



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 81564

(13) C2

(51) МПК (2006)

C12N 15/08

A61K 35/28

C12N 13/00

A61K 35/12

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

(54) СПОСІБ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ СТРОМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ У КУЛЬТУРАЛЬНОМУ СЕРЕДОВИЩІ IN VITRO

1

2

(21) a200607514

(22) 05.07.2006

(24) 10.01.2008

(72) АСТАХОВА ВІРА СЕМЕНІВНА, UA

(73) АСТАХОВА ВІРА СЕМЕНІВНА, UA

(56) RU2160112 C1 A61K35/48, 10.12.2000.
RU95115822A1 C12N5/00. 26.05.1995.

Фриденштейн А.Я., Лалыкина К.С. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники. - М.: Медицина, 1973. - 223 с.
Кухарчук А.Л., Радченко В.В., В.М. Сирман В.М. Регенеративная медицина: направления, достижения, проблемы и перспективы развития. Часть 2. Стволовые пространства. Фриденштейн А.Я., Чайлахян Р.К. Стволовые стромальные клетки костного мозга. Сборник научных трудов. - К: Наук. думка, 1985

(57) 1. Спосіб диференціації стромальних стовбурових клітин людини у культуральному середовищі, який передбачає приготування суспензії клітин кісткового мозку з видалених кісток людини, визначення концентрації ядровмісних клітин за загальноприйнятою методикою, додавання одержаної суспензії у культуральне середовище для культивування стовбурових клітин, який **відрізняється** тим, що для диференціації стовбурових стромальних клітин людини in vitro перед приготуванням суспензії клітин кісткового мозку клітини кроля летально опромінують і одноразово додають у поживне середовище за відсутності факторів росту і подальшої зміни культурального середовища у кількості не нижче 5×10^5 ядровмісних клітин на 1 cm^2 площі дна "культуральної" посудини, при цьому ядровмісні клітини вимивають механічно і без застосування ферментів, матеріал фіксують на визначений термін в залежності від ступеня зрілості культури і визначають динаміку диференціації стовбурових стромальних клітин людини.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що суспензію культивують у середовищі з визначеним типом клітин, вибраному з групи, що складається із середовища 199 та сироватки крові.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що видалені кістки, які містять кістковий мозок, герметизують у чашці Петрі.

4. Спосіб диференціації стромальних стовбурових клітин людини у культуральному середовищі, який передбачає приготування суспензії клітин кісткового мозку з видалених кісток людини, визначення концентрації ядровмісних клітин за загальноприйнятою методикою, додавання одержаної суспензії у культуральне середовище для культивування стовбурових клітин, який **відрізняється** тим, що для диференціації стовбурових стромальних клітин людини in vitro перед приготуванням суспензії клітин кісткового мозку клітини кроля летально опромінують і одноразово додають у поживне середовище за відсутності факторів росту і подальшої зміни культурального середовища у кількості не нижче 5×10^5 ядровмісних клітин на 1 cm^2 площі дна "культуральної" посудини, при цьому ядровмісні клітини вимивають механічно і без застосування ферментів, матеріал фіксують на визначений термін в залежності від ступеня зрілості культури і визначають динаміку диференціації стовбурових стромальних клітин людини, причому для культуральної системи використовують заморожений при температурі не вище -20°C кістковий мозок кроля, який активують шляхом розморожування при кімнатній температурі за відсутності активуючого агента.

5. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що суспензію культивують у середовищі з визначеним типом клітин, вибраному з групи, що складається із середовища 199 та сироватки крові.

6. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що видалені кістки, які містять кістковий мозок, герметизують у чашці Петрі.

(13) C2

(11) 81564

(19) UA

Винахід належить до біотехнології та медицини, зокрема до ортопедії та травматології і може використовуватися з метою диференціювання стовбурових стромальних клітин, зокрема людини.

Для визначення строків лікування та повноцінності і прогнозу зрощення тканин важливо враховувати строки утворення перших колоній та ефективність колонієутворення в короткостроковій і тривалій культурі *in vitro*.

В 70-80-х роках минулого століття О.Я. Фріденштейном і його учнями [1-3] були розроблені методи культивування стовбурових стромальних клітин тварини і людини *in vitro*. Їх дані були підтверджені багатьма вченими світу. У [4-9] розкриті методики, за якими вивчалися досліджувані із зазначеною метою культури. У роботах вказаних вчених було показано, що в умовах *in vitro* стовбурові стромальні клітини кісткового мозку протягом 2-3-х тижнів проходять повний цикл диференціювання, починаючи від стовбурової клітини і закінчуючи формуванням примітивних тканинних структур. Так відомо, що стовбурові стромальні клітини кісткового мозку миші за 2 тижні розмноження і росту в культурі формували примітивну кісткову тканину з відкладення солей кальцію [7].

Що стосується стовбурових стромальних клітин кісткового мозку людини, то з відомих джерел інформації невідомо забезпечення умов, які б дозволяли спостерігати весь процес їх диференціювання *in vitro*. Необхідність використання коштовних реактивів та устаткування разом з неминучістю проведення декількох етапів проміжних операцій, у тому числі внаслідок швидкої біодеградації носія ССК в процесі культивування, роблять відомі методики непридатними для визначення процесу диференціювання у культурі *in vitro*. Також слід зауважити, що культури вивчалися без урахування їх функціональної активності і далеко не співпадали із строками їх диференціювання *in vivo*. Тому відомі методики не можуть свідчити про достатність диференціювання у організмі людини стовбурових стромальних клітин людини.

Найближчим аналогом запропонованого винаходу є спосіб (8), у якому розкрито методику диференціювання клітин у культуральному середовищі *in vitro*, за якою готують у чашці Петрі суспензію клітин кісткового мозку з видалених кісток людини, визначають концентрацію ядровмісних клітин, і потім додають одержану суспензію у культуральне середовище для культивування стовбурових клітин. Недоліком відомого способу є те, що, незважаючи на застосування таких прийомів, як зміна культурального середовища кожні 3 і навіть 1 добу, додавання різних ростових факторів, гормонів, ферментів та ін., авторам не вдавалося забезпечити умови, які б дозволяли спостерігати весь процес диференціювання їх *in vitro*

стовбурових стромальних клітин кісткового мозку людини.

Задача винаходу полягає у створенні засобу, який дозволяє просліджувати весь процес диференціювання ССК кісткового мозку людини *in vitro*, починаючи від ранніх попередників і закінчуючи формуванням кісткової тканини з відкладенням солей кальцію, шляхом вибору джерела стовбурових клітин. Очікуваний технічний результат полягає в одержанні колоній стовбурових клітин у короткостроковий термін з визначенням динаміки диференціювання, а також забезпеченні стандартизування умов культивування і диференціювання стовбурових клітин під час колонієутворення фібробластів ядровмісними клітинами кісткового мозку.

Поставлена задача вирішується у способі визначення диференційованих клітин у культуральному середовищі, який включає приготування суспензії клітин кісткового мозку з видалених кісток кроля, визначення концентрації ядровмісних клітин за загальною прийнятою методикою, додавання одержаної суспензії у культуральне середовище для культивування стовбурових клітин, в якому, згідно з винаходом, для диференціювання стромальних клітин людини перед приготуванням суспензії клітин кісткового мозку кроля їх летально опромінують і одноразово додають у культуральне середовище у відсутності факторів росту і подальшої зміни культурального середовища у кількості не нижче 5×10^5 ядровмісних клітин на 1 cm^2 площі дна «культуральної» посудини, при цьому ядровмісні клітини вимивають механічно і без застосування ферментів, і фіксують матеріал на визначений термін в залежності від ступеня зрілості культури для визначення динаміки диференціювання стовбурових клітин. При цьому ефективним є герметизування видалених кісток, що містять кістковий мозок, у чашці Петрі, та утворення культуральної системи з визначеним типом кліток у середовищі, обраному з групи, що складається із середовища 199 та сироватки крові. Підвищенню ефективності способу сприяє використання замороженого при температурі не вище -20°C кісткового мозку кроля, який активують шляхом розморожування при кімнатній температурі у відсутності активуючого агента.

Запропонований спосіб дозволяє звести до мінімуму вплив на ріст клітин допоміжних факторів (колювання температури, газового складу, дії механічних факторів та ін.) та значно економити затрати (час персоналу, культуральне середовище, коштовні додаткові інгредієнти, як то стимулятори росту, гормони, тощо).

Об'єктом винаходу є також культура клітин для диференціювання стовбурових клітин у культуральному середовищі, одержана на основі суспензії клітин кісткового мозку з видалених кісток людини з визначеною концентрацією ядровмісних клітин, яка, згідно з винаходом, має клітини-попередники остеогенеза, клітини стромального та

гемопоезного ряду вказаного кісткового мозку, культивовані у культуральному середовищі для диференціювання стовбурових клітин людини *in vitro*, при цьому культуральне середовище містить одноразово доданий летально опромінений фідер у відсутності факторів росту і подальшої зміни культурального середовища у кількості не нижче 5×10^5 ядромісних клітин на 1 см^2 площі дна «культуральної» посудини, при цьому ядромісні клітини є вимитими механічно і без застосування ферментів. Вказана суспензія з визначеним типом клітин одержана у середовищі, обраному з групи, що складається із середовища 199 та сироватки крові, а для культуральної системи використовують заморожений при температурі не вище -20°C кістковий мозок кроля, який активують шляхом розморожування при кімнатній температурі у відсутності активуючого агента.

Приклад I застосування запропонованого способу

Отримано шматок спонгіози крила клубової кістки від хворої М. (діагноз: адамантінома нижньої щелепи) об'ємом 0,6мл. З якого було вимито $1,9 \cdot 10^6$ ядромісних клітин. Отриману суспензію саджали на 3 чашки Петрі по $9 \cdot 10^5$ ядромісних клітин. При цьому в поживне середовище додали фідер в кількості по $2,3 \cdot 10^7$ на кожен чашку. Матеріал було зафіксовано на 14 добу. Кількість отриманих колоній склала: 93, 124 та 125. Відповідно ефективність колонієутворення фібробластів (ЕКУФ) - 10,3; 13,77; $13,8 \cdot 10^5$ ядромісних клітин кісткового мозку.

Приклад II застосування запропонованого способу

Отримано шматок спонгіози крила клубової кістки від хворої Б. (діагноз: недорозвинення середньої зони обличчя) об'ємом 0,1мл. З якого було вимито $4,3 \cdot 10^6$ ядромісних клітин. Отриману суспензію саджали на чашку Петрі в кількості: $9,5 \cdot 10^5$ ядромісних клітин. При цьому в поживне середовище ми додали фідер в кількості по $2,4 \cdot 10^7$ на чашку. Матеріал було зафіксовано на 14 добу. Отримано 170 колоній. Відповідно ЕКУФ - $17,89 \cdot 10^5$ ядромісних клітин кісткового мозку. Завдяки запропонованому засобу протягом 6 міс. можна користуватись клітинами кісткового мозку кроля, який було отримано за одних і тих же умов (t° оточуючого повітря, γ -опромінення, сезон року та ін.), зменшити навантаження на апарат γ -опромінення та персонал, що його обслуговує, економити час на приготування суспензії клітин і при цьому повністю використати кістковий мозок кроля.

Запропонований винахід дозволяє одержувати колонії клітин з відкладенням солей кальці. Крім остеогенного напрямку за запропонованим способом диференціювання можливо культивування клітин кісткової, хрящової, жирової і інших видів сполучної тканини. При цьому виключена необхідність багатьох маніпулювань, характерних для використання довготривалої культури.

Джерела відомості:

1. Фриденштейн А.Я., Лалыкина К.С. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники. - М.: Медицина, 1973. - 223 с.

2. Фриденштейн А.Я., Чайлахян Р.К., Герасимов Ю.В. Пролиферативные и дифференцировочные потенции скелетогенных костномозговых колониобразующих клеток // Цитология. - Т. XXVIII. №3, 1986. - С. 341-349.

3. Фриденштейн А.Я., Чайлахян Р.К., Герасимов Ю.В. Стволовые стромальные клетки костного мозга // Стволовые клетки и опухолевый рост. Сб. науч. тр. - Киев, 1985. - С. 80-87.

4. Панасюк А.Ф., Лурия Е.А., Фриденштейн А.Я., Кулагина Н.Н., Герасимов Ю.В., Смирнов А.Н. Культуры фибробластоподобных клеток костного мозга человека // Проб. гемат. и перелив, крови, №8, 1972. - С. 34-39.

5. Лациник Н.В. Стромальные клоногенные клетки в костном мозге мышей. Кроветворные клетки-предшественники в механизмах повреждения и компенсации системы крови при действии на организм экстремальных факторов // Тезисы докл. к симпозиуму. Челябинск, 1986. - С. 10-11.

6. Лациник Н.В., Грошева А.Г., Наровлянский А.Н., Павленко Р.Г., Фриденштейн А.Я. Клональная природа колоний фибробластов, образуемых стромальными костномозговыми клетками в культурах // Бюллетень эксперим. биологии и медицины, №3, 1987. - С. 356-358.

7. H. Sudo, H.-A. Kodama Y., Amagai et al. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. // J. Cell Biology, Vol. 96, №1, 1983. - P. 191-198.

8. Gordon M.Y. Gordon-Smith E.C. Bone marrow fibroblast function in relation to granulopoiesis in aplastic anaemia // Brit. J. Haematol, Vol. 53, №3, 1983. - P. 483-489.

9. D. Zipori, N. Reichman, L. Arcavi et al. In vitro function of stromal cells from human and mouse bone marrow // Exp. Haematol, Vol. 13, №7, 1985. - P. 603-609.