

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ».

Физический факультет

Кафедра общей физики

Замараева Екатерина Владиславовна

КУРСОВАЯ РАБОТА

**Исследование точности измерения эритроцитов с
помощью метода Культера и сканирующей проточной
цитометрии**

Электромагнитный практикум, 2 курс, группа №19310

Научный руководитель:

д.ф.-м.н. В.П. Мальцев

Оценка научного руководителя

«_____» _____ 20__ г.

Преподаватель практикума

к.ф.-м.н. А.А. Симонов

Оценка преподавателя практикума

«_____» _____ 20__ г.

Куратор практикума:

к.т.н. В.Т. Астрелин

Итоговая оценка

«_____» _____ 20__ г.

Новосибирск 2020

Аннотация

Целью работы являлось исследование погрешности измерения объема эритроцитов на базе двух различных методов измерения. Для этой цели был использован сканирующий проточный цитометр (СПЦ), измеряющий светорассеяние клеток в угловом диапазоне. Данный подход позволяет определять параметры эритроцита с помощью решения задачи светорассеяния, основанной на оптической модели двойковогнутого диска. Результаты, полученные на СПЦ для эритроцитов, проходили сравнение с Sysmex XT-4000i, который широко распространен в клинических лабораториях. Принцип работы этого аппарата основан на импедансометрическом методе определения размера частиц путем измерения изменения электропроводности в проводящей жидкости, проходящей через малое отверстие. На основании полученных данных по объему эритроцитов в обоих методах оценены погрешности полученных величин. Было выяснено, что метод Культера является менее чувствительным методом по сравнению с оптическим методом СПЦ.

Ключевые слова: эритроциты, цитометрия, электропроводность, метод Культера, погрешность.

Оглавление

1. Введение.....	4
2. Основная часть.....	5
2.1 Метод Культера.....	5
2.1.1 Теория.....	5
2.1.2 Эксперимент.....	5
2.2 СПЦ.....	6
2.2.1 Теория.....	6
2.2.2 Эксперимент.....	7
3. Заключение.....	9
4. Список используемой литературы.....	10

1. Введение

Анализ крови широко используется в настоящее время для мониторинга возникновения заболеваний. Для повышения качества результатов диагностики требуется повышать точность определения морфофункциональных параметров исследуемых клеток крови.

Эритроциты — это самые многочисленные клетки крови, благодаря которым происходит перенос кислорода к тканям и органам в организме и выведение углекислого газа в обратном направлении. По форме эритроцит представляет собой двояковогнутый диск диаметром около 7.5 мкм и толщиной около 2 мкм (см. Прил. 1). Состоит из гемоглобина (32%), воды (65%) и компонент мембраны (3%).

Параметры клеток могут варьироваться в зависимости от возраста и пола пациента, а их эластичность снижается с возрастом самих клеток (около 120 дней). Существует несколько методик, как можно провести данные замеры. В данной работе будет проведено сравнение двух из возможных.

Первый метод был получен в лабораторных условиях с использованием сканирующий проточного цитометра. Это метод позволяет исследовать одиночные частицы в различных средах по сигналам светорассеяния.

Второй используется в клиниках для общего анализа крови, конкретно в НМИЦ Мешалкина, на гематологическом анализаторе Sysmex XT-4000i. Этот метод анализа уступает по точности измерений характерного объема эритроцитов. В данной работе будет приведено, что прибор менее чувствительный к изменению объема эритроцитов.

2. Основная часть

2.1. Метод Култера

2.1.1. Теория

Один из самых распространенных методов подсчёта количества и измерения объёма эритроцитов – это метод Култера, основанный на измерении электрического сопротивления одиночных клеток в целом потоке эритроцитов. Это разделение обеспечивается тем, что создается малое отверстие, через которое может пройти только одна частица. Проходя через отверстие прибор регистрирует изменение значения сопротивления вследствие другой проводимости эритроцита нежели раствора. Из недостатков можно отметить, что данный метод не учитывает различия в форме среди клеток пробы, это вносит погрешность для измерения объёма.



Рис 1. Sysmex XT-4000i

Подробнее об устройстве Sysmex XT-4000i (рис.1), на которой был реализован метод Култера. это автоматический гематологический анализатор, способный исследовать основные параметры жидкостей тела. Характерен быстротой проведения результата (порядка минуты).

2.1.2 Эксперимент

В качестве пробы была взята свежая венозная кровь, разбавленная 150 мМ хлоридом аммония в 10 раз. Данный раствор необходим для того, чтобы проверить чувствительность прибора к изменению эритроцита, так как он инициирует изотонический гемолиз. По прохождении 10 минут из двояковогнутого диска превращаются в сферы. На Sysmex XT-4000i были получены следующие значения (таблица 1).

Время от начала эксперимента	0 сек	6 мин	10 мин
Значение объема(fL)	83,8	87,5	89,6

Таблица 1. Значение объема эритроцита от времени, метод Култера

Проведем аналогичные измерения сферизации эритроцитов и посмотрим чувствительность лабораторного метода к изменению объема эритроцита.

2.2. Сканирующий проточный цитометр

2.2.1. Теория

Метод построен на том, что жидкость протекает по проточной кювете с постоянным давлением (установка на рис.2). По параметрам отражения луча лазера от отдельной клетки можно произвести физические показатели клетки. Фиксировалась частица следующим образом: частица, пересекая пучок Лазера 2, то свет, рассеянный от неё приходит на фотоприёмник (ФЭУ).

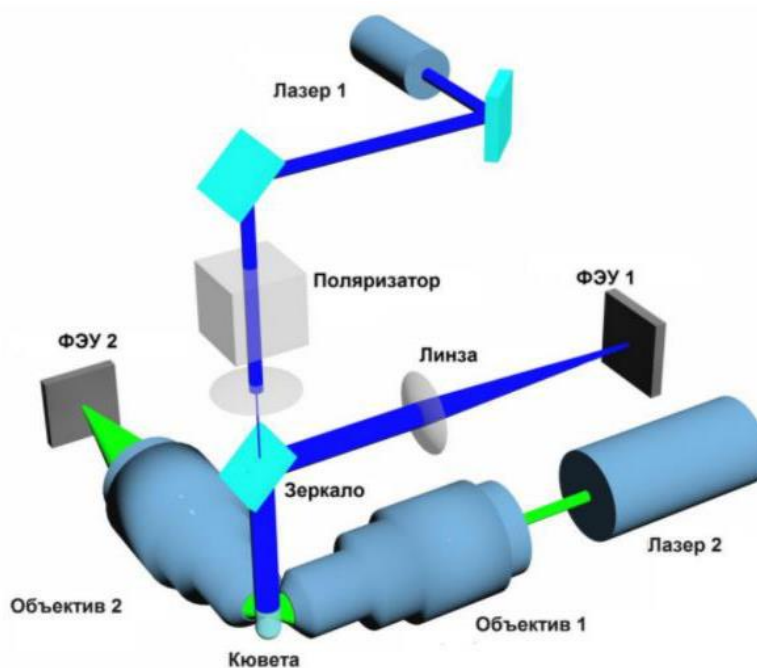


Рис 2. Установка СФЗ

Ниже представлены две формулы, предсказывающие на какой угол преломится свет, зная его сферическую форму, потом из этих данных можно найти параметры эритроцитов. Измеряемые индикатриса светорассеяния

$I^{LSP}(\theta)$ и сигнал рассеяния вбок I^{SSC} .

$$I^{LSP}(\theta) = k_1 \int_0^{2\pi} [S_{11}(\theta, \varphi) + S_{14}(\theta, \varphi)] d\varphi$$

$$I^{SSC} = k_2 \iint_{\omega} d\theta d\varphi \sin\theta [S_{11}(\theta, \varphi) - S_{12}(\theta, \varphi) \cos(2\varphi) - S_{13}(\theta, \varphi) \sin 2\varphi]$$

Где $S_{ij}(\theta, \varphi)$ элементы матрицы Мюллера, (θ) и φ - полярные и азимутальные углы рассеяния соответственно, ω - круговая апертура объектива, а k_i определялись из калибровки.

2.2.2. Эксперимент

Первой задачей было получить раствор, который бы сферизовал клетки крови. Проведя первые эксперименты раствором состоящего из дистиллированной воды и физического раствора малая часть клеток приобрела нужную форму. Поэтому в качестве второго взяли раствор, состоящий из крови и в 10 раз разбавленной хлоридом аммония. В ходе эксперимента были построены следующие графики (график 2)- где по оси x отложен угол рассеяния эритроцита на сферическое зеркало.

Теория работает максимально точно для сферизованных эритроцитов. Используя программу, которая по виду импульса отсеивала не сферические эритроциты (через преобразование Фурье и вид получившегося графика). Таким образом, можно сравнить экспериментальные значения с теоретическими.

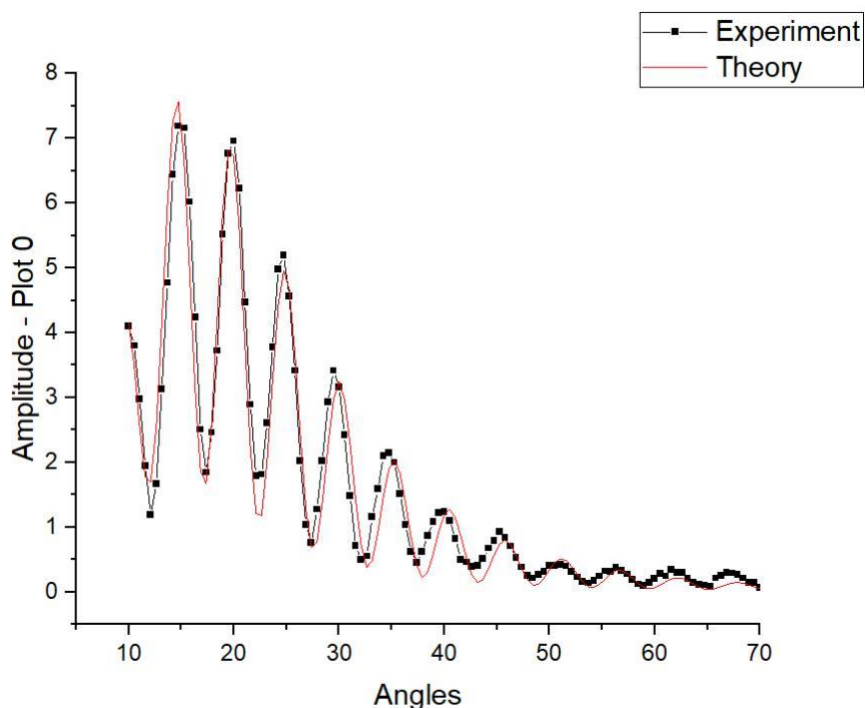


График 2. Сравнение теории с практикой

В процессе изотонического гемолиза эритроцитов в режиме реального времени записывались сигналы от одиночных клеток с помощью сканирующего проточного цитометра. Это позволяет построить распределения по объему в интересующий момент протекания кинетики, а также проследить весь процесс и скорость изменения объема.

Полученные значения о размерах эритроцита представлены в таблице 2

Время от начала эксперимента	0 сек	6 мин	10 мин
Значение объема(fL)	90,1	110,5	120,3

Таблица 2. Значение объема эритроцита от времени, метод СПЦ

Заключение

В ходе работы было выяснено, что анализ крови методом Култера, применяемый в клиниках, является не таким точным, как сканирующий проточный цитрометр, поскольку он менее чувствителен к изменению объема эритроцитов. Подвержена точность метода СПЦ: сходимость с теорией, основанной на рассеянии лучей, т.е. оптический метод оказался точнее электрического.

Список литературы

1. Burnier L. et al. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine // *Thromb. Haemost.* 2009. Vol. 101, No 3. P. 439–451
2. Shet A.S. Characterizing blood microparticles: technical aspects and challenges // *Vasc. Health Risk Manag.* 2008. Vol. 4, No 4. P. 769.
3. Maltsev V.P. Characterisation of bio-particles from light scattering. Utrecht ; Boston: VSP, 2004. 133 p.