



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 22.06.77 (P. 199102)

Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 15.01.70

Opis patentowy opublikowano: 30.10.1981

Int. Cl.²

G01N 33/16

G01N 23/225

G01N 1/28

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: Julian Aleksandrowicz, Jan Dobrowolski, Piotr Bole-
chała, Jan Głownia, Zbigniew Bonderek

Uprawniony z patentu: Ośrodek Badawczo-Rozwojowy Górnictwa Su-
rowców Chemicznych, Kraków; Akademia Me-
dyczna, Kraków (Polska)

Sposób oznaczania mikroelementów w pojedynczych komórkach krwi

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób oznaczania mikroelementów w pojedynczej komórce krwi przez monitorowanie za pomocą aparatu skaningowego połączonego z mikrosondą elektronową.

Dotychczas stosowane sposoby badań mikroelementów nie pozwalały na dokładne określenie ich jakości, rozmieszczania, a szczególnie ilości w pojedynczych komórkach krwi. Możliwe były tylko analizy pierwiastków w homogenatach dużej ilości komórek. Nie pozwalało to na powiązanie szczegółowych badań morfofizjologicznych, hematologicznych i innych z analizą zawartości pierwiastków ważnych dla profilaktyki zdrowotnej.

Znane są także sposoby oznaczania pierwiastków w metalurgii drogą monitorowania pierwiastków przy pomocy mikrosondy rentgenowskiej sprzężonej z elektronowym mikroskopem skaningowym.

Celem wynalazku jest sposób oznaczania mikroelementów w pojedynczych komórkach krwi dla uzyskania możliwości ich porównania w odniesieniu do wzorców chemicznych, przy zastosowaniu tego używanego w metalurgii urządzenia do oznaczania pierwiastków.

Sposób według wynalazku polega na tym, że pobraną na heparynę próbkę krwi rozcieńcza się dwukrotnie roztworem fizjologicznym, odwirowuje, przepłukuje się trzykrotnie w płynie Parkera, a następnie trzykrotnie w płynie Parkera zbuforowanym do pH 7,3 przy użyciu buforu fosforanowego. Następnie oddzielone komórki umieszcza się

2

w 2,5% roztworze aldehydu glutarowego w roztworze fizjologicznym na 8 godz. w temperaturze najkorzystniej 4°C, komórki krwi zostają w ten sposób utrwalone, po czym odwodnienie przeprowadza się kolejno w gradiencie roztworów acetonu o stężeniach 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, a następnie trzykrotnie opłukuje się w acetonie absolutnym przez odwirowanie z szybkością do 2000 obrotów na minutę przez 10 minut i w trzeciej zmianie tego acetonu pozostawia się komórki na 24 godzin. Odwodnione komórki krwi wkrapla się w roztworze acetonu na metalowe podstawki wykonane z aluminium lub innego metalu o czystości 99,999%, suszy się w suszarce próżniowej, a następnie napyla czystym chemicznie węglem w napyłarce próżniowej. Podstawki z napyłonymi preparatami komórek krwi umieszcza się w mikroskopie skaningowym połączonym z mikrosondą elektronową, dokonuje się obserwacji na monitorze telewizyjnym, oraz wykonuje się analizy i fotografie, przy czym parametry używanego prądu elektrycznego, a szczególnie napięcia przyspieszającego dobiera się do badanej próbki i pierwiastków w niej analizowanych tak, aby wiązka elektronów nie przenikała poza badaną komórkę wgłąb metalowego stolika najkorzystniej napięcie 15 kV i natężenie prądu próbki 5–10 mA, po czym z liczby impulsów wzorca i próbki badanej wylicza się zawartość oznaczonego pierwiastka (mikroelementu). Po określeniu liczby impulsów związanych z pro-

mieniowaniem rentgenowskim charakterystycznym dla wybranego pierwiastka, oraz dla badanej komórki, następuje wyliczenie ilości tego pierwiastka w komórce w % wagowych według wzoru:

$$C_P = K \cdot \frac{N_P}{N_W} \cdot C_W$$

gdzie:

K_W = współczynnik uwzględniający poprawki absorpcyjne,

N_P — liczba impulsów promieniowania Rtg charakterystycznego dla analizowanego pierwiastka w komórce krwi,

N_W = liczba impulsów promieniowania Rtg charakterystycznego dla analizowanego pierwiastka we wzorcu chemicznym,

C_W — ilość badanego pierwiastka we wzorcu określona w % wagowym.

Przykład. Przykład dotyczy badania zawartości żelaza w komórce krwi. Pobrano 2 ml krwi żywej do strzykawki zawierającej 200 jednostek heparyny i rozcieńczono dwukrotnie roztworem fizjologicznym. Po każdorazowej zmianie płynu, komórki krwi odwirowano z szybkością 2000 obrotów na minutę przez 10 minut. Komórki krwi przepłukano trzykrotnie płynem Parkera, a następnie trzykrotnie płynem Parkera zbuforowanego do pH 7,3 za pomocą buforu fosforanowego. Następnie zawiesinę tych komórek wkröpfono do 2,5% roztworu aldehydu glutarowego w płynie fizjologicznym i pozostawiono przez 8 godzin w temperaturze 4°C. Zostały one w ten sposób utrwalone. Odwodnienie komórek przeprowadzono przez zmianę roztworów acetonu o rosnących stężeniach 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%. Następnie trzykrotnie opłukano komórki krwi w roztworze acetonu absolutnego i pozostawiono je w trzeciej zmianie tego acetonu przez 24 godziny w temperaturze 4°C. Odwodnione komórki wkröpfono w roztworze acetonu na metalowe podstawki wykonane z aluminium o czystości 99,99%. Tak przygotowane próbki suszono w suszarce próżniowej, a następnie napyłano w napyłarce próżniowej czystym chemicznie węglem. Następnie podstawki z komórkami krwi wprowadzono do mikroskopu skaningowego połączonego z mikrosondą elektronową i zapisywano liczbę impulsów promieniowania rentgenowskiego charakterystyczną dla danego pierwiastka stwierdzoną w okresie 40 sekund podczas analizy badanej komórki.

Jako wzorzec przyjęto określoną liczbę impulsów promieniowania rentgenowskiego charakterystycz-

nego dla tego samego pierwiastka. Dla badanego pierwiastka w komórce krwi stwierdzono średnio 162 impulsy promieniowania Rtg charakterystycznego dla żelaza.

Natomiast dla wzorca zawierającego 100% żelaza stwierdzono 152216 impulsów w tym samym czasie. Stąd też:

$$C_P = \frac{162}{152216 \cdot 100\%} = 0,11\% \text{ wag.}$$

Obliczono też, że zawartość żelaza w analizowanej komórce krwi wynosi 0,11% wagowych.

Prowadzone badania według sposobu przyjętego według wynalazku pozwolą na wskazanie zawartości pierwiastków w badanej komórce krwi.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób oznaczania mikroelementów w komórkach krwi, znamienny tym, że pobraną najkorzystniej na heparynę próbkę krwi rozcieńcza się dwukrotnie roztworem fizjologicznym, przy czym przy zmianie płynu komórki krwi odwirowuje się, a odwirowane komórki przepłukuje się trzykrotnie płynem Parkera a następnie trzykrotnie płynem Parkera zbuforowanym do pH 7,3 przy użyciu buforu fosforanowego, następnie zawiesinę tych komórek wkröpfia się w roztworze fizjologicznym do 2,5% roztworu aldehydu glutarowego i pozostawia w nim najkorzystniej przez 8 godzin w temperaturze 4°C, po czym odwadnia się komórki w roztworze acetonu przez zmianę acetonu o rosnących stężeniach 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, następnie opłukuje się je w roztworze acetonu absolutnego przez odwirowanie najkorzystniej z szybkością do 2000 obrotów na 10 minut i pozostawia w trzeciej zmianie tego acetonu najkorzystniej przez 24 godziny, po czym odwodnione komórki wkröpfia się w roztworze acetonu na metalowe podstawki o czystości metalu 99,99%, suszy się w suszarce próżniowej i napyła czystym węglem w napyłarce próżniowej i po umieszczeniu podstawki z komórkami w mikroskopie skaningowym połączonym z mikrosondą elektronową wykonuje się analizy i fotografie przy określonych parametrach prądu elektrycznego, a szczególnie napięcia dobieranego do badanej próbki tak, aby wiązka elektronów nie przenikała poza komórkę najkorzystniej przy napięciu przyspieszającym 15 kV i natężeniu prądu próbki 5–10 mA, po czym w oparciu o liczbę impulsów wzorca i próbki badanej wylicza się zawartość oznaczonego pierwiastka.