



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **48553** (13) **U**  
(51) МПК (2009)  
C12N 5/0775МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**  
**ДО ПАТЕНТУ**  
**НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під  
відповідальність  
власника  
патенту**(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ КЛІТИН НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ ІЗ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ КЛІТИН ТКАНИНИ ССАВЦІВ**

1

2

(21) u200909538

(22) 17.09.2009

(24) 25.03.2010

(46) 25.03.2010, Бюл. № 6, 2010 р.

(72) МИКУЛИНСЬКИЙ ЮРІЙ ЮХИМОВИЧ, ХВИСЮК ОЛЕКСАНДР МИКОЛАЙОВИЧ, ЗАБІРНИК АРСЕНІЙ СЕРГІЙОВИЧ, ПАНІБРАТЦЕВА СВІТЛАНА ГЕОРГІЇВНА, КУЛЬШИН ВОЛОДИМИР ЄВГЕНОВИЧ, ОМЕЛЬЧЕНКО ОЛЕНА АНАТОЛІЇВНА, АНТОНЯН ІГОР МИХАЙЛОВИЧ

(73) ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ ФІРМА "ВІРОЛА", ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ

(57) Спосіб одержання клітин нервової тканини із мезенхімальних клітин тканини ссавців шляхом культивування в специфічних середовищах з додаванням у середовище індукторів нервової тканини, який **відрізняється** тим, що для отримання мезенхімальних клітин застосовують жирову тканину.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до трансплантаційної медицини і може бути використана для одержання аутологічних клітин різних тканин для репарації хворих і ушкоджених органів людини.

Серед мезенхімальних клітин-попередників до недавнього часу найбільший інтерес викликали клітини строми кісткового мозку (КСКМ). У великій кількості робіт показано, що клітини строми кісткового мозку є плюрипотентними і під дією специфічних індукторів можуть диференціюватися у різні види клітин, наприклад у нервові клітини (Sanchez - Ramos et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. // Experimental Neurology, 2000, V. 164, № 2, P. 247-256.), кардіоміоцити (Makino et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. // J. Clin. Invest., 1999, V. 103, № 5, P. 1168-1170.), клітини підшлункової залози (Микулинський Ю. Е. и др., 2004, Индуцированная дифференцировка клеток костного мозга мыши в островки клеток, экспрессирующие инсулин. // Третий Российский конгресс по патофизиологии, Москва, с. 232).

Але незважаючи на відомі досягнення, метод отримання мезенхімальних клітин із кісткового мозку має суттєвий недолік - травматичний спосіб одержання кісткового мозку. Недоліком відомих способів отримання аутологічних нейробластів (попередників нервових клітин) з кісткового мозку є травматичність отримання останнього та його зна-

чно обмежена кількість. При отриманні нейробластів з клітин, вилучених з інших тканин також постають труднощі.

Найбільш близьким і обраний, як прототип є спосіб одержання плюрипотентних мезенхімальних клітин із кісткового мозку ссавців (патент А 67602 «Спосіб одержання клітин різних типів біологічних тканин зі стромальних клітин кісткового мозку ссавців» Микулинський Ю. Ю., Щегельська О.А., та ін. 2004 р.).

Спосіб одержання клітин різних типів біологічних тканин зі стромальних клітин кісткового мозку одержують шляхом культивування в специфічних кондиційних середовищах, з додаванням у середовище специфічних індукторів використовують фактори, що виділяють з відповідних біологічних тканинам, клітин ембріонального походження.

За рахунок того, що, додаються до культуральних середовищ фактори, виділені з відповідних ембріональних тканин, досягається спрямована індукція стромальних клітин кісткового мозку в задані типи тканин (печінки, підшлункової залози, серця, репродуктивної системи).

Недоліком відомих способів отримання аутологічних нейробластів (попередників нервових клітин) з кісткового мозку є травматичність отримання останнього та його значно обмежена кількість. При отриманні нейробластів з клітин, вилучених з інших тканин, також постають труднощі.

(13) **U**  
(11) **48553**  
(19) **UA**

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу отримання клітин нервової тканини із мезенхімальних клітин тканини ссавців, в якому за рахунок зміни джерела постачання стовбурових клітин, та за рахунок застосування специфічних нейроіндукторів в комплексі з допоміжними факторами та підібраними умовами культивування, досягається диференціювання отриманих клітин в нервові.

Поставлена задача вирішується в способі отримання клітин нервової тканини із мезенхімальних клітин тканини ссавців шляхом культивування в специфічних середовищах з додаванням у середовище індукторів нервової тканини, який відрізняється тим, що для отримання мезенхімальних клітин застосовують жирову тканину.

За рахунок того, що до культури мезенхімальних клітин жирової тканини додається специфічний нейроіндуктор, створюються оптимальні умови для переходу клітин в диференційований стан та сприятливі умови для культивування клітин нервової тканини, досягається спрямована індукція мезенхімальних клітин жирової тканини (МКЖТ) в клітини нервової тканини. Особливий інтерес в останній час викликають клітини, отримані із жирової тканини - МКЖТ. Отримання зразків жирової тканини можливо, наприклад при косметичних операціях, спрямованих на видалення зайвих жирових відкладень. Жирова тканина вважається найбільш перспективним джерелом стовбурових клітин завдяки достатньо високому вмісту цих клітин, безпеки та низької травматичності їх отримання.

Сутність способу полягає у підборі специфічних умов диференціювання і культивування мезенхімальних клітин жирової тканини, результатом яких є отримання в різному ступені диференційованих нервових та гліальних клітин. Це пояснюють малюнки Фіг.1-3, де зображена направлена індукція МКЖТ в клітини нервової тканини.

Фіг.1. Інтактна первинна культура мезенхімальних клітин жирової тканини щура. Зб. 200x 6 доба культивування

Фіг.2 - Інтактна первинна культура мезенхімальних клітин жирової тканини щура. Зб. 200x 11 доба культивування

Фіг.3. Індукція мезенхімальних клітин жирової тканини в нервові і гліальні клітини під дією ретиноевої кислоти. (Біполярні нейрони).

Фіг.4 - Індукція мезенхімальних клітин жирової тканини в нервові і гліальні клітини під дією ретиноевої кислоти, гліальна клітина поряд з недиференційованими клітинами

Фіг.5. Диференціювання мезенхімальних клітин жирової тканини в клітини нервової тканини під дією ретиноевої кислоти. Імуноцитохімічний аналіз. Зб. 200x,  $\beta$ -тубулін-позитивний мультиполярний нейрон поряд з недиференційованою фібробластоподібною клітиною строми жирової тканини.

Фіг.6 - Диференціювання мезенхімальних клітин жирової тканини в клітини нервової тканини під дією ретиноевої кислоти. Імуноцитохімічний аналіз. Зб. 200x, клітина астроцитарної глії, позитивне забарвлення на GFAP.

Спосіб, що заявляється, проілюструємо на

прикладі диференціювання МКЖТ щура в клітини нервової тканини.

Спосіб, що заявляється, здійснюють таким чином.

Зразки жирової тканини щурів забирають у стерильний посуд з середовищем Хенкса. Жирову тканину фрагментують і інкубують у 0,25% розчині трипсину протягом 1 години при 37°C. Трипсин вилучають, тканину ресуспендують у середовищі DMEM/F12 (1/1) Sigma з 10% фетальної бичачої сироватки (Sigma), 2mM L-глутаміна (Sigma), 50  $\mu$ g/ml гентаміцину. Клітини осаджують центрифугуванням при 1000 об/хв протягом 10 хв. Осад ресуспендують у свіжому культуральному середовищі і розсівають клітини у культуральний флакон (75 см<sup>2</sup>) у 13 мл середовища. Клітини культивують при 37°C і 5% CO<sub>2</sub> у CO<sub>2</sub> інкубаторі протягом 12-14 днів до створення моношару. Заміну середовища проводять кожні 3-4 доби.

Отримана первинна культура стромальних клітин жирової тканини, а також клітини першого пасажу застосовують для кріоконсервування у рідкому азоті. Клітинну суспензію заморожують у середовищі DMEM з 10 % ДМСО і 20 % ФБС застосовуючи звичайний двухетапний спосіб (I етап - -30°C, 15 хв., II етап - -196°C).

Культура МКЖТ подібна до культури клітин строми кісткового мозку, яку використовували в обраному прототипі. Клітини МКЖТ є фібробластоподібними клітинами, серед яких різні дослідники виділяють від 3 до 7 типів клітин з різною морфологією і проліферативною активністю.

Відмінністю МКЖТ від КСКМ є наявність нетипового для КСКМ типу клітин з багатокутниковою морфологією і високим проліферативним потенціалом.

Для диференціювання МКЖТ у клітини нервової тканини використовують відомий нейроіндуктор ретиноеву кислоту в комплексі з допоміжними факторами, зокрема, N-2 supplement (Sigma, cat. N. 17502-048) та змінну концентрацію ФБС.

Морфологію клітин вивчають в живій культурі та після фіксації метанолом з забарвленням 1 % розчином метилового фіолетового. Клітинні культури та пофарбовані препарати вивчають за допомогою інвертованого мікроскопа «Біолам» П2-1(ЛОМО, Санкт-Петербург) і та цифрової фотокамери Nikon.

Приклад 1.

1. Нейродиференціювання.

Для направленої диференціювання МКЖТ в клітини нервової тканини використовують первинну культуру на 6-7 добу культивування або відновлену кріоконсервовану культуру першого пасажу на тих же строках культивування.

На першому етапі індукції диференціювання в культурі МКЖТ базове поживне середовище замінюється на аналогічне, але без фетальної бичачої сироватки. Також в індукційне середовище додається стоковий розчин N-2 supplement 100x до фінальної концентрації 1x, та 10<sup>-6</sup> М ретиноева кислота. Індуковані клітини культивують в наведеному середовищі 1 добу, після чого індукційне середовище замінюється на аналогічне, але з 2 % ФБС. Вже на 3 добу культивування в культу-

рі з'являється до 20 % попередників клітин нервової тканини (нейробласти, нейрони, гліальні клітини). При подальшому культивуванні в культурі нейрони можуть об'єднуватись, утворюючи структуру подібну до нервового ланцюга. Спостереження та ідентифікування клітин, що диференціюються, проводять в живій культурі та фіксованих препаратах з фарбуванням 1 % розчином метилового фіолетового або специфічними антитілами. Позитивним фактом є те, що ретиноева кислота індукує диференціювання не тільки нейронів, а й гліальних клітин, що здійснюють підтримуючу функцію для нервових клітин.

## 2. Імуноцитохімічний аналіз.

Культуру з нервовими клітинами, що диференціюються, промивають розчином Хенкса та фіксують метанолом при  $-20^{\circ}\text{C}$  безпосередньо в культуральному флаконі. Зафіксовані клітини промивають фосфатно-сольовим буфером (ФСБ) і послідовно інкубують у 3 % розчині перекису водню (30 хвилин) та 5 % БСА (1 година). Потім клітини інкубують з мишачими моноклональними антитілами до  $\beta$ -тубуліну II, або з мишачими моноклональними антитілами до Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) при  $4^{\circ}\text{C}$  протягом ночі, далі з вторинними козячими анти мишачими, кон'югованими з пероксидазою хрому 1 годину при кімнатній температурі. Як барвник використовували розчин діамінобензидину (ДАБ).

Нервові клітини, що забарвлюються антитілами до  $\beta$ -тубуліну (маркеру нейронів), знаходяться в культурі поряд з недиференційованими фібробластоподібними клітинами, що не забарвлюються специфічними до нервової тканини антитілами. Серед клітин, що диференціюються переважають

гліальні клітини, зокрема, астроцити, що специфічно забарвлюються антитілами до GFAP. При специфічному зв'язуванні антитіл з клітинами-мішенями останні в результаті імуноцитохімічної реакції забарвлюються в коричневий колір.

За допомогою імуноцитохімічної реакції з антитілами до  $\beta$ -тубуліну та GFAP ми підтвердили, що серед клітин, що знаходяться в культурі, є клітини, які експресують вищезазначені білки. Їхня цитоплазма в результаті імуноцитохімічної реакції забарвлюється ДАБ у коричневий колір. Число нервових клітин варіює: на початку диференціювання їх дещо більше ніж на подальших етапах, що, вочевидь, пояснюється частковим апоптозом, викликаним дією ретиноевої кислоти.

Отримані результати були відтворені нами 5 разів. При цьому були використані первинні культури та культури першого пасажу. МКЖТ були взяті від різних щурів однієї лінії. Щоразу на 2-3 добу індукції спостерігали ознаки початку диференціювання МКЖТ в клітини нервової тканини.

Таким чином, мезенхімальні клітини жирової тканини являють собою нове дешеве джерело стовбурових клітин, які можна одержувати з жирової тканини пацієнта, розмножувати в культурі, заморожувати для збереження в кріобанку, диференціювати в клітини нервової тканини і використовувати для регенерації хворих і ушкоджених органів людини, зокрема, головного і спинного мозку. Використання цих клітин також дозволить вирішити оперативно-травматичні, імунологічні і етичні проблеми сучасної клітинної терапії.



Fig.1

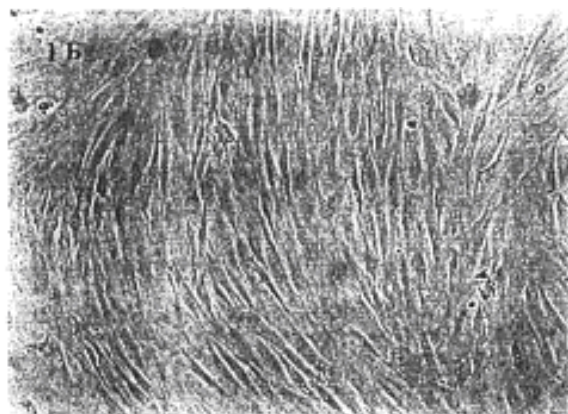


Fig.2

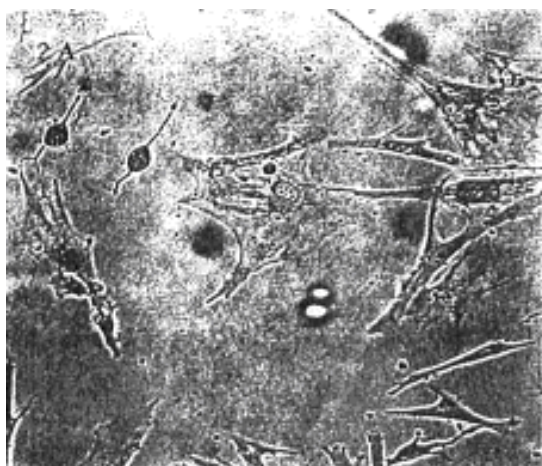


Fig. 3



Fig. 4

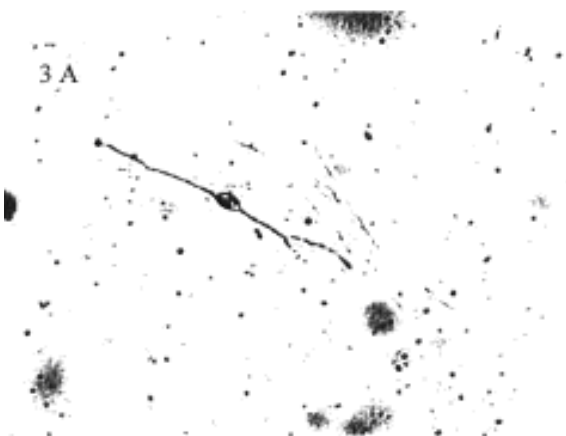


Fig. 5

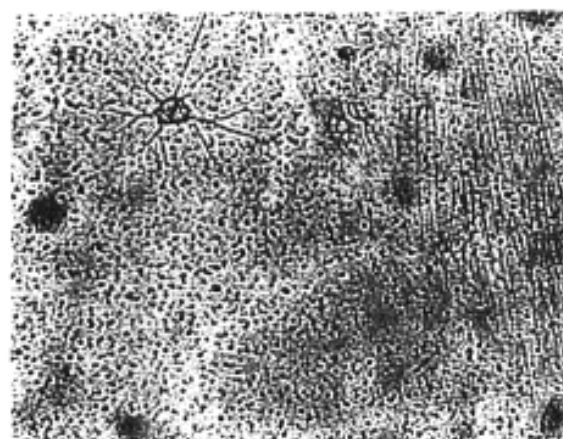


Fig. 6