



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **49022** (13) **U**
(51) МПК (2009)
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КОРЕКЦІЇ ПОКАЗНИКІВ ІМУННОЇ СИСТЕМИ У ЛЕТАЛЬНО ОПРОМІНЕНИХ СТАРИХ МИШЕЙ ЛІНІЇ СВА/СА

1

(21) u200911649

(22) 16.11.2009

(24) 12.04.2010

(46) 12.04.2010, Бюл. № 7, 2010 р.

(72) КИРИК ВІТАЛІЙ МИХАЙЛОВИЧ, БУТЕНКО
ГЕННАДІЙ МИХАЙЛОВИЧ

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕРОН-
ТОЛОГІЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ",
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕНЕТИЧНОЇ
ТА РЕГЕНЕРАТИВНОЇ МЕДИЦИНИ АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"

2

(57) Спосіб корекції показників імунної системи у летально опромінених старих мишей лінії СВА/Са, що включає трансплантацію гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки мишей, який **відрізняється** тим, що через 3 години після летального опромінення мишей віком 20 місяців, їм вводять несортвані гемопоетичні стовбурові клітини з клітинами мікрооточення, отримані з печінки плодів мишей 13 дня внутрішньоутробного розвитку.

Корисна модель відноситься до експериментальної медицини, зокрема, до галузі клітинних технологій, і може використовуватись для відновлення імунної системи у летально опромінених мишей.

Для оцінки та порівняння ефективності регенераторного потенціалу гемопоетичних стовбурових клітин використовують модель летального опромінення мишей з наступною трансплантацією клітин. Трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин летально опроміненим тваринам має на меті відновлення кількісного складу системи гемопоезу для відтворення функціонального потенціалу клітин в центральних органах імунної системи, які в свою чергу дають початок усім диференційованим клітинам в дорослому організмі. Останнім часом значна увага приділяється вивченню ефективності використання для потреб регенеративної медицини стовбурових клітин, які виділяють на ранніх етапах онтогенезу (ембріональні та фетальні), в порівнянні із стовбуровими клітинами дорослого організму. Оцінка ефективності застосування донорських гемопоетичних стовбурових клітин у старих реципієнтів є актуальною, виходячи з даних про зменшення активності власних стовбурових клітин в організмі при старінні.

Відомий спосіб корекції показників імунної системи у летально опромінених мишей, який полягає у трансплантації клітинної суспензії, отриманої шляхом дезагрегації плодів мишей 6-7 дня гестації (Hollands P. Differentiation and grafting of

haemopoietic stem cells from early postimplantation mouse embryos // Development. – 1987. – Vol.99. – P.69-76). Проте, при цьому способі для трансплантації використовуються клітини усіх тканин ембріона та децидуальних оболонок, а не лише гемопоетичні клітини, вміст яких максимальний в фетальній печінці 13-14 дня гестації.

Також відомо застосування клітин фетальної печінки у інтактних старих тварин в експерименті для оцінки морфофункціональних змін в тимусі (Кочеткова Н.Г. Влияние фетальных тканей на процессы инволюции тимуса в эксперименте // Успехи геронтологии. – 2008. – Т.21, №1. – С.56-60.). Але такий спосіб реалізований на щурах, у яких не змодельоване пошкодження імунної системи шляхом летального опромінення.

Найбільш близьким до даного рішення є спосіб, який полягає в трансплантації сортованих гемопоетичних клітин фетальної печінки (Morrison S. et al. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1995. - Vol.92. - P.10302-10306). Недоліком даного способу є необхідність у високоякісному магнітному та флюоресцентно-активованому сортуванні клітин, а також цей спосіб виконаний на мишах лінії C57Bl, які опромінені двічі з інтервалом 3 години.

В основу даної корисної моделі поставлено завдання розробити спосіб корекції показників імунної системи у летально опромінених старих мишей лінії СВА/Са, шляхом застосування транспла-

(13) **U**
(11) **49022**
(19) **UA**

птації несорттованих гемопоетичних стовбурових клітин фетальної печінки мишей, що дозволить регенерувати імунну систему, скоригувати її функції та зберегти життя експериментальним тваринам.

До даного рішення автори прийшли, досліджуючи кількісні та якісні показники імунної відповіді у лабораторних мишей лінії СВА різного віку після летального опромінення з наступною трансплантацією гемопоетичних клітин. Доведено, що дані несорттовані клітини в присутності клітин мікрооточення здатні відновлювати показники імунної системи у старих летально опромінених мишей, у яких знижені регенераторні властивості імунної системи. Гемопоетичні стовбурові клітини фетальної печінки виступають в якості попередників диференційованих клітин імунної системи, а клітини мікрооточення забезпечують їх приживлення та функціонування.

Поставлене завдання вирішується тим, що в способі, що включає трансплантацію клітин фетальної печінки, трансплантують несорттовані гемопоетичні стовбурові клітини з клітинами мікрооточення фетальної печінки мишей 13 дня внутрішньоутробного розвитку, які вводяться старим летально опроміненим мишам.

Спосіб здійснюють наступним чином.

Мишей-реципієнтів віком 20 місяців опромінюють за 3год. до трансплантації за допомогою рентгенологічного апарата РУМ-17 в дозі 9,0Гр, з потужністю дози 0,8Гр/хв.

Вагітні самки мишей з терміном гестації 13 днів підлягають евтаназії методом цервікальної дислокації під ефірним наркозом. Термін гестації визначається від моменту виявлення копулятивної пробки у самок, відсаджених із самцями для спарювання. В стерильних умовах після обробки операційного поля 70% розчином етанолу виконують розріз черевної порожнини та препарування рогів матки. Матку відсакають в районі шийки і маткових труб та переносять в стерильну чашку Петрі з 0,9% розчином NaCl при температурі +4°C. Після первинного відмивання від крові, проводиться розсікання стінки матки та виділення плодів разом з плодовими оболонками. Плоди звільняють від плодових оболонок і плаценти в чашці Петрі, що містить 3мл поживного середовища RPMI-1640 та переносять в чисту чашку з 1мл середовища.

Фетальну печінку препарують у плодів мікропіпететами, подрібнюють в середовищі RPMI-1640 шляхом пропускання через голки зменшеного діаметру до отримання однорідної суспензії. Фракцію мононуклеарних клітин, що містить ГСК та клітини мікрооточення, виділяють шляхом центрифугування протягом 15хв. при 1500об./хв. на градієнті щільності Ficoll-Paque (питома густина 1,077г/см³), відмивають в поживному середовищі, пропускають через клітинний фільтр з розміром пор 70мкм, визначають відсоток життєздатних клітин і доводять до необхідної концентрації.

Вміст гемопоетичних стовбурових клітин визначають методом проточної цитометрії з використанням моноклональних антитіл до поверхневих антигенів Sca-1, c-kit, CD150, flt3 та панелі антигенів Lin. Відсоток життєздатних клітин визначають

методом проточної цитометрії за рівнем проникнення в клітини з пошкодженою мембраною 7-аміноактиноміцину.

Трансплантацію несорттованих гемопоетичних клітин з клітинами мікрооточення (8млн. ядровмісних клітин фетальної печінки на мишу в 100мкл поживного середовища RPMI-1640) проводять в хвостову вену.

Протягом перших 10 днів після опромінення тварини отримують кип'ячену підкислену воду (1 ммоль/л HCl, pH=2,5) з вмістом окситетрацикліну в концентрації 100мг/л. Оцінку показників імунологічної реактивності у опромінених реципієнтів клітин проводять через 3 та 12 тижнів після трансплантації.

Приклад

Досліди проведені на 35 старих самках мишей лінії СВА/Са віком 20 місяців, які утримувались в розпліднику ДУ "Інститут геронтології АМН України" в стандартних умовах віварію на основі племінних ядер, отриманих з колекції Лабораторії експериментальних біологічних моделей РАМН.

Тварин-реципієнтів опромінювали в летальній дозі 9,0Гр, з потужністю дози 0,8Гр/хв. за 3 години до трансплантації.

Гемопоетичні стовбурові клітини з клітинами мікрооточення виділяли з печінки плодів 13 дня гестації за описаною методикою та вводили в хвостову вену. Частка життєздатних клітин відразу після виділення становила від 93,1% до 95,0%.

В контрольній групі без трансплантації клітин фетальної печінки усі летально опромінених тварин загинули протягом 3-8 днів після опромінення. Результати експерименту оцінювали через 3 та 12 тижнів після опромінення та трансплантації клітин серед мишей, які вижили, та порівнювали з нормальними інтактними тваринами такого ж віку.

Через 3 тижні після опромінення з наступною трансплантацією фетальних гемопоетичних стовбурових клітин виявлено перерозподіл субпопуляцій Т-лімфоцитів в кістковому мозку, тимусі, селезінці. Спільною рисою було зростання числа CD3-позитивних клітин в порівнянні з інтактними тваринами та посилення міграційних процесів в тимусі, що особливо важливо, враховуючи роль тимуса у фізіологічному старінні організму. В тимусі виявлено стимуляцію проліферації і дозрівання клітин, більш виражену щодо ранніх дозріваючих тимоцитів. Зокрема, виявлено зростання числа ранніх попередників тимоцитів (triple negative і double negative тимоцитів) та диференційованих single positive CD4⁺ і CD8⁺ клітин при зниженні числа недиференційованих double positive тимоцитів (p<0,05).

Відзначено тенденцію до зростання у кістковому мозку та селезінці кількості CD4⁺8⁺-клітин, які можуть мігрувати з тимуса у відповідь на сигнали пошкодження та регенерації кісткового мозку (p<0,05). Зростання індексу CD4⁺/CD8⁺ клітин в кістковому мозку вказувало на зміни співвідношення субпопуляцій зрілих лімфоцитів у бік більш вираженого зростання клітин з імуnoreгуляторними властивостями.

Через 12 тижнів після опромінення та трансплантації клітин відмічено зростання маси тимуса,

показника тимічного індексу ($p < 0,05$) та виявлено позитивний кореляційний зв'язок між зростанням маси тимуса та кількості ядромісних клітин у ньому.

При оцінці показників фагоцитарної активності у реципієнтів відмічено зростання функціональної активності перитонеальних макрофагів ($p < 0,05$), на фоні зниження їх абсолютної кількості.

Кількість антитілоутворюючих клітин селезінки через 3 тижні після опромінення та трансплантації

перевищувала на 31% показник інтактних старих тварин ($p < 0,05$). Через 12 тижнів ця тенденція також продовжувала спостерігатись. Було виявлено зростання титрів гемаглютининів та гемолізінів в крові тварин.

Таким чином, даний спосіб забезпечує корекцію показників імунної системи мишей лінії СВА/Са, необхідну для їх виживання після летального опромінення, і може використовуватись в експериментальній медицині.