



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(11) 753346

(61) Дополнительный к патенту —

(22) Заявлено 04.07.78 (21) 2639945/28-13

(23) Приоритет — (32) 21.07.77

(31) 817595 (33) США

(43) Опубликовано 30.07.80. Бюллетень № 28

(45) Дата опубликования описания 30.07.80

(51) М.Кл.³ А 61 К 35/14
С 12 К 1/04

(53) УДК 615.45:
:616.155
(088.8)

(72) Автор
изобретения

Иностранец
Ран Ким
(США)

(71) Заявитель

Иностранная фирма
«Текникон Инструментс Корпорейшн»
(США)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СУСПЕНЗИИ КЛЕТОК

1

Изобретение относится к области медицины, а именно к гематологии.

Известен способ получения суспензии клеток путем обработки крови формальдегидом и добавления гемолизирующего агента [1].

Однако известный способ не позволяет дифференцировать тромбоциты от лейкоцитов и эритроцитов.

Целью изобретения является обеспечение возможности дифференциации тромбоцитов от лейкоцитов и эритроцитов.

Эта цель достигается тем, что перед введением формальдегида кровь обрабатывают детергентом, таким как полиоксиэтилен 20 сорбитан монолаурат концентрации от 0,3 до 2,0% по отношению к смеси, при рН от 6 до 8 с последующим инкубированием смеси при температуре от 55°С до 62°С в течение двух минут.

Способ осуществляют следующим образом.

Первоначально производят обработку антикоагулированного образца крови детергентом. Он действует как вещество, предварительно меняющее среду для того, чтобы при добавленных концентрациях не повредить морфологию белых кровяных клеток или тромбоцитов, а также лизирование красных кровяных клеток.

2

Детергентом предпочтительно является полиоксиэтилен 20 сорбитан монолаурат, но могут быть применены и другие детергентные материалы, такие как полиоксиэтилен 23 монолауриловый простой эфир и полиоксиэтилен 20 сорбитан моноолеат, способные предварительно изменять среду красных кровяных клеток без их лизирования.

Концентрация детергента в смеси может быть от 0,03 до 2,0%, предпочтительно 0,4—0,6%. Во время предварительного изменения среды полученную смесь инкубируют при комнатной температуре или при температуре окружающей среды, а именно около 25°С, в течение одной минуты.

Фиксатив прибавляют к инкубированной смеси при перемешивании и поддерживают его рН нейтральным. Предпочтительным фиксативом является сбуферированный фосфатом раствор формальдегида; его рН находится в интервале 6—8. Затем смесь инкубируют при 55—62°С в течение 2 мин, предпочтительно 2 мин при 58°С. Затем смесь разбавляют, если необходимо, и проводят оптические измерения.

Для определения количества тромбоцитов смесь разбавляют подкисленным изотоническим солевым раствором; полученная смесь имеет рН от 2 до 4. Разбавление

30

осуществляют суспензией с использованием 0,5%-ной уксусной кислоты — солевой раствор. При этом улучшается соотношение сигналов тромбоцитов к шумам, четкое разделение тромбоцитов и похожих красных клеток и лейкоцитов и хорошо сохраняются исходные индивидуальные объемы тромбоцитов. Можно также, а в некоторых случаях предпочтительно, частично разбавить образец, добавляя изотонический солевой раствор перед стадией обработки детергентом.

Для определения белых кровяных клеток образец разбавляют путем добавления изотонического солевого раствора, предпочтительно после стадии инкубации. Образец может быть разбавлен и перед стадией обработки детергентом. Разбавленная суспензия белых кровяных клеток сохраняет морфологию белых клеток, позволяя разделить неокрашенные белые клетки с помощью светорассеяния под малыми и большими углами, и дает возможность дифференцировать лимфоциты, моноциты, нейтрофилы и эозинофилы без окрашивания.

Пример 1. К антикоагулированному цельному образцу крови (0,1 мл) прибавляют 0,32 мл 1%-ного раствора полиоксидэтилен 20 сорбитан монолаурата (в изотоническом солевом растворе), полученную смесь оставляют для инкубации при комнатной температуре в течение 1 мин.

К смеси при перемешивании прибавляют сбуферированный фосфатом раствор формальдегида (0,42 мл), содержащий 8 об. % формальдегида, и инкубируют полученную смесь 2 мин при 57° С. Определение белых кровяных клеток осуществляют путем добавления к инкубированной смеси 1,2 мл изотонического солевого раствора, и с помощью светорассеяния проводят подсчет белых кровяных клеток.

Для определения тромбоцитов к инкубированной выше смеси прибавляют 1,2 мл изотонического солевого раствора. Прибавляют 0,1 мл полученной смеси к 4,0 мл 0,5%-ного раствора уксусной кислоты — изотонического солевого раствора. С помощью светорассеяния проводят подсчет тромбоцитов и измерение их размеров.

Пример 2. Разбавляют 0,01 мл антикоагулированной капиллярной цельной крови в соотношении 1:10 изотоническим солевым раствором, и 0,1 мл полученной смеси прибавляют к 0,32 мл 0,125%-ного раствора полиоксидэтилен 20 сорбитан монолаурата (в изотоническом солевом растворе). Смесь инкубируют 1 мин при комнатной температуре, к ней при перемешивании прибавляют 0,42 мл сбуферированного фосфатом раствора формальдегида, содержащего 8 об. % формальдегида, и инкубируют при 57° С в течение 2 мин.

Дифференцированный подсчет белых кровяных клеток в приведенной выше суспензии осуществляют с помощью светорассеяния.

Определение тромбоцитов осуществляют прибавлением к инкубированной выше смеси 1,2 мл изотонического солевого раствора, 0,1 мл полученной смеси прибавляют к 1,0 мл 0,5%-ного раствора уксусной кислоты — изотонический солевой раствор. С помощью светорассеяния проводят подсчет тромбоцитов и измерение их размеров.

Предлагаемый способ позволяет дифференцировать тромбоциты от лейкоцитов и эритроцитов.

Формула изобретения

Способ получения суспензии клеток путем обработки крови формальдегидом, добавления гемолизирующего агента, отличающийся тем, что, с целью обеспечения возможности дифференциации тромбоцитов от лейкоцитов и эритроцитов, перед введением формальдегида кровь обрабатывают детергентом, таким как полиоксидэтилен 20 сорбитан монолаурат концентрации от 0,3 до 2,0% по отношению к смеси, при pH от 6 до 8 с последующим инкубированием смеси при температуре от 55° С до 62° С в течение 2 мин.

Источник информации, принятый во внимание при экспертизе:

1. Патент США № 3741875, кл. С 12 Р 1/04, опубл. 1973.

Составитель С. Малютина

Редактор Н. Хубларова

Техред А. Камышникова

Корректор С. Файн

Заказ 890/1016

Изд. № 400

Тираж 673

Подписное

НПО «Поиск» Государственного комитета СССР по делам изобретений и открытий
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д 4/5

Тип. Харьк. фил. пред. «Патент»