



УКРАЇНА

(19) UA (11) 41302 (13) C2

(51) 7 C12N5/08, A61K35/407, A61K35/54

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ГЕМОПОЕЗУ З ЕМБРІОНАЛЬНИХ КРОВОТВОРНИХ ОРГАНІВ ЕМБРІОНІВ ЛЮДИНИ

(21) 94042151

(22) 04.04.1994

(24) 17.09.2001

(46) 17.09.2001, Бюл. № 8, 2001 р.

(72) Смикодуб Олександр Іванович, Новицька Алла Володимирівна, Марков Ігор Семенович

(73) Центр ембріональних тканин "Емселл", UA

(56) WO 89/04168.

Клиническое применение криоконсервированных гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека // Методические рекомендации МЗ Украины, 1991, 9 с.

Touraine J.I. and al. Fetal liver transplantation in immunodeficiencies and inborn errors of metabolism // Fetal liver transplantation, New York, 1985, p. 299-313.

Алексанян М.Ж., Рыжко В.В., Селезнева О.М. Получение стволовых гемопоэтических клеток из периферической крови больных гемобластозами // Гематология и трансфузиология, 1990, № 6, С. 9-12

(57) 1. Способ выделения стволовых гемопоэтических клеток из кроветворных органов эмбрионов человека, включающий в себя криоконсервирование, оттаивание и центрифугирование, **отличающийся** тем, что клеточную суспензию гемопоэтических клеток подвергают криоконсервированию с криопротектором, а оттаивание осуществляют при комнатной температуре.

2. Способ по п. 1, **отличающийся** тем, что полученную после центрифугирования надосадочную жидкость повторно подвергают криоконсервированию с криопротектором.

Изобретение относится к биологии, медицине.

В печени, селезенке эмбриона человека и экспериментальных животных в раннем онтогенезе (у человека в возрасте от 5 до 24 недель) осуществляется кроветворение. Начиная с недели гемопоэтические клетки размножаются в костном мозге. Родоначальником кроветворения являются, так называемые, стволовые клетки, ранние предшественники дифференцированных кровяных клеток. Их процент достаточно высок в эмбриональной кроветворной ткани (от 4 до 1%) и зависит от возраста ткани. В более молодой, содержание стволовых клеток более высокое.

Стволовые клетки эмбрионального печеночного гемопоэза используются для лечения как нарушений крови, так и иммунодефицитных состояний.

Наиболее близким по техническому решению к предложенному является метод клеточного сортирования с использованием центрифугирования (Алексанян М.Ж. и др., 1990). Для получения гемопоэтических стволовых клеток периферической крови используют сепаратор клеток крови непрерывного действия. Однако данному способу присущи следующие недостатки:

1. Должен использоваться объем кроветворной ткани не менее 0,5 л;

2. Требуется наличие технического средства, каким является клеточный сепаратор;

3. К стволовым элементам относят все мононуклеарные элементы, которые выделяются в результате клеточной сепарации, хотя процент их в суспензии значительно меньше (1:14000).

4. Не проводилась оценка содержания ранних предшественников гемопоэза моноклональными антителами (СД₃₄).

В основу изобретения положена задача разработать способ выделения стволовых клеток гемопоэза из эмбриональных кроветворных органов, с помощью которого можно было бы легко и с высоким процентом выхода стволовых клеток получать клеточные суспензии для дальнейшего применения у больных.

Способ осуществляется следующим образом.

Из эмбриональной печени одного эмбриона 5-14 недель гестации выделяют гемопоэтические клетки в стерильных условиях. Подсчитывают общее количество клеток в единице объема. Клеточную суспензию разливают в полиэтиленовые пробирки объемом 0,3-0,5-0,7 мл и криоконсервируют с криопротектором по программе, обеспечивающей высокую функциональную активность клеток. Проводится исследование на бактериальную стерильность, наличие вирусных и паразитарных инфекций (Enzygnost Anti-HJV₁/HJV₂, HBsAg, Anti-HBc, Anti-CMV/IgG+IgM, Anti-Rubella Virus/IgG, Varicella/Zoster, Toxoplasmosis/JgG,

(19) UA (11) 41302 (13) C2

Toxoplasma-sis/IgM), содержание CD₃₄ (Progenitor Cells). Контейнеры извлекают из жидкого азота, и они медленно оттаивают при комнатной температуре. Затем проводится центрифугирование при 1500 об/мин. в течение 5 минут. Недифференцированные лимфоидные клетки находятся в надосадочной жидкости и в зависимости от задачи или трансплантируются или переносятся в стерильных условиях в новые контейнеры и вновь криоконсервируются по программе с криоконсервантом. Проводится повторное исследование на бактериальную стерильность, вновь определяется содержание CD₃₄.

Исследование проведено на клеточных суспензиях, выделенных из печени человеческого эмбриона возрастом 5-6 недель. Именно в эти сроки содержание недифференцированных лимфоидных элементов достигает 15-17% в клеточной массе. В более поздние сроки их содержание заметно падает.

Способ позволяет выделить до 70-80% недифференцированных лимфоидных элементов, процент CD₃₄ в клеточной суспензии достигает 71,2±1,6%.

При объеме материала от 0,3 до 5,0 мл способ позволяет получить клеточную суспензию на 70-80% состоящую из недифференцированных лимфоидных элементов, при содержании CD₃₄ до 71,2±1,6%. Обогащенная таким образом клеточная суспензия может расцениваться как состоящая из стволовых клеток. Процент сохранности CD₃₄ при таком способе выделения в среднем равен 64,8 ± 3,26%.

Источники информации

1. Клиническое применение криоконсервированных гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека. Методические рекомендации МОЗ Украины, 1991 г. 9 стр.

2. Touraine J.I. and al. Fetal liver transplantation in immunodeficiencies and inborn errors of metabolism // Fetal liver transplantation, New York, 1985, p. 299-313.

3. Алексанян М.Ж., Рыжко В.В., Селезнева О.М. Получение стволовых гемопоэтических клеток из периферической крови больных гемобластомами

Гематология и трансфузиология, 1990, № 6, с. 9-12.

Содержание стволовых клеток в клеточных суспензиях эмбриональной печени человека (N=5)

Перед криоконсервированием						
	N	Миним.	Макс.	Средн.	Ошибка средн.	Квадрат. отклон.
Общее содерж. клеток (x10 ⁶)	5	21,20	42,40	30,60	4,11	9,20
Недиф. лимф. кл. - %	5	16,80	28,00	19,52	2,13	4,77
Недиф. лимф. кл. - (x10 ⁶)	5	3,35	11,90	5,60	1,59	3,57
CD ₃₄ - %	5	13,02	25,23	17,19	2,19	4,91
CD ₃₄ - (x10 ⁶)	5	2,76	10,70	5,54	1,43	3,20
После оттаивания и центрифугирования						
Общее содерж. клеток (x10 ⁶)	5	2,54	8,21	4,90	1,06	2,37
Недиф. лимф. кл. - %	5	71,00	82,00	76,80	1,93	4,32
Недиф. лимф. кл. - (x10 ⁶)	5	1,80	6,40	3,78	0,84	1,87
CD ₃₄ - %	5	66,00	74,00	71,20	1,59	3,56
CD ₃₄ - (x10 ⁶)	5	1,76	5,99	4,11	0,70	1,58
Процент сохранности CD ₃₄	5	56,00	72,00	64,80	3,26	7,29

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2002 р. Формат 60x84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22