



УКРАЇНА

(19) UA (11) 60458 (13) U
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ТЕРАПЕВТИЧНОГО ПОТЕНЦІАЛУ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ФЕТАЛЬНИХ НЕРВОВИХ КЛІТИН

1

2

(21) u201012549

(22) 25.10.2010

(24) 25.06.2011

(46) 25.06.2011, Бюл.№ 12, 2011 р.

(72) ГОЛЬЦЕВ АНАТОЛІЙ МИКОЛАЙОВИЧ, БА-
БЕНКО НАТАЛЯ МИКОЛАЇВНА, ПОРОЖАН ЄВ-
ГЕНІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА, ОСТАНКОВ МАКСИМ
ВАДИМОВИЧ, ДУБРАВА ТЕТЯНА ГЕОРГІЇВНА

(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІО-
МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ

(57) Спосіб оцінки терапевтичного потенціалу кріо-
консервованих фетальних нервових клітин, що
включає введення кріоконсервованих фетальних

нервових клітин тваринам з модельованою нейро-
дегенеративною патологією аутоімунної природи і
дослідження на клітинному рівні, який **відрізня-**
ється тим, що після введення клітин у тварин ви-
діляють лімфоцити селезінки, суспензію яких до-
дають до попередньо підготовленої культури
нервових клітин щурів і інкубують протягом 2 годин
в термостаті, після чого знімають лімфоцити, ви-
значають їх концентрацію, порівнюють її з почат-
ковою концентрацією і розраховують відсоток аг-
регованих лімфоцитів, при цьому, чим нижче цей
відсоток, тим вище терапевтичний потенціал кріо-
консервованих фетальних нервових клітин.

Корисна модель належить до галузі кріобіоло-
гії і кріомедицини і може бути використана для
виготовлення клітинних препаратів.

Відомий спосіб оцінки терапевтичного потен-
ціалу кріоконсервованих фетальних нервових клі-
тин (ФНК) щурів [1], згідно з яким визначають роз-
поділ субпопуляційного складу цих клітин методом
проточної цитофлуориметрії з використанням мо-
ноклональних антитіл. По співвідношенню різних
субпопуляцій, наявності стовбурових клітин роб-
лять висновок про можливий терапевтичний поте-
нціал кріоконсервованих ФНК.

Відомий спосіб оцінки терапевтичного потен-
ціалу кріоконсервованих ФНК щурів [2], відповідно
до якого проводять культивування цих клітин на
колагеновому субстраті з використанням середо-
вища DMEM. Культивовані клітини досліджують за
морфологічними ознаками - формування нейронів
з дендритним ростом та наявністю гліальних еле-
ментів, які обумовлюють функцію клітин. За цими
характеристиками роблять висновок про терапев-
тичний потенціал кріоконсервованих ФНК.

Загальним недоліком обох способів є низька
достовірність, тому що терапевтичну дію клітин,
введених в живий організм, неможливо точно пе-
редбачити.

Найбільш близьким до заявленого є спосіб
оцінки терапевтичного потенціалу кріоконсервова-
них ФНК щурів [3], відповідно до якого ці клітини
вводять тваринам з модельованою нейродегене-
ративною патологією аутоімунної природи. Далі
проводять візуальний контроль патології, клінічні
дослідження крові та імунної системи на клітинно-
му рівні. Якщо досліджувані показники наближені
до норми, то роблять висновок про високий тера-
певтичний потенціал кріоконсервованих ФНК.

Недоліком способу є низька достовірність, то-
му що оцінити дію саме введених кріоконсервова-
них ФНК в живому організмі достатньо складно, бо
постійно діють різні механізми взаємозв'язаних
функціональних систем організму.

В основу корисної моделі поставлена задача
створити такий спосіб оцінки терапевтичного поте-
нціалу кріоконсервованих ФНК, який би за рахунок
використання кількісного показника забезпечив
можливість одержання більш достовірної інфор-
мації про терапевтичний потенціал цих клітин.

Для вирішення поставленої задачі в способі
оцінки терапевтичного потенціалу кріоконсервова-
них ФНК, що включає введення кріоконсервованих
ФНК тваринам з модельованою нейродегенерати-
вною патологією аутоімунної природи і досліджен-

UA (11) 60458 (13) U

ня на клітинному рівні, згідно з корисною моделлю, після введення клітин у тварин виділяють лімфоцити селезінки, суспензію яких додають до попередньо підготовленої культури нервових клітин щурів і інкубують протягом 2 годин в термостаті, після чого знімають лімфоцити, визначають їх концентрацію, порівнюють її з початковою концентрацією і розраховують відсоток агрегованих лімфоцитів, при цьому, чим нижче цей відсоток, тим вище терапевтичний потенціал кріоконсервованих ФНК.

Використання кількісного показника відображає дію безпосередньо введених кріоконсервованих ФНК і тому, у порівнянні з прототипом, забезпечує можливість підвищити достовірність отриманої інформації і може ефективно застосовуватися при виготовленні клітинних перпаратів.

Спосіб пояснюється прикладом.

На тваринах моделювали нейродегенеративну патологію аутоімунної природи. Хворим тваринам вводили кріоконсервовані ФНК, після чого виділяли селезінку, гомогенізували її і отримували суспензію лімфоцитів. Цю суспензію доводили до концентрації 5×10^6 клітин/мл і додавали до попередньо підготовленої трьохденної культури нервових клітин щурів, вирощених на колагеновому субстраті з використанням середовища DMEM. Культуру нервових клітин з лімфоцитами інкубували протягом 2 годин в термостаті. Лімфоцити знімали шляхом промивання культури живильним середовищем. Кількість знятих лімфоцитів рахували під мікроскопом. Початкову концентрацію приймали за 100% і розраховували відсоток знятих лімфоцитів. По різниці між двома цими концен-

траціями розраховували відсоток агрегованих лімфоцитів.

Початкова концентрація

лімфоцитів 5×10^6 клітин/мл - 100%

Концентрація знятих лі-

мфоцитів $3,9 \times 10^6$ клітин/мл - X

$X = 3,9 \times 10^6 \times 100 / 5 \times 10^6 =$

$= 78\%$

% агрегованих лімфоцитів $= 100 - 78 = 22\%$

Для контролю були використані здорові тварини, у яких було 10% агрегованих лімфоцитів, і тварини з патологією без введення кріоконсервованих ФНК, у яких визначили 62% агрегованих лімфоцитів. Таким чином, після введення кріоконсервованих ФНК тваринам з патологією цей відсоток значно знизився (в 2,8 рази), наближаючись до показника здорових тварин. Це достовірно свідчить про високий терапевтичний потенціал кріоконсервованих ФНК.

Джерела інформації:

1. Останков М.В., Лебединец Д.В., Порожан Е.А., Гольцев А.Н. Влияние факторов крíoоnсервирования на цитоморфологические и структурные характеристики фетальных нервных клеток // Проблемы криобиологии - 2009. - Т. 19, №4. - С.431-437.

2. Taupin P. Cryopreservation of early postmitotic neuronal cells in culture // Expert Opin Ther Pat - 2009. - Vol.19, №2. - P.265-268.

3. Грищенко В.И., Гольцев А.Н., Бабенко Н.Н. Экспериментальный аллергический энцефаломиелит как возможная модель изучения механизма действия продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса при лечении аутоиммунных заболеваний // Пробл. криобиологии. - 2002. - №2. - С. 34-43.