

Mérési jegyzőkönyv

1. mérés:

Coulter számláló és áramlási citometria

A mérés helyszíne: Semmelweis Egyetem, Elméleti Orvostudományi Központ
Biofizika laboratórium

A mérés időpontja: 2013.02.13.

A mérést végezte: Jánosa Dávid Péter – FDSA7Y

A mérést vezető oktató neve: Hajdú Angéla

A jegyzőkönyvet tartalmazó fájl neve: Coulter_Janosa_D_P.pdf

Felhasznált eszközök: Coulter számláló



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

A mérés célja

Sok orvosi diagnosztikai módszer, különösen a vérvizsgálatok fontos része, hogy mérni tudjuk a különböző szövetek sejtjes állományának kvantitatív és kvalitatív összetételét. Ezen méréseket régen a minta szuszpendálása után mikroszkóp alatt, speciálisan skálázott mérőlemezekon végezték, mely meglehetősen időigényes folyamat, a technológia fejlődésével hamar nyilvánvalóvá vált az automatizálás iránti igény.

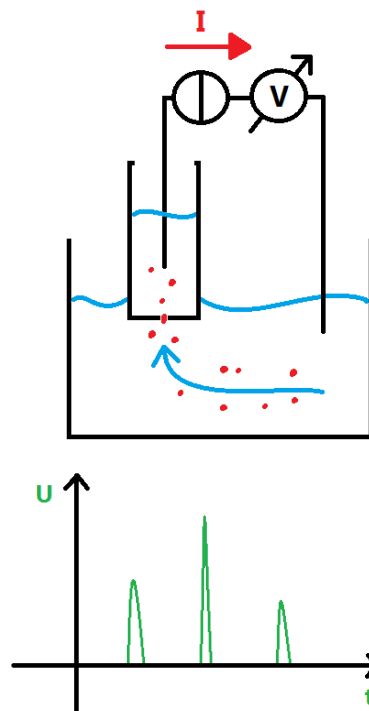
A labor célja, hogy megismerkedjünk két olyan eszköz, az áramlási citométer és a Coulter számláló működésének elméleti alapjaival, melyek választ kínáltak erre a kérdésre, valamint utóbbi használatával kapcsolatban gyakorlati tapasztalatokra is szert tegyünk.

A mérés során felhasznált eszközök

A méréshez egy Coulter számlálót használunk, mely működési elve az alábbi:

Az eszköz egy pumpa segítségével felszívja a tartólapjára helyezett üvegcséből a mérendő oldatot, egy $70\ \mu\text{m}$ átmérőjű kapillárison keresztül, miközben az egész oldaton egy áramgenerátor segítségével állandó áramot vezet át. Az eszköz méri a kapillárison átjutott, és a minta oldat közti feszültséget. Mivel az oldat jó vezető, amíg az szabadon áramlik a kapillárison keresztül, addig ez a feszültség érték viszonylag alacsony.

Ha azonban a kapillárisba egy, az oldathoz képest rossz vezető, például vörös vértest kerül, az saját méretének megfelelő mértékben kiszorítja az elektromos vezetés szűk keresztmetszeti pontjából a vezető oldatot, így az egész mért rendszer elektromos ellenállása a kapillárisba került elem méretével arányban megnő. Ez szintén megnöveli az állandó áram fenntartásához szükséges feszültséget, melynek mérésével a kapillárison áthaladó (sejtjes) elemek számára és méreteloszlására következtethetünk.



A Coulter számláló rendelkezik egy integrál diszkriminátorral (ID), mellyel meghatározható, mi az a minimum feszültségérték, melyet a készülék jelként értékel, és számol. Ennek segítségével gyakorlatilag megadhatjuk azt a sejtméretet, melynél kisebb törmelékeket a gép nem vesz figyelembe. Sajnos ez a módszer sem véd meg a konstrukció alaphibájától, nevezetesen azon ritka esetekben, amikor két kis elem egyszerre halad át a kapillárison, együttes méretük olyan feszültségimpulzust válthat ki, melyet a gép tévesen jelnek értékel. Így előfordulhat, hogy vörös vértest helyett csupán pár vérlemezket mérünk. szerencsére ez a jelenség, bár növeli a hibát, nem oly mértékű, hogy a diagnosztikai felhasználásban gondot jelentsen.

A gép rendelkezik előre beállított ID értékekkel (RBC), melyek segítségével a vérlemezket elkülöníthetjük a vér többi alakos elemétől.

Bár az általunk használt Coulter számlálót elsősorban vérminták vizsgálatához fejlesztették ki, a mérés során biztonsági okokból mi csak NaCl tisztító oldatot, valamint a vér vörösvértesteit

mintázó műanyag gyöngyöket tartalmazó ismert koncentrációjú kalibrációs, valamint ismeretlen koncentrációjú, bemérendő oldatot fogunk használni.

A mérés menete

Első lépésben a tiszta, jól vezető NaCl oldat segítségével meghatározzuk a műszer saját háttérzajt, használva az alakos elemek kimutatására szolgáló RBC diszkriminátor beállítást. Ideális esetben az oldatban a Coulter számláló egy alakos elemnek megfelelő jelet sem generál, azonban mind az oldatban lévő, levegőből bejutó szennyeződések (por, baktériumok), mind a gép általános állapota miatt reális elvárás az lehet, hogy a háttérzaj legalább két nagyságrenddel maradjon az ismert kalibrációs oldat mérendő koncentrációja alatt.

Bár a mérésre kevés idő állt csak rendelkezésre, a háttér mérését két mérés átlagából származtattuk.

Második lépésben bemértük a kalibrációs oldatot úgy, hogy a mért értékből kivontuk a háttérzajt. Az eredményt összehasonlítottuk a kalibrációs oldat valós koncentrációjával, és ebből a valós és a mért érték hányadosaként meghatározunk egy korrekciós faktort. A mérést háromszor végeztük el, és a kalibrációs faktor számításához az értékek átlagát használtuk. A mérés során a diszkriminátor RBC állásban volt.

Harmadik mérésenként meghatároztuk az ismeretlen oldat koncentrációját. Ehhez háromszor lemértük az oldatot RBC diszkriminátorral, a mérések átlagából levontuk a már ismert háttérzajt, és az eredményt beszoroztuk a harmadik mérésben kiszámolt korrekciós faktoral.

Utolsó mérésenként az ismeretlen oldatot manuálisan beállított, növekvő diszkriminátor értékek mellett vizsgáltuk. Két mérés között az oldatot felráztuk, hogy így kerüljük el az ülepedésből származó hibákat. Az idő rövideje miatt egy diszkriminátor állás mellett csak egy mérést végeztünk. A vizsgált diszkriminátor értékek: 20, 40, 60, 80 és 100. Tekintve, hogy az ismeretlen koncentrációjú oldatban lévő kalibrációs gyöngyök mérete nagyjából azonos, a mérés során azt várjuk, hogy az alacsony diszkriminátor állásban meglévő jel, mely megegyezik a harmadik méréssel, a diszkriminátor szint emelésével előbb alig változik, majd teljesen eltűnik, amikor a diszkriminátor szint a minimum vizsgált méretet a gyöngyök mérete fölé emeli.

A mért értékek

Első mérés:

Háttér mérés (sárga üvegcse)

Disztkriminátor: RBC

Korrekción: nincs

	Mutatott érték	Tényleges [db/μl]
1. mérés	46	4,60E+04
2. mérés	35	3,50E+04

Átlagos háttér [db/μl]:
4,05E+04

Második mérés:

Ismert koncentráció (fekete üvegcse)

Disztkriminátor: RBC

Korrekción: mért érték - háttér

	Mutatott érték	Tényleges [db/μl]
1. mérés	186	1,82E+06
2. mérés	190	1,86E+06
3. mérés	182	1,78E+06

Elméleti koncentráció:
4,61E+06
Korrekcións faktor [db/μl]:
2,53366

Harmadik mérés:

Ismeretlen koncentráció (piros)

Disztkriminátor: RBC

Korrekción: (mért érték - háttér) * korrekcions faktor

	Mutatott érték	Tényleges [db/μl]
1. mérés	397	9,96E+06
2. mérés	402	1,01E+07
3. mérés	417	1,05E+07

Ismeretlen koncentráció [db/μl]:
1,00E+07

Negyedik mérés:

Ismeretlen koncentráció (piros)

Disztkriminátor: Manuális

Korrekción: (mért érték - háttér) * korrekcions faktor

	Mutatott érték	Tényleges [db/μl]
ID = 20	401	1,01E+07
ID = 40	266	6,64E+06
ID = 60	179	4,43E+06
ID = 80	61	1,44E+06
ID = 100	21	4,29E+05

Az eredmények értékelése

A háttérzaj meghatározása során kapott 405.000 db/ μ l érték kielégíti a realiztikus elvárásainkat, azonban világosan jelzi, hogy a készülék nem alkalmas a kis számban előforduló alakos elemek, például fehér vérsejtek számának pontos mérésére, amennyiben azok száma nem lép ki az egészséges határok közül. Kórosan magas fehérvérsejt szám kvalitatív kimutatása azonban lehetséges.

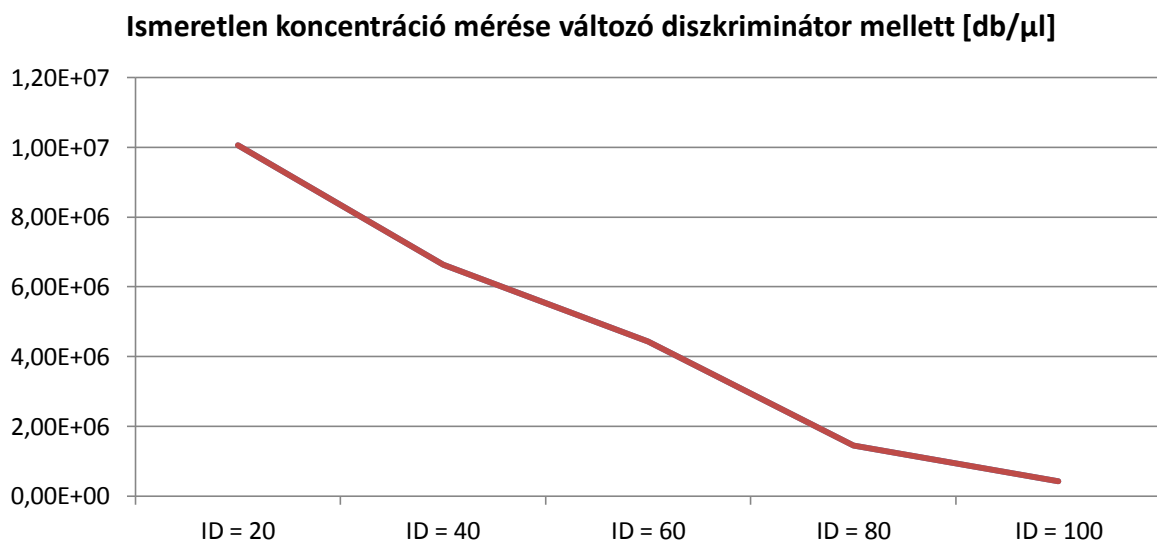
Az ismert koncentráció meghatározásakor kiszámolt kalibrációs faktor nagyjából 2,5336-nak adódott. Egy darabszámot impulzus beütések alapján mérő eszköznél véleményem szerint ez az eredmény kétségeket vet fel az eszköz használhatóságát illetően.

Több méréssel lenne érdemes vizsgálni, hogy a kalibrációs faktor szórása, valamint az időbeli stabilitása milyen viselkedést mutat, mert megfelelően kis drifttel és szórással, valamint a mérések idejére tanúsított rövidtávú stabilitással kvantitatívan kevésbé igényes alkalmazások számára a berendezés pontossága elegendő lehet.

Az ismeretlen oldat koncentrációjának 10.000.000 db/ μ l adódott, melynek hitelességét nem tudtuk az órán ellenőrizni, mivel az oldatok koncentrációit tartalmazó kódlap nem állt rendelkezésünkre. Ennek az értéknek az ellenőrzése pedig megnyugtató választ kínálhatott volna a kalibrációs konstansnál felmerült pontossági kérdésre.

A diszkriminátor kézi állítása szintén nem hozta a várt eredményt. Sem abszolút értékben, sem arányaiban vizsgálva nincs olyan csökkenés két ID érték között, mely domináns lenne a többi ID érték közti csökkenésekhez képest.

A mérési adatok ábrázolva:



Az ID emelésével tapasztalt csökkenések rendre az alábbiak voltak:

	Csökkenés abszolút értékben [db/μl]	Csökkenés arányosan
ID: 20->40	3,42E+06	0,65991
ID: 40->60	2,20E+06	0,66788
ID: 60->80	2,99E+06	0,32552

Zárszóként elmondható, hogy a gyakorlaton megismertük a Coulter számláló elméleti működési alapjait, és több sikeres mérést is végrehajtottunk vele, melyek pontossága azonban kétséges. Bár a berendezés ezen problémák ellenére is számos orvosi diagnosztikai területen sikerrel alkalmazható, nem véletlen, hogy igény volt egy pontosabb, megbízhatóbb, többféle mért elem megkülönböztetési lehetőséget kínáló technológiára is. Ebben a szellemiségben történt az áramlási citometria mérési elvének kidolgozása.

Itt a mért folyadékot, és a benne szuszpendált alakos elemeket a mérési kapillárison történő átvezetés előtt lamináris burkoló folyadékkal veszik körbe, mely csökkenti annak esélyét, hogy a kapillárisba egymás mellé több elem is beússzon. A detektálást megbízhatóbb lézeres technológia végzi, mely festési technológiákkal, valamint spektrumelemzéssel összekötve sokkal részletesebb információt szolgáltat az oldatunk összetevőiről.

Áramlási citométerrel azonban a labor során nem végeztünk méréseket.