



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **59270** (13) **U**
(51) МПК
C12N 5/0775 (2010.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) ІНДУКТОР ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ IN VITRO МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОVBУРОВИХ КЛІТИН В ІНСУЛІН-ПРОДУКУЮЧІ КЛІТИНИ**

1

2

(21) u201012329

(22) 19.10.2010

(24) 10.05.2011

(46) 10.05.2011, Бюл.№ 9, 2011 р.

(72) ПЕТРЕНКО ЮРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ, МАЗУР СВІТЛАНА ПЕТРІВНА, ГРИЩУК ВІКТОР ПЕТРОВИЧ, ЛЕБЕДИНСЬКИЙ ОЛЕКСАНДР СЕРГІЙОВИЧ, БЛОХ КОНСТАНТІН, ІЛ, ВАРДІ ПІІНА, ІЛ, СКОРОБОГАТОВА НАТАЛІЯ ГРИГОРІВНА, ВОЛКОВА НАТАЛІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА, ПЕТРЕНКО ОЛЕКСАНДР ЮРІЙОВИЧ

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

(57) Індуктор диференціювання in vitro мезенхімальних стовбурових клітин в інсулінпродукуючі клітини, що являє собою екстракт, одержаний з тканини підшлункової залози тварин, який **відрізняється** тим, що екстракт одержаний з підшлункової залози новонароджених поросят.

Корисна модель належить до галузі клітинної біології та біотехнології і може бути використана при створенні експериментальних та клінічних схем корекції цукрового діабету.

Відомий індуктор диференціювання in vitro мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) в інсулінпродукуючі клітини, який є складною композицією хімічних речовин і містить нікотинамід, активін-2, ексендин-4, фактор росту гепатоцитів, пентагастрин [1]. При культивуванні МСК жирової тканини людини у присутності даного індуктора має місце збільшення експресії панкреатичних транскрипційних факторів Isl-1, Irf-1 та Ngn3, а також індукція синтезу таких гормонів підшлункової залози як інсулін, глюкагон та соматостатин.

Недоліком наведеного індуктора є його дорожнеча, пов'язана з високою вартістю високоочищених ксенобіотичних речовин, що входять до його складу.

Найбільш близьким до індуктора, що заявляється, є індуктор, що являє собою екстракт тканини підшлункової залози молодих щурів, яка регенерує після часткової панкреатектомії. Він індуктує вступ МСК кісткового мозку щурів [2] та МСК жирової тканини людини [3] до диференціювання в інсулінпродукуючі клітини. При культивуванні МСК в присутності цього індуктора в клітинах збільшується рівень експресії панкреатичних транскрипційних факторів та м-РНК інсуліну.

Недоліком даного індуктора є те, що для його отримання використовується тканина підшлункової залози щурів - тварин, чий біохімічний, метаболічний та імунні характеристики суттєво відрізняються від відповідних показників людини. Тому цей індуктор не має перспектив клінічного застосування. До того ж він не виявляє достатньої ефективності щодо стимуляції диференціювання МСК людини в інсулінпродукуючі клітини - рівень утвореного С-пептиду, який є показником синтезу інсуліну de novo, в культурі МСК жирової тканини людини у присутності даного індуктора був низьким і не визначався методом ELISA, вірогідною причиною чого є недостатня кількість клітин, в яких результативно було індуковане диференціювання [3].

В основу корисної моделі поставлено задачу створити такий індуктор диференціювання in vitro МСК в інсулінпродукуючі клітини, який би за своїм біохімічним складом та біологічним потенціалом був наближений до людських тканин та виявляв більш високий стимулюючий ефект.

Ця задача вирішується тим, що індуктор диференціювання in vitro МСК в інсулінпродукуючі клітини одержують з тканини підшлункової залози новонароджених поросят.

Ці тварини за біохімічним складом та функціонуванням більшості тканин, органів і систем дуже близькі до людини, тому отримані з них біоматеріали та препарати широко застосовуються в медицині. Додатково перевагою заявленого індуктора є те, що в тканинах новонароджених поросят, окрім видо- та тканиноспецифічних біологічно активних сполучень, містяться також стадіоспецифі-

(13) **U**
(11) **59270**
(19) **UA**

чні речовини, які регулюють ріст та диференціювання стовбурових та прогеніторних клітин. Тому такий індуктор здатний забезпечити високий рівень стимуляції диференціювання *in vitro* МСК в інсулінпродукуючі клітини.

Отримання індуктора диференціювання МСК в інсулінпродукуючі клітини з тканини підшлункової залози новонароджених поросят здійснюють таким чином. Тканину підшлункової залози гомогенізують в фізіологічному розчині, отриманий гомогенат центрифугують при 3000 об/хв протягом 10 хвилин при 0°C. Супернатант відділяють та центрифугують при 12000 об/хв протягом 20 хвилин при 0°C, після чого отриманий екстракт фільтрують через мембрановий фільтр із розміром пор 0,22 мкм, розливають порціями по 0,5 мл та зберігають при -80°C до використання.

Для порівняння ефективності індукторів диференціювання *in vitro* МСК людини в інсулінпродукуючі клітини, а саме: екстракту, отриманого з підшлункової залози молодих щурів, яка регенерує, та екстракту з підшлункової залози новонароджених поросят, - проводили паралельне вивчення їхньої дії на МСК людини в культурі. Для цього використовували моношарові культури МСК жирової тканини людини, культивування яких вели до досягнення субконфлуентного моношару в середовищі α -MEM (Minimum Essential Medium Eagle, alpha modification), доповненому 10% сироватки ембріонів корів, 2 мМ L-глутаміна, 50 од/мл пеніциліна та 50 мкг/мл стрептоміцина, при 37°C в атмосфері 5% CO₂ та абсолютній вологості із заміною середовища кожні 3 доби.

Індукцію диференціювання МСК в інсулінпродукуючі клітини здійснювали на субконфлуентних моношарових культурах МСК жирової тканини людини. Для цього проводили культивування в стандартному середовищі DMEM/F12 з додаванням 10% сироватки ембріонів корів, 25 мМ глюкози і 10 мМ нікотинамід у присутності екстракту тканини підшлункової залози молодих щурів та екстракту підшлункової залози новонароджених поросят в кількості 0,2 мг білка/мл протягом 21 доби з заміною середовища кожні 3 доби. Після цього обидві серії клітинних культур піддавали морфофункціональному оцінюванню за допомогою цитологічних, біохімічних та імуноцитохімічних методів.

Було з'ясовано, що в обох отриманих серіях культур індуковані клітини гетерогенні, частина з них набула епітеліоподібного вигляду, частина клітин кооперувалася між собою, утворюючи невеликі клітинні групи і кластери. Процес кластеризації проходив більш виразно, із залученням більшої кількості клітин культури, в серіях, де культивуван-

ня велося у присутності індуктора - екстракту підшлункової залози новонароджених поросят.

При цитохімічному забарвленні кластерів та одиничних клітин дітізоном, який є специфічним барвником для інсулінпродукуючих клітин, дітізон-позитивні клітини виявлялися в культурах обох досліджуваних серій, але більше їх спостерігалось в культурах, індукованих за допомогою екстракту підшлункової залози новонароджених поросят.

На представлених мікрофотографіях імуноцитохімічної реакції на вміст інсуліну та проінсуліну в культурах МСК, індукованих за допомогою екстракту регенеруючої підшлункової залози молодих щурів (Fig.1) та екстракту підшлункової залози новонароджених поросят (Fig.2) видно, що обидва використаних екстракти індукували вступ МСК до диференціювання у гормонпродукуючі клітини - наявність зеленого кольору специфічного забарвлення клітин за допомогою моноклональних антитіл на інсулін та проінсулін. Але розподіл індукованих клітин з позитивним зеленим забарвленням серед усіх клітин моношару, що ідентифікувалися по синьому забарвленню ядер клітин ядерним барвником DAPI, розрізнявся. При використанні екстрактів підшлункової залози щурів позитивне забарвлення на гормони виявлялося тільки в зонах високої щільності клітин, а при використанні екстрактів підшлункової залози новонароджених поросят позитивне забарвлення спостерігалось незалежно від клітинної щільності практично по всьому полю препарату. Виконані морфометричні дослідження показали, що відносна кількість гормонпродукуючих клітин на 36% вища в культурі МСК при використанні як індуктора екстракта підшлункової залози новонароджених поросят (Fig.2). Таким чином, імуноцитохімічний аналіз на вміст інсуліну та проінсуліна в досліджуваних культурах клітин підтвердив перевагу індуктора, що заявляється.

Джерела інформації:

1. Timper K., Seboek D., Eberhardt M. et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2006; 341. - P. 1135-1140.
2. Choi K.S., Shin J-S., Lee J. et al. In vitro transdifferentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2005. - 330. P. 1299-1305.
3. Lee J., Han D.J., Kim S.C. In vitro differentiation of human adipose tissue-derived stem cells into cells with pancreatic phenotype by regenerating pancreas extract // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2008. - 375. - P. 547-551.

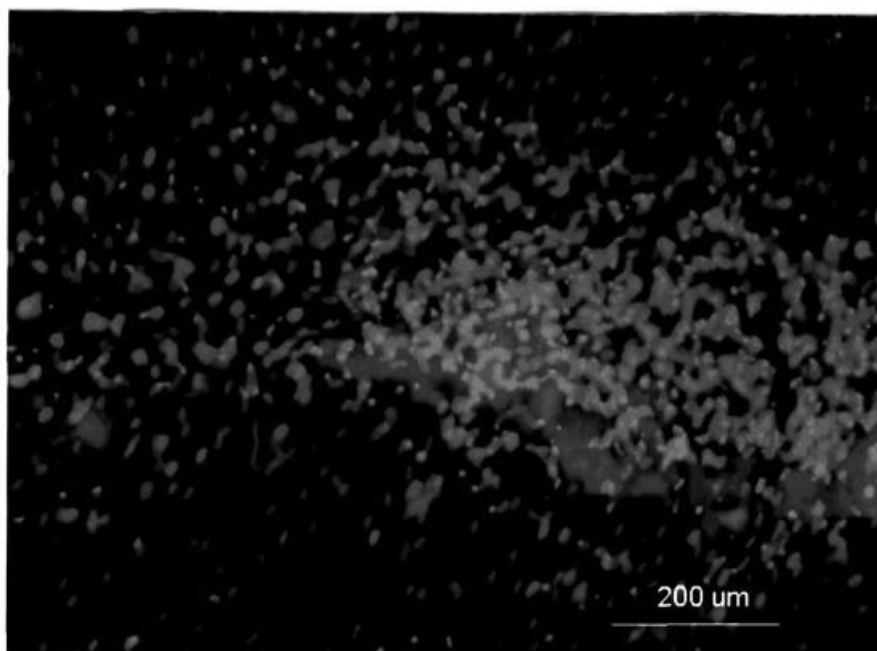


Fig. 1

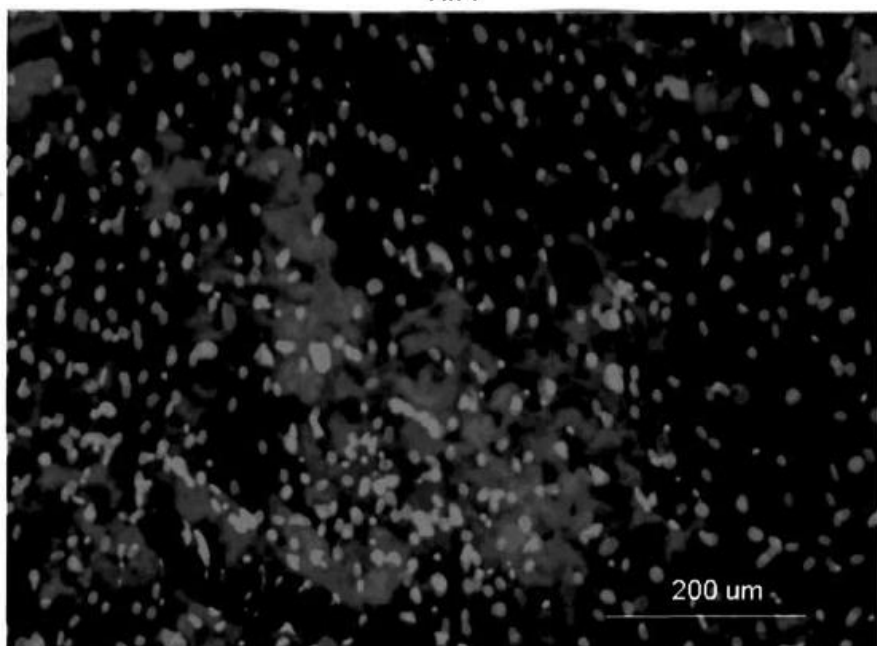


Fig. 2