

УДК 577.3

МЕТОД ЛАЗЕРНОГО ЦИТОМОНИТОРИНГА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗМЕРОВ ЭРИТРОЦИТОВ

© 2002 г. К. В. Шайтан, А. Ф. Лобков, И. Б. Тимофеев, И. Л. Лисовская*,
А. А. Чижов, Э. В. Терёшкин

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
119899 Москва, Воробьевы горы, МГУ; факс (095) 939-11-15, тел.: (095) 939-43-67;
электронная почта: sasha@biophys.msu.ru*

**Гематологический центр РАМН,
123167 Москва, Новозыковский проезд, 4а; факс (095) 212-88-70*

Метод лазерного цитомониторинга, в основе которого лежит измерение малоуглового светорассеяния частицами в разбавленных суспензиях, позволяет получить функции распределения частиц по размерам и проследить их эволюцию во времени с высоким временным разрешением. В работе рассмотрены методические вопросы применения лазерного цитомонитора для исследования эритроцитов человека, ресуспендированных в различных солевых средах.

С помощью метода лазерного цитомониторинга были получены функции распределения эритроцитов по размерам в зависимости от осмотичности ресуспендирующих сред. Проводилось сравнение объема эритроцитов, полученных методом цитомониторинга, с реальным объемом клеток. На основании этого были построены калибровочные функции. Проверялось также влияние изменения формы клеток на результаты измерения объемов эритроцитов методом цитомониторинга. Полученные в данной работе результаты показывают, что метод лазерного цитомониторинга чувствителен к изменению объема эритроцитов в гипертонических и гипотонических средах и практически нечувствителен к изменению морфологии клеток.

Клеточный объем является одним из основных показателей функционального и структурного состояния клетки [1]. В норме регуляцию клеточного объема осуществляет множество взаимосвязанных физиологических и биохимических процессов [1, 2]. Известно, что при некоторых патологических состояниях происходит нарушение этой регуляции [3–5]. Существенную роль в жизнедеятельности организма играет регуляция объема эритроцитов, поскольку отношение площади поверхности к объему этих клеток является одним из основных параметров, определяющих реологические свойства крови [6, 7]. Это делает весьма актуальной разработку методов, позволяющих эффективно определять функции распределения клеток по размерам и, в частности, наблюдать кинетику изменения клеточных размеров с высоким временным разрешением.

Данная работа посвящена методическим вопросам определения функций распределения по размерам частиц на биологических объектах. В качестве экспериментального материала выбраны нормальные эритроциты человека. Особенности строения и доступность получения этих клеток делают их удобным объектом для изучения. Для определения функций распределения эритроцитов по размерам использовалась оригинальная многоцелевая аналитическая система (лазерный цитомонитор), работающая в автоматическом ре-

жиме. Работа системы основана на известном методе измерения малоуглового рассеяния света на взвешенных в жидких средах малоразмерных объектах. Лазерный цитомонитор позволяет получить функции распределения клеток по размерам и их эволюцию во времени с разрешением порядка 0.02 с.

ОСНОВЫ МЕТОДА

Ниже в работе используется численная обработка результатов оптических измерений в терминах функций распределения частиц по размерам. Для определения функции распределения частиц по размерам, рассчитываемой по измеряемой индикатрисе рассеяния света, необходимо решить обратную задачу рассеяния. Эта задача относится к классу некорректных и не имеет однозначного решения [8]. Принципиальные трудности восстановления функции распределения связаны с конечной точностью измерения индикатрисы рассеяния.

При математической обработке экспериментальной индикатрисы рассеяния света на малых объектах часто используется метод Шифрина [9]. Применение этого метода требует предварительного сглаживания индикатрисы рассеяния перед численным дифференцированием. Этот метод принципиально непригоден для описания рассея-

ния на малых частицах (для рассматриваемой установки – менее 2 мкм), что связано с использованием асимптотического решения. Метод приводит к появлению в функции распределения участков с отрицательными значениями. Использование метода также требует обрезания экспериментальной индикатрисы рассеяния по углам: сверху – из-за нарастания влияния на результат экспериментальных погрешностей при больших углах рассеяния и снизу – для устранения области аппаратного искажения индикатрисы при малых углах.

Для регуляризации данной задачи, повышения точности и надежности конечных результатов целесообразно использовать дополнительные сообщения относительно изучаемых объектов.

Будем полагать, что в суспензии исследуемых частиц имеется несколько достаточно хорошо выраженных по размерам классов (К). Представим функцию распределения рассеивающих центров (РЦ) по размерам в виде:

$$\frac{\partial N_k}{\partial r} = \gamma_k \Lambda_k(r) N, \quad k = 0 \dots K-1, \quad (1)$$

здесь η_k – доля РЦ в классе k , $\Lambda_k = \Lambda_k(r)$ – распределение РЦ по размерам внутри класса k (ниже используется нормальное распределение), N – полное число клеток, N_k – число клеток в классе k .

В результате непрерывная функция распределения по размерам заменяется распределением населенностей по дискретным классам η_k .

Часть классов соответствует не только увеличившимся в размерах единичным клеткам, но и кластерам, состоящим из двух, трех и т.д. слипшихся клеток. Очевидно, что сохранение суммарного числа клеток приводит к наличию нормированных соотношений вида:

$$\sum_{k'_\sigma} \eta_k w_k = X_\sigma, \quad \sigma = 0 \dots \Sigma-1, \quad (2)$$

здесь w_k – весовой фактор (число клеток в РЦ), k'_σ и k''_σ – начальный и конечный номер классов клеток вида σ , X_σ – доля клеток вида σ .

В рассматриваемом методе производятся многократные измерения индикатрисы рассеяния в различные моменты времени t_λ :

$$I = I(t, \beta) = I_{\lambda k}, \quad \lambda = 0 \dots \Omega-1, \quad (3)$$

$$k = 0 \dots M-1.$$

Шумовые составляющие могут быть достаточно эффективно устранены усреднением результатов измерений по нескольким близким моментам времени. Однако если время заметного

изменения населенностей клеточных классов сравнимо с интервалом усреднения индикатрисы или меньше его, то при этом усреднении теряется информация о динамике распределения клеток по размерам. Подавление высокочастотных знакопеременных шумов в этом случае проводится с использованием гладкости временной зависимости населенности η_k класса k . Представим далее функцию $\eta_k = \eta_k(t)$ многочленом степени $T < \Omega$:

$$\eta_k(t) = \sum_{T=0}^{T-1} v_{kT} t^T, \quad (4)$$

Сформулируем метод восстановления функции распределения по размерам, учитывающий вышеуказанные особенности методики измерения и исследуемых объектов – клеточных популяций. Для этого представим интенсивность I_{ap} , зависящую как от угла рассеяния β , так и от времени t , в виде разложения по функциям $h_k = h_k(\beta)$, описывающим вклады в индикатрисы рассеяния от частиц с размерами, относящимися к классам k

$$I_{ap}(\beta, t) = N \sum_{k=0}^{K-1} \eta_k(t) h_k(\beta). \quad (5)$$

Функция $h_k(\beta)$ определяется интегралом:

$$N h_k(\beta) = \int_0^\infty \Lambda_k(r) N I(r, \beta) dr, \quad (6)$$

здесь $N h_k(r, \beta)$ – теоретическая индикатриса рассеяния от частиц размера r , получаемая с помощью асимптотических формул метода Шифрина [9]. Подставив (4) и (6) в (5), получим:

$$I_{ap}(\beta, t) = N \sum_{k=0}^{K-1} \left[\int_0^\infty \Lambda_k(r) I(r, \beta) dr \right] \sum_{T=0}^{T-1} v_{kT} t^T =$$

$$= N \sum_{k=0}^{K-1} h_k(\beta) \sum_{T=0}^{T-1} v_{kT} t^T. \quad (7)$$

Отметим, что вид функций $h_k(\beta)$ определен заранее и зависит от заданных типов классов. В известных точках β_k эти функции рассчитываются заранее, так же как и величины t_λ^T в точках t_λ , т.е. вся информация содержится в матрице размерностью $K \times T$.

Система условных уравнений для определения параметров включает $M \times \Omega$ уравнений:

$$I_{ap}(t_\lambda, \beta_k) = I_{\lambda k}, \quad \lambda = 0 \dots \Omega-1, \quad (8)$$

$$k = 0 \dots M-1,$$

и $\Sigma \times \Omega$ условий нормировки

$$\sum_{k'_\sigma}^{k_\sigma} \eta_k(t_\lambda) w_k = X_\lambda, \quad \sigma = 0 \dots \Sigma - 1, \quad (9)$$

$$\lambda = 0 \dots \Omega - 1$$

Задача о наилучшем возможном согласии между $I_{ap}(\beta, t)$ и измеренными значениями $I_{\lambda k}$ при удовлетворении нормировочных соотношений (2) решается стандартными методами. Под наилучшим возможным согласием понимается наименьшая сумма квадратов отклонений $I_{ap}(\beta, t)$ от $I_{\lambda k}$ и квадратов отклонений от соотношения (2):

$$S = \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} [I_{ap}(t_\lambda, \beta_k) - I_{\lambda k}]^2 +$$

$$+ \langle I \rangle^2 \mu \sum_{\sigma=0}^{\Sigma-1} \left[X_\sigma - \sum_{k'_\sigma}^{k_\sigma} \eta_k w_k \right]^2, \quad (10)$$

$$\text{где } \langle I \rangle^2 = \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} I_{\lambda k}^2 / (\Omega M).$$

здесь $\langle I \rangle^2$ – средний квадрат интенсивности, вводится для согласования размерностей в сумме (10), а фактор $\mu \geq 1$ может делать нормировку более строго выполняемой, чем совпадение I и I_{ap} в некоторой точке λ, k .

С учетом (5) и (7) уравнение (10) принимает вид:

$$S = \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} \left[N \sum_{k=0}^{K-1} h_k(\beta_k) \sum_{T=0}^{T-1} v_{KT} t_\lambda^T - I_{\lambda k} \right]^2 +$$

$$+ \langle I \rangle^2 \mu \sum_{\kappa=0}^{\Omega-1} \sum_{\sigma=0}^{\Sigma-1} \left[X_\sigma - \sum_{k'_\sigma}^{k_\sigma} w_k \sum_{T=0}^{T-1} v_{KT} t_\lambda^T \right]^2. \quad (11)$$

Условие минимума функции S от $K \times T$ переменных v_{kT} имеет вид

$$\frac{\partial S}{\partial v_{KT}} = 0, \quad k = 0 \dots K-1, \quad T = 0 \dots T-1, \quad (12)$$

или, с учетом (11) и после элементарных преобразований:

$$\sum_{\sigma=0}^{\Sigma-1} \sum_{\kappa=k'_\sigma}^{k_\sigma} \sum_{T=0}^{T-1} v_{KT} \left[2N^2 \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} h_k(\beta_k) t_\lambda^T h_{k'}(\beta_k) t_\lambda^T + \right.$$

$$\left. + \langle I \rangle^2 \mu \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} 2w_k t_\lambda^T w_{k'} t_\lambda^T \right] =$$

$$= 2 \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} I_{k\lambda} H h_{k'}(\beta_k) t_\lambda^T + \langle I \rangle^2 \mu 2 \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} w_k t_\lambda^T X_k,$$

$$k' = 0 \dots K-1, \quad T' = 0 \dots T-1,$$

или

$$\sum_{\gamma=0}^{\Gamma-1} \eta_\gamma a_{\gamma\delta} = b_\delta, \quad \delta = 0 \dots \Gamma-1, \quad \Gamma = KT, \quad (14)$$

где индекс γ пробегает все пары значений $k = 0 \dots K-1, \tau = 0 \dots T-1$, индекс δ – значения $k' = 0 \dots K-1, \tau' = 0 \dots T-1$:

$$a_{\gamma\delta} = 2N^2 \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} h_k(\beta_k) h_{k'}(\beta_k) t_\lambda^{T+T'} +$$

$$+ \langle I \rangle^2 \mu 2 \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} w_k w_{k'} t_\lambda^{T+T'}, \quad (15)$$

$$b_\delta = 2N \sum_{k=0}^{M-1} \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} I_{k\lambda} h_{k'}(\beta_k) t_\lambda^T + 2 \langle I \rangle^2 \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} w_k t_\lambda^T X_k.$$

Заметим, что $a_{\gamma\delta} = a_{\delta\gamma}$, индексы k и τ, k' и $\tau'(\tau + \tau')$ в $a_{\gamma\delta}$ входят одинаковым образом, что сокращает объем вычислений $a_{\gamma\delta}$. Вводя следующие обозначения:

$$\Pi_{KK'} = \sum_{k=0}^{M-1} h_k(\beta_k) h_{k'}(\beta_k),$$

$$\Delta_i = \sum_{\lambda=0}^{\Omega-1} t_\lambda^i, \quad (16)$$

запишем уравнения (15) в виде:

$$a_{\gamma\delta} = 2N^2 \Delta_{T+T'} \Pi_{KK'} + 2\mu \langle I \rangle^2 w_k w_{k'} \Delta_{T+T'},$$

$$b_\delta = 2N \sum_{\lambda=0}^{T-1} t_\lambda^T \sum_{k=0}^{M-1} I_{k\lambda} h_{k'}(\beta_k) + 2\mu \langle I \rangle^2 w_{k'} X_{k'} \Delta_T. \quad (17)$$

Итак, решение задачи определения динамики функции распределения сводится к определению элементов матрицы v_{kT} (т.е. v_γ) путем решения системы $K \times T$ линейных уравнений (14), для чего предварительно вычисляются элементы матриц $a_{\gamma\delta}$ и b_δ по (15) или (17).

Отметим, что предлагаемый метод не требует предварительного сглаживания экспериментальной индикатрисы рассеяния и обрезания ее сверху и снизу по углам. В нем явно не использованы также свойства функции Бесселя (что важно в

методе [9, 10]), т.е. возможно расширение области применимости измерений в сторону меньших размеров частиц, рассеяние на каждой из которых дает индикатрису, отличную от функции Бесселя. Громоздкие вычисления функций распределения могут выполняться предварительно – один раз для данного набора классов клеток (точнее, вычисляются не сами эти функции, а их интегралы $\Pi_{kk'}$), что упрощает численную процедуру.

Предлагаемый метод изучения кинетики изменения размеров клеток использует информацию о структуре распределения исследуемых клеток по размерам и нормировочные соотношения, вытекающие из сохранения числа клеток (но не рассеивающих центров). При этом целесообразно использовать также стандартные методы подавления высокочастотных экспериментальных шумов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приготовление суспензий. В работе использовали кровь здоровых доноров, взятую на гепарине (5 ед. акт/мл). Эритроциты осаждали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин, удаляли плазму и клетки белой крови, осадок дважды отмывали 10 – кратным объемом изотонического HEPES-буфера (5 mM KCl, 10 mM HEPES, 145 mM NaCl, pH 7.4) при том же режиме центрифугирования и ресуспендировали в HEPES-буфере при гематокрите 40–50%. Все измерения проводили в течение 24 ч с момента взятия крови при температуре $20 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Осмотичность растворов определяли с помощью криоскопического осмометра ОМКА 1Ц-01. Перед измерением суспензию эритроцитов разбавляли до необходимой концентрации клеток HEPES-буфером, содержащим NaCl, в концентрации, обеспечивающей необходимое значение осмотичности.

Контроль за изменением формы эритроцитов осуществляли с помощью светового микроскопа.

Лазерный цитомонитор. Определение средних размеров эритроцитов и функций распределения по размерам клеток проводили с использованием лазерного цитомонитора, конструкция которого разработана на кафедре физической электроники МГУ, и затем произведена его заводская сборка [11]. Прибор укомплектован PC с CPU Athlon T-K7 1.1 ГГц.

На рис.1 представлена блок-схема прибора. Основными элементами являются: источник когерентного излучения – He–Ne-лазер (1) с длиной волны 623 нм; расширитель лазерного луча – двухлинзовая оптическая система, помещенная в цилиндрический металлический корпус (2); стекло, направляющее часть входного светового пучка на фотодиод для определения интенсивности излучения (3); кюветный блок со встроенной магнитной мешалкой и подвесной съемный модуль рабочей кюветы с исследуемой суспензией клеток крови человека (4); стекло, направляющее часть выходного лазерного пучка на фотодиод для определения интенсивности излучения (5); щель, вырезающая из симметричной картины рассеяния радиальную полоску (6); длиннофокусная собирающая линза, проектирующая изображение щели в фокальной плоскости (7); жестко фиксируемая юстировочная система для фотоприемника (ПЗС-линейки) (8). Непосредственно перед фотоприемником помещается нейтральный фильтр для уменьшения паразитной засветки и подвижный “нож”, ограничивающий сечение прямого лазерного луча. Видеосигнал с ПЗС-линейки обрабатывается схемой прибора.

Кюветное отделение лазерного цитомонитора с объемом кюветы 5 мл имеет встроенную магнитную мешалку. Прибор имеет систему термостатирования для поддержания температуры кле-

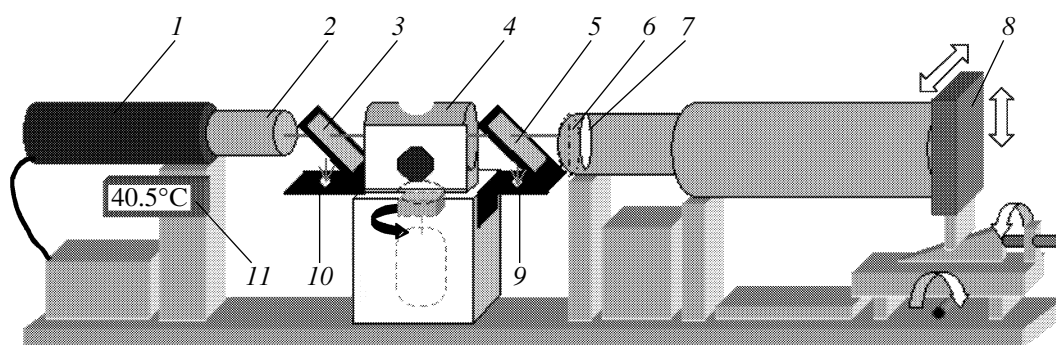


Рис. 1. Блок-схема лазерного цитомонитора. 1 – He–Ne-лазер; 2 – расширитель лазерного луча – двухлинзовая оптическая система; 3 – стекло, направляющее часть входного светового пучка на фотодиод для определения его интенсивности; 4 – кюветный блок с магнитной мешалкой; 5 – стекло, направляющее часть выходного лазерного пучка на фотодиод для определения его интенсивности; 6 – вырезающая щель; 7 – собирающая линза; 8 – ПЗС линейка; 9 и 10 – фотодиоды, 11 – индикатор температуры.

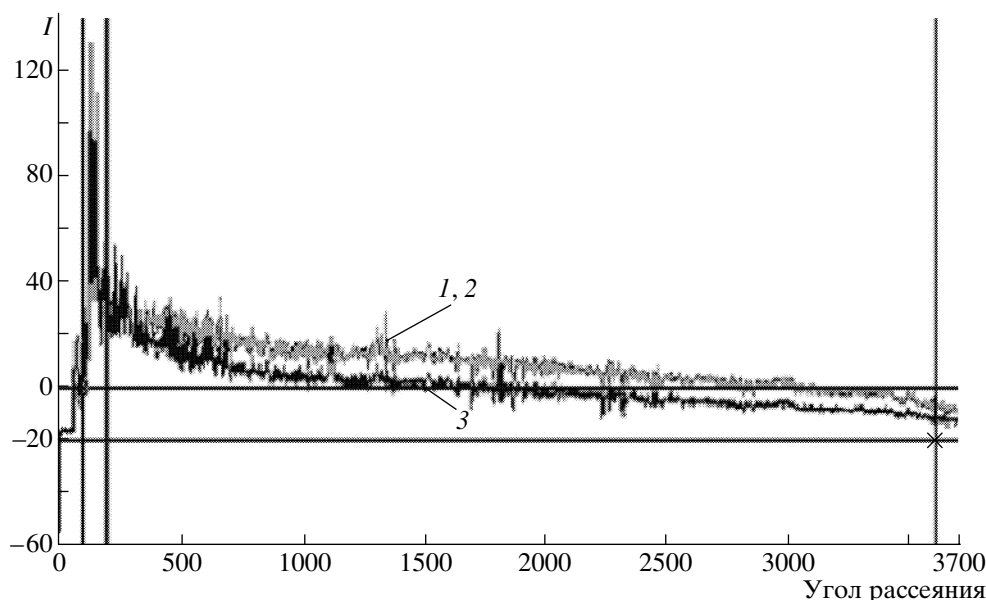


Рис. 2. Индикатрисы рассеяния на суспензии эритроцитов в изоосмотической среде. Концентрации клеток, тыс. мл: 1 – 20; 2 – 30; 3 – 50.

точной суспензии в кювете цитомонитора на заданном уровне в диапазоне 10–60°C с точностью не хуже 0.2°C, с цифровой индикацией температуры и с установкой необходимой погрешности измерений. В качестве нагревательного элемента служит мощный $n-p-n$ транзистор, работающий в режиме эмиттерного повторителя. Рассеиваемая им мощность

достигает 20 Вт, что позволяет нагревать необходимый объем суспензии на 20°C за 1 мин. Лазерное излучение, проходя через кювету с суспензией эритроцитов, рассеивается клетками. Для определения функции распределения по размерам необходимо измерить индикатрису рассеяния $I(\beta)$. Чтобы избавиться от исходного пучка, который мешает выделить сигнал при малых углах рассеяния, измерения проводятся за пределами фокального пятна, в котором собран исходный пучок. При этом перемещение частиц вдоль и поперек пучка не меняют распределения интенсивности в фокальной плоскости. Свет, рассеянный под данным углом, распределен в фокальной плоскости линзы на соответствующее угловое расстояние от центра и образует ореол вокруг фокального пятна от исходного пучка лазера. Размеры фокального пятна обычно соответствуют углу $\beta_{\min} \approx 10'$. Измерения $I(\beta)$ проводили для углов $\beta > \beta_{\min}$ и захватывали область до $\beta \approx 4^\circ$ (или от 50 до 3700 элемента ПЗС).

В эксперименте излучение рассеивается на исследуемой суспензии эритроцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 показаны индикатрисы рассеяния на суспензии эритроцитов с концентрациями клеток 20, 30, 50 тысяч на 1 мл в изоосмотической среде (~295 мОсМ). По оси абсцисс отложена величина угла рассеяния в относительных единицах (соответствует углу в градусах от 0 до 4), а по оси ординат – интенсивность рассеянного света.

Возрастание концентрации клеток в суспензии выше 50 тыс./мл сопровождается быстрым увели-

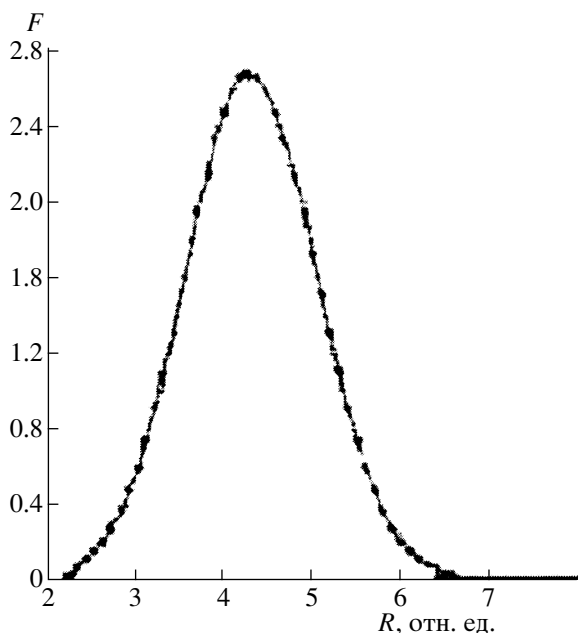


Рис. 3. Функция распределения по размерам для эритроцитов, ресуспендированных в изоосмотической среде ($\mu = 295$ мОсМ).

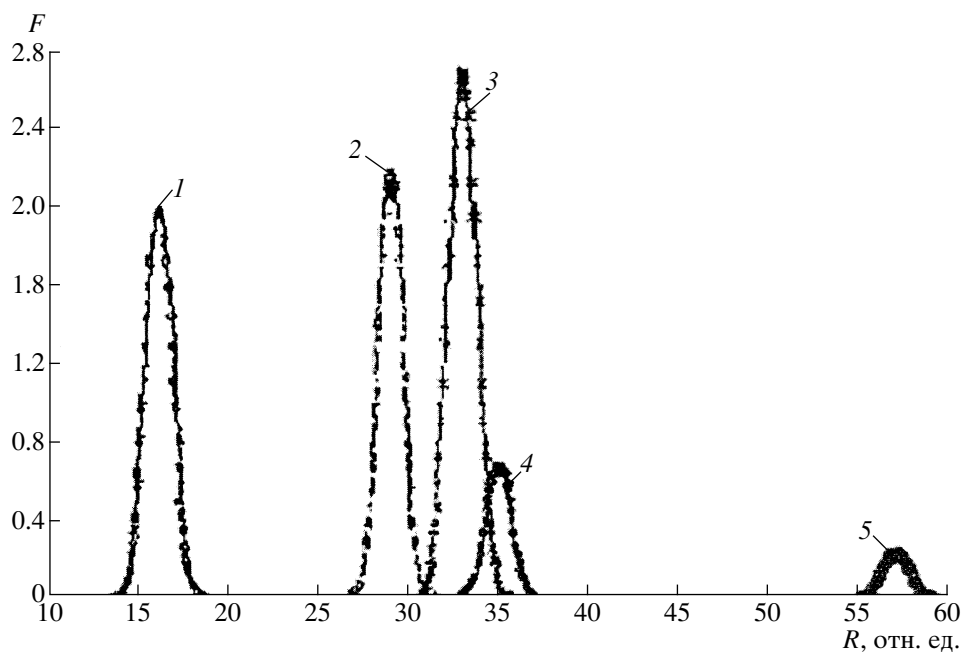


Рис. 4. Функции распределения примесей. 1–5 – функции распределения частиц примесей, находящихся в буферном растворе, не содержащем клеток.

чением поглощения света, рассеянного клеточной взвесью. При этом регистрируемая интенсивность рассеяния снижается, и становится невозможным восстановление функции распределения по размерам. Как видно из рисунка 2, индикатрисы, соответствующие суспензиям с концентрацией клеток 20 и 30 тыс/мл (кривые 1, 2), практически совпадают, а интенсивность рассеяния для концентрации 50 тыс/мл (кривая 3) несколько ниже. Поэтому в дальнейшем использовали концентрацию эритроцитов ~30 тыс./мл.

Математическая обработка индикатрисы рассеяния описанным выше методом позволяет получить функции распределения клеток по размерам. На рис. 3 представлена восстановленная функция распределения по размерам эритроцитов, ресуспендированных в изоосмотической среде. На графике по оси абсцисс отложен эффективный радиус R в относительных единицах, а по оси ординат – доля частиц данного размера. Видно, что средний эффективный радиус клеток $R \sim 4.3$ отн. ед.

В суспензиях, кроме клеток, находятся также частицы пыли. На рис. 4 представлены функции распределения частиц примесей находящихся в буферном растворе, не содержащем клетки. Средний диаметр этих частиц, являющихся более крупнодисперсной фракцией исследуемой системы, значительно превосходит характерные клеточные размеры.

На рис. 5 приведены кривые распределения клеток, ресуспендированных в средах с разными значениями осмотичности (π). С изменением π ме-

няется величина набухания и соответственно – объем клеток. При этом в гипотонических условиях объем увеличивается, а в гипертонических – уменьшается.

Из рис. 5 видно, что при возрастании осмотичности среды инкубации от 160 до 430 мосМ средний эффективный радиус эритроцитов уменьшается с 7 до 2.5 отн. ед. Проверяться воспроизводимость результатов измерений в серии из семи опытов. Отклонение от приведенных выше значений среднего радиуса составляло ± 0.1 .

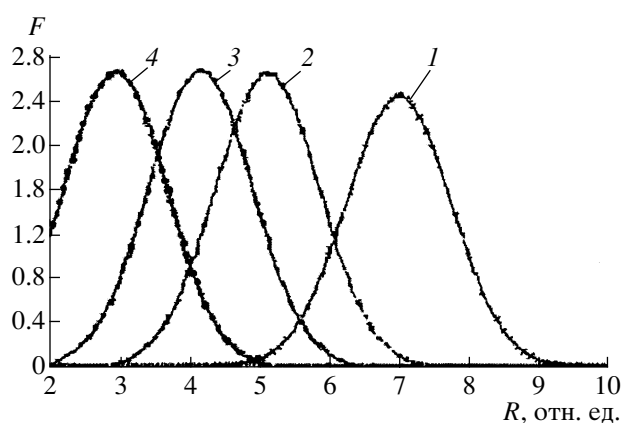


Рис. 5. Функции распределения эритроцитов по значениям R .
Значения осмотичности π , мосМ: 1 – 160; 2 – 260; 3 – 295; 4 – 430.

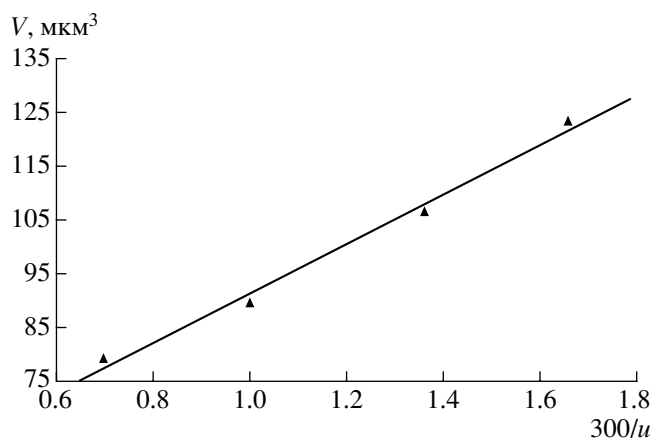


Рис. 6. Зависимость объема эритроцитов ($V, \mu\text{m}^3$) от обратной осмотичности ($300/u$).

Для калибровки шкалы лазерного цитомонитора определяли средние абсолютные значения объема эритроцитов (в μm^3) в зависимости от осмотичности ресуспендирующей среды. Распределение эритроцитов по плотности измеряли с помощью центрифугирования в капиллярах, содержащих смеси диметилфталата и диэтилфталата (метод Данона и Мариковского [12]). Зная среднее значение содержания гемоглобина в клетке, можно перейти от экспериментально определенных средних значений плотности к средним значениям объема [13]. Были определены средние величины объема клеток в средах со значениями $u = 180, 220, 300, 430$ мосМ. Зависимость объема клетки V от обратной осмотичности изображена на рис. 6. Эта зависимость линейна, что согласуется с литературными данными [6].

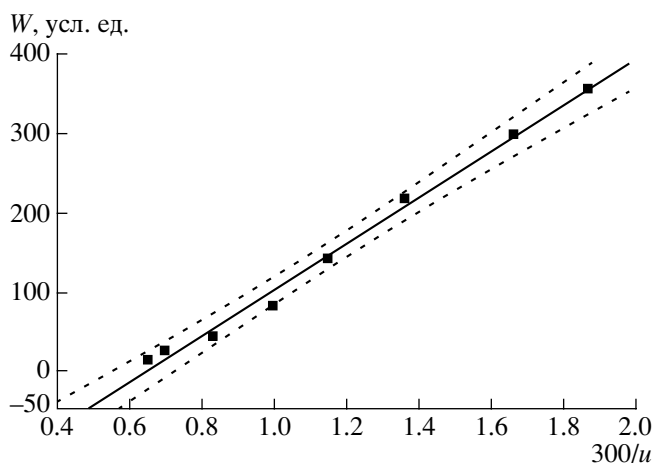


Рис. 7. Зависимость эффективного объема эритроцитов ($W, \text{ усл. ед.}$) от обратной осмотичности ($300/u$).

Аналогичная зависимость может быть построена для полученной методом лазерного цитомониторинга величины $R^3 \equiv W$ (эффективный объем). На рис. 7 представлена зависимость W от обратной осмотичности. Измерения проводили в средах с $u = 160, 180, 220, 260, 300, 360, 430, 480, 500$ и 532 мосМ. Значения R при $u = 500$ и 532 мосМ были меньше минимального радиуса, определяемого в данном методе, и не использовались для построения графика на рис. 6. Видно, что полученная зависимость достаточно близка к линейной.

Сравнивая между собой зависимости, представленные на рис. 6 и 7, можно видеть, что значения V и W с помощью линейного преобразования легко пересчитываются друг в друга. На рис. 8 представлена калибровочная кривая, позволяющая по величине среднего эффективного объема W , определяемого методом лазерного цитомониторинга, определить реальный средний объем эритроцитов V .

Поскольку рассеяние света клетками может зависеть от их формы, мы проверяли влияние изменения морфологии эритроцитов на результаты измерения их объема методом лазерного цитомониторинга. Известно, что некоторые химические соединения изменяют определенным образом форму эритроцитов [14]. Так, в присутствии 2,4-динитрофенола (концентрация ~ 5 мМ) клетки становятся эхиноцитами, а в растворе хлоропромазина с концентрацией 60 мкМ преобладают стоматоциты. Результаты определения средних значений эффективного радиуса R для эритроцитов, ресуспендированных в средах с различными значениями осмотичности, в зависимости от присутствия агентов, изменяющих морфологию клеток, представлены в таблице.

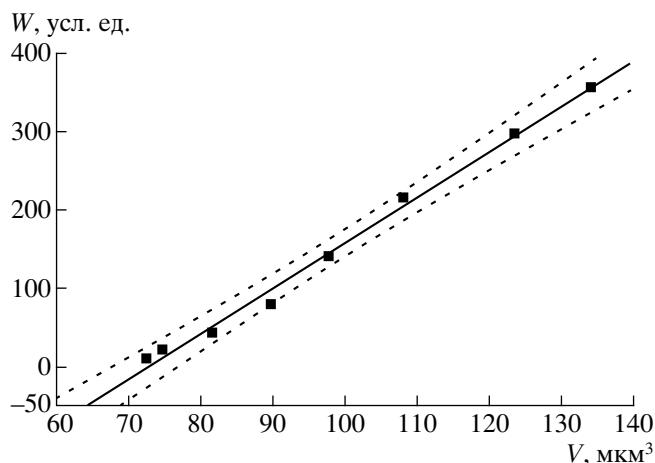


Рис. 8. Калибровочная кривая для определения среднего объема эритроцитов ($V, \mu\text{m}^3$) по величине определяемого методом лазерного цитомониторинга среднего эффективного объема ($W, \text{ усл. ед.}$).

Из таблицы видно, что изменение формы эритроцитов незначительно влияет на измеряемый методом лазерного мониторинга эффективный объем клеток. Это можно рассматривать как достоинство метода, поскольку многие из существующих методов измерения объема дают результаты, которые довольно чувствительны к форме клеток.

Размер клеток животных и человека является одним из важных показателей их состояния. Сохранение нормального объема является задачей системы ионного гомеостаза – одной из важнейших систем клетки [15]. Многие повреждающие факторы, например окислительный стресс, лекарственные препараты, приводят к изменению объема клетки, что одновременно сказывается и на ее жизнеспособности.

Метод лазерного цитомониторинга позволяет получить функции распределения эритроцитов в клеточных суспензиях. При разных значениях осмотичности сред можно получить клетки с разными значениями среднего объема. Полученные в данной работе результаты показывают, что метод лазерного цитомониторинга чувствителен к изменению объема эритроцитов в гипертонических и гипотонических средах. Сравнивая зависимости реального объема эритроцитов (V) и полученного методом цитомониторинга эффективного объема (W) от осмотичности, можно получить калибровочную функцию для перехода от W к V . По-видимому, при оценке объема эритроцитов методом цитомониторинга изменение морфологии клеток не очень существенно. Поскольку метод позволяет получать функции распределения клеток по размерам с высоким временным разрешением, может оказаться возможным использовать его для исследования быстрой кинетики изменения размеров клеток при различных воздействиях, например при действии ионофоров. По-видимому, характер калибровочных кривых будет изменяться в зависимости от свойств исследуемых суспензий. В частности, он может зависеть от содержания гемоглобина в эритроцитах. Поэтому для получения точных оценок может потребоваться построение калибровочных функций для каждой исследуемой суспензии.

Авторы благодарны Ф.И. Атауллаханову за многочисленные полезные обсуждения.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 01-04-49302), Минпромна-

Улияние динитрофенола (5 мМ) и хлоропромазина (60 мкМ) на величину эффективного радиуса эритроцитов (R) при разных значениях осмотичности

Среда (морфология клеток)	Осмотичность, мосМ				
	160	220	300	430	532
	R , усл. ед.				
Без добавленных агентов (дискоциты)	7	6	4.4	2.9	1.9
2,4-ДНФ (5 мМ) (эхиноциты)	6.9	5.8	4.1	2.9	1.8
ХПМ (60 мкМ) (стоматоциты)	7	6	4.2	2.9	1.9

уки, Правительства Москвы (гранты Москвы № 1.1.144 и 1.2.45 за 2001 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lang F., Busch G.L., Ritter M., Volkl H., Waldegger S., Gulbins E., Haussinger D. // *Physiol. Rev.* 1998. V. 78. P. 247–306.
2. Hoffmann E.K., Simonsen L.O. // *Physiol. Rev.* 1989. V. 69. P. 315–382.
3. Iolascon A., Miraglia del Giudice, Perrotta S., Morle L., Delaunay J. // *Haematologica*. 1998. V. 83. P. 240–257.
4. Reinhart W.H. // *J. Thorac. Cardiovasc Surg.* 1990. V. 100 (4). P. 538–543.
5. Hallgren R., Svenson K., Johansson E., Lindh U. // *Arthritis Rheum.* 1985. V.28. P. 169–173.
6. Атауллаханов Ф. И., Вумвицкий В. М., Лисовская И. Л., Тужилова Е. Г. // *Биофизика*. 1994. Т.39. № 4. С. 672–680
7. Clark M.R., Mohandas N., Shohet S.B. // *Blood*. 1983. V.61. P. 899–910.
8. Тихонов.А.Н., Арсенин.В.Я. Методы решения некорректных задач. М.:Наука, 1979.
9. Шифрин К.С. Введение в оптику океана.Л.: Гидрометеоиздат, 1983.
10. Ван де Хюлст. Рассеяние света малыми частицами. М.: Иностр. лит., 1961.
11. Александров А.Ф., Свистов Д.А., Тимофеев И.Б., Тимофеев Б.И., Черников В.А., Чижов А.А., Чувашев С.Н. // *Биомед. радиоэлектроника*. 2000. № 5. С. 50–64.
12. Danon D., Marikovsky Y. // *J. Lab. Clin. Med.* 1964. V. 64. P. 668–673.
13. Lew V.L., Raftos J.E., Sorette M., Bookchin R.M. Mohandas N. // *Blood*. 1995. V. 86. P. 334–341.
14. Alhanaty E., Sheety M. // *Blood*.1984. V. 63. P. 1203–1208.
15. Therien A. G., Blostein R. // *Amer. J. Cell. Physiol.* 2000. V. 279. P. 541–566.

Method of Laser Cyto-monitoring and its Application for ErythroCytes Sizing

**K. V. Shaitan, A. F. Lobkov, I. B. Timofeev, I. L. Lisovskaya,
A. A. Chizhov, E. V. Tereshkin**

*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
Haemological Scientific Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia*

This work discusses methodical questions of application of multipurpose analytical system (laser cytomonitor) for investigation of biological objects. The method of laser cytomonitor allows to obtain distribution functions of cell size and to trace their evolution with high time resolution.

Distribution functions of erythrocytes depending on osmotic pressure of incubating medium were determined with the help of a laser light-scattering. Volume estimated using cytomonitoring was compared with actual volume of cells, and calibration curves were constructed. The effect of the changes in cell shape on results of measuring of erythrocyte volume was also tested. The results obtained in the given work show that the method of laser cytomonitoring is sensitive to the changes of erythrocyte volume in hypertonic and hypotonic media.