитов тестировались некоторые изотонические среды и растворы (среды Игла и 199, растворы Хэкса, Коултера* и Изотон [19]). Сопротивление отверстия датчика для них составило $R_{\text{д}} \sim 40$ кОм, напряжение питания датчика $U = 30$ В. Объектами исследования служили латексы диаметром $d = 4,2$ мкм и эритроциты периферической крови белых крыс. Кровь хранилась в гепаринизированных пробирках. Разведение эритроцитов в растворах осуществлялось в два приема непосредственно перед измерением. На первом этапе кровь разводилась в отношении 1:100—1:200, а на втором — доводилась до рабочей концентрации (см. ниже). Контроль аппаратуры выполнялся с помощью генератора стабилизированных импульсов и цифрового вольтметра В7-16. Коэффициент вариации распределения импульсов генератора, определенный по шкале амплитудного анализатора, для всех измерений не превышал 1%.

Тестирование электронного тракта и сопротивления датчика при постоянной температуре и неизменном составе электролита с помощью генератора стабилизированных импульсов показало высокую стабильность аппаратуры $\delta \sim 1,5\%$, если принять

$$\delta = (\Delta x_{\text{ген}} / \bar{x}_{\text{ген}}) 100\%,$$

где $\bar{x}_{\text{ген}}$ — канал пика распределения импульсов генератора на шкале анализатора, $\Delta x_{\text{ген}}$ — максимальный сдвиг пика за период наблюдений. Наблюдения проводились через день в течение двух месяцев (не менее 40 раз). Стабильность измерений, определенная с помощью латексов, соответствовала полученной оценке. (Измерения осуществлялись один раз в неделю в течение того же периода.)

Рассмотрим некоторые обстоятельства, которые могут служить дополнительными источниками ошибок при сопоставлении результатов измерений в эксперименте.

Известно, что при одновременном попадании двух или более частиц в зону чувствительности датчика возникает ошибочный сигнал с амплитудой, пропорциональной суммарному объему частиц [2, 9, 10]. При увеличении концентрации суспензии вероятность попадания в зону чувствительности нескольких частиц увеличивается. Это приводит к сдвигу кривой распределения объемов частиц по шкале амплитудного анализатора в сторону больших объемов (см. рис. 2).

Для иллюстрации в табл. 1 приведены параметры распределений объемов латексов в относительных единицах в зависимости от концентрации частиц в суспензии, полученные экспериментально.

* Состав раствора Коултера: NaCl — 16,74 г, Na₂HPO₄ — 804,95 мг, KH₂PO₄ — 136,5 мг, ЭДТА — 200 мг, формалин 40%-ный — 20 мл, H₂O — до 2 л.

Аналогичная картина наблюдается и для эритроцитов. Устранить совпадения позволяет выбор концентрации, при которой последующее разведение не сдвигает кривую распределения объемов частиц. Для эритроцитов периферической крови крыс нами выбрана степень разведения 1:250 000. Дальнейшее разведение клеток крови в наших опытах не приводило к сдвигам распределений, превышающим 2%, но существенно увеличивало время набора статистики. Частота следования импульсов анализируемых частиц достигала при этом $\nu \sim 400$ имп./с. Здесь необходимо отметить, что единого мнения относительно выбора степени разведения крови, по-видимому, не существует. Частота следования импульсов при измерениях эритроцитов в различных работах колеблется в довольно широких пределах (от 200 до 2000 имп./с) [9—12].

Следующий вопрос относится к температурной зависимости распределений. Как следует из формулы (6), амплитуда сигнала генератора стабилизированных импульсов связана с сопротивлением датчика, которое, в свою очередь, зависит от температуры электролита. Эта зависимость проявляется экспериментально в сдвигах по шкале анализатора кривых распределений импульсов при изменениях температуры электролита. В согласованном режиме работы датчика скорость сдвигов у нас составляла $\Delta \bar{x}_{\text{ген}}/\Delta t \sim 1$ канал/град на интервале $\bar{x}_{\text{ген}} = 80-90$ каналов и при $t = 10-20^\circ\text{C}$. Очевидно, на кривую температурной зависимости влияют такие факторы, как состояние отверстия датчика, проводимость электролита, параметры входных цепей. Однако если эти факторы неизменны в процессе измерений, то электронный калибратор позволяет определить температуру электролита по положениям пиков распределения импульсов генератора на шкале анализатора.

Согласованный режим работы датчика при условии высокого входного сопротивления усилителя (экстремальный вариант режима) приводит к уменьшению температурного дрейфа распределений частиц, связанного с изменением проводимости электролита. Например, относительный сдвиг распределений объемов частиц монодисперсной суспензии в рабочем интервале температур $10-20^\circ\text{C}$ в наших экспериментах не превышал 2%. Однако для эритроцитов периферической крови крыс температурная зависимость оказывается более сильной, чем для латексов: 5% на интервале $10-20^\circ\text{C}$ (табл. 2). Это может быть связано как с изменением объемов эритроцитов, так и с конечной проводимостью их мембран (см. [18] и формулу (5)). Поэтому для эритроцитов необходимо выбирать относительно узкий температурный интервал ($\Delta t \sim 3^\circ$ для 1% дрейфа) при проведении сравнительных измерений.

Рассмотрим, наконец, влияние состава электролитов на распределение объемов эритроцитов крови белых крыс. Обычно применяются изотонические растворы и среды (среды 199 и Игла, растворы Коултера, Хэнкса и Изотон), проводимости которых мало отличаются друг от друга. Для частиц монодисперсной суспензии наблюдаются совпадающие с

Таблица 2

Раствор	$t, ^\circ\text{C}$	$x_{\text{эрит}}$	$\sigma_{2/3}^-$	$\sigma_{2/3}^+$	$\sigma_{1/2}^-$	$\sigma_{1/2}^+$	$\sigma_{1/3}^-$	$\sigma_{1/3}^+$	$\sigma_{1/6}^-$	$\sigma_{1/6}^+$
Коултер	10	80	69	89	66,5	93	62	98,5	56	—
	20	75	65,5	84,5	63	88,5	60	92,5	54	99
Хэнкс	10	87	78	101	75	—	71,5	—	66	—
	20	82,5	73,5	93,5	70,5	98	67	—	62	—
Изотон	10	74	65	81	62	84	58	88	52	93
	20	70	62,5	78	57,5	80,5	55	84	50	90

Таблица 3

Раствор	$\bar{x}_{\text{эрит}}$	$\sigma_{2/3}^-$	$\sigma_{2/3}^+$	$\sigma_{1/2}^-$	$\sigma_{1/2}^+$	$\sigma_{1/3}^-$	$\sigma_{1/3}^+$	$\sigma_{1/6}^-$	$\sigma_{1/6}^+$	$\bar{x}_{\text{лат}}$	$\bar{x}_{\text{ген}}$
Среда 199	68	60	76	56	78,5	53	83	47	89	83	86
Среда Игла	68,5	60	76	56,5	79	54	83	48,5	88,5	83	87

точностью до 1—2% распределения объемов частиц в каждом из указанных растворов. Однако для эритроцитов ситуация оказывается иной. В одних растворах распределения совпадают с точностью до 1% (среды 199 и Игла), в других — различаются в пределах 5—10% (растворы Коултера и Хэнкса, среда Игла). В Изотоне распределения имеют несколько меньшую дисперсность по сравнению с другими электролитами (табл. 3). Это указывает на существование взаимодействия эритроцитов с изотоническими растворами, механизм которого, по-видимому, связан с ионным составом раствора, так как все прочие условия выдержаны одинаковыми (температура, степень разведения, проводимость). Проводимость раствора характеризуется положением пика импульсов генератора на шкале анализатора (см. $\bar{x}_{\text{ген}}$ в табл. 3). Время пребывания эритроцитов в электролитах перед измерениями было минимальным.

По нашим наблюдениям, время пребывания эритроцитов при столь высоком разведении (от 10^{-5} до $1/2 \cdot 10^{-6}$) при температурах 10—20°C не должно превышать 10—15 мин для всех растворов, за исключением раствора Хэнкса, для которого $\tau \sim 5$ —10 мин. В течение такого промежутка времени мы успевали получить от 4 до 6 распределений эритроцитов по объемам, совпадающих с точностью до 1—2%. Число импульсов при этом в каждом распределении составляло не менее 30 тыс. Более продолжительное время хранения эритроцитов в электролитах приводит к последовательным смещениям распределений в сторону больших объемов с увеличением дисперсности, что, вероятно, вызвано набуханием клеток [4].

Закключение. В работе ставилась задача свести к минимуму ошибки, сопровождающие измерения микрочастиц кондуктометрическим методом, и тем самым обеспечить высокую воспроизводимость результатов измерений объемов частиц.

Анализ показал, что для решения этой проблемы необходимо использовать стабильно функционирующую электронику и источники питания в сочетании с датчиками, изготовленными из рубина или сапфира и вплавленными непосредственно в стеклянную оправу. Независимость сигнала датчика от проводимости электролита при постоянном напряжении источника питания достигается выбором рассмотренных в работе режимов входных цепей датчика и входного сопротивления усилителя. Апробация экстремального варианта согласованного режима работы датчика в лабораторных условиях подтвердила возможность его успешного применения при проведении сравнительных измерений, несмотря на сужение допустимого диапазона изменения проводимости, который не влияет на сигнал датчика.

Контроль системы с помощью электронного калибратора кажется нам перспективным, так как обладает определенными преимуществами перед контролем посредством частиц (оперативность, надежность, возможность многократного повторения). Правда, при этом необходимо контролировать напряжение в цепи питания датчика, что, впрочем, осу-

ществить несложно. Исследование возможных причин ошибок в измерениях позволяет утверждать, что при проведении тонких сравнительных измерений объемов биологических объектов в экспериментах необходимо соблюдать такие условия, как достаточно узкие диапазоны концентраций суспензий и температуры электролита. Измерения следует проводить в тех растворах, воздействие которых на мембрану исследуемых биологических клеток минимально. Для получения спектров распределений по объемам эритроцитов крови, по-видимому, наиболее подходящим из рассмотренных выше электролитических сред является раствор Изотон.

ЛИТЕРАТУРА

1. Coulter W. H. Means for counting particles suspended in fluid.—Publ. 1953. Cl. 324/71CP. USA. Pat. 2656508.
2. Harvey R. J. Measurement of cell volumes by electric sensing zone instruments.—Methods in Cell Physiology, 1968, vol. 3, p. 1.
3. Von Behreus W., Edmondson S. Comparison of techniques improving the resolution of standard Coulter cell sizing systems.—J. of Histochem. and Cytochem., 1976, vol. 24, p. 274.
4. Рабинович Ф. М. Кондуктометрические счетчики частиц и их применение в медицине.—М.: Медицина, 1972.
5. Salvati A. M., Camagna A., Samoggia P., Tentori L. Reference values in Haematology. A survey in Italy: report from Latium.—Haematologica, 1979, vol. 64, p. 296.
6. Karlov L. S., Schauble M. K., Beektel J. M. Validity of hematologic data in veterans administration hospital laboratories.—Am. J. Clin. Path., 1979, vol. 71, p. 291.
7. Nosanchuk J. S. et al. A comparative study of five commercial reagents for the Coulter model S.—Arch. Pathol. Lab. Med., 1978, vol. 102, p. 258.
8. Morgan L. O., Jones W. G., Fisher J., Cavill I. A whole blood control for the Coulter model S.—J. of Clin. Path., 1978, vol. 31, p. 50.
9. Weed R. L., Bowdler A. J. The influence of hemoglobin concentration on the distribution pattern of the volumes of human erythrocytes.—Blood, 1967, vol. 29, p. 297.
10. Bull B. S. On the distribution of red cell volumes.—Blood, 1968, vol. 31, p. 503.
11. Piomelli S., Lurinsky G., Wasserman L. R. The mechanism of red cell aging. 1. Relationship between cell age and specific gravity evaluated by ultracentrifugation in a discontinuous density gradient.—J. Lab. and Clin. Med., 1967, vol. 69, p. 659.
12. Lushbaugh C. C., Basmann N. J., Glascock B. Electronic measurement of cellular volumes.—Blood, 1962, vol. 20, p. 241.
13. Шустов М. И. Кондуктометрический датчик счета частиц.—Новости мед. техн., 1979, вып. 2.
14. Андрианов Л. А. и др. Использование спектров распределения клеток культуры ткани по объемам в изучении механизмов действия биологически активных соединений.—Новосибирск, 1973. (Препринт/АН СССР, Сиб. отд-ние, ИАиЭ; № 12.)
15. Рабинович Ф. М. Кондуктометрический метод дисперсионного анализа.—Л.: Химия, 1970.
16. Солобоев В. Е., Чернов Ю. П. Улучшение разрешения системы типа Коултера для измерения распределений эритроцитов по объемам.—В кн.: Автоматизированный анализ клеточных популяций.—Новосибирск: ИАиЭ СО АН СССР, 1978.
17. Deblois R. W., Bean C. P. Counting and sizing of submicron particles by the resistive pulse technique.—Rev. Sci. Instrum., 1970, vol. 41, p. 909.
18. Kachel V. Basic principles of electrical sizing of cells and particles and their realization in the new instrument "Metricell".—J. of Histochem. and Cytochem., 1976, vol. 24, p. 211.
19. Douglas A. Multi-purpose diluent for use in blood analysis by electronic instrumentation of the Coulter type.—Publ. 1976. Cl. 252—408. USA. Pat. 3962125.

Поступила в редакцию 20 апреля 1982 г.