

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-3-54-59>



МЕТОДИКА ВЫДЕЛЕНИЯ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК (МОНОНУКЛЕАРОВ) ИЗ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ, ПОЛУЧЕННОЙ ОТ МИНИ-СВИНЬИ

О.И. Степанова, В.Н. Каркищенко, Р.А. Клёсов*, Н.В. Станкова,
Р.А. Агельдинов, М.А. Савина

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства России»

143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1

Впервые отработана методика выделения лимфоидных клеток (мононуклеаров) из цельной крови у светлогорских мини-свиней по методу, описанному Дж. Клаусом.

Ключевые слова: светлогорские мини-свиньи, лимфоидные клетки, мононуклеары

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Степанова О.И., Каркищенко В.Н., Клёсов Р.А., Станкова Н.В., Агельдинов Р.А., Савина М.А. Методика выделения лимфоидных клеток (мононуклеаров) из цельной крови, полученной от мини-свиньи. *Биомедицина*. 2020;16(3):54–59. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-3-54-59>

Поступила 17.06.2020

Принята после доработки 29.06.2020

Опубликована 10.09.2020

METHOD FOR SEPARATING LYMPHOID CELLS (MONONUCLEAR CELLS) FROM THE BLOOD OF MINI-PIGS

Olga I. Stepanova, Vladislav N. Karkischenko, Roman A. Klesov*, Nataliya V. Stankova,
Ruslan A. Ageldinov, Mariya A. Savina

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk district, Svetlye gory village, building 1

This paper proposes a new method for separating lymphoid cells (mononuclears) from the whole blood of Svetlogorsk mini-pigs according to the method described by J. Klaus.

Keywords: Svetlogorsk mini-pigs, lymphoid cells, mononuclears

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Stepanova O.I., Karkischenko V.N., Klesov R.A., Stankova N.V., Ageldinov R.A., Savina M.A. Method for Separating Lymphoid Cells (Mononuclear Cells) from the Blood of Mini-Pigs. *Journal Biomed*. 2020;16(3):54–59. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-3-54-59>

Submitted 17.06.2020

Revised 29.06.2020

Published 10.09.2020

Методика забора крови у светлогорских мини-свиней

Правильно отобранные образцы крови гарантируют получение достоверных результатов, снижают к минимуму возможность появления артефактов при лабораторных исследованиях. При заборе крови важно использовать стерильные вакуумные пробирки и важно, чтобы цельная кровь стекала по стенке в пробирку струей, а не каплями. Кровь, взятая каплями или вспененная, быстрее гемолизируется и часто дает неправильные результаты.

Забор крови проводили методом пункции краниальной полой вены с правой стороны (рис. 1). Поросенка в возрасте 6 мес. массой 16 кг надежно фиксировали в положении лежа на спине в специальном V-образном станке, передние конечности фиксировали вдоль туловища, а голову вытягивали вперед. Точка пункции находится вблизи рукоятки грудной кости в области первого ребра. Место пункции обрабатывали спиртовым р-ром. Иглу вводили медленно вниз перпендикулярно телу между двумя первыми ребрами. Шприц вводили с небольшим вакуумом, когда игла достигала полой вены, кровь поступала в шприц. Этим метод позволяет быстро получить требуемый объем стерильной крови, исключая длительную фиксацию и страдания животного.

Градиентное разделение крови на фракции

Выделение лимфоидных клеток (мононуклеаров) из цельной крови провели по методу, описанному Дж. Клаусом в 1990 г. Свежевыделенную свиную кровь в количестве 5 мл помещаем в пробирку с антикоагулянтом ЭТДА (18,0 мг) на 10 мл. Пробирку с кровью вращаем вокруг своей оси несколько раз для перемешивания, затем разбавляем кровь равным объемом р-ром Хенкса (без Ca^{+2} и Mg^{+2}) в соотношении 1:1 при комнатной температуре



Рис. 1. Забор крови у мини-свиньи из краниальной полой вены.

Fig. 1. Blood sampling from the cranial vena cava of a mini-pig.

$t^{\circ}=22^{\circ}\text{C}$. С помощью пипетки аккуратно наслаиваем разбавленную кровь на градиент Ficoll-P с удельной плотностью $1,077 \text{ г/см}^3$, где в пробирке объем градиента составляет 2,5–3 мл, а объем наслаиваемой разведенной крови составляет 6–7 мл (рис. 2).

Затем центрифугируем при 2000 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре $t^{\circ}=22^{\circ}\text{C}$. Принцип метода градиентного разделения основан на разделении клеточных элементов крови по плотности при центрифугировании в градиенте фикола-урографина с удельной плотностью $1,077 \text{ г/см}^3$.

В результате центрифугирования кровь разделяется на 4 отдельные фракции: первая фракция — на дне пробирки содержит гранулоциты, тромбоциты, эритроциты и обломки клеток крови; вторая фракция — это р-р фикола-урографина; третья фракция — расположенная над градиентом, представляет собой суспензию лимфоидных клеток; четвертая фракция — плазма крови, это хорошо видно из рис. 3.

Слой лимфоцитов осторожно собираем по всей площади сечения пробирки, переносим в чистую сухую центрифужную пробирку и разбавляем р-ром Хенкса (без Ca^{+2} и Mg^{+2}) в соотношении 1:5. Содержимое пробирки центрифугируем 5 мин при 1500 об/мин (рис. 3А). Затем надосадочную жидкость

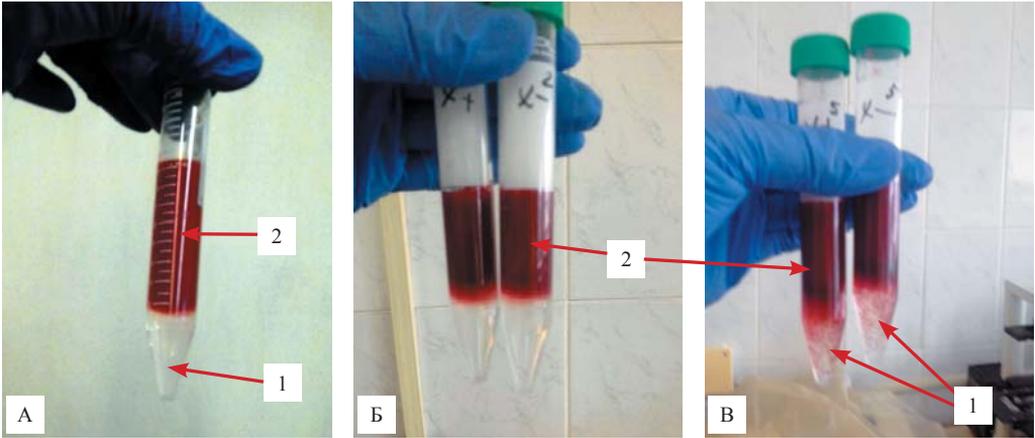


Рис. 2. Схема наслаивания форменных элементов крови на градиент плотности фиколл-урографин ($1,077 \text{ г/см}^3$) до центрифугирования крови. А, Б — стрелками указано: 1 — градиент Ficoll-P с удельной плотностью $1,077 \text{ г/см}^3$; 2 — разбавленная кровь наслаена на градиент; В — через 1–3 мин идет оседание эритроцитов (указаны стрелками).

Fig. 2. A scheme of layering blood components on the density gradient of phycoll-urographin ($1,077 \text{ g/cm}^3$) prior to blood centrifugation. А, Б — the arrows indicate: 1 — Ficoll-P gradient with a specific density of $1,077 \text{ g/cm}^3$; 2 — diluted blood layered on the gradient. В — 1–3 minutes after blood centrifugation, red blood cells sediment (indicated by arrows).

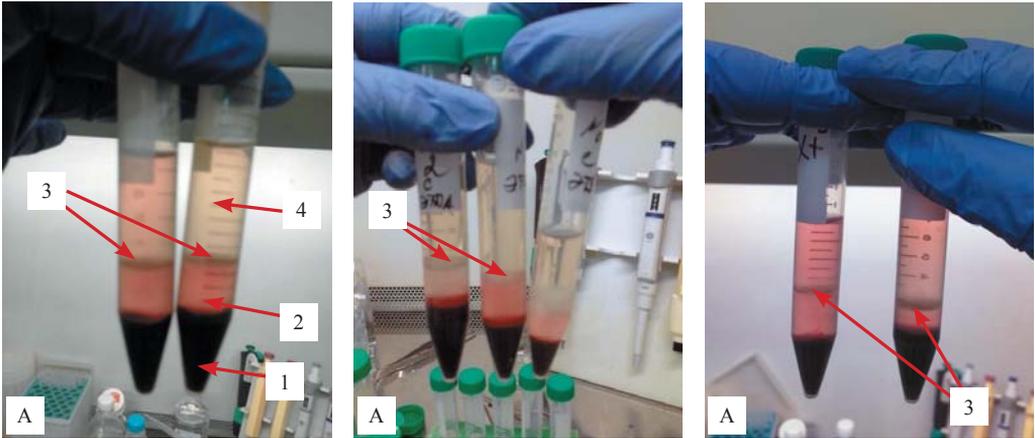


Рис. 3. Схема разделения форменных элементов крови на градиенте плотности фиколл-урографин после центрифугирования крови. А — стрелками указано: 1 — осадок крови с эритроцитами, гранулоцитами и тромбоцитами; 2 — градиент Ficoll-P с удельной плотностью $1,077 \text{ г/см}^3$; 3 — лимфоциты (мононуклеары); 4 — плазма разведенной крови.

Fig. 3. A diagram depicting the separation of blood components on the density gradient of phycoll-urographin following blood centrifugation. А — the arrows indicate: 1 — blood precipitate with erythrocytes, granulocytes and platelets; 2 — the Ficoll-P gradient with a specific gravity of $1,077 \text{ g/cm}^3$; 3 — lymphocytes (mononuclear); 4 — diluted blood plasma.

удаляем, а полученный осадок ресуспендируем в р-ре Хенкса (без Ca^{+2} и Mg^{+2}) с использованием лизирующего р-ра ($114 \text{ mM NH}_4\text{Cl}$; $7,5 \text{ mM KHCO}_3$; 100 мкМ EDTA)

в соотношении 1:4 с целью удаления оставшихся эритроцитов путем лизирования. Центрифугируем при 1500 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре $t^\circ=22^\circ\text{C}$.

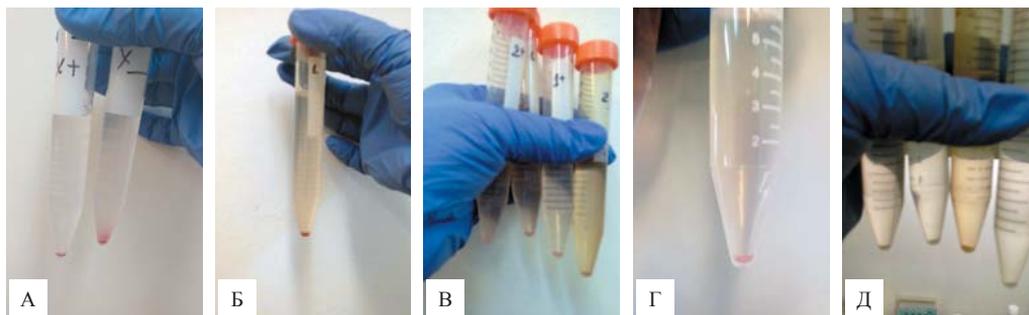


Рис. 4. Схема использования трехкратной отмывки в лизирующем р-ре с целью лизиса эритроцитов во фракции мононуклеаров (лимфоцитов). А — клеточный осадок лимфоцитов до использования лизирующего р-ра; Б — клеточный осадок лимфоцитов после первого использования лизирующего р-ра; В, Г — клеточный осадок лимфоцитов после второго использования лизирующего р-ра; Д — клеточный осадок лимфоцитов после третьего использования лизирующего р-ра.

Fig. 4. A scheme of using a 3-fold washing in a lysing solution for the purpose of erythrocyte lysis in the fraction of mononuclears (lymphocytes). А — the lymphocyte cell precipitate prior to the use of a lysing solution; Б — the lymphocyte cell precipitate following the first use of a lysing solution; В, Г — the lymphocyte cell precipitate following the second use of a lysing solution; Д — the lymphocyte cell precipitate following the third use of a lysing solution.

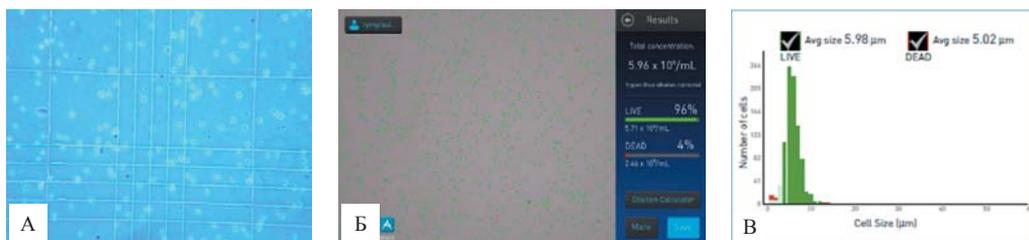


Рис. 5. Подсчет количества и жизнеспособности после трехкратной отмывки в лизирующем р-ре лимфоидных клеток, окрашенных 0,4% р-ром красителя трипановым синим. А — визуализация клеток лимфоцитов в камере Горяева, клетки неокрашенные — живые; клетки, окрашенные в синий цвет, — мертвые; фазово-контрастная микроскопия, ув. $\times 200$; ув. $\times 100$; Б — на счетчике клеток с визуализацией на экране с 96% выживаемостью клеток и ее постройкой в виде графика (В).

Fig. 5. Count of the number and viability of lymphoid cells following a 3-fold washing in a lysing solution stained with a 0.4% trypan blue dye solution. А — imaging of lymphocyte cells in a Goryaev chamber: unstained cells are alive; cells stained blue are dead (phase contrast microscopy, magn. $\times 200$; magn. $\times 100$); Б — screen image on the cell counter; 96% cell survival and its construction in the form of a graph (В).

Для удаления и отмывки оставшихся клеток эритроцитов из суспензии лимфоцитов используем лизирующий р-р трехкратно с помощью метода, указанного выше. На рис. 4 видно, как после трехкратного использования лизирующего р-ра (114 mM NH_4Cl ; 7,5 mM KHCO_3 ; 100 мкМ EDTA) осветляется осадок смеси лимфоцитов, который освобождается от эритроцитов крови, осадок становится более светлым, белым (рис. 3), но при этом сохраняется высокий

уровень жизнеспособности лимфоидных клеток (до 96%).

Для подсчета количества и определения жизнеспособности клеток лимфоцитов применяем тест с красителем трипановым синим. Этот краситель не проникает через мембраны живых клеток, но при их повреждении способен окрашивать клеточное ядро.

С этой целью используем автоматический счетчик клеток Countess II®. Счетчик

клеток имеет современную оптику и алгоритмы анализа изображений для выполнения подсчета и анализов жизнеспособности (подсчета живых, мертвых и общего числа клеток), окрашенных трипановым синим клеток в суспензии. Подсчет количества клеток на приборе производится автоматически из расчета на 1 мл, далее полученный результат умножается на объем исследуемого материала. Для подготовки образца в соответствии с протоколом берем 10 мкл исследуемой суспензии клеток лимфоцитов и соединяем с 10 мкл 0,4% р-ра красителя трипанового синего. Подсчет суспензии клеток выполняем сразу же после окрашивания в соответствии с протоколом анализа. Клетки для подсчета загружаем в счетчик клеток на слайд-камеру при комнатной температуре $t^{\circ}=22^{\circ}\text{C}$. Подсчет клеток в световом поле занимает 15 сек, и результат готов с визуализацией и постройкой таблиц, что видно из рис. 4.

В результате проведенной методики градиентного разделения цельной крови на фракции с использованием Ficoll-P (с удельной плотностью $1,077\text{ г/см}^3$) получены лимфоидные клетки (мононуклеары) из периферической крови мини-свиньи, отмытые трехкратно в лизирующем р-ре ($114\text{ мМ NH}_4\text{Cl}$; $7,5\text{ мМ KHCO}_3$; 100 мкМ EDTA).

Нами получены следующие данные по количеству клеток и их жизнеспособности в выделенной интерфазе:

- из 2 мл цельной крови выделены лимфоциты в количестве $(16-18)\times 10^6$;
- из 5 мл цельной крови выделены лимфоциты в количестве $(44-48)\times 10^6$;
- из 10 мл цельной крови выделены лимфоциты в количестве $(88-90)\times 10^6$;
- из 14 мл цельной крови выделены лимфоциты в количестве $(120-130)\times 10^6$.

Жизнеспособность выделенных лимфоидных клеток из цельной крови мини-свиньи при использовании данной методики составляет от 92 до 96%.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Степанова Ольга Ивановна, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: olgsima50@mail.ru

Olga I. Stepanova, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: olgsima50@mail.ru

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н., проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Клёсов Роман Алексеевич*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: klesrom@mail.ru

Roman A. Klesov*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: klesrom@mail.ru

Станкова Наталия Владимировна, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;
e-mail: sinayva@yandex.ru

Nataliya V. Stankova, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: sinayva@yandex.ru

Агельдинов Руслан Андреевич, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентст-
ва России»;
e-mail: ageldinov@gmail.com

Ruslan A. Ageldinov, Scientific Center of
Biomedical Technologies of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia;
e-mail: ageldinov@gmail.com

Савина Мария Анатольевна, ФГБУН
«Научный центр биомедицинских технологий
Федерального медико-биологического агентст-
ва России»;
e-mail: graff22@mail.ru

Mariya A. Savina, Scientific Center of Biomedical
Technologies of the Federal Medical and Biological
Agency of Russia;
e-mail: graff22@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author