



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **53756** (13) **U**
(51) **МПК (2009)**
C12N 5/02
C12N 5/078
C12N 5/0786
C12N 5/0789

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЯКОСТІ ПОТЕНЦІЙНОГО ТРАНСПЛАНТАТУ КУЛЬТИВОВАНИХ СТОVBУРОВИХ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН

1

2

(21) u201010292

(22) 21.08.2010

(24) 11.10.2010

(46) 11.10.2010, Бюл.№ 19, 2010 р.

(72) БІЛЬКО НАДІЯ МИХАЙЛІВНА, БОРБУЛЯК
ІРИНА ЗІНОВІЇВНА, БАРАШ ОЛЕКСІЙ ОЛЕКСАН-
ДРОВИЧ, БІЛЬКО ДЕНИС ІВАНОВИЧ

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ "КИЄВО-
МОГИЛЯНСЬКА АКАДЕМІЯ"

(57) 1. Спосіб оцінки якості потенційного трансплантату культивованих стовбурових гемопоетичних клітин, що включає попередній морфологічний аналіз клітин з довгострокової культури, подальше короткострокове культивування in vitro стовбурових гемопоетичних клітин у повному живильному середовищі з додаванням гелеутворюючої речовини та підрахунок кількості колоній-клонів, що утворилися, який **відрізняється** тим, що додатково з кожної отриманої колонії-клону виготовляють препарат і здійснюють морфологічний аналіз клітин, які формують клон, при цьому, якщо кількість проліферуючих гемопоетичних клітин перевищує

кількість макрофагальних клітин не менше ніж у 4 рази, трансплантат вважають перспективним, здатним забезпечити відновлення кровотворення.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як гелеутворюючу речовину використовують агар або метилцелюлозу, або плазмений згусток.

3. Спосіб за пп. 1, 2, який **відрізняється** тим, що препарат для морфологічного аналізу клітин кожної колонії-клону виготовляють на предметному скельці шляхом вилучення кожної колонії з гелеутворюючої речовини, розміщення клітин у живильному середовищі та подальшого цитоцентрифугування і забарвлення препарату.

4. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що живильне середовище готують на основі синтетичного живильного середовища з додаванням стимуляторів росту клітин.

5. Спосіб за пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що морфологічний аналіз клітин, які формують колонію-клон, здійснюють під світловим мікроскопом на збільшенні не менше x900.

Корисна модель належить до клітинної біології, медицини, зокрема гематології, онкології, трансплантології, і може бути використана для вибору високоякісного трансплантату гемопоетичних стовбурових клітин та їх найближчих нащадків - клітин-попередників, здатних відновити гемопоєз.

Нині трансплантація кісткового мозку є радикальним методом лікування багатьох онкогематологічних захворювань.

При трансплантації кісткового мозку гемопоетичні (кровотворні) стовбурові клітини відіграють основну роль у пересадженому кістковому мозку, а тому трансплантація кісткового мозку є, по суті,

трансплантацією гемопоетичних стовбурових клітин.

В зв'язку з цим, отримання знань про наявність стовбурових клітин у потенційному трансплантаті є одним з ключових питань сучасної трансплантології, тому що від їхньої кількості і функціональної активності залежить успіх вказаної процедури.

Відомий спосіб оцінки потенційного трансплантату, який полягає у визначенні кількісного і якісного складу формених елементів кісткового мозку з підрахунком різних типів гемопоетичних клітин [Н.М. Третяк Гематологія. - Київ, 2005. - С.18-25].

У відповідності з цим способом, клітини кісткового мозку перевіряються на життєздатність за-

(13) **U**

(11) **53756**

(19) **UA**

вдяки суправітальному забарвленню, наприклад, трипановим синім, а далі готують мазки, забарвлюють за Романовським-Гімзою і проводять їх морфологічний аналіз під світловим мікроскопом. При цьому трансплантат вважають перспективним, якщо в ньому виявлена переважна кількість життєздатних, морфологічно збережених гемопоетичних клітин.

Недоліком такого способу є суб'єктивність міркувань. Крім того, його можливості обмежені візуальною оцінкою картини сукупності клітин кісткового мозку, яка не дає змоги розкрити функціональний потенціал отриманих клітин.

Цілком очевидна недостатність тільки морфологічного вивчення гемопоетичних клітин. Саме функціональні методи дослідження клітин дозволяють оцінити їх проліферативні і диференційні потенції.

Найбільш цінними у цьому напрямку виявились методи клонування *in vitro* кровотворних гемопоетичних клітин. Загальною відмітною рисою цих методів є посів гемопоетичних клітин у таку культуральну систему (живильне середовище з гелеутворюючою речовиною), де клітини активно розмножуються, а їх нащадки виявляються локалізованими і доступними візуальному спостереженню.

Так, відомий спосіб культивування гемопоетичних клітин з кісткового мозку у повному живильному середовищі з напіврідким агаром [Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.П. Шахов. Методи культуры ткани в гематологии. - Томск, 1992. - С.146-151].

У відповідності з цим способом, після морфологічного вивчення гемопоетичні клітини культивують у рідкому бактоагарі у суворо визначених умовах. В результаті чого, відбувається клональний ріст гемопоетичних клітин-попередників. Отримані колонії-клони піддають кількісному обліку під інвертованим мікроскопом. Функціональну активність гемопоетичних клітин-попередників оцінюють за кількістю колоній-клонів, які виростають на 10-14-ту добу культивування.

Проте недоліком цього способу є недостатність інформації про шляхи диференціювання гемопоетичних клітин у сформованих клонах, аналіз яких надає би підставу судити про потенції до відновлення кровотворної системи.

Сам по собі факт активної проліферації клітин не є показником перспективності культури для отримання на її основі якісного трансплантаційного матеріалу. Проблема полягає в тому, що отримані колонії-клони містять велику кількість мієлоїдних та макрофагальних клітин, останні з яких, як відомо, не є джерелом відродження кровотворення. Тому, переважна більшість саме макрофагальних клітин в колоніях скоріше свідчить про переживання культури, незважаючи на їх зовнішній вигляд, цілісність і активну проліферацію, які можна засвідчити у інвертованому мікроскопі. Звісно, таку культуру не можна вважати перспективною для майбутнього відновлення кровотворення.

В основу корисної моделі поставлена задача - відбір якісного трансплантаційного матеріалу гемопоетичних стовбурових клітин, здатного до ефективного відновлення гемопоезу, за рахунок

поглибленого аналізу клітинного складу колоній-клонів, отриманих з довготривалих культур.

Поставлена задача вирішується тим, що потенційний трансплантат використовують суспензію збагачених довготривалим культивуванням стовбурових гемопоетичних клітин та їх найближчих нащадків (з кісткового мозку, кордової крові, мобілізованої периферійної крові та з інших джерел), які піддають морфологічному аналізу і подальшому короткостроковому культивуванню *in vitro* у повному живильному середовищі з додаванням гелеутворюючої речовини (агару, або метилцелюлози, або плазменного згустку).

Отримані після культивування колонії-клони піддають кількісному обліку. Після цього, кожну отриману колонію під контролем інвертованого мікроскопа вилучають з гелеутворюючої речовини, поміщають у живильне середовище, піддають цитоцентрифугуванню, забарвлюють отриманий препарат і здійснюють морфологічний аналіз клітин, які формують колонію-клон, під світловим мікроскопом на збільшенні не менше $\times 900$.

Якщо кількість проліферуючих гемопоетичних клітин перевищує кількість макрофагальних клітин не менше, ніж у 4 рази, трансплантат вважають перспективним, здатним забезпечити відновлення кровотворення.

Між сукупністю суттєвих ознак способу, що застосовується, і технічним результатом, що досягається, мається наступний причинно-наслідковий зв'язок.

Аналіз морфологічних характеристик культивованих клітин при наступному культивуванні у напіврідкому агарі показує, що клітини, які складають колонії, під інвертованим мікроскопом без забарвлення не можуть бути ідентифікованими, тобто, кількість отриманих колоній-клонів не відображає істинного стану культури. Склад клітин, які формують майбутній трансплантат, різний, і залежить від умов, в яких культивувалися клітини. Механізми диференціювання їх у визначених напрямках ще до кінця незрозумілі. Тому, щоб запобігти помилки, для визначення наявності стовбурових гемопоетичних клітин та їх клітин-попередників в культурі, слід не обмежуватись кількісним аналізом клонів.

Якщо об'єднати у групу мієлоїдні гемопоетичні клітини, що проліферують (бластні, промієлоцити, мієлоцити і метамієлоцити та інші), і протиставити їх кількості макрофагів, що не є джерелом відродження кровотворення, то виявиться, що в культивованих зразках, в залежності від умов зберігання і культивування, спостерігається різна картина.

Саме вивчення співвідношення кількості мієлоїдних до макрофагальних клітин в колоніях-клоніях дозволить об'єктивно оцінювати якість потенційного трансплантату. Заявлене співвідношення кількості таких клітин є оптимальним у зв'язку з тим, що у разі зміни співвідношення у сторону збільшення макрофагальної експансії, наприклад, 4:2, 4:3 та інших, падає здатність культурального матеріалу відновлювати гемопоез. А уявити собі культуру, в якій зовсім немає макрофагів, неможливо.

Заявлений спосіб здійснюється таким чином.

Для отримання потенційного трансплантату гемопоетичних клітин використовують суспензію збагачених довготривалим культивуванням стовбурових гемопоетичних клітин та їх найближчих нащадків. Спосіб культивування може бути будь-яким і з існуючих і обирається кожним дослідником індивідуально.

Впродовж тривалого культивування (5-7 тижнів) культура може проліферувати і диференціюватися різними шляхами. У оптимальних умовах вона збагачується на стовбурові клітини та клітини-попередники, при наявності негативних причин, яких не вдалося запобігти, клітини у культурі диференціюються у макрофагальному напрямку, хоча під інвертованим мікроскопом культура виглядає оптимістично. Клітини, вилучені з довготривалої культури, відмивають центрифугуванням у живильному середовищі протягом 10 хвилин.

Заздалегідь готують повне живильне середовище на основі синтетичного живильного середовища, телячої сироватки, суміші ростових факторів, до якого додають напіврідкий агар.

Підготовлені клітини переносять у суміш повного живильного середовища з агаром (щільність посіву не менше 5×10^5 на 1мл), отриману суспензію розливають у стерильні чашки Петрі (чи планшети 6-24 коміркові) і проводять їх культивування за умов абсолютної вологості, 5% концентрації CO_2 і 37°C.

Облік результатів проводять на 10-14-й день культивування. Кількісний облік колоній-клонів під інвертованим мікроскопом при збільшенні $\times 200$ зазвичай показує високий результат - на 100.000 культивованих клітин від 40 до 60 колоній-клонів.

Проводять наступний аналіз кожної отриманої колонії-клону для вивчення морфології клітин, які формують клон.

Для цього, готують препарат наступним чином.

Чашку Петрі з колоніями у напіврідкому агарі розкривають, встановлюють під інвертований мікроскоп (збільшення $\times 200$) і пастерівською піпеткою чи дозатором з наконечником, установленим на 10мкл, висмоктують колонію і переносять її на предметне скельце. Обережно під контролем мікроскопа очищують клітини від агару і переносять їх у комірку 96-коміркового планшета. Додають 20мкл живильного середовища RPMI-1640 з 1% фетальної телячої сироватки. Дозатором з наконечником на 10мкл переносять суспензію клітин у комірку цитоцентрифуги і проводять центрифугування при 1000зв. протягом 1 хвилини в результаті чого клітини осядуть на предметні скельця. Отри-

маний препарат, забарвлюють, наприклад, за Романовським-Гімзою.

Далі проводять морфологічний аналіз препарату під світловим мікроскопом при збільшенні $\times 900$ за обліком клітин різного ступеня зрілості, які формували колонії.

У разі переважання в препаратах клітин мієлоїдного напрямку диференціювання різного ступеня зрілості, але з переважанням проліферуючих клітин, трансплантат оцінюють як високоефективний, який здатен забезпечити відновлення кровотворення.

В той же час макрофагальна експансія, незважаючи на велику кількість клітин в клонах, свідчить про згасання кровотворення, відсутність чи падіння відновлюючого потенціалу, а в зв'язку з чим констатують недоцільність використання продукту з такими характеристиками в якості трансплантату.

Приклад виконання способу.

Для перевірки факту перспективності чи неперспективності клітинного матеріалу для відновлення гемопоєзу в експерименті використовували традиційну модель врятування смертельно опромінених мишей ін'єкцією культивованих клітин, оцінених в результаті додаткового короткострокового культивування кісткового мозку миші у напіврідкому агарі, підрахунком колоній і визначенням їх якісного складу під світловим мікроскопом.

В таблиці наведені результати порівняльного аналізу двох культур кісткового мозку, функціональна оцінка яких відбувалася з урахуванням морфологічного аналізу внутрішнього складу колоній.

Приведені результати виживаності мишей після ін'єкцій трансплантату з переважною кількістю мієлоїдних клітин (1-а серія) та з переважною кількістю макрофагальних клітин (2-а серія).

Як свідчать приведені результати, саме трансплантат, у якому, згідно із заявленим способом, виявлена переважна кількість мієлоїдних клітин (у 4 рази, порівняно з кількістю макрофагальних клітин) виявився високоефективним, здатним відновити гемопоєз - виживають 17 із 20-ти смертельно опромінених мишей.

Таким чином, перевагою корисної моделі є можливість об'єктивної оцінки потенційного трансплантату стовбурових гемопоетичних клітин та їх найближчих нащадків і, як наслідок, відбір якісного трансплантаційного матеріалу, здатного до ефективного відновлення гемопоєзу, що забезпечить успішне використання заявленого способу як у наукових цілях, так і у практичній медицині - для лікування хворих широкого кола захворювань.

Таблиця

Групи порівняння	Показники кістковомозкового колонієутворення	Вживаність мишей після ін'єкції клітин	Кількість ЕКУ на селезінку
1-а серія	Кількість колоній (ЕКУ*) 55,0±1,2	17/20	23-25
	Якісний склад колоній		
	Мієлоїдні клітини 80% Макрофаги 20%		
2-а серія	Кількість колоній (ЕКУ*) 53,2±0,9	2/20	0-1
	Якісний склад колоній		
	Мієлоїдні клітини 10% Макрофаги 90%		

* ЕКУ: ефективність колонієутворення - кількість колоній, що утворилися після культивування у розрахунку на 100 000 культивованих клітин.