



(19) KG (11) 1253 (13) C1 (46) 30.04.2010

ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЛУЖБА
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

(51) G01N 33/49 (2010.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя (владельца)

(21) 20090002.1

(22) 14.01.2009

(46) 30.04.2010, Бюл. №4

(76) Мамасаидов А.Т., Кулчинова Г.А. (KG)

(56) Справочник // Лабораторные методы исследования в клинике / Под редакцией профессора В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 307 с.

(54) Способ выделения лимфоцитов из периферической венозной крови человека

(57) Изобретение относится к медицине, а именно к иммунологии. Задачей изобретения является разработка способа выделения лимфоцитов из периферической венозной крови человека, отличающегося более высоким выходом лимфоцитов. Задача решается в способе выделения лимфоцитов из периферической венозной крови человека, где готовят раствор 76 % верографина и 15 % поливинилпиролидона в соотношении 1:4, затем насылаивают цельную кровь на этот раствор в соотношении 2:1, проводят центрифугирование при 1500 оборотов в минуту, после чего пипеткой отсасывают слой лимфоцитов. 1 п. ф-лы.

(21) 20090002.1

(22) 14.01.2009

(46) 30.04.2010, Bull. №4

(76) Mamasaidov A.T., Kulchinova G.A. (KG)

(56) Reference book //Laboratory methods of research in clinic / Edited by Professor V.V. Menshikov. - M: Medicina, 1987. - 307 pages.

(54) Method of separation of lymphocytes from peripheral venous blood of a person

(57) Invention refers to medicine, specifically to immunology. The invention problem is working out of method of lymphocytes separation from peripheral venous blood of a person, differing by more productive output of lymphocytes. This problem solves by the method of separation of lymphocytes from peripheral venous blood of a person, where solution is prepared from the components: 76 % of verografin and 15 % of polyvinylpyrrolidone in the ratio 1:4, then the whole blood is layered on this solution in the 2:1 ratio, centrifugal separation is made at 1500 rpm and after that, the layer of lymphocytes is sucked off with a pipette. 1 claim.

Изобретение относится к медицине, а именно к иммунологии.

Известен способ выделения лимфоцитов из периферической венозной крови человека, заключающийся в осаждении (седиментации) эритроцитов трилоном Б, где 3 % раствор трилона Б смешивают с венозной кровью в соотношении 1:3, после чего инкубируют при 37°C в течение 30-40 минут, собирают надосадочную жидкость, полученные клетки осаждают центрифугированием

(Справочник // Лабораторные методы исследования в клинике / Под редакцией профессора В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 126 с.).

Недостатком способа является недостаточная эффективность – выход лимфоцитов составляет $31,2 \pm 1\%$.

Известен способ выделения лимфоцитов из периферической крови человека путем центрифугирования, где 10 мл стабилизированной антикоагулянтом (гепарином) крови разводят фосфатным буфером pH 7,4 в соотношении 1:2. Затем 9 мл полученной смеси (кровь + фосфатный буфер) осторожно насыпают на раствор гипак – фиколл плотности 1,077 г/мл (12 частей 9 % фиколла и 5 частей 33,9 % гипака). Пробирки центрифугируют 40 минут при 1500 об/мин. После чего отсасывают пипеткой слой лимфоцитов (Справочник // Лабораторные методы исследования в клинике / Под редакцией профессора В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 307 с.).

Способ обладает рядом недостатков. Использование такого полисахарида бактериального происхождения как фиколл является стимулирующим иммунологические реакции фактором, в частности фиколл стимулирует экспрессию М-рецепторов лимфоидных клеток, что приводит к активации какой-то части лимфоцитов. Фиколл обладает недостаточной вязкостью, что не позволяет эффективно проводить выделение лимфоцитов из цельной крови, а разведение крови в 2-3 раза во столько же раз уменьшает исходную концентрацию клеток и соответственно выход лимфоцитов. Фиколл относительно дорогостоящий и дефицитный реагент.

Задачей изобретения является разработка способа выделения лимфоцитов из периферической венозной крови человека, отличающегося более высоким выходом лимфоцитов.

Задача решается в способе выделения лимфоцитов из периферической венозной крови человека, где готовят раствор 76 % верографина и 15 % поливинилпиролидона в соотношении 1:4, затем насыпают цельную кровь на этот раствор в соотношении 2:1, проводят центрифугирование при 1500 оборотов в минуту, после чего пипеткой отсасывают слой лимфоцитов

Способ осуществляют следующим образом.

Готовят градиент: 1 часть 76 % раствора верографина смешивают с 4 частями 15 % раствора поливинилпиролидона. После тщательного перемешивания смесь готова к употреблению (для длительного хранения смесь помещают в холодильник при 4°C). В бактериологическую пробирку наливают 3 мл смеси (высота столба смеси 2-2,5 см). Пробирку оставляют на столе до тех пор, пока смесь не примет комнатную температуру. Затем 6 мл крови из локтевой вены вносят в пробирку с раствором гепарина для предотвращения свертывания в соотношении 20 единиц на 1,0 мл крови. Пипеткой аккуратно насыпают цельную стабилизированную гепарином венозную кровь в объеме 6 мл на градиент. Необходимо при насыщении избегать смешивания градиента и крови. Центрифугируют при 1500 оборотов в минуту в течение 40 минут. Эритроциты и гранулоциты оседают на дно пробирки, а на границе раздела находятся лимфоциты. По всей площади сечения пробирки на границе раздела фаз отсасывают пастеровской пипеткой слой лимфоцитов (плотное облачко над смесью). Клетки, прилипшие к стенке собирают кончиком пипетки. Лимфоциты переносят в чистую центрифужную пробирку. Выделенные клетки отмывают 1 раз в питательной среде, в объеме 4 раза превышающей объем суспензии лимфоцитов.

Основные сравнительные исследования проводили в группе здоровых лиц (20 человек). Выделение лимфоцитов из крови проводили 3-мя способами: осаждением эритроцитов 3 % раствором трилона Б (I способ), на градиенте фиколл-верографин (II способ), и на градиенте поливинилпиролидон – верографин (предлагаемый способ).

Определяли выход лимфоцитов в процентах по сравнению с их содержанием в 1 мл крови. Для чего, выделенные и осажденные на дно пробирки, клетки ресусцидируют в 1,0 мл питательной среды. 0,01 мл данной клеточной взвеси разводят в 0,3 мл раствора Тюрка (3 % раствор уксусной кислоты, подкрашенной генциановым фиолетовым) тщательно перемешивают. Немного взвеси вносят в одну из половинок заранее приготовленной камеры Горяева. Через 1-2 минуты подсчитывают лимфоидные клетки. Общее число лимфоцитов подсчитывают в 25 больших квадратах камеры Горяева, умножают на 10, затем еще раз умножают на фактор разведения клеточной взвеси, и получают число лимфоцитов, содержащихся в 1 мл внесенной в камеру. Определяют выход лимфоцитов в % по сравнению с их содержанием в крови по формуле:

$$\text{Выход лимфоцитов, в \%} = \frac{\text{Число лимфоцитов в 1 мл взвеси}}{\text{Число лимфоцитов в 1 мл крови}} \times 100$$

Выход лимфоцитов в % составил: по I способу – $38,1 \pm 4,6$ %, по II способу – $92,6 \pm 4,2$ %, по предлагаемому способу – $94,8 \pm 3,2$ %.

По проценту выхода клеток предлагаемый способ выделения лимфоцитов на градиенте плотности верографин – поливинилпиролидон эффективнее I способа в среднем на 56,7 % и II способа в среднем на 2,2 %.

Также проводили анализ 3-х способов по жизнеспособности выделенных клеток по поглощению ими трипанового синего на 100 клеток с выведением % жизнеспособных клеток. Для чего к выделенным клеткам добавили трипановый синий, тщательно перемешали, инкубировали 2-3 минуты, затем провели подсчет клеток в камере Горяева. Число клеток, поглотивших трипановый синий на 100 клеток составило: по I способу – $97,2 \pm 0,46$, по II способу – $97,5 \pm 0,31$, предлагаемым способом – $97,7 \pm 0,42$. Жизнеспособность клеток, выделенных I, II, так и предлагаемым способом, высокая и приближается к 100 %, что говорит почти о полной сохранности и целостности выделенных клеток.

Преимуществом предложенного способа является упрощение процедуры выделения лимфоцитов из цельной крови, что обеспечено более высокой вязкостью смеси с поливинилпиролидоном. Кроме того, цельная кровь, обладая собственной высокой вязкостью, препятствует взаимной диффузии двух жидких фаз в процессе выделения, что улучшает все характеристики процесса. Использование неиммуногенного вещества поливинилпиролидона имеет положительные стороны для последующей работы с выделенными клетками.

Формула изобретения

Способ выделения лимфоцитов из периферической венозной крови человека, включающий насыщивание крови на приготовленный раствор, центрифугирование при скорости 1500 оборотов в минуту и извлечение пипеткой взвеси лимфоцитов, отличающийся тем, что раствор готовят из 76 % верографина и 15 % поливинилпиролидона в соотношении 1:4.

Выпущено отделом подготовки материалов

Государственная служба ИС КР, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41; факс: (312) 68 17 03