



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2003118723/15, 25.06.2003

(24) Дата начала действия патента: 25.06.2003

(43) Дата публикации заявки: 27.12.2004

(45) Опубликовано: 27.11.2005 Бюл. № 33

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: HAN S.R. et al. One-step polymerase chain reaction-based typing of *Helicobacter pylori vac A* gene: association with gastric histopathology. *Med. Microbiol. Immunol.* 1999, 188 (3), p.131-138. VOLAND P. et al. Antigenic properties of Hpa A and Omp 18, two outer membrane proteins of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 2003, 71, p.3837-3843. HOSHINA S(см. прод.)

Адрес для переписки:

117997, Москва, ул. Островитянова, 1,
патентный отдел, С.В. Пыжеву

(72) Автор(ы):

Нелюбин В.Н. (RU),
Мудров В.П. (RU),
Ковальчук Л.В. (RU)

(73) Патентообладатель(ли):

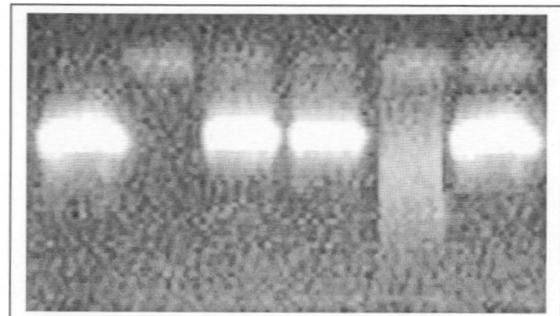
Российский государственный медицинский университет (RU)

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ HELICOBACTER PYLORI-ИНФЕКЦИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к лабораторной диагностике и может быть использовано для диагностики хронической персистирующей *Helicobacter pylori*-инфекции. Сущность изобретения состоит в том, что проводят выделение мононуклеарных клеток периферической крови, в которых регистрируют участки генома *Helicobacter pylori* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Техническим результатом является разработка малоинвазивного и специфичного способа диагностики хронической персистирующей *Helicobacter pylori*-инфекции, позволяющего оценить системность заболевания и вовремя назначить адекватную терапию. 1 з.п. ф-

лы, 1 табл., 3 ил.



1 2 3 4 5 6
Фиг.1

(56) (продолжение):

et al. Direct detection and amplification of *Helicobacter pylori* ribosomal 16S gene segments from gastric endoscopic biopsies. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1990, 13 (6), p.473-479.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2003118723/15, 25.06.2003**

(24) Effective date for property rights: **25.06.2003**

(43) Application published: **27.12.2004**

(45) Date of publication: **27.11.2005 Bull. 33**

Mail address:

**117997, Moskva, ul. Ostrovitjanova, 1,
patentnyj otdel, S.V. Pyzhev**

(72) Inventor(s):

**Neļjubin V.N. (RU),
Mudrov V.P. (RU),
Koval'chuk L.V. (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Rossijskij gosudarstvennyj meditsinskij
universitet (RU)**

(54) **METHOD FOR PREDICTING HELICOBACTER PYLORI-INFECTION**

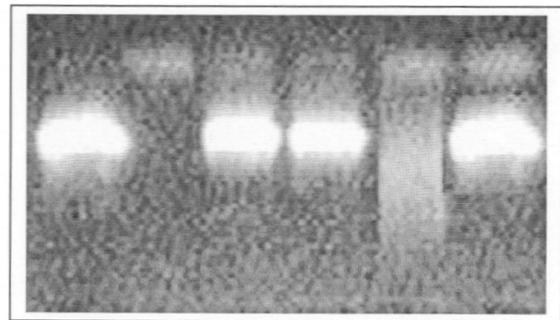
(57) Abstract:

FIELD: medicine, laboratory diagnostics.

SUBSTANCE: one should isolate mononuclear cells in peripheral blood to register there the parts of *Helicobacter pylori* genome due polymerase chain reaction (PCR). Thus, the innovation provides low-invasive and specific way for predicting chronic persisting helicobacter pylori-infection that enables to evaluate systematic nature of the disease and prescribe adequate therapy in due time.

EFFECT: higher efficiency of diagnostics.

1 cl, 3 dwg, 3 ex, 1 tbl



1 2 3 4 5 6
Фиг.1

Настоящее изобретение относится к диагностике хронических персистирующих заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), в частности к диагностике заболеваний, вызванных *Helicobacter pylori*-инфекцией.

Уже известно, что при заболеваниях желудочно-кишечного тракта обнаруживается *Helicobacter pylori* в биопсийном материале слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки (Hoshina S., Kahn S.M., Jiang W., Green P.H., Neu H.C., Chin N., Morotomi M., Logerfo P., Weinstein I.B. "Direct detection and amplification of *Helicobacter pylori* ribosomal 16S gene segments from gastric endoscopic biopsies" *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1990 Nov-Dec; 13 (6): 473-479).

Также известно об обнаружении *Helicobacter pylori* в слюне (Song M. "Detection of *Helicobacter pylori* in human saliva by using nested polymerase chain reaction" *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 1993 Aug; 14 (4): 237-40).

Известно и обнаружение *Helicobacter pylori* в фекалиях (Mapstone N.P., Lynch D.A., Lewis F.A., Axon A.T., Tompkins D.S., Dixon M.F., Quirke P. "PCR identification of *Helicobacter pylori* in faeces from gastritis patients" *Lancet.* 1993 February 13; 341 (8842): 447).

Целью настоящего изобретения является способ диагностики хронической персистирующей инфекции, обусловленной *Helicobacter pylori*.

Эта цель достигается тем, что исследуют мононуклеарные клетки периферической крови, регистрируя методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) специфические участки генома (*ure C*, *vac A*, *cag A*), характерные для *Helicobacter pylori*, кодирующие факторы патогенности данного микроорганизма - С-субъединицу уреазы, А-субъединицы вакуолизирующего цитотоксина и цитотоксин ассоциированного белка. Диагностическая чувствительность способа обуславливается чувствительностью применяемых ПЦР-тест-систем и находится в пределах 10^2 - 10^3 микробных тел.

В отличие от известных способов диагностики данной инфекции, в частности, обнаружения *Helicobacter pylori* в биоптатах слизистой оболочки гастро-дуоденальной зоны ЖКТ, слюне и фекалиях методом ПЦР предлагаемый способ позволяет определить факт персистенции возбудителя в периферической крови, т.е. вовлечение в инфекционный процесс всего организма, что характерно для хронических инфекций.

Детекция *Helicobacter pylori* в биопсийном материале слизистой оболочки ЖКТ отражает инфицированность данным микробом только *in situ*, как и неинвазивные способы определения возбудителя в слюне и фекалиях.

Известен факт наличия *Helicobacter pylori* на слизистых оболочках ЖКТ без возникновения воспалительных изменений в организме и развития заболевания (Исаков В.А., Домарадский И.В. *Хеликобактериоз* - М.: Медпрактика-М, 2003, 412 с.). Поэтому указанные аналоги не дают возможности в полной мере оценить степень развития и системность процесса, обусловленного *H. pylori*-инфекцией.

Наиболее близким прототипом предлагаемого способа диагностики *Helicobacter pylori* - инфекции является определение микроорганизма в биопсийном материале, полученном при эзофагогастродуоденоскопии (ЭГДС). Этот способ позволяет оценить степень повреждения слизистых оболочек и наличие указанного микроба.

Однако проведение ЭГДС является инвазивной манипуляцией, требующей специальной дорогостоящей аппаратуры и, тем не менее, также не позволяющей оценить степень развития и системность инфекционного процесса, поскольку полученные при этом данные могут свидетельствовать только о местных проявлениях инфекции. Кроме того, не все пациенты одинаково хорошо переносят проведение ЭГДС, что существенно влияет на частоту исследований в процессе лечения.

Предлагаемый способ диагностики *Helicobacter pylori*-инфекции является малоинвазивным способом в отличие от получения биопсийного материала при (ЭГДС). Позволяет оценить инфицированность клеток периферической крови, степень вовлечения в инфекционный процесс организма в целом, отражает системность заболевания, чего не удастся достигнуть определением возбудителя на слизистых оболочках ЖКТ, в слюне и фекалиях. Предлагаемый способ легко применим при мониторинге проводимых

терапевтических мероприятий.

Из локтевой вены пациента берут 5-10 мл крови с использованием динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты в качестве антикоагулянта в стандартной концентрации, выделяют фракцию моноклеарных клеток по общепринятой методике на градиенте плотности, выдерживая при комнатной температуре 15-20 минут, наслаивая надэритроцитарную фазу в объеме 2 -2,5 мл на 3-4 мл смеси 9% водного раствора фиколла 400 и верографина ($\rho=1.077$), центрифугируя при 1500-2000 об/мин в течение 15-20 минут, отбирая интерфазное кольцо, содержащее моноклеарные клетки, отмывая их в забуференном изотоническом растворе NaCl (pH - 7,2) или растворе Хэнкса по общепринятой методике, клеточный осадок ресуспендируют в 400-600 мкл используемого для отмывки раствора, готовят необходимое количество аликвот клеточной суспензии объемом 60-90 мкл, из которых известным методом иммуномагнитной сепарации, используя суспензию ферромагнитных частиц с соответствующими антителами к поверхностным мембранным структурам, разделяют субпопуляции клеток, выделяют из них ДНК известными методами, в частности лизированием биопробы раствором гуанидина с последующей сорбцией ДНК на сорбенте, многократной отмывке и ресорбции ДНК, проводят амплификацию с использованием праймеров к специфическим участкам генома *Helicobacter pylori* (ure C, vac A, sag A), осуществляют детекцию продуктов амплификации, после чего делают вывод о наличии участков генома *Helicobacter pylori* в моноклеарных клетках периферической крови.

На фиг.1 представлена электрофореграмма продуктов амплификации биологических проб, полученных от пациента в примере 1; на фиг.2 электрофореграмма продуктов амплификации биологических проб, полученных от пациента в примере 2; на фиг.3 - электрофореграмма продуктов амплификации биологических проб, полученных от пациента в примере 3. Заявленный способ поясняется на следующих конкретных примерах его осуществления.

Пример 1.

Больной К., 26 лет, поступил с жалобами на периодические боли умеренной интенсивности в области эпигастрия, изжогу, отрыжку.

Анамнез: Болен в течение 2 лет. Весной 2001 года впервые обратился в поликлинику по месту жительства с жалобами: на боли в области желудка умеренной интенсивности, изжогу, чувство переполнения желудка после приема пищи, даже в небольших количествах. Установлен диагноз: хронический гастрит в стадии обострения. Лечился амбулаторно. Какие препараты принимал, не помнит. После лечения некоторое время чувствовал себя удовлетворительно. Осенью этого же года и весной 2002 года симптомы заболевания повторялись, но были значительно менее выражены. За медицинской помощью не обращался. Осенью 2002 года произошло обострение заболевания. С указанными выше жалобами пациент обратился в консультативно-диагностический центр ЦБ №6 МПС России.

При поступлении проведена эзофагогастродуоденоскопия желудка и двенадцатиперстной кишки с взятием биопсийного материала слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки. Биологический материал направлен на гистологическое, цитологическое исследования и определение *Helicobacter pylori* методом полимеразной цепной реакции. Кроме того, этим же методом *Helicobacter pylori* определяли в слюне. При эзофагогастродуоденоскопическом обследовании пациента получено: Пищевод свободно проходим. Слизистая без патологии. Кардия смыкается. В желудке большое количество желчи. Складки среднего калибра расправляются при инсуффляции воздухом. Перистальтика симметричная. Слизистая бугристая в виде "булыжной мостовой", застойная. Привратник округлый, зияет. Луковица двенадцатиперстной кишки не деформирована. Слизистая рыхлая, белесовато-розовая. Заключение: Рефлюкс-гастрит. Гастропатия с гиперплазией.

Гистологический диагноз: Гиперпластический гастрит.

При цитологическом исследовании мазка-отпечатка измененной слизистой оболочки

желудка обнаружена умеренная гиперплазия клеток покровно-ямочного эпителия.

Helicobacter pylori найден в значительном количестве.

При исследовании методом полимеразной цепной реакции участки генома *Helicobacter pylori* обнаружены в биопсийном материале слизистой оболочки желудка и слюне.

5 В сыворотке крови определены высокие уровни специфических к *Helicobacter pylori* антител классов А, М, G (IgA - 44 МЕ/мл; IgM - 40 МЕ/мл; IgG - 28 МЕ/мл).

Больной обследован по предложенному способу.

Из локтевой вены пациента взяли 7,0 мл крови с использованием динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты в качестве антикоагулянта. Выдержав при комнатной
10 температуре 15 минут, выделили фракцию мононуклеарных клеток по общепринятой методике на градиенте плотности, наложив надэритроцитарную фазу в объеме 2 мл на 3,5 мл смеси 9% водного раствора фиколла 400 и верографина ($\rho=1.077$), отцентрифугировав при 1500 об/мин в течение 15 минут. Отобрав интерфазное кольцо, содержащее мононуклеарные клетки, отмыли их в забуференном изотоническом растворе NaCl (pH -
15 7,2), клеточный осадок ресуспендировали в 400 мкл используемого для отмывки раствора. Приготовили три аликвоты клеточной суспензии объемом 60 мкл, из которых стандартным методом иммуномагнитной сепарации выделили субпопуляции клеток, выделили из них ДНК методом, основанным на лизисе биопробы раствором гуанидина, сорбции ДНК на сорбенте, отмывке и ресорбции ДНК, провели амплификацию с использованием праймеров
20 к специфическим участкам генома *Helicobacter pylori*, осуществили детекцию продуктов амплификации методом электрофоретического разделения этих продуктов в агарозном геле с последующей их визуализацией в ультрафиолетовом свете, где в исследуемой пробе общей фракции мононуклеарных клеток была выявлена светящаяся полоса на уровне положительного контроля, в пробе Т-лимфоцитов периферической крови таковая
25 отсутствовала.

На фиг.1: проба 1 - положительный контрольный образец; проба 2 - отрицательный контрольный образец; проба 3 - биопсийный материал слизистой оболочки желудка; проба 4 - слюна; проба 5 - Т-лимфоциты периферической крови; проба 6 - общая фракция мононуклеарных клеток периферической крови.

30 В этом примере обследование указанным способом и обнаружение *Helicobacter pylori* в мононуклеарных клетках периферической крови позволило сделать вывод о длительном течении болезни, что косвенно подтверждалось высоким уровнем антител классов А, М, G к *Helicobacter pylori*, а также о неблагоприятном прогнозе развития заболевания, приобретающем характер системного. На основании полученных данных была назначена
35 адекватная терапия.

Пример 2.

Больной Д., 53 года, поступил с жалобами на боли в эпигастральной области, ослабевающие после приема пищи, чувство тяжести в желудке, изжогу.

40 Анамнез: Болен в течение 7 лет. Обострения заболевания происходят регулярно в весенне-осенний период. Лечение проходил амбулаторно. Эрозивный характер процесса и наличие *Helicobacter pylori*-инфекции выявлено впервые при настоящем обращении.

При эзофагогастродуоденоскопическом обследовании пациента получено: Пищевод свободно проходим, слизистая розовая. Определяется грыжевое расширение в абдоминальном отделе пищевода. Кардия смыкается не полностью. В желудке большое
45 количество пенистого содержимого. Складки среднего калибра, расправляются при инсuffляции воздухом. Перистальтика симметрична. Слизистая розовая, отечная, в препилорическом отделе три приподнятые над поверхностью дефекта слизистой с фибрином на верхушках. Привратник округлый, проходим. Луковица двенадцатиперстной кишки не деформирована. Слизистая розовая. Дистальные отделы двенадцатиперстной
50 кишки не изменены.

Заключение: Эрозии антрального отдела желудка.

Гистологический диагноз: Хронический эрозивный гастрит.

При цитологическом исследовании мазка-отпечатка измененной слизистой оболочки

желудка обнаружены клетки покровно-ямочного эпителия в состоянии гиперплазии, ряд из них деформирован, встречаются клетки с признаками кариорексиса. *Helicobacter pylori* выявлен в большом количестве.

При исследовании методом полимеразной цепной реакции участки генома *Helicobacter pylori* обнаружены в биопсийном материале слизистой оболочки желудка, в слюне - не обнаружен.

В сыворотке крови определены высокие уровни специфических к *Helicobacter pylori* антител классов А, М, G (IgA - 33 МЕ/мл; IgM - 57 МЕ/мл; IgG - 31 МЕ/мл).

Больной обследован по предложенному способу.

Из локтевой вены пациента взяли 8,0 мл крови с использованием динатриевой соли этилендиамина тетрауксусной кислоты в качестве антикоагулянта. Выдержав при комнатной температуре 15 минут, выделили фракцию мононуклеарных клеток по общепринятой методике на градиенте плотности, наложив надэритроцитарную фазу в объеме 2 мл на 3 мл смеси 9% водного раствора фиколла 400 и верографина ($\rho=1.077$), отцентрифугировав при 1500 об/мин в течение 20 минут. Отобрав интерфазное кольцо, содержащее мононуклеарные клетки, отмыли их в растворе Хэнкса, клеточный осадок ресуспендировали в 500 мкл используемого для отмывки раствора. Приготовили три аликвоты клеточной суспензии объемом 70 мкл, из которых стандартным методом иммуномагнитной сепарации выделили субпопуляции клеток, выделили из них ДНК методом, основанным на лизисе биопробы раствором гуанидина, сорбции ДНК на сорбенте, отмывке и ресорбции ДНК, провели амплификацию с использованием праймеров к специфическим участкам генома *Helicobacter pylori*, осуществили детекцию продуктов амплификации методом электрофоретического разделения этих продуктов в агарозном геле с последующей их визуализацией в ультрафиолетовом свете, где в исследуемых пробах Т-лимфоцитов и мононуклеарных клетках периферической крови были выявлены светящиеся полосы на уровне положительного контроля.

На фиг.2: проба 1 - положительный контрольный образец; проба 2 - отрицательный контрольный образец; проба 3 - биопсийный материал слизистой оболочки желудка; проба 4 - слюна; проба 5 - Т-лимфоциты периферической крови; проба 6 - общая фракция мононуклеарных клеток периферической крови.

В данном примере обследование указанным способом и сопоставление его результатов с результатом инструментального метода и клинической симптоматики позволило сделать предположение о системности процесса, глубоком характере повреждения слизистой оболочки желудка и еще до получения гистологического подтверждения начать адекватную терапию.

Пример 3.

Больная Г., 29 лет, поступила с жалобами на чувство тяжести в области желудка, отрыжку, изжогу.

Анамнез: Впервые описанные симптомы заболевания почувствовала около 2 месяцев назад. Их появление связывает с повышением физической и эмоциональной нагрузок. До настоящего времени за медицинской помощью не обращалась. Лечение не проходила.

При эзофагогастродуоденоскопическом обследовании пациентки получено: Пищевод свободно проходим. Слизистая бугристая, белесовато-розовая. Кардия смыкается полностью. В желудке большое количество содержимого с желчью. Складки среднего калибра, расправляются при инсuffляции воздухом. Перистальтика симметричная. Привратник округлый, проходим. Луковица двенадцатиперстной кишки не деформирована. Слизистая белесовато-розовая. Заключение: Дуодено-гастральный рефлюкс. Рефлюкс-эзофагит. Рефлюкс-гастрит.

Гистологический диагноз: Слизистая желудка с картиной хронического гастрита.

При цитологическом исследовании мазка-отпечатка измененной слизистой оболочки желудка обнаружена умеренная гиперплазия клеток покровно-ямочного эпителия. *Helicobacter pylori* найден в небольшом количестве.

При исследовании методом полимеразной цепной реакции геном *Helicobacter pylori*

процесса поражения слизистой оболочки гастро-дуоденальной области и может отражать системный характер процесса.

Таким образом, достигается важный для клинической практики результат. Определение в мононуклеарах периферической крови генома *Helicobacter pylori* отражает степень и
5 глубину (системность) развития заболевания, обусловленного *Helicobacter pylori*-инфекцией и позволяет назначать адекватную терапию.

Настоящее изобретение не очевидно для специалистов, работающих в данной области.

Несмотря на кажущуюся простоту до настоящего времени никто не мог даже
10 предположить, что *Helicobacter pylori* может персистировать в мононуклеарных клетках периферической крови. Нами это выявлено и доказано впервые.

Потребовались длительные научные исследования (начиная с февраля 2000 года) по
изучению биологических субстратов персистенции данного микроорганизма в организме
человека при хронических заболеваниях, обусловленных *Helicobacter pylori*: ротовая
15 полость (слюна, зубо-десневая борозда, лимфоидное глоточное кольцо); полость желудка и двенадцатиперстной кишки (желудочный сок, поверхность и собственно слизистая
оболочка); периферическая кровь (сыворотка, плазма, форменные элементы).

Полученные данные позволили впервые выявить факт персистенции генома *Helicobacter pylori* в мононуклеарных клетках периферической крови при хронической инфекции,
обусловленной *Helicobacter pylori*, для доказательства которого потребовалось
20 сопоставление результатов эзофагогастродуоденоскопии, гистологии, цитологии, серологических исследований по определению специфических иммуноглобулинов классов А, М, G, полимеразной цепной реакции в биопсийном материале и форменных элементов крови.

Метод иммуномагнитной сепарации позволил определить субпопуляции клеток,
25 наиболее подверженных персистенции генома *Helicobacter pylori*.

Всего нами в течение 3,5 лет было выполнено комплексное обследование 1504
пациентов по выявлению *Helicobacter pylori* в различных биологических субстратах, из
них у 73 проведено исследование периферической крови. Факт персистенции генома
30 *Helicobacter pylori* в мононуклеарных клетках периферической крови при хронических заболеваниях желудочно-кишечного тракта обнаружен нами впервые.

Впервые выявленный нами факт персистенции генома *Helicobacter pylori* в
мононуклеарных клетках периферической крови при хронической *Helicobacter pylori*-
инфекции имеет важное научно-практическое значение и позволяет сделать важные для
науки и практики выводы о том, что:

35 Во-первых, детекция участков генома *Helicobacter pylori* в мононуклеарах периферической крови, в частности лимфоцитах, при заболеваниях желудочно-кишечного
тракта свидетельствует о вовлечении в инфекционный процесс защитных механизмов всей
системы иммунитета, а не только его местной составляющей. По-видимому, при
инфицировании микроорганизмом, обладающим тропностью к эпителию слизистой
40 оболочки желудочно-кишечного тракта, процесс не ограничивается местными реакциями, а приобретает системный характер.

Во-вторых, если при заболевании желудочно-кишечного тракта, обусловленном
Helicobacter pylori, считающимся тропным к поверхности эпителиальных клеток слизистой
45 оболочки, его фрагменты могут обнаруживаться в кровяном русле, то, вероятно, и при других инфекциях барьерных тканей подобный феномен может иметь место. При этом
определенную важность имеет чувствительность метода детекции возбудителя и
правильно выбранный тканевой или клеточный субстрат его обнаружения.

Обнаружение *Helicobacter pylori*, тропного к поверхности эпителиальных клеток
желудочно-кишечного тракта, в клетках периферической крови позволяет по-новому
50 рассматривать систему патогенеза заболеваний, обусловленных *Helicobacter pylori*,
принципы диагностики и используемые для этого методы. Применение предлагаемого
способа диагностики *Helicobacter pylori*-инфекции в протоколах обследования пациентов
позволяет упростить диагностические манипуляции, оценить системность заболевания и

вовремя назначить адекватную терапию.

Предлагаемый способ является малоинвазивным, специфичным, может использоваться как скрининговый метод без проведения эзофагогастродуоденоскопии и взятия биопсийного материала для дальнейших исследований различными методами.

5 Настоящее изобретение стало результатом длительных научно-практических исследований. Факт персистенции генома *Helicobacter pylori* в мононуклеарных клетках периферической крови явился неожиданным для самих авторов, но не случайным, доказанным нами путем тщательной перепроверки полученных результатов.

10 Заявленное изобретение позволяет в короткие сроки без проведения эзофагогастродуоденоскопии и взятия биопсийного материала делать предварительные заключения о наличии в организме пресистирующей *Helicobacter pylori*-инфекции, причем впервые определять ее как системное поражение организма.

Настоящее изобретение может быть осуществлено непосредственно по данному описанию.

15

Формула изобретения

1. Способ диагностики *Helicobacter pylori*-инфекции методом полимеразной цепной реакции (ПНР), отличающийся тем, что проводят выделение мононуклеарных клеток периферической крови, в которых регистрируют участки генома *Helicobacter pylori*.

20 2. Способ по п.1, отличающийся тем, что при выделении мононуклеарных клеток в качестве антикоагулянта используют динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, фракцию мононуклеарных клеток выделяют на градиенте плотности, а субпопуляции клеток разделяют методом иммуномагнитной сепарации.

25

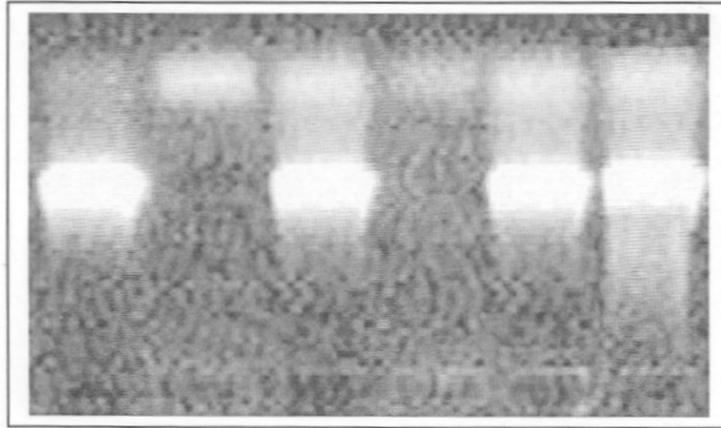
30

35

40

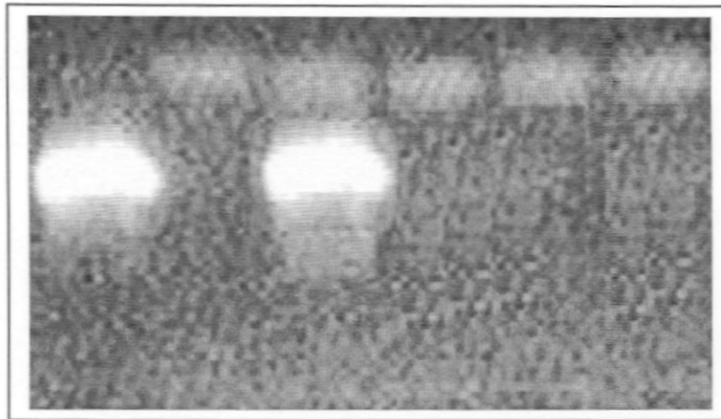
45

50



1 2 3 4 5 6

Фиг.2



1 2 3 4 5 6

Фиг.3