



УКРАЇНА

(19) UA (11) 67620 (13) U
(51) МПК
C12N 5/0735 (2010.01)
C12N 9/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН

1

(21) u201111561

(22) 30.09.2011

(24) 27.02.2012

(46) 27.02.2012, Бюл.№ 4, 2012 р.

(72) ЛОБИНЦЕВА ГАЛИНА СТЕПАНІВНА, ШАБЛІЙ
ВОЛОДИМИР АНАТОЛІЙОВИЧ, КУЧМА МАРІЯ
ДМИТРІВНА(73) ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДА-
ЛЬНІСТЮ ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ ТЕРАПІЇ

(57) Спосіб виділення мезенхімальних мультипо-
тентних стромальних клітин, що включає проми-
вання тканини плаценти, механічне подрібнення,
виділення клітини шляхом ферментації та висі-
вання в ростове середовище, що містить розчин
фетальної бичачої сироватки, та розчин антибіо-
тиків, культивування при 37 °C в атмосфері 5 %
CO₂, здійснення пересіву при досягненні культу-
рою граничного значення обсягу моношару, обро-
бку клітин для пересіву розчином трипсину-ЕДТА
при 37 °C, центрифугування суспензії, видалення
супернатанту, суспендування осаду клітин в рос-
товому середовищі, який **відрізняється** тим, що
попередньо гладкий хоріон плацентарної тканини
промивають розчином Хенкса з додаванням 50
од/мл амфотерицину, 100 од/мл пеніциліну, 50
мкг/мл стрептоміцину, тканину переносять в пробі-

2

рки 50 мл, з додаванням 2-3 мл розчину Хенкса та
подрібнюють на фрагменти не більше 3 мм, фраг-
ментовану тканину переносять в кріоампули та
додають диметилсульфоксиду (ДМСО) до кінцевої
концентрації 0,7-1,4 мол., проводять заморожу-
вання, кріоконсервовані зразки зберігають у рідко-
му азоті при температурі -196 °C, фрагмент кріо-
консервованого гладкого хоріона зрілої плаценти
розморожують на водяній бані 38-40 °C, виводять
ДМСО з тканини шляхом повільного додавання
розчину Хенкса, тканину промивають розчином
Хенкса та подрібнюють, виділяють клітини шляхом
ферментації в розчині колагенази I та диспази та
висівають в ростове середовище, що містить 15 %
фетальної бичачої сироватки, 2 мМ глютаміну, 5
мМ HEPES, 100 од/мл пеніциліну, 50 мкг/мл стреп-
томіцину, культивування проводять при 37 °C в
5 % CO₂ зі зміною середовища 2 рази на тиждень,
пересів здійснюють при досягненні культурою
80 %-90 % моношару в співвідношенні 1:3, клітини
для пересіву обробляють 0,05 %-им розчином
трипсину-ЕДТА до повного відкріплення протягом
3-5 хв. при 37 °C, суспензію центрифугують 5 хв.
при 300 g, супернатант видаляють, суспендують
осад клітин в ростовому середовищі та переносять
у флакони.

Корисна модель належить до області клітинної
біології, зокрема до виділення мезенхімальних
стовбурових клітин з тканин людини, і може знайти
застосування в медицині для лікування широкого
кола захворювань.

Відомий спосіб виділення мезенхімальних му-
льтипотентних стромальних клітин в експерименті
(RU2415476, МПК G09B23/28, A61K35/50,
A61P43/00, дата публікації: 27.03.2011). Отриман-
ня культури ММСК проведено на 8 щурах лінії
Wistar, масою 150-170 гр. Здійснювалося виділен-
ня плаценти в терміні гестації 18 днів. Зразок тка-
нини масою 2 г промивали фізіологічним розчи-
ном, забуференим фосфатами (PBS) при pH 7,2,
без іонів Ca₂ і Mg₂, доповненим антибіотиками (пе-
ніцилін 50 од/мл, стрептоміцин 50 мкг/мл), після
чого здійснювалося механічне подрібнення ткани-
ни і ензиматична обробка (0,25 % трипсин - ЕДТА

15 мін при 37 °C). Отримана суспензія клітин була
двічі профільтрована через 100 мкм нейлонову
мембрану для очищення від великих не подрібне-
них шматочків тканини. Суспензію розбавляли
середовищем α -MEM, що містить антибіотики,
потім клітини осаджували центрифугуванням
впродовж 15 хв. при 1000 д. Отриманий клітинний
осад суспендували в середовищі α -MEM з 10 %
сироватки ембріонів корів, одноразовим розчином
амінокислот і одноразовим розчином антибіотиків.
Суспензію клітин висівали в концентрації 150000-
160000 кл/см² на чашки Петрі 60 мм. Культивуван-
ня здійснювалося при 37 °C в зволоженій атмо-
сфері з 5 % CO₂. субкультивування клітин здійсню-
вали після досягнення ними 80 % моношару.
Клітини промивали сумішшю 0,25 % трипсин - ЕД-
ТА в співвідношенні 1:1, в якій клітини інкубували
близько 5 хв. при 37 °C. Трипсин інактивували до-

UA (19) 67620 (13) U

даванням ростового середовища з фетальною бичачою сироваткою (10 %) і центрифугували суспензію при 200g впродовж 5 хв. Видаливши супернатант, клітини суспендували, здійснювали підрахунок і висівали в концентрації 10000 кл/см².

Недоліком способу є його вузька специфічність направлена на отримання мезенхімальних мультипотентних стромальних клітин щурів. Застосовані у способі режими визначаються умовами плаценти щурів, не відповідають умовам плаценти людини і тому прямо не можуть бути застосовані для виділення мезенхімальних мультипотентних стромальних клітин людини. Спосіб має здійснюватися безпосередньо перед процесом застосування отриманих за способом клітин, що можливо у випадку застосування лише лабораторних тварин що також суттєво ускладнює здійснення способу.

Відомий спосіб виділення мезенхімальних мультипотентних стромальних клітин (RU2252252, МПК C12N5/08, дата публікації: 20.05.2005). Зразок тканини попередньо промивають в PBS (pH 7,2) без іонів Ca²⁺ і Mg²⁺, доповненим антибіотиками (пеніцилін 100 од/мл, стрептоміцин 100 мкг/мл) і антимікотиком (амфотерицин В 0,25 мкг/мл). Після відмивки тканину подрібнюють та додають DMEM-LG, що містить антибіотики та антимікотик, що вказані вище, при об'ємному співвідношенні тканини і середовища від 1:5 до 1:10. До суспензії додають розчин колагенази до кінцевої концентрації 0,075 % та інкубують при 37 °C протягом 30 хвилин на шейкері. При досягненні однорідної суспензії колагеназу інгібують додаванням рівного об'єму середовища DMEM, що містить 10 % ФБС з наступним центрифугуванням протягом 10 хвилин при 1000d. Осад ресуспендують в буфері, що лізує еритроцити (155 мкм NH₄Cl, 10 мМ KHCO₃, 0,1 мМ Na₂EDTA). Суміш ретельно перемішують і інкубують 3-5 хвилин при кімнатній температурі. До суспензії клітин додають рівний об'єм середовища DMEM, що містить антибіотики і антимікотик, потім клітини осаджують центрифугуванням протягом 10 хвилин при 1000 d. Клітинний осад промивають середовищем DMEM і знову осаджують центрифугуванням в тому ж режимі. Клітини суспендують в середовищі DMEM-LG з концентрацією глюкози 1 г/л, з 20 % фетальної сироватки корів (ФСК), антибіотиками та антимікотиком. Отриману клітинну суспензію пропускають через фільтри з розміром пор 100 мкм і 10 мкм та висівають з розрахунку 1 млн клітин на 1 см². Виділена популяція клітин характеризується високою однорідністю МСК, причому зміна параметрів фільтрації в бік збільшення і /або зменшення розмірів пор призводить до зниження однорідності цільового продукту або виходу клітин.

Недоліком такого способу є придатність даної технології для отримання ММСК з нативної тканини плаценти, що унеможливило проведення первинного скринінгу матеріалу на інфекції та стерильність.

Відомий спосіб виділення мезенхімальних мультипотентних стромальних клітин (RU2418066, МПК C12N5/00, дата публікації: 10.05.2011). Отримання культури ММСК здійснювали з ліпоаспірата

людини. Матеріал до виділення зберігали в холодильнику при 4 °C. В 50 мл пробірку поміщали ліпоаспірат (приблизно 1/3 від об'єму пробірки) і, доливши до 50 мл D-PBS, струшували 5 разів. Центрифугували 5 хв. при 1500 об/хв., при 18 °C. Зливали поверхневий шар жиру із зруйнованих адипоцитів. Переносили ліпоаспірат в чисту стерильну пробірку (50 мл) і повторно відмивали тканину за наступних умов - 10 хв., 1000 об/хв., 18 °C. Переносили ліпоаспірат в заздалегідь зважену стерильну пробірку (50 мл), зважували і додавали розчин колагенази ІА. Готували 0,15 % розчин колагенази. У пробірку із заздалегідь зваженим ліпоаспіратом додавали розчин ферменту до кінцевої концентрації 0,075 %. Інкубували на водяній бані 30 хв. при 37 °C, періодично струшували - 1 раз в 5 хв. Інактивували колагеназу ІА додаванням повного середовища до 50 мл. Центрифугували 5 хв., 1500 об/хв., при 18 °C. Супернатант зливали і осад ресуспендували в 10 мл повного середовища, довівши до 50 мл ростовим середовищем. Центрифугували 5 хв., 1500 об/хв., при 18 °C. Супернатант зливали і осад ресуспендували в 10 мл повного середовища. Клітинний фільтр поміщали на пробірку 50 мл і суспензія клітин і залишків тканини пропускали через нього. У пробірку додавали ростове середовище до 50 мл Центрифугували 10 хв., 1000 об/хв., при 18 °C. Супернатант зливали, осад ресуспендували в 10 мл ростового середовища.

Недоліком такого способу є його складність, багато стадійність, що суттєво ускладнює виділення мезенхімальних мультипотентних стромальних клітин.

Відомий спосіб виділення мезенхімальних мультипотентних стромальних клітин (RU2391400, МПК C12N5/0735, C12N9/48, дата публікації: 10.06.2010), хоріальну строму відділяють від плаценти. Зразок тканини масою 5 г промивають PBS при pH 7,2, без іонів Ca₂ і Mg₂, що містить одноразовий розчин антибіотиків. Тканина змізернюють в чашках Петрі діаметром 10 см, потім додають середовище DMEM об'ємом 25 мл, що містить антибіотики, суспендують і переносять в пробірку на 50 мл. В отриману суспензію вводять 1 мл 2 % розчину колагенази типу IV до кінцевої концентрації 0,075 %, інкубують 30 хв. при 37 °C на шейкері при похитуванні. Отриману суміш перемішують до отримання однорідної суспензії, потім додають 25 мл середовища DMEM, що містить 100.000000BS. Клітини осаджують центрифугуванням впродовж 10 хв. при 1000 g. Надосадову рідину видаляють. Для лізування еритроцитів осади ресуспендують в 20 мл холодного буфера, що містить 155 мМ NH₄Cl, 10 мМ KHCO₃, 0,1 мМ Na₂EDTA. Суміш перемішують і інкубують 3-5 хв. при кімнатній температурі. Суспензію розбавляють середовищем DMEM, що містить антибіотики і антимікотик потім клітини осаджують центрифугуванням впродовж 10 хв. при 1000 g. Надосадову рідину видаляють, клітинний осад суспендують в середовищі DMEM для промивання. Клітини осаджують центрифугуванням впродовж 10 хв. при 1000 g. Отриманий клітинний осад суспендують в 25 мл середовища DMEM-LG з концентрацією глюкози 1 мілігра-

ма/мл, доповненої 200.000000BS, одноразовим розчином незамінних амінокислот і одноразовим розчином антибіотиків. Суспензію клітин пропускають послідовно через фільтри з розміром пір 100 мкм і 10 мкм для видалення клітинних залишків і дебриса. Кількість очищених клітин оцінює підрахунком в камері Горяєва. Сумарний вихід клітин складає 109/1 г тканини. Клітини висівають в чашки Петрі площею 25 см² з розрахунку 1 млн/1 см². Через 24 години клітинами міняють середовище на свіжу. Після досягнення моношару клітини субкультивують. Зняття клітин з культивованої поверхні при проведенні пасажу здійснюють в парах ферменту акутази. Для цього після видалення поживного середовища в культуру мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин додається перша порція 0,075 % розчину акутази (5 мл на 25 см² підкладки). Додавання другої порції 0,075 % (5 мл на 25 см² підкладки) розчину акутази робиться відразу після видалення першої порції ферментів. Інкубація здійснюється впродовж 2-3 секунд, після чого 0,075 % розчин акутази знову аспірується. Подальша інкубація робиться вже в парах акутази впродовж 2 хв. при 37 °C.

Недоліком такого способу є його складність, багато стадійність, що суттєво ускладнює виділення мезенхімальних мультипотентних стромальних клітин.

Задачею розробки є створення способу виділення мезенхімальних мультипотентних стромальних клітин людини, в якому за рахунок застосування нових дій по попередній обробці вихідних сировинних матеріалів та зміни режимів та параметрів етапів виділення мезенхімальних мультипотентних стромальних клітин забезпечується спрощення здійснення способу та використання мезенхімальних мультипотентних стромальних клітин, та зменшення дій по виділенню мезенхімальних мультипотентних стромальних клітин людини.

Для вирішення цієї задачі спосіб виділення мезенхімальних мультипотентних стромальних клітин включає промивання тканини плаценти, механічне подрібнення, виділення клітини шляхом ферментації та висівання в ростове середовище, що містить розчин фетальної бичачої сироватки, та розчин антибіотиків, культивування при 37 °C в атмосфері 5 % CO₂, здійснення пересіву при досягненні культурою граничного значення обсягу моношару, обробку клітин для пересіву розчином трипсину-ЕДТА при 37 °C, центрифугування суспензії, видалення супернатанту, суспендування осаду клітин в ростовому середовищі.

Новим у способі є те, що попередньо гладкий хоріон плацентарної тканини промивають розчином Хенкса з додаванням 50 од/мл амфотерицину, 100 од/мл пеніциліну, 50 мкг/мл стрептоміцину, тканину переносять в пробірки 50 мл, з додаванням 2-3 мл розчину Хенкса та подрібнюють на фрагменти не більше 3 мм., фрагментовану тканину переносять в кріоампули та додають диметилсульфоксиду (ДМСО) до кінцевої концентрації 0,7-1,4 мол., проводять заморожування, кріоконсервовані зразки зберігають у рідкому азоті при температурі -196 °C, фрагмент кріоконсервованого

гладкого хоріона зрілої плаценти розморожують на водяній бані 38-40 °C, виводять ДМСО з тканини шляхом повільного додавання розчину Хенкса, тканину промивають розчином Хенкса та подрібнюють, виділяють клітини шляхом ферментації в розчині колагенази I та диспази та висівають в ростове середовище, що містить 15 % фетальної бичачої сироватки, 2 мМ глутаміну, 5мМ HEPES, 100 од/мл пеніциліну, 50 мкг/мл стрептоміцину, культивування проводять при 37 °C в 5 % CO₂ зі зміною середовища 2 рази на тиждень, пересів здійснюють при досягненні культурою 80 %-90 % моношару в співвідношенні 1:3, клітини для пересіву обробляють 0,05 %-им розчином трипсину-ЕДТА до повного відкріплення протягом 3-5 хв. при 37 °C, суспензію центрифугують 5 хв. при 300g, супернатант видаляють, суспендують осад клітин в ростовому середовищі та переносять у флакони.

Внаслідок застосування нових ознак способу забезпечується отримання мезенхімальних мультипотентних стромальних клітин людини. Дії способу забезпечують отримання мезенхімальних мультипотентних стромальних клітин високої концентрації в умовах з мінімальною кількістю дій по їх виділенню. Спосіб дає можливість отримати ММСК в будь-який час з перевіреної на відсутність патогенів тканини для проведення клітинної терапії що спрощує використання мезенхімальних мультипотентних стромальних клітин

Спосіб ілюструється прикладами його застосування.

В загальному вигляді при здійсненні способу для проведення досліджень зрілу плаценту отримували з інформативної згоди жінок після операції Кесаревого розтину на нормальних фізіологічних пологах. Жінки були обстежені на наявність вірусних та гемічних інфекцій (At Threpanema pallidum, HCV, ВІЛ 1/2, HbsAg).

Плацентарну тканину промивають в чашках Петрі діаметром 90 мм розчином Хенкса з додаванням 50 од/мл амфотерицину, 100 од/мл пеніциліну, 50 мкг/мл стрептоміцину. Тканину переносять в пробірки 50 мл, додавали 2-3 мл розчину Хенкса та подрібнюють за допомогою ножиць на фрагменти не більше 3 мм. Фрагментовану тканину переносять в кріоампули та додають диметилсульфоксид (ДМСО) до кінцевої концентрації 0,7-1,4 мол. Заморожування проводять за спеціально розробленими 4-х етапними програмами. Кріоконсервовані зразки зберігають у рідкому азоті при температурі -196 °C. Плацентарну тканину тестують методом ПЛР на HCV, HBV, CMV, HSV 1/2, EBV, Trep.pallidum, Toxop.gondii, HIV-1, Chlam.trachom., Mycop. genit., Ureapl. urealyt. та parvum та проводять визначення бактеріальної та грибової флори. В разі присутності вище перерахованих інфекційних агентів чи бактеріальної та грибової флори матеріал кріоконсервованої тканини плаценти утилізують.

Фрагмент кріоконсервованого гладкого хоріона зрілої плаценти розморожують на водяній бані 38-40 °C. Виводять ДМСО з тканини шляхом повільного додавання розчину Хенкса. Тканину промивають розчином Хенкса та подрібнюють. Виділяють

ють клітини шляхом ферментації в розчині колагенази I та диспази та висівають в ростове середовище, що містить 15 % фетальної бичачої сироватки, 2 мМ глютаміну, 5мМ HEPES, 100 од/мл пеніциліну, 50 мкг/мл стрептомицину.

Культитивування проводять при 37 °C в 5 % CO₂ зі зміною середовища 2 рази на тиждень. Пересів здійснюють при досягненні культурою 80 %-90 % моношару в співвідношенні 1:3. Клітини для пересіву обробляють 0,05 %-им розчином трипсину/ЕДТА до повного відкріплення протягом 3-5 хв. при 37 °C. Суспензію центрифугують 5 хв. при 300g, супернатант видаляють, суспендують осад клітин в ростовому середовищі та переносять у флакони.

Клітини мають морфологію, характерну мезенхімальним стромальним мультипотентним клітинам. Клітини вузькі, витягнуті веретеновидної форми або розгалуженої форми та сильно розпластані. Для фенотипування клітини аналізують методом проточної цитометрії з використанням моноклональних антитіл anti-CD34, anti-CD90, anti-CD45, anti-CD105, anti-CD73, anti-CD14 (Becton Dickinson), кон'югованих з флуорохромами. Фенотипування проводять на лазерному проточному цитофлуориметрі (FacsAria, Becton Dickinson). Для аналізу використовують 500 тис. клітин.

Імуноцитохімічний аналіз культур клітин проводили з використанням антитіл проти цитокератину (Дако) та цитокератину 7 (Дако).

Для визначення здатності диференціюватися в остеогенному напрямку культуру клітин на 3 пасажі культивують з дексаметазоном, β -гліцерофосфатом та аскорбат-2-фосфатом протягом 21 діб. Мінералізований матрикс виявляли фарбуванням 1 % розчином Алізаринового червоного. Хондрогенне диференціювання проводять в середовищі DMEM з 6,25 мкг/мл інсулін-трансферин-селеніну, 0,1 мкМ дексаметазону, 0,1 мМ аскорбат-2-фосфату та 10 нг/мл TGF- β 3. Виявлення протеогліканів здійснюють фарбуванням алціановим синім (Sigma). Для адипогенного диференціювання клітини культивують в DMEM з додаванням 10 % ФБС, 1 мкМ дексаметазону, 0,5 мМ ізобутил-метилксантину, 100 мМ індометацину та 10 нг/мл інсуліну протягом 21 доби, жирові включення виявляють фарбуванням Oil Red (Sigma).

Отримана культура клітин за вище наведеним способом несе поверхневі маркери CD90, CD105, CD73 та характеризується відсутністю CD34, CD45 та CD14 (див. табл.1). Також клітини експресують цитокератин (90 %).

Таблиця 1

Експресія поверхневих маркерів	Кількість клітин, що мають відповідну експресію, %	Кількість зразків на II та IV пасажах, P=0,05
CD90	88,1 \pm 10,9	n=7
CD73	99,4 \pm 0,2	n=9
CD105	89,6 \pm 9,0	n=9
CD34	2,3 \pm 1,9	n=9
CD45	2,0 \pm 1,3	n=9
CD14	1,3 \pm 1,0	n=9

Розробку ілюструють наступні приклади Приклад 1:

Плацентарну тканину промивають в чашках Петрі діаметром 90 мм розчином Хенкса з додаванням 50 од/мл амфотерицину (Синтез), 100 од/мл пеніциліну (Артеріум), 50 мкг/мл стрептомицину (Артеріум). Тканину переносять в пробірки 50 мл, додають 2-3 мл розчину Хенкса та подрібнюють за допомогою ножиць на фрагменти не більше 3 мм. Фрагментовану тканину переносять в кріоампули та додають диметилсульфоксиду (ДМСО) до кінцевої концентрації 0,7-1,4 мол. Заморожування проводять за спеціально розробленими 4-х етапними програмами. Кріоконсервовані зразки зберігають у рідкому азоті при температурі -196 °C. Плацентарну тканину тестують методом ПЛР на HCV, HBV, CMV, HSV 1/2, EBV, Trep.pallidum, Toxop.gondii, HIV-1, Chlam.trachom., Mycop. genit., Ureapl.urealyt. та parvum та проводять визначення бактеріальної та грибової флори. В разі присутності вище перерахованих інфекційних агентів чи бактеріальної та грибової флори матеріал кріоконсервованої тканини плаценти утилізують.

Фрагмент кріоконсервованого гладкого хоріона зрілої плаценти розморожують на водяній бані при 38-40 °C. Виводять ДМСО з тканини шляхом повільного додавання розчину Хенкса (Sigma). Зразки тканини переносять в 50 мл пробірку та подрібнюють ножицями на фрагменти менше 5 мм. Тканину промивають розчином Хенкса шляхом додавання до об'єму тканини двох об'ємів розчину, через 2 хвилини видаляють супернатант, повторюють 2-3 рази. До тканини у співвідношенні 1:2 додають розчин диспази (Gibco), що готують на фосфатному буфері без іонів Ca²⁺ Mg²⁺ (Gibco) в концентрації 0,6 од/мл та розчин 0,1 % колагенази 1 типу (Serva), що готують на середовищі DMEM з додаванням 5мМ HEPES та інкубують при 37 °C протягом 20-30 хв. Суміш піпетують декілька разів. До суміші додають фетальну бичачу сироватку (Gibco) до кінцевої концентрації 10 % для зниження активності колагенази. Залишки тканини видаляють шляхом фільтрування крізь фільтр 100 мкм (Millipore). Тканину промивають середовищем DMEM з додаванням 5мМ HEPES 1 раз та збирають фільтрат. Суспензії клітин поєднують та центрифугують протягом 5 хв. при 300g. Отрима-

ний осад клітин суспендують в середовищі DMEM, що містить 15 % фетальної бичачої сироватки, 2 мМ глютаміну (Sigma), 5мМ HEPES, 100 од/мл пеніциліну (Sigma), 50 мкг/мл стрептоміцину (Sigma).

Кількість клітин підраховують в камері Горяєва. Клітини висівають в культуральні флакони для адгезивних культур клітин (Sarstedt) з розрахунку 300-400 тис. клітин на 1 см². Через 48 години середовище відбирають, промивають флакон DMEM з додаванням 5мМ HEPES для видалення еритроцитів і неадгезивних клітин та додають ростове середовище, склад якого вказано раніше.

Культигування проводять при 37 °C в 5 % CO₂ зі зміною середовища 2 рази на тиждень. Пересів здійснюють при досягненні культурою 80 %-90 % моношару в співвідношенні 1:3. Клітини для пересіву обробляють 0,05 %-им розчином трипсину/ЕДТА (Biocrom AG) до повного відкріплення протягом 3-5 хв. при 37 °C. Суспензію центрифують

5 хв. при 300g, супернатант видаляють, суспендують осад клітин в ростовому середовищі та переносять у флакони.

Клітини мають морфологію, характерну мезенхімальним стромальним мультипотентним клітинам. Клітини вузькі, витягнуті веретеновидної форми або розгалуженої форми та сильно розпластані.

Для фенотипування клітини аналізують методом проточної цитометрії з використанням моноклональних антитіл anti-CD34, anti-CD90, anti-CD45, anti-CD105, anti-CD73, anti-CD14 (Becton Dickinson), кон'югованих з флуорохромами. Фенотипування проводять на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері (FacsAria, Becton Dickinson). Для аналізу використовують 500 тис. клітин. Результати аналізу культури клітин отриманої з кріоконсервованої тканини плаценти на третьому пасажі наводяться в таблиці 2.

Таблиця 2

Експресія поверхневих маркерів на ММСК отриманих з кріоконсервованої тканини плаценти людини

Вид маркера	Кількість позитивних клітин, %
CD90	98.3
CD73	99.9
CD105	98.6
CD34	1.7
CD45	2.2
CD14	0.2

Використання багато параметричного аналізу на проточному цитофлуориметрі показало присутність 94 % клітин з фенотипом CD90+CD73+CD105+CD45-CD34-CD14-.

Імуноцитохімічний аналіз культур клітин проводили з використанням антитіл проти цитокератину (Dako) та цитокератину 7 (Dako). Близько 90 % клітин експресують цитокератин, поодинокі клітини позитивні на цитокератин 7.

Для визначення здатності диференціюватися в остеогенному напрямку культуру клітин на 3 пасажі культивують в DMEM з 10 % ФБС та 0,1 мкМ дексаметазону, 0,1 мМ аскорбат-2-фосфату, 10 мМ β-гліцерофосфату протягом 21 діб. Мінералі-

зований матрикс виявляють фарбуванням 1 % розчином Алізаринового червоного (Sigma).

Хондрогенне диференціювання проводять в середовищі DMEM з 6,25 мкг/мл інсулін-трансферин-селеніну, 0,1 мкМ дексаметазону, 0,1 мМ аскорбат-2-фосфату та 10 нг/мл TGF-β3. Виявлення протеогліканів здійснюють фарбуванням алціановим синім (Sigma).

Для адипогенного диференціювання культуру клітин культивують в DMEM з додаванням 10 % ФБС, 1 мкМ дексаметазону, 0,5 мМ ізобутилметилксантину, 100 мМ індометацину та 10 нг/мл інсуліну протягом 21 доби, жирові включення виявляють фарбуванням Oil Red (Sigma).