



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **39506** (13) **U**
(51) **МПК (2009)**
A61B 5/00
G01N 33/50

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ТА ВИЛУЧЕННЯ КЛІТИН ПОПУЛЯЦІЇ, ЩО ТЕСТУЄТЬСЯ, НЕ СУМІСНИХ З КЛІТИНАМИ БІЛОЇ КРОВІ ТА ПЛАЗМИ КРОВІ ОРГАНІЗМУ

1

2

(21) u200812638

(22) 28.10.2008

(24) 25.02.2009

(46) 25.02.2009, Бюл.№ 4, 2009 р.

(72) КОРДЮМ ВІТАЛІЙ АРНОЛЬДОВИЧ, UA, ЛИ-
ХАЧОВА ЛЮДМИЛА ІВАНІВНА, UA, РУБАН ТЕ-
ТЯНА ПАНАСІВНА, UA

(73) КОРДЮМ ВІТАЛІЙ АРНОЛЬДОВИЧ, UA

(57) Спосіб виявлення та вилучення клітин популяції, що тестується, не сумісних з клітинами білої крові та плазми крові організму, при якому виконують забір аліквоти крові з організму, виділяють із

одержаної аліквоти крові фракцію білих клітин та плазму, які додають до популяції клітин, призначених для введення в організм, витримують одержану суміш до встановлення факту взаємодії, кінцевим етапом якої є руйнування під дією білих клітин та плазми крові організму клітин популяції, які є не сумісними з організмом, а клітини, які не були зруйновані, визнають сумісними з цим організмом та придатними і безпечними для введення в організм, при цьому визначення сумісних та не сумісних з організмом клітин популяції та вилучення останніх виконують одночасно.

Пропонована корисна модель відноситься до клітинної терапії та регенеративної медицини, а більш конкретно - до способу виявлення клітин популяції, що тестується, несумісних з клітинами білої крові та плазмою крові організму та вилучення (елімінації) з популяції клітин, що призначена для введення в організм, несумісних з ним клітин.

Відомі способи виявлення цільових клітин із загальної популяції, які базуються на використанні антитіл до специфічних рецепторів (маркерів) цих клітин. Використання специфічних антитіл також дозволяє проводити відбір цих клітин із загальної популяції з допомогою спеціальних приладів - сортирувальників. Також можна проводити ізоляцію (елімінацію) потрібних клітин або збагачення популяції клітин цільовими клітинами за рахунок вилучення непотрібних клітин з допомогою спеціальних магнітних кульок - Dynabeads (Invitrogen), принцип дії яких також базується на використанні антитіл до специфічних клітинних рецепторів. Але такі способи мають ряд недоліків. Зокрема, вони обмежені наявністю антитіл тільки до декотрих рецепторів, а зміни можуть відбуватися в будь-якому з них. Крім того, треба мати спеціальне обладнання та матеріали, більшість з яких дорого коштують. Також можна виявити змінені клітини по зміні стану ядра клітини та внутрішньогеномним процесам. Наприклад, відомий спосіб ідентифікації стоволових клітин, заснований на ядерних морфотипах, відповідно до якого ідентифікація цільової клітини або

цільового багатоклітинного синцитія, стосовно якого цільова клітина або цільовий синцитій одержані чи включені в клітинну культуру або зразок тканини, відповідно до якого цільова клітина або цільовий синцитій ідентифікується шляхом візуалізації ядерної морфології, і цільова клітина або синцитій включає гетероморфні ядерні морфотипи [заявка РФ №2007101496, МПК (2006.01) G01N33/50, дата подання заявки 2005.06.17]. Згаданий спосіб - це спосіб оцінки змін, які відбулися в клітині, а саме, оцінки стану ядра клітини та по внутрішньогеномним процесам - делеціям, перебудовам і т.п. Однак, такий спосіб довгостроковий, трудомісткий та не дозволяє проводити елімінацію змінених клітин.

Також відомий спосіб виявлення клітин популяції, що базується на селективній адгезії стовбурових клітин шкіри людини із гетерогенної популяції базальних кератиноцитів. В якості субстрату використовують специфічні білки зовнішньоклітинного матриксу (колагени та фібронектин) [інформація з сайту Інституту цитології РАН <http://www.strf.ru/science.aspx?CatalogId=222&no=12288>, одержана 29/08/2008].

Описаний спосіб заснований на використанні специфічних клітинних рецепторів та не дозволяє проводити відбір усіх змінених клітин, тобто клітин, в яких відбулися зміни в інших рецепторах або в інших місцях клітини. Крім того, використання цього способу обмежене тільки специфічними клітинами - кератиноцитами. До того ж згаданий спосіб

(19) **UA** (11) **39506** (13) **U**

не передбачає вилучення (елімінації) з досліджуваної популяції клітин, несумісних з організмом.

Під час підготовки заявки і проведення патентно-інформаційних досліджень авторами не було виявлено способів виявлення та вилучення клітин популяції, що тестується, несумісних з клітинами білої крові та плазми крові організму.

У основу пропонованої корисної моделі поставлено задачу створення такого способу виявлення та вилучення клітин популяції, що тестується, несумісних з клітинами білої крові та плазми крові організму, який би дозволив виявляти та вилучати з цієї популяції клітини, в яких відбулися будь-які зміни, що можуть викликати небажані наслідки в організмі. Поставлена задача вирішується за рахунок створення умов, при яких виявлені в популяції, що тестується, змінені клітини розпізнають, а потім і знищують (піддають елімінації) клітинами імунної системи цього ж організму одночасно - протягом одного процесу.

Поставлена задача вирішується пропонованим способом виявлення та вилучення клітин популяції, що тестується, несумісних з клітинами білої крові та плазми крові організму, при якому виконують забір аліквоти крові з організму, виділяють із одержаної аліквоти крові фракцію білих клітин та плазму, які додають до популяції клітин, призначених для введення в організм, витримують одержану суміш до встановлення факту взаємодії, кінцевим етапом якої є руйнування під дією білих клітин та плазми крові організму клітин популяції, які є не сумісними з організмом, а клітини, які не були зруйновані, визнають сумісними з цим організмом та придатними для введення в організм, при цьому, визначення сумісних та несумісних з організмом клітин популяції та вилучення останніх виконують одночасно.

Запропонований спосіб дозволяє досить просто і з високою індивідуальною специфічністю визначити та вилучити змінені клітини з популяції, що тестується. Він заснований на розпізнаванні змінених, небезпечних та несумісних з організмом клітин імунною системою. Оскільки ж імунна система кожного організму індивідуальна, то за рахунок її використання отримується суворо індивідуальна реакція.

Принципово така процедура виконується шляхом додавання до популяції клітин, призначених для конкретного організму, його ж клітин білої крові та плазми. Як відомо, присутні в плазмі крові імуноглобуліни - антитіла розпізнають та зв'язують антигени, в результаті чого вони можуть миттєво нейтралізувати токсини, сприяти поглинанню мікробних та інших чужорідних клітин та агрегатів фагоцитами. Одночасно, зміни в молекулах імуноглобулінів призводять до запуску паралельних механізмів захисту, таких як активація комплементу та ін. Ті клітини, які несумісні з організмом, знищуються клітинами його білої крові в присутності його ж плазми. А ті, що залишаються і не розпізнаються імунною системою як чужі, небезпечні, тобто, на які немає захисної реакції організму, за визначенням, є сумісними.

Суть корисної моделі пояснюється фотографіями (фарбування флуоресцентним барвником ДНК Hoechst):

На фото 1 - показано факт руйнування під дією білих клітин та плазми крові організму клітин популяції, що тестується, на прикладі клітин фібробластів 3-го пасажу (дослідний варіант - з додаванням клітин білої крові; ультрафіолетовий фільтр).

На фото 2 - показано факт руйнування під дією білих клітин та плазми крові організму клітин популяції, що тестується, на прикладі клітин фібробластів 3-го пасажу (дослідний варіант - з додаванням клітин білої крові; прохідне світло).

На фото 3 - показано факт руйнування під дією білих клітин та плазми крові організму клітин популяції, що тестується, на прикладі клітин фібробластів 3-го пасажу (дослідний варіант - з додаванням клітин білої крові; сумісне освітлення - ультрафіолетовий фільтр одночасно з прохідним світлом).

На фото 4 - показано контрольний варіант клітин фібробластів 3-го пасажу - без додавання клітин білої крові - ультрафіолетовий фільтр.

На фото 5 - показано контрольний варіант клітин фібробластів 3-го пасажу - без додавання клітин білої крові - прохідне світло.

На фото 6 - показано контрольний варіант клітин фібробластів 3-го пасажу - без додавання клітин білої крові - сумісне освітлення: ультрафіолетовий фільтр з прохідним світлом одночасно.

На фото 7 - показано факт руйнування під дією білих клітин та плазми крові організму клітин популяції, що тестується, на прикладі клітин фібробластів 4-го пасажу (дослідний варіант - з додаванням клітин білої крові; ультрафіолетовий фільтр). На фото 8 - показано факт руйнування під дією білих клітин та плазми крові організму клітин популяції, що тестується, на прикладі клітин фібробластів 4-го пасажу (дослідний варіант - з додаванням клітин білої крові; прохідне світло).

На фото 9 - показано факт руйнування під дією білих клітин та плазми крові організму клітин популяції, що тестується, на прикладі клітин фібробластів 4-го пасажу (дослідний варіант - з додаванням клітин білої крові; сумісне освітлення - ультрафіолетовий фільтр одночасно з прохідним світлом).

На фото 10 - показано контрольний варіант клітин фібробластів 4-го пасажу - без додавання клітин білої крові - ультрафіолетовий фільтр.

На фото 11 - показано контрольний варіант клітин фібробластів 4-го пасажу - без додавання клітин білої крові - прохідне світло.

На фото 12 - показано контрольний варіант клітин фібробластів 4-го пасажу - без додавання клітин білої крові - сумісне освітлення - ультрафіолетовий фільтр одночасно з прохідним світлом).

На фото 13 - показано факт відсутності руйнування під дією білих клітин та плазми крові організму клітин популяції, що тестується, на прикладі клітин фібробластів 0-го пасажу (дослідний варіант - з додаванням клітин білої крові; ультрафіолетовий фільтр).

На фото 14 - показано факт відсутності руйнування під дією білих клітин та плазми крові організму клітин популяції, що тестується, на прикладі клітин фібробластів 0-го пасажу (дослідний варіант - з додаванням клітин білої крові; ультрафіолетовий фільтр).

ант - з додаванням клітин білої крові; прохідне світло).

На фото 15 - показано факт відсутності руйнування під дією білих клітин та плазми крові організму клітин популяції, що тестується на прикладі клітин фібробластів 0-го пасажу (дослідний варіант - з додаванням клітин білої крові; сумісне освітлення - ультрафіолетовий фільтр одночасно з прохідним світлом).

На фото 16 - показано контрольний варіант клітин фібробластів 0-го пасажу – без додавання клітин білої крові - ультрафіолетовий фільтр.

На фото 17 - показано контрольний варіант клітин фібробластів 0-го пасажу – без додавання клітин білої крові - прохідне світло.

На фото 18 - показано контрольний варіант клітин фібробластів 0-го пасажу – без додавання клітин білої крові - сумісне освітлення - ультрафіолетовий фільтр одночасно з прохідним світлом).

Приклад: Асептично виділенні ембріони мишей на 13,5 днів вагітності (м'які тканини нижніх кінцівок) переносили в флакони та 3 рази промивали поживним середовищем DMEM (Sigma), яке містить 10% пеніциліну та стрептоміцину, та залишали на 20 хвилин при 4 °С. Потім середовище зливали та додавали 0,25% розчин трипсину з Версеном (1:1). Ресуспендували тканини та дозволяли великим часточкам осісти. Концентровану клітинну суспензію розбавляли середовищем DMEM, підраховували клітини в камері Горяєва та висівали 15 тисяч клітин в зручний для подальшого мікроскопіювання посуд - пластикову або скляну невелику чашку Петрі, або в лунку планшета (Nunclo). Клітини вирощували при 37 °С. Клітини, які вирости, були нульовим пасажем. Подальший пересів давав перший пасаж і т.д.

Із крові дорослих мишей тієї ж лінії (1-2 мл) отримували фракцію клітин білої крові шляхом центрифугування в капілярах. Клітини білої крові переносили в поживне середовище RPMI, яке містить 10% плазми крові мишей тієї ж лінії. $1-5 \times 10^5$ клітин білої крові додавали до $1,5 \times 10^4$ клітин фібробластів мишей (від нульового до четвертого пасажів), які прикріплені до поверхні скляної або пластикової чашки Петрі (діаметр 2,5-5 см), або до лунки планшета, і знаходилися в поживному сере-

довищі з 10% плазми мишей. Клітини експонували 1 годину при температурі 37 °С, потім поживним середовищем відмивали надлишок клітин білої крові. Клітини фіксували 5 хвилин в парах формаліну і після фарбування (наприклад, флуоресцентним барвником Hoechst, який фарбує ДНК [Boris Zhivotovsky, Afshin Samali and Sten Orrenius. Current Protocols in Toxicology, 1998, Unit 3.2. Determination of Apoptosis and Necrosis, p.8; Institute of Environmental Medicine, Division of Toxicology, Karolinska Institutet S-171 77 Stockholm, Sweden] або по Романовського-Гімза) мікроскопували препарати для контролю за процесом взаємодії клітин білої крові та фібробластів.

Авторами показано, що при використанні вихідного (нульового) пасажу не спостерігаються зміни в культурі клітин фібробластів при додаванні клітин білої крові (фото 13-18). На фото 13, 14 та 15 видно, що клітини та ядра фібробластів (більші за розміром) не змінені та не ушкоджені клітинами білої крові (на фото 13 ядра меншого розміру та більш яскраві) в порівнянні з контролем (фото 16, 17 та 18). Нанесення клітин периферичної крові на клітини культури фібробластів першого та другого пасажів призводить до появи змін в морфології частини клітин фібробластів. Подальше збільшення числа пасажів клітин фібробластів до четвертого призводило до руйнування цих клітин внесеними клітинами білої крові. На фото 1, 2 та 3 видно, що під дією клітин білої крові відбувається часткове руйнування клітин та ядер фібробластів 3-го пасажу та на фото 7, 8 і 9 повне руйнування клітин фібробластів 4-го пасажу на відміну від контрольних варіантів, де руйнування клітин немає (відповідно фото 4, 5, 6 та 10, 11 і 12). Це говорить про те, що в процесі пасирування культури фібробластів, клітини змінюються до такого ступеня, що власні клітини білої крові, серед яких є клітини, які виконують захисні функції, сприймають їх як чужорідні та знищують.

На цьому явищі і базується спосіб виявлення та елімінації змінених клітин, чужорідних для організму, несумісних з ним та шкідливих для нього, із загальної популяції клітин, які призначені для введення в організм.

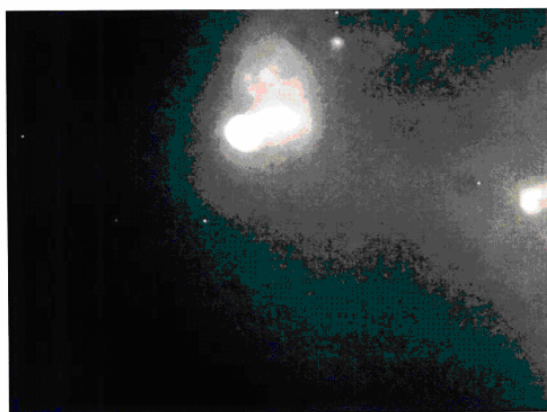


Фото 1

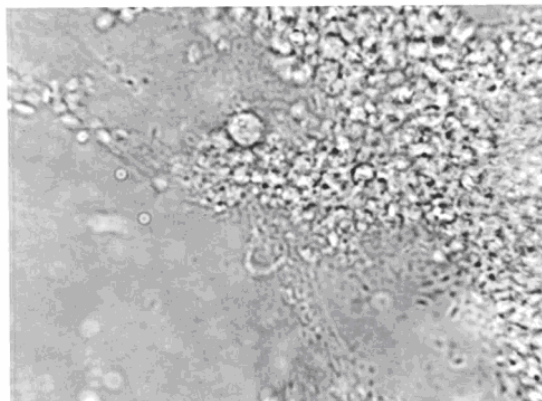


Фото 2

7

39506

8

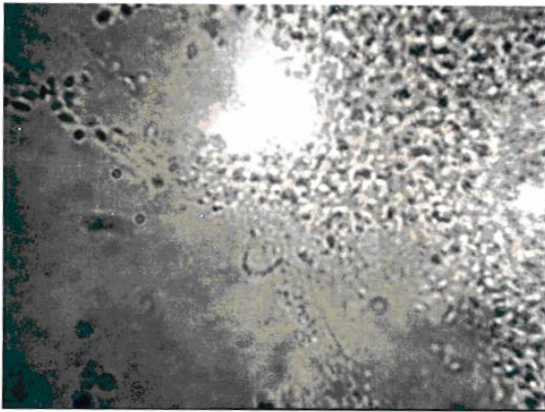


Фото 3

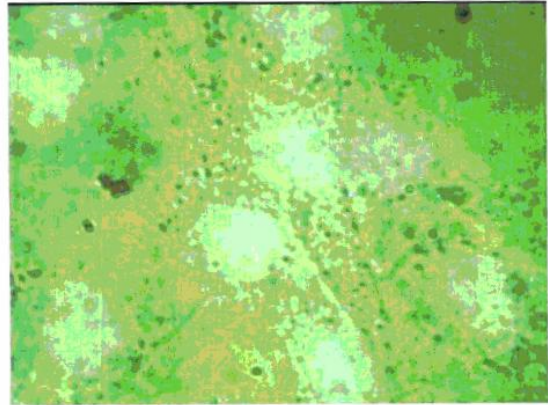


Фото 6

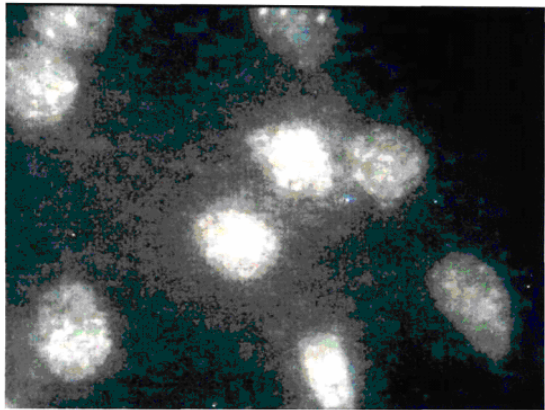


Фото 4

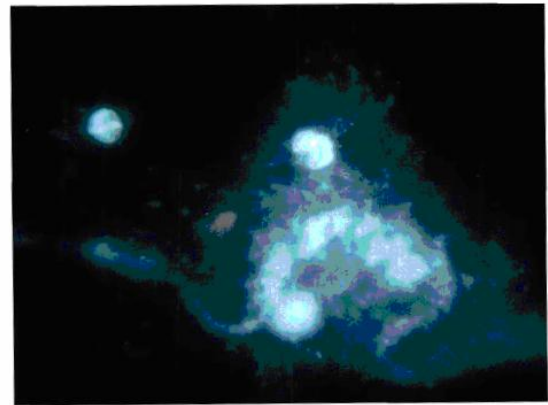


Фото 7

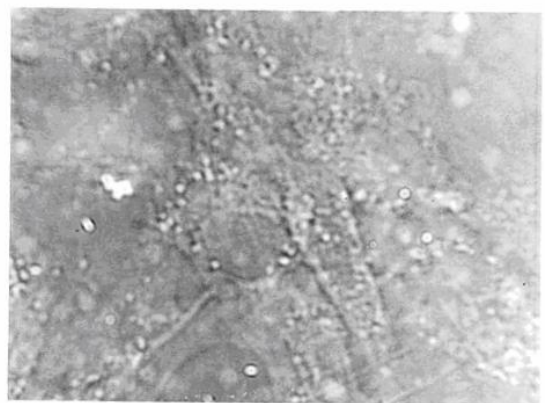


Фото 5

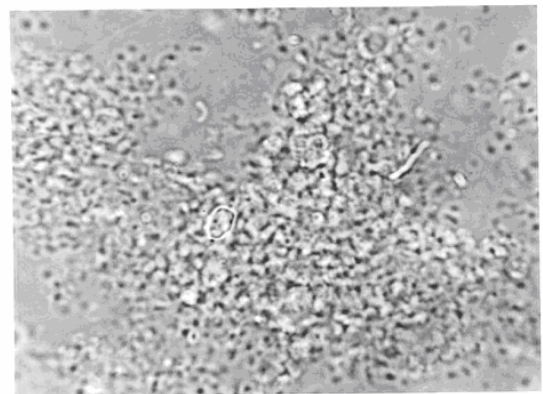
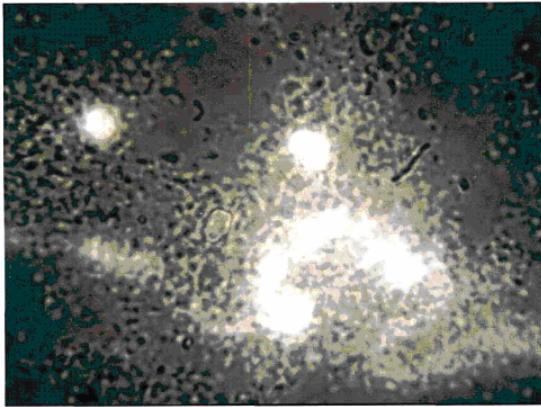


Фото 8

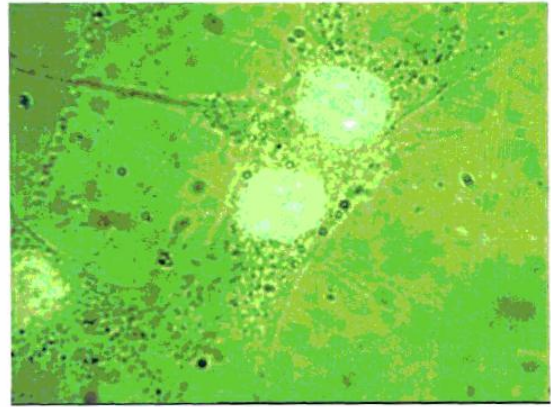
9

39506

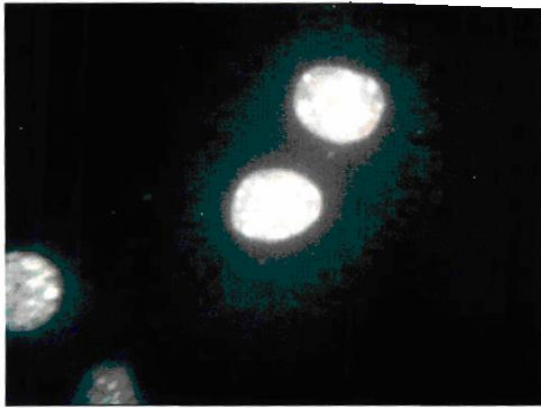
10



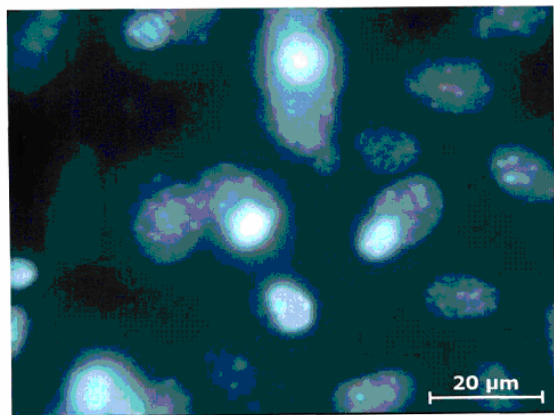
Φoto 9



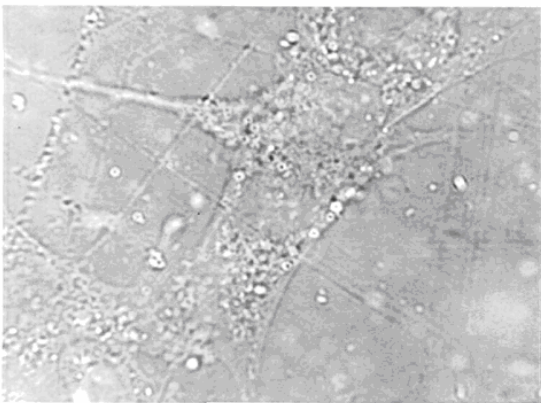
Φoto 12



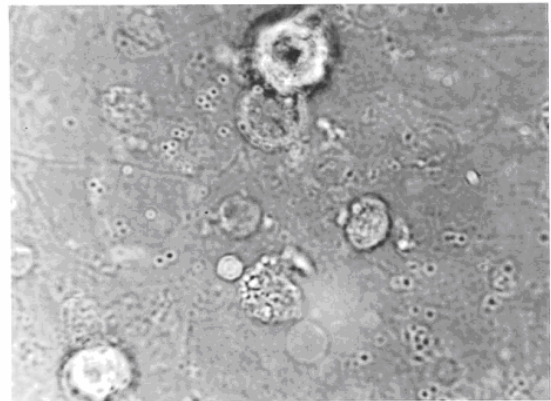
Φoto 10



Φoto 13



Φoto 11



Φoto 14

11

39506

12

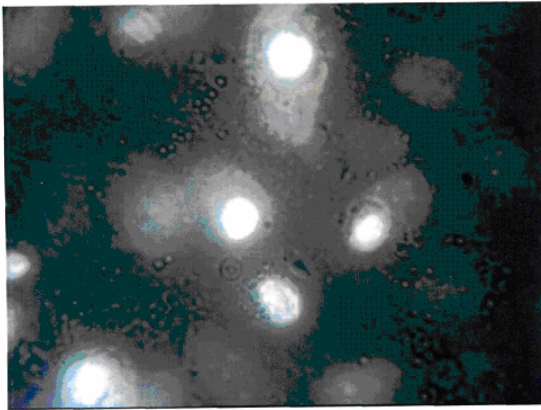


Фото 15

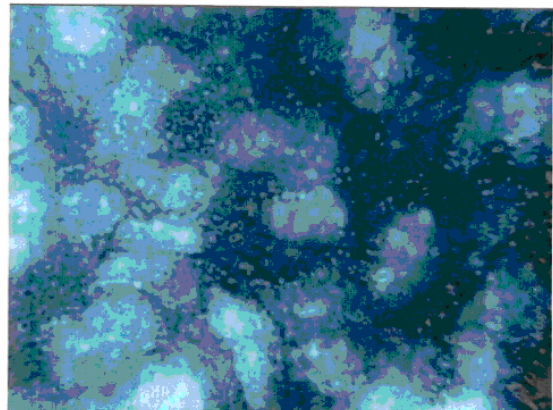


Фото 18

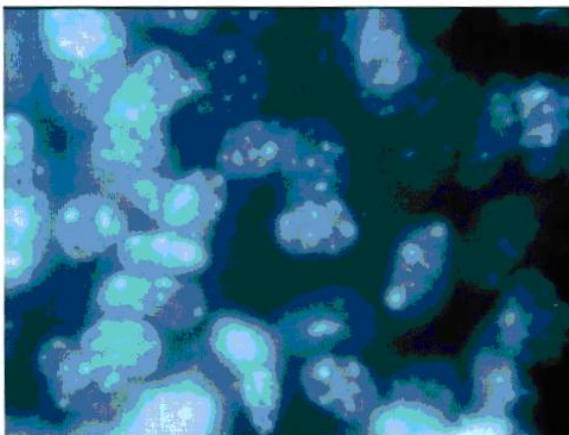


Фото 16

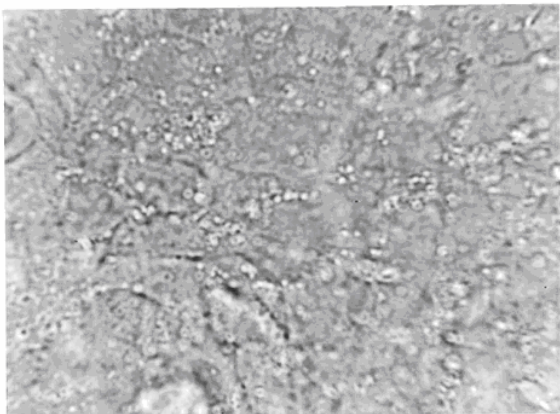


Фото 17