

Корисна модель, що заявляється, стосується медицини, точніше імунології, і призначена для збагачення суспензії клітин печінки ембріона людини стовбуровими гемопоетичними клітинами.

Гемопоетичні стовбурові клітини - універсальне джерело для регенеративних і репаративних процесів в організмі. Вони володіють високим проліферативно-диференціальним потенціалом і утворюють різні типи клітин багатоклітинного організму. Стовбурові клітини вже використовуються в лікуванні онкологічної патології (лейкемії, лімфоми), вивчаються як перспективне знаряддя для можливості збільшити тривалість життя, для комплексного омолодження людини.

Гемопоетичні стовбурові клітини характеризуються наступними властивостями - здатність до проліферації, міграції та диференціації. Саме проблема вивчення механізмів проліферації, міграції та диференціації гемопоетичних стовбурових клітин є ключовою в теоретичній і практичній імунології, вона тісно пов'язана з проблемою регуляції імунологічної реактивності.

Важливою перешкодою, яка стримує дослідження та застосування гемопоетичних стовбурових клітин людини є обмежені джерела цих клітин. Лікування хворих із застосуванням аутологічних гемопоетичних стовбурових клітин передбачає проведення пункції кісткового мозку, або проведення податкових лікувальних процедур, пов'язаних зі стимуляцією виходу стовбурових клітин у кровообіг та їх накопичення (лейкоферез). Крім того, існують клінічні ситуації, які вимагають при застосуванні аутологічних гемопоетичних стовбурових клітин додаткового введення хворому антиtimoцитарного глобуліну для знищення власних патологічних Т-лімфоцитів. Іншим джерелом гемопоетичних стовбурових клітин можна вважати аlogenну кордову кров, але банки кордової крові тільки починають створюватися, запаси кордової крові досить обмежені. Стримують використання цього джерела і дуже обмежена кількість гемопоетичних стовбурових клітин, яка може бути отримана з одного зразка кордової крові.

Відомо, що печінка ембріона людини містить гемопоетичні стовбурові клітини і може бути джерелом цих клітин. Клітини ембріона печінки людини використовуються для лікування онкологічних захворювань системи гемопоєзу, для корекції показників гемопоєзу після хіміотерапії [1]. Але питома вага гемопоетичних стовбурових клітин серед клітин печінки ембріона людини досить мала. Свіжеотримана суспензія клітин ембріональної печінки містить  $1,6 \pm 0,2$  % клітин, що несуть загально визнаний маркер гемопоетичних стовбурових клітин - антиген CD34, решту складають еритроцити, пізні клітини-попередники гемопоєзу, овальні клітини та інші [2].

Методи виділення стовбурових клітин та клітин-попередників досить інтенсивно розробляються при використанні в якості джерела гемопоетичних стовбурових клітин кордової крові людини. Відомий спосіб виділення фракції ядровмісних клітин кордової крові двоступеневим методом, який передбачає проведення седиментації еритроцитів крізь шар полігеліну (Emagel) у комплексі з сепарацією на градієнті щільності філолгіпака ( $\rho=1,077$ ). Відомий спосіб, в якому лізують еритроцити за допомогою розчину хлориду амонію з послідовним відмиванням клітин за допомогою буферного розчину та центрифугування без зменшення об'єму суспензії.

Найближчим аналогом (прототипом) способу збагачення клітин печінки ембріона людини гемопоетичних стовбурових клітин є спосіб, при якому для збагачення використовується культивування суспензії клітин печінки ембріона людини 6-8 тижнів гестації в умовах збідненого сироватковими факторами поживного середовища ДМЕМ на протязі 6 діб. Такий спосіб передбачає отримання методом механічної дезагрегації з печінки ембріона людини 6-8 тижнів гестації суспензії клітин, перенесення клітин у безсироваткове поживне середовище ДМЕМ та культивування протягом 6 діб в умовах  $37^{\circ}\text{C}$  і 5%  $\text{CO}_2$ . Дослідження через 6 діб питомої ваги CD34-позитивних клітин в отриманій суспензії свідчить про суттєве збільшення кількості гемопоетичних стовбурових клітин за рахунок загибелі диференційованих клітин та клітин-попередників [3].

В основу збагачення суспензії клітин печінки ембріона людини гемопоетичними стовбуровими клітинами покладено особливості біологічних властивостей стовбурових клітин, які не вибагливі у порівнянні зі зрілими клітинами до поживного середовища. Описаний спосіб дозволяє збагатити суспензію клітин печінки ембріона людини гемопоетичними стовбуровими клітинами.

Проте однією з причин, які стримують використання цього способу і змушують більш прискіпливо розглядати результати такого методу, є тривалість способу (6 діб), суттєві зміни життєздатності клітин печінки протягом культивування і „отруєння” поживного середовища продуктами розпаду клітин, що може впливати на функціональний стан гемопоетичних стовбурових клітин. Існує також загроза інфікування поживного середовища і в подальшому інфікування і втрати самих клітин печінки. Крім того, спосіб-прототип вимагає застосування, великих об'ємів поживного середовища, бо клітини печінки культивуються в низьких концентраціях ( $4 \times 10^6$  клітин/мл).

Завдання, яке вирішує корисна модель, що заявляється, полягає в прискоренні процедури збагачення клітин печінки ембріона людини гемопоетичними стовбуровими клітинами, зменшенні ризику інфікування клітин при культивуванні, зменшенні витрат поживного середовища ДМЕМ.

Поставлене завдання досягається: тим, що у відомому способі збагачення клітин печінки ембріона людини гемопоетичними стовбуровими клітинами, який включає отримання з печінки ембріона людини 6-8 тижнів гестації суспензії клітин, визначення кількості та життєздатності клітин, згідно корисної моделі, отриману суспензію додатково центрифугують у градієнті щільності верографіну ( $d=1,078$ ), фракцію клітин збирають, відмивають та ресуспендують.

Збагачення клітин печінки ембріона людини гемопоетичними стовбуровими клітинами досягається тим, що з суспензії клітин печінки методом центрифугування в градієнті щільності верографіну отримують фракцію клітин, які мають щільність  $d=1,078$ . Ця фракція містить тільки мононуклеари, до яких відносяться і гемопоетичні стовбурові клітини. Такий спосіб надає можливість вибірково накопичувати гемопоетичні стовбурові клітини у фракції  $d=1,078$ , клітини з іншою щільністю при даних умовах центрифугування не попадають в цю фракцію. Досягнення збагачення клітин печінки гемопоетичними стовбуровими клітинами підтверджується визначенням питомої ваги CD34-позитивних клітин в отриманій суспензії. Запропонований спосіб дозволяє значно прискорити отримання гемопоетичних стовбурових клітин із зразка клітин печінки ембріона людини, звільняє гемопоетичні стовбурові клітини від небажаного впливу факторів поживного середовища, що продукуються клітинами, що

гинуть, значно зменшує об'єм використаного поживного середовища та ризики інфікування клітин при культивуванні.

Відмінною особливістю способу, що заявляється, є те, що при такому способі вдається уникати довготривалого культивування клітин печінки, знижується ризик інфікування клітин, зменшуються витрати на поживне середовище ДМЕМ.

Запропонований спосіб здійснюється наступним чином. Фрагмент печінки ембріона людини 6-8 тижнів гестації подрібнюють ножицями, методом механічної дезагрегації отримують суспензію клітин, проводять підрахунок клітин печінки за допомогою камери Горяєва та вітального барвника (0,2% розчин трипанового синього). 18-20млн. клітин нашаровують на 2мл верографіну ( $d=1,078$ ), центрифугують 30 хвилин за допомогою центрифуги при 1500 обертів за хвилину. Потім забирають отриманий шар клітин, переносять в пробірку з поживним середовищем, відмивають центрифугуванням (10 хвилин, 1000 обертів за хвилину), ресуспендують і знову проводять підрахунок клітин печінки за допомогою камери Горяєва та вітального барвника. Порівняльний аналіз запропонованого способу і способу-прототипу наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Порівняльний аналіз запропонованого способу і способу-прототипу

Показники	Способи, що порівнюються	
	Спосіб-прототип	Запропонований спосіб
Тривалість збагачення суспензії клітин печінки ембріона людини гемопоетичними стовбуровими клітинами	6 діб	1 година
Витрати поживного середовища на обробку зразку клітин печінки $40 \times 10^6$	14 мл	4мл
Збільшення питомої ваги CD34-позитивних клітин	4-кратне	6-кратне

#### Приклад 1.

Фрагмент печінки ембріона людини (7-й тиждень гестації) подрібноли ножицями, провели механічну дезагрегацію за допомогою пастеровської піпетки, отримали суспензію клітин, провели підрахунок клітин печінки за допомогою камери Горяєва та вітального барвника (0,2% розчин трипанового синього). Кількість клітин становила  $36 \times 10^6$ , життєздатність (питома вага не забарвлених барвником клітин) - 75 %. Нашарували по 20млн. клітин (об'єм суспензії 2мл) на 2мл верографіну ( $d=1,078$ ) у дві пробірки, центрифугували 30 хвилин за допомогою центрифуги при 1500 обертів за хвилину. Потім забрали отриманий в інтерфазі шар клітин, перенесли в пробірку з поживним середовищем, відмили центрифугуванням (10 хвилин, 1000 обертів за хвилину), ресуспендували і провели підрахунок клітин печінки за допомогою камери Горяєва та вітального барвника. Отримано  $2,7 \times 10^6$  клітин. Питома вага CD34-позитивних клітин збільшилася у 6,8 разів.

Таким чином, нами розроблено спосіб збагачення клітин печінки ембріона людини гемопоетичними стовбуровими клітинами, при якому вдається уникати довготривалого культивування клітин печінки в поживному середовищі і зменшити витрати поживного середовища. Спосіб у порівнянні з прототипом є більш швидким, простим і доступним у виконанні для дослідників і може бути використаний у експериментальних і клінічних дослідженнях, спрямованих на вивчення гемопоетичних стовбурових клітин людини.

#### Літератури:

1. Гриневич Ю.А., Храновская Н.Н., Бендюг Г.Д. Влияние клеток эмбриональной печени на естественную противоопухолевую резистивность организма // Иммунология. - 2003. - 3. - с. 54-59.
2. Петренко А.Ю., Грищенко В.І. Трансплантация стволовых клеток - перспективное направление терапии XXI века. Стволовые кроветворные клетки из разных источников. // Междунар. мед. журнал. - 2003.- 1 - с. 123-129.
3. Маркова О.В. Нейрональная трансдифференцировка стволовых гемопоетических и мезенхимальных клеток. // В кн. „Нейрогенная дифференцировка стволовых клеток“. Под ред. Ю.А. Зозули, Н.И. Лисяного. - 2005 - Киев. - с. 146-175.