



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **45641** (13) **U**
(51) МПК (2009)
C12N 5/08

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ РАДІОЗАХИСНОЇ АКТИВНОСТІ ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОVBУРОВИХ КЛІТИН, ОТРИМАНИХ З РІЗНИХ ДЖЕРЕЛ

1

2

(21) u200900839

(22) 05.02.2009

(24) 25.11.2009

(46) 25.11.2009, Бюл.№ 22, 2009 р.

(72) НІКОЛЬСЬКИЙ ІГОР СЕРГІЙОВИЧ, НІКОЛЬСЬКА ВАЛЕНТИНА ВАСИЛІВНА, ЗУБОВ ДМИТРО ОЛЕКСАНДРОВИЧ, ТАРАНУХА ЛЮБОВ ІВАНІВНА, ГАЛИЦЬКА СВІТЛАНА МИКОЛАЇВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕНЕТИЧНОЇ ТА РЕГЕНЕРАТИВНОЇ МЕДИЦИНИ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"

(57) Спосіб підвищення радіозахисної активності гемопоетичних стовбурових клітин, отриманих з різних джерел, що включає культивування клітин при певних умовах, який **відрізняється** тим, що гемопоетичні стовбурові клітини, які отримані з різних джерел, активують шляхом спільної інкубації та культивування з культурою мезенхімальних стовбурових клітин.

Спосіб відноситься до медичної біотехнології, зокрема до трансплантаційної радіології, імунології, і може бути використаний для підвищення радіозахисної дії гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) отриманих з різних джерел з метою лікування радіаційних уражень, а також інших захворювань, які супроводжуються пригніченням імунної та кровотворної систем.

Відомий спосіб збагачення гемопоетичних клітин-попередників, який полягає у використанні супернатанту культури мононуклеарів кордової крові. Застосовуються такі клітини при трансплантації для підвищення ефективності лікування хворих на онкогематологічну патологію [Пат. № 22514U UA, МІЖ (2006) A61B19/00; Опубл. 25.04.2007, Бюл. № 5].

Однак, клітини отримані даним способом є недостатньо ефективними при застосуванні для лікування або ж профілактики опромінення.

Відомий і спосіб збагачення суспензії клітин печінки ембріона людини гемопоетичними стовбуровими клітинами, який полягає в тому, що одержану суспензію додатково центрифугують у градієнті щільності верографіну, а фракцію клітин відмивають та ресуспендують [Пат. № 23916U UA, МПК (2006) C12N5/08; Опубл. 11.06.2007, Бюл. № 8].

Спосіб простий і доступний у виконанні та може застосовуватись для експериментальних і клінічних досліджень спрямованих на вивчення ГСК, однак не доведена їх радіозахисна дія.

Відомий і спосіб збагачення суспензії клітин печінки ембріона людини ГСК, в якому для збагачення використовується метод культивування суспензії клітин печінки ембріона людини в умовах збідненого сироватковими факторами поживного середовища протягом 6-х діб [Маркова О. В. Нейрональная трансдифференцировка стволовых гемопоетических и мезенхимальных клеток / О. В. Маркова; под ред. Ю.А.Зозули, Н.И. Лисяного // Нейрогенная дифференцировка стволовых клеток. - Киев, 2005. - С. 146-175].

Згідно з даним способом, клітинна суспензія збагачується ГСК за рахунок збільшення їх кількості, однак культивовані клітини спільно не інкубувались, тому не мала місце активація культур ГСК тобто підвищення радіозахисної активності.

В основу даної корисної моделі поставлено завдання розробити спосіб підвищення радіозахисної активності гемопоетичних стовбурових клітин, отриманих з різних джерел, який би забезпечував підвищення радіозахисної активності клітин, які можна застосовувати для лікування радіаційних уражень, а також інших захворювань, які супроводжуються пригніченням імунної та кровотворної систем.

Поставлене завдання досягається тим, що у способі, який включає культивування клітин при певних умовах, згідно з даною корисною моделлю, гемопоетичні стовбурові клітини з різних джерел активують шляхом спільної інкубації та культиву-

(13) **U**
(11) **45641**
(19) **UA**

вання з культурою мезенхімальних стовбурових клітин.

До даного рішення автори дійшли шляхом проведення експериментальних робіт та досліджуючи вплив спільно культивованих ГСК та мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) на відновлення імунної та кровотворної систем в опромінених мишей. Виявлено, що під дією МСК здійснюється активація ГСК отриманих із різних джерел.

Перевага наведеного способу активації ГСК при спільній інкубації та культивуванні з МСК полягає в тому, що МСК за допомогою клітинних та гуморальних взаємодій сприяють активації ГСК, достовірно збільшуючи виживаність детально опромінених мишей до 4-х місяців.

Спосіб здійснюють таким чином.

Культуру отримують зі строми тимусу, кісткового мозку, дерми, жирової тканини механічним способом та культивують в культуральних флаконах з використанням ростового середовища RPMI 1640 з 10% ембріональної телячої сироватки (надалі ЕТС). Після утворення колоній або моношару МСК на 15-ту добу культивування додають $2,4 \times 10^7$ свіжих ізольованих або розморожених регіональних ГСК кісткового мозку або ембріональної печінки розчинених в 12 мл свіжого середовища RPMI 1640 з 10% ЕТС. Культури розміщують в CO_2 -інкубаторі з 7,5 % CO_2 при 37°C .

Спільна інкубація та культивування МСК та ГСК виконується протягом 20-ти год., після чого ГСК із супернатанту концентрують центрифугуванням при 1000 об./хв. протягом 10 хв., осад ресуспендують в ростовому середовищі RPMI 1640 з 10 % ЕТС до концентрації $2,5 \times 10^6/\text{мл}$.

Мишей, лінії СВА, масою 20-25г, напередодні введення клітин (за 24 год.), піддавали загальному γ - опроміненню ^{60}Co в летальній дозі 9 Гр, потужність дози - 1,5 Гр/хв. Отримані клітини в об'ємі 0,2 мл вводили в хвостову вену опроміненим мишам. Після трансплантації, активованих за нашим способом ГСК, миші виживали до 4-х місяців, що підтверджує високу радіозахисну активність даних клітин.

Підвищення радіозахисної активності ГСК, отриманих з різних джерел підтверджується дослідженням радіопротекторної властивості таких клітинних культур:

клітини строми тимусу мишей (надалі СКТ) - $2,5 \times 10^6/\text{мл}$;

клітини ембріональної печінки мишей, інкубовані з СКТ (ЕПм+СКТ) - $2,5 \times 10^6/\text{мл}$; клітини ембріональної печінки людини (надалі ЕПл) - $2,5 \times 10^6/\text{мл}$; клітини ембріональної печінки людини, інкубовані з СКТ (ЕПл+СКТ) - $2,5 \times 10^6/\text{мл}$.

Порівняльні дані радіозахисної активності клітин отриманих з різних джерел та тривалість життя детально опромінених мишей, що отримували РГК з різних джерел представлені у таблиці.

Статистичні показники	Середня тривалість життя тварин, дів				
	контрольних	що отримували клітини			
		ЕПл	ЕПл+СКТ	ЕПм+СКТ	СКТ
M	15,0	40,0	70,0	83,4	41,8
$\pm T$	1,6	5,1	8,9	8,7	6,2
n	38	16	16	14	15
p_1	-	<0,01	<0,001	<0,001	<0,01
p_2		-	<0,05	<0,01	
p_3					<0,05

Як видно з таблиці, обчислена методом лінійної регресії, середня тривалість життя мишей в усіх групах, які отримували клітини, виявилась суттєво більшою, ніж в контролі, оскільки колонії СКТ містять в значній кількості високоактивні лімфоїдні клітини-попередники.

Таким чином, даний спосіб підвищення радіозахисної активності гемопоетичних стовбурових клітин, отриманих з різних джерел дозволяє значно підвищити радіозахисний ефект ГСК. Спосіб простий у виконанні та доступний у відтворенні.