УКРАЇНА

(19) UA (11) 23499 (13) U

(51) МПК (2006)
C12N 5/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ ЯДРОВМІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ

(21) u200700585
(22) 22.01.2007
(24) 25.05.2007
(46) 25.05.2007, Бюл. № 7, 2007 р.
(72) Бабійчук Любов Олександрівна, Рязанцев Володимир Васильович, Зубов Павло Михайлович, Зубова Оксана Леонідівна, Грищенко Валентин Іванович
(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб виділення ядровмісних клітин кордової крові, що включає центрифугування крові з наступним вилученням шару ядровмісних клітин, який **відрізняється** тим, що проводять додаткове центрифугування крові і вилучення шару ядровмісних клітин, після чого ядровмісні клітини, отримані після першого та другого центрифугування, об'єднують.

1

Корисна модель належить до галузі клітинної біології і може бути використана для отримання клітинних препаратів крові.

Кордова кров містить достатньо велику кількість ядровмісних клітин, особливо гемопоетичних стовбурових клітин, та є по відношенню до кісткового мозку альтернативним джерелом цих клітин для трансфузії [1]. Зважаючи на невеликі об'єми кордової крові (в середньому не більш 100 мл), дуже важливим є повне виділення ядровмісних клітин, особливо гемопоетичних, зі збереженням їх життєздатності.

Найбільш близьким до способу, який заявляється, є спосіб виділення ядровмісних клітин у градієнті щільності фіколу [2]. Згідно з цим способом кордову кров напластовують у центрифужну пробірку на розчин фікол-верографіну (щільність розчину 1,077г/см^3), далі пробірки центрифугують у горизонтальному положенні при 400g протягом 30хв. По закінченню центрифугування утворене на межі суміші фікол-кров кільце ядровмісних клітин відбирають піпеткою.

Основним недоліком цього способу є низький загальний вихід ядровмісних клітин та низька кількість життєздатних клітин. Так, загальна кількість ядровмісних клітин, виділених з дози кордової крові, на 50% нижча контролю, при цьому відмічається значна втрата гемопоетичних стовбурових клітин-попередників (від 30 до 50%). Кількість життєздатних клітин (7AAD) знижується на 6-8%.

Крім цього спосіб потребує використання дорогих імпортних градієнтутворюючих реактивів.

2

В основу корисної моделі поставлена задача розробити такий спосіб виділення ядровмісних клітин кордової крові, у якому б за рахунок виключення використання градієнтутворюючих полімерних речовин, забезпечувалася можливість підвищення загального виходу ядровмісних клітин та кількості життєздатних клітин.

Ця задача вирішується тим, що в способі виділення ядровмісних клітин кордової крові, який включає центрифугування крові з наступним вилученням шару ядровмісних клітин, згідно з корисною моделлю, проводять додаткове центрифугування крові і вилучення шару ядровмісних клітин, після чого ядровмісні клітини, отримані після першого та другого центрифугування об'єднують.

Проведення двохетапного центрифугування дає можливість відмовитися від використання градієнтутворюючих полімерних речовин та за рахунок цього підвищити концентрацію ядровмісних клітин на 1 мл крові у 3,25 рази у порівнянні з контролем та у 7 разів у порівнянні з прототипом, і підвищити кількість життєздатних клітин до 98,8% (у контролі 99,3%), у той час як у прототипі відбувається зниження життєздатних клітин до 92,4%.

Приклад. Брали 100мл кордової крові на розчині „Глюгіцир" у пропорції 1:5 за об'ємом та центрифугували при 1000g протягом 20-30хв. По закінченню центрифугування на поверхні утворювався шар ядровмісних клітин, 12,5мл якого видаляли від кордової крові шляхом збирання його піпеткою з поверхні в окрему ємність. З кров'ю, що залишилася повторювали центрифугування при

(19) UA (11) 23499 (13) U

тих же умовах. По закінченню центрифугування ще раз видаляли шар ядровмісних клітин у кількості 12,5мл та об'єднували з отриманими після першого центрифугування, всього об'єм складав 25мл концентрату ядровмісних клітин.

Для порівняння спосіб отримання ядровмісних клітин крови проводили за прототипом, тобто шляхом одноетапного центрифугування з використанням градієнтутворюючої полімерної речовини - фікол-верографіну. Порівняльні дані наведені у таблиці.

Вивчення кількості та життєздатності ядровмісних клітин ($CD45^+$) кордової крові, у тому числі і гемопоетичних стовбурових ($CD34^+$), у процесі виділення ядровмісних клітин було проведено методом проточної цитофлуориметрії на проточному цитометрі FACS Calibur фірми Becton Dickinson (США) з використанням моноклональних реагентів Becton Dickinson за міжнародним ISHAGE протоколом.

З даних, що наведені у таблиці, видно, що після виділення клітин способом, що заявляється, зміна популяційного складу ядровмісних клітин у порівнянні з цільною кордовою кров'ю не виявляється. Кількість ядровмісних $CO45^+$-клітин і гемопоетичних стовбурових $CO34^+$-клітин складає 80-82%, у той час як після виділення фіколом спостерігається зниження абсолютної кількості $CO45^+$-клітин і гемопоетичних стовбурових $CO34^+$-клітин на 50%. Кількість життєздатних ядровмісних $CO45^+$-клітин і гемопоетичних стовбурових $CO34^+$-клітин зростає у порівнянні з прототипом на 6,4% та 8,1% відповідно (таблиця).

Таблиця

Кількість та життєздатність різних типів ядровмісних клітин
у залежності від способу їх виділення з кордової крові людини

№	Спосіб отримання ядровмісних клітин	Концентрація ядровмісних клітин 10^6 кл/мл.	Кількість ядровмісних клітин різного фенотипу, виділених з 100мл кордової крові		Кількість життєздатних ядровмісних клітин (7AAD--)	
			Лейкоцити (CD45+), 10^6кл	Стовбурові клітини (CD34+), 10^4кл	Лейкоцити (CD45+), %	Стовбурові клітини (CD34+), %
1	Контроль, (кордова кров)	11,56±1,85 100%	1156±185 100%	180±35 100%	99,26±0,2	97,7±1,6
2	Спосіб за прототипом (фіколверографін)	6,25±1,60 55%	58U148 50%	91±14 50%	92,4±2,4	89,4±4,2
3	Спосіб, що заявляється (двохетапне центрифугування)	37,76±4,10 325%	944±103 82%	144±19 80%	98,8±0,3	97,3±0,7

Джерела інформації:

1. Абдулкадыров К.М., Романенко Н.А., Старков Н.Н. Получение и клиническое применение периферических гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови. // Вопросы онкологии. - 2000. - Т.46, №5 - С.17-26.

2. Cornetta K., Laughlin M., Carter S., Wall D., Weinthal J., Delaney C, Wagner J., Sweetman R., McCarthy P., Chao N. Umbilical cord blood transplantation in adults: results of the prospective Cord Blood Transplantation (COBLT)..// Biol Blood Marrow Transplant. - 2005. - v.11, N2. - P.149-60.

Комп'ютерна верстка В. Мацело Підписне Тираж 26 прим.

Міністерство освіти і науки України

Державний департамент інтелектуальної власності, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601