

Корисна модель відноситься до медицини, зокрема гематології, онкології та трансплантології, і може бути використана для збагачення гемопоетичних клітин-попередників, отриманих з різних джерел, що використовуються як при алогенній, так і при аутологічній трансплантації.

Відомий спосіб вибору кордової крові як джерела стовбурових клітин для алогенної трансплантації, який полягає у застосуванні стовбурових клітин кордової крові для трансплантації [С.В. Юрасов, Е.Б. Владимирская, А.Г. Румянцев и соавт. Выделение гемопоетических стволовых клеток из пуповинной крови человека для трансплантации /Гематология и трансфузиология. -1997. -№2. -С.10-15] визначає кордову кров як джерело СК для алогенної трансплантації на основі визначення функціональних властивостей стовбурових клітин. Однак, даний спосіб не враховує стимулюючі властивості супернатанта кордової крові для підвищення проліферативного потенціалу клітин-попередників.

Технічним завданням корисної моделі є створення способу збагачення гемопоетичних клітин-попередників для підвищення ефективності лікування хворих на онкогематологічну патологію із застосуванням трансплантації, покращання безрецидивного та загального виживання пацієнтів.

Поставлене технічне завдання вирішується за рахунок додавання супернатанту культури мононуклеарів кордової крові до гемопоетичних клітин-попередників, отриманих з різних джерел, з подальшою оцінкою ефективності колонієутворення гемопоетичних клітин-попередників периферичної та кордової крові. Для збагачення ми використовували супернатант, отриманий після 5- та 14-денного культивування мононуклеарів кордової крові.

Заявлений спосіб здійснюється таким чином.

Фракцію мононуклеарів із периферичної крові отримували методом аферезу за допомогою сепаратора безупинного току крові "COBE Spectra".

Збір пуповинної крові здійснювали під час пологів у здорових жінок віком від 21 до 32 років. Клітинну суспензію в об'ємі 15мл вносили до стерильної пробірки з розчином гепарину (фірми "Ріхтер") у середовищі Iscove's (Sigma) із розрахунку 40-50од/мл.

З метою виділення мононуклеарної фракції стерильною піпеткою нашаровували 3мл гепаринізованої крові, розведеної розчином Хенксу 1:1 на градієнт щільності тріомбаст ($\rho=1,074$). Центрифугували при 1500об. впродовж 20 хвилин, відбирали та переносили кільце ядровмістних клітин та відмивали двічі живильним середовищем RPMI-1640 із додаванням 10% ембріональної телячої сироватки. Кількість мононуклеарів, яка повинна бути не менше 1,5млн. на 1мл, підраховували в камері Горяєва.

Для приготування супернатантів зразки біологічного матеріалу розливали по 0,5мл в стерильні центрифужні пробірки з 0,1мл гепарину в розведенні 1:10 і додавали 5мл живильного середовища RPMI-1640 (Sigma, Germany) з 20% ембріональної телячої сироватки (Sigma, Germany). Суспензію клітин інкубували в термостаті при 37,0°C протягом 5 та 14 днів. Після закінчення культивування вміст пробірок центрифугували (10хв. при 1000об.), надосадову рідину розливали по 1,5мл для подальшого використання.

Для постановки культуральних досліджень використовували живильне середовище RPMI-1640, 20% фетальну телячу сироватку Serva (CША), рекомбінантний гранулоцитарно-макрофагальний фактор у концентрації 30нг/мл (Sigma), 3,3% агар (Merk), антибіотики (пеніцилін і стрептоміцин по 50од/мл). Культивування кровотворних клітин проводили в стерильних чашках Петрі (d=35мм). В останню чергу вносилися клітини (щільність посіву 1×10^5 на 1мл) та супернатант, отриманий після культивування мононуклеарів кордової крові. Культивування проводили в умовах абсолютної вологості при 5% концентрації CO₂ і температурі 37°C протягом 5 та 14 днів.

Збагачення клітин попередників у зразках периферичної крові проводили в декілька етапів. Перший етап полягав в проведенні хворим курсів інтенсивної хіміотерапії в поєднанні з колонієстимулюючими факторами, на другому етапі збільшення відносної кількості стовбурових клітин в 2-3 рази відбувалось за допомогою цитаферезу на клітинному сепараторі, на третьому - проводилось збагачення клітин-попередників надосадовою рідиною, вилученою в процесі 5-та 14-денного культивування клітин попередників кордової крові, при культивуванні in vitro.

Установлено, що найбільша ефективність колонієутворення характерна для культури клітин-попередників, отриманих з кордової крові, в порівнянні з периферичною кров'ю, що свідчить про їх більшу функціональну активність. Доведено, що надосадова рідина, отримана з культури клітин кордової крові, має стимулюючі властивості щодо колонієутворення та призводить до підвищення ЕКУ периферичної та кордової крові. Значне підвищення ЕКУ (в 1,5-2 рази) досягається при додаванні надосадової рідини, отриманої після культивування клітин-попередників кордової крові, як до культури клітин периферичної крові, так і самої кордової крові.

Перевагою способу є можливість змінювати функціональні властивості клітин-попередників стимулюючи їхню проліферативну активність без зміни фенотипу та морфології клітин. На відміну від прототипу для збагачення використовувалась не клітинна суспензія, а субстрат, з якого вилучені елементи крові з певними антигенними властивостями, що знижує ризик розвитку хвороби „трансплантат проти хазяїна”.

Приклади.

Приклад 1. Значення ЕКУ СК ПК збагачених супернатантом культури мононуклеарів кордової крові приблизно в 2,1 рази більше від ЕКУ незбагачених клітин. Причому збагачення супернатантом 14-денної культури дає значно кращий результат (середні значення ЕКУ $67,7 \pm 0,7$ колоній), порівняно з 5-денною культурою (середні значення ЕКУ $60,6 \pm 1,1$ колоній).

Таблиця 1

Спосіб збагачення гемопоетичних клітин-попередників, отриманих з різних джерел.
Вплив супернатанта 5-денної та 14- денної культури мононуклеарів кордової кров на ЕКУ СК ПК
у хворих на онкогематологічну патологію

№ зразка	Пацієнт	Діагноз	ЕКУ СК ПК без збагачення	ЕКУ СК ПК з супернатантом 5-денної культури мононуклеарів кордової крові	ЕКУ СК ПК з супернатантом 14-денної культури мононуклеарів КК
1.	К-ка	ГМЛ	15,0±0,30	41,0±1,30	49,0±0,10
2.	М-ов	ЛГМ	30,0±1,20	70,0±1,11	73,0±0,40
3.	О-л	ЛГМ	17,0±1,50	55,0±1,70	64,0±1,50
4.	Д-ан	ГЛЛ	24,4±0,10	54,0±0,30	64,0±0,30
5.	С-на	ГЛЛ	43,3±0,50	75,0±1,40	80,0±0,14
6.	П-ко	ГЛЛ	31,4±1,20	74,0±0,30	81,0±0,70
7.	К-юк	НЗЛ	45,1±0,30	90,0±1,70	97,0±1,11
8.	В-ко	ЛГМ	15,4±1,30	51,0±1,10	60,0±0,60
9.	С-ко	ЛГМ	20,3±0,60	42,0±0,30	49,0±1,80
10.	Г-ой	ХЛЛ	14,1±1,40	54,0±1,50	60,0±0,40
Середні значення			25,6±0,74	60,6±1,1	67,7±0,71

Приклад 2. Вплив супернатанта 14-денної культури мононуклеарів кордової крові збільшував ЕКУ мононуклеарів кордової крові приблизно у 2 рази. Максимальна ЕКУ, зареєстрована в культурі клітин попередників кордової крові при додаванні супернатанту, отриманого після 14-денного культивування ГСК кордової крові, складала 179,0±1,20 колоній при середніх значеннях.

Таблиця 2

Спосіб збагачення гемопоетичних клітин-попередників, отриманих з різних джерел.
Вплив супернатанта 14-денної культури мононуклеарів кордової крові на ЕКУ клітин-попередників кордової крові

№	Зразок	ЕКУ СК КК без супернатанта	ЕКУ СК КК, збагачених супернатантом 14-денної культури мононуклеарів КК
1.	№1	84,0±0,13	159,0±1,50
2.	№2	71,0±1,20	144,0±0,40
3.	№3	95,0±0,11	179,0±1,40
4.	№4	70,0±1,70	144,0±0,12
5.	№5	65,0±0,13	122,0±1,50
6.	№6	55,0±1,70	103,0±0,14
7.	№7	74,0±1,30	145,0±1,11
8.	№8	85,0±0,60	168,0±0,30
9.	№9	90,0±1,40	179,0±1,20
10.	№10	66,0±1,13	112,0±0,50
Середні значення		75,5±0,94	145,5±0,82

Запропонований спосіб збагачення гемопоетичних клітин-попередників може бути впроваджений в онкогематологічних відділеннях України при проведенні як алогенних, так і аутологічних трансплантацій.