

Корисна модель відноситься до біотехнології і стосується способу одержання біологічного препарату на основі клітин ембріональної печінки (КЕП) собаки для корекції системи імуногемопоезу, що містить стовбурові клітини.

Хронічні захворювання і їх ускладнення викликають гемо- і імундепресивні стани, які швидко розвиваються і мають довгий перебіг. Вони характеризуються недосконалістю клітинного і гуморального імунітету, недостатністю кровотворення, низькими гематологічними показниками крові, зниженням білоксинтезуючої активності печінки й іншими. Відновлення нормального кровотворення можливо тільки за умови достатньої гемопоетичної потенції, що залежить від стану клітин-попередників усіх паростків кровотворення (еритро-, міело, лімфо і мегакаріоцитозу). Донорські клітини при попаданні в організм здатні впливати на всі його органи і тканини. В першу чергу це стосується процесу кровотворення. Ембріональні клітини здатні поповнювати найменш зрілий пул кровотворних клітин і, таким чином, значно збільшувати кровотворний потенціал організму. Крім того, ці клітини виробляють цілий спектр гемопоетинів, які можуть забезпечувати повноцінну стимуляцію кровотворної активності клітин дорослого організму. Клітинна трансплантація має ряд суттєвих переваг у порівнянні з трансплантацією цілого органа (печінки): ембріональні клітини мають більший потенціал росту й проліферації, виражену здатність до диференціації та функціонально більше активні, продукують фактори росту й регенерації; клітини можуть бути приготовлені заздалегідь і використовуватися на першу вимогу.

Відомо спосіб одержання біологічного препарату [RU №96115729 кл А61К35/48 от 07.25.1996 „Способ изготовления биологически активных препаратов из эмбриональных тканей“]. Спосіб включає подрібнення м'яких тканин, гомогенізацію, фракціонування супернатанту з виділенням цільового продукту.

Існує спосіб одержання біологічного препарату [RU №2041717 кл А61К35/55 „Биологически активное средство, способ его получения и препарат, содержащий указанное средство, и способ использования препарата“]. За цим способом тканину із тварин подрібнюють, гомогенізують, із гомогенату видаляють осад, який містить клітинні мембрани. Після ресуспендування із осаду одержують компоненти клітинних мембран. Недоліком є те, що у цих способах застосовують клітинні мембрани, які не здатні забезпечувати повноцінну стимуляцію кровотворної активності клітин донора.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб отримання біотрансплантату [рішення про видачу патенту RU №2272638 кл А61К35/407, С12N5/08 от 2004.08.18 „Биотрансплантат, способ его получения и способ лечения хронического гепатита и цирроза печени“]. За цим способом одержують біотрансплантат, який містить мезенхимальні стовбурові клітини. При цьому проводять подрібнення печінки, фільтрування, центрифугування, промивання і дезагрегацію. Це рішення може бути прототипом. Але спосіб має певні недоліки: для одержання біотрансплантату використовують свіжо виготовлену культуру фетальних гепатоцитів людини, це не дає змоги використовувати біотрансплантат для лікування собак. При довгостроковому культивуванні, клітини набувають онкогенних властивостей.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб одержання біологічного препарату на основі клітин ембріональної печінки собаки для корекції системи імуногемопоезу у собак, який включає інфільтрацію, подрібнення, дезагрегацію, фільтрування, центрифугування, промивання, кріоконсервування шляхом використання тканини печінки 37-45 - добових ембріонів собак, інфільтрації її розчином колагенази (50мг колагенази на 20см³ розчину Хенкса) та додавання в суспензію дисоційованих клітин середовища RPMI та кріозахисного середовища, щоб забезпечити ефективність способу одержання біологічного препарату. Порівняльний аналіз з прототипом дозволяє зробити висновок, що спосіб який заявляється відповідає критерію "новизна".

Спосіб виконується таким чином:

Печінку промивають в трьох змінах розчину, після чого поміщають в стерильну чашку Петрі і інфільтрують розчином колагенази (50мг колагенази на 20см³ розчину Хенкса), витримують 30-40 хвилин при 37°С. Потім печінку поміщають у флакон, подрібнюють на шматочки, додають подвійний об'єм розчину Хенкса і піддають дезагрегації на магнітній мішалці впродовж 15 хвилин. Отриману суспензію фільтрують і центрифугують при 1000об/хв. протягом 5 хвилин. Виділяють супернатант, а осад тричі відмивають центрифугуванням при 700об/хв., додаючи розчин. Осад ресуспендують живильним середовищем RPMI.

Приклад 1.

Печінку промивали в трьох змінах розчину, що вміщував NaCl-145ммоль, KCl-6ммоль, MgCl-1,2ммоль, NaHCO₃-2,9ммоль та антибіотик (канаміцин або гентаміцин, 50ЕД/см³), поміщали в стерильну чашку Петрі і інфільтрували розчином колагенази (з розрахунку 50мг колагенази на 20см³ розчину Хенкса), витримували 30-40 хвилин при 37°С. Після цього печінку поміщали у флакон, подрібнювали на шматочки розміром 2-3мм, додавали подвійний об'єм розчину Хенкса і піддавали дезагрегації на магнітній мішалці впродовж 15хв. Отриману суспензію фільтрували через 4 шара марлі і центрифугували при 1000об/хв. протягом 5 хвилин. Видаляли супернатант, а осад тричі відмивали центрифугуванням при 700об/хв., додаючи розчин, що містив KCl-5ммоль, CaCl-1ммоль, K₂HPO₄-0,4ммоль, NaH₂PO₄-1,6ммоль, сахарозу - 250ммоль, в об'ємі, що перевищував об'єм осаду у 4-5 рази.

Приклад 2.

Осад клітин розводили поживним середовищем RPMI і додавали кріозахисне середовище, до складу якого входив ПВП (Мв 12300-12600) - 100,0, глюкоза - 60,0, лактоза - 35,0, гідроцитрат натрію - 10,0, натрій фосфорнокислий 2-х заміщ. - 7,5, вода бідистильована - до 1000см³.

Приклад 3.

Життєздатність клітин оцінювали методом вітального фарбування трипановим синім. Для цього клітини інкубували протягом 5 хвилин при кімнатній температурі з 0,6% розчином барвника (виготовленим на 0,9%-ом розчині NaCl, рН7,4) у співвідношенні 1:1 та підраховували частку ушкоджених клітин (блакитне забарвлення ядра та цитоплазми). Підрахунок клітин проводили в камері Горяєва, паралельно визначаючи їх концентрацію за стандартною методикою.

Кількість ядерних клітин в суспензії КЕП підраховували у камері Горяєва після лізису еритроцитів 3%-ним розчином оцтової кислоти з 1% розчином генціанвіолету.

Спосіб, що заявляється, є доступним, простим у виконанні, забезпечує вихід 90% життєздатних клітин ембріональної печінки собаки. Препарат одержаний у такий спосіб, при трансплантації собакам не викликає реакції „трансплантат - проти хазяїна”.