



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101881** (13) **U**  
(51) МПК (2015.01)  
**C12N 5/00**  
**C12N 5/0775** (2010.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки:	<b>u 2015 01828</b>	(72) Винахідник(и):	<b>Щегельська Олена Анатоліївна (UA), Григор'єва Тамара Григорівна (UA), Маркелова Олена Володимирівна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки:	<b>02.03.2015</b>	(73) Власник(и):	<b>ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ, вул. Корчагінців, 58, м. Харків, 61176 (UA)</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	<b>12.10.2015</b>		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>12.10.2015, Бюл.№ 19</b>		

**(54) СПОСІБ ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ РОЗМНОЖЕННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОVBУРОВИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ ТА ЇХ ПОХІДНИХ**

**(57) Реферат:**

Спосіб приготування поживного середовища для розмноження мезенхімальних стовбурових клітин людини та їх похідних включає додавання до поживного середовища для культивування in vitro еукаріотичних клітин аутологічної сироватки крові людини. Комплекс ростових факторів додають в середовище шляхом його кондиціювання на культурі аутологічних тромбоцитів, введених в фібриновий гель, сформований з аутологічної плазми крові людини.

**UA 101881 U**



Корисна модель належить до медицини, а саме до біотехнології та регенеративної медицини, конкретно до біомедичних клітинних технологій. Більш точно дана корисна модель належить до способів приготування поживного середовища для ефективного розмноження в культурі мезенхімальних стовбурових клітин різного походження (кістковий мозок, жирова

тканина, шкіра, слизові оболонки, м'язи). Мезенхімальні (стромальні) стовбурові клітини (МСК) дорослого організму поступово займають значне місце в клітинній терапії та регенеративній медицині завдяки їх плюрипотентності, тобто здатності диференціюватися в різні клітинні типи як *in vitro* під дією специфічних індукторів, так і після трансплантації в організм під дією мікрооточення. МСК можуть бути виділені із суспензії кісткового мозку, жиру, шкіри, м'язів і інших тканин дорослого організму, розмножені в культурі і заморожені для зберігання в рідкому азоті. Помічено, що МСК проліферують у культурі повільніше, ніж фібробласти або перевивані клітинні лінії, і фахівці часто стикаються з проблемою їх швидкого розмноження до необхідних терапевтичних доз. Для їх успішного розмноження в культуральне середовище додають фетальну бичачу сироватку або певний коктейль факторів росту.

Відомі способи культивування МСК людини в середовищі  $\alpha$ -MEM (GIBCO) з 20 % FBS (фетальної бичачої сироватки) (1), у середовищі DMEM/F12 (1:1) з додаванням 10 % FBS (Плюрипотентность клеток стромы костного мозга и перспективы их использования в клеточной терапии. / Е.А. Щегельская, Ю.Е. Микулинский, А.В. Ревизин и др.// Онтогенез. - 2003. - Т. 34, № 3. - С. 228-235), у середовищі DMEM з 10 % FBS (Baksh D. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. / D. Baksh, R. Yao, R.S. Tuan // Stem Cells. - 2007. - V.25, № 6. - P. 1384-1392). У всіх випадках в середовище для культивування додають також нетоксичні для клітин дози антибіотиків і 200 mM L-Glutamine. Незважаючи на те, що МСК людини в цих середовищах ростуть добре, наслідком наявності в складі середовищ для культивування клітин високих концентрацій ембріональної телячої сироватки може стати ризик інфікування пацієнта агентами пріонної природи або зоонозними інфекціями, навіть незважаючи на те, що сироватки від провідних виробників тестуються за багатьма параметрами. Інша небезпека полягає в можливості імунізації пацієнта ксеногенними білками, що особливо небезпечно при повторному введенні клітинного матеріалу. Вимоги безпеки приготування клітинних препаратів в умовах GMP (Good Manufacturing Production) лабораторій змушують дослідників шукати шляхи виключення з культуральних середовищ ксеногенних білків, що входять до складу фетальної бичачої сироватки.

Для цього пропонують використовувати середовища без сироватки, але з комплексом рекомбінантних факторів росту (FGF, EGF, IGF, TGF- $\beta$ ), які є досить ефективними, але дуже дорогими.

Відомий спосіб розмноження МСК людини в середовищах без сироватки (Reinisch A. Isolation and Animal Serum Free Expansion of Human Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) and Endothelial Colony Forming Progenitor Cells (ECFCs)./ A. Reinisch, D. Strunk // Journal of Visualized Experiments. - 2009. - V. 32. - P. 1525). Однак, наявність у них навіть невеликих кількостей рекомбінантних білків може стати причиною алергічних реакцій у пацієнтів після трансплантації МСК.

Добрих результатів при культивуванні клітин домоглися автори, які замінювали в культуральному середовищі сироватку тваринного походження сироваткою крові людини (Optimization of culture conditions for the expansion of umbilical cord-derived mesenchymal stem or stromal cell-like cells using xeno-free culture conditions./ T. Hatlapatka, P. Moretti, A. Lavrentieva et al. // Tissue Eng Part C Methods. - 2011. - V. 17, № 4. - P. 485-93.), фракціями плазми крові людини (Юрченко М.Ю., Шумский А.В. Обзор оборудования и методик получения аутогенной обогащенной тромбоцитами плазмы в стоматологии / М.Ю. Юрченко, А.В. Шумский. // Новое в стоматологии. - 2003. - № 7. - С. 46), збагаченою тромбоцитами плазмою крові пацієнта (Preliminary separation of the growth factors in platelet-rich plasma: effects on the proliferation of human marrow-derived mesenchymal stem cells / Q. Huang [et al.] // Chinese Medical Journal. - 2008. - Vol. 122, № 1. - P. 83-87; Effect of platelet-rich plasma on the *in vitro* proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on distinct calcium phosphate scaffolds: the specific surface area makes a difference / P. Kasten [et al.] // J of Biomat. Application. - 2008. - Vol. 23. - P. 169-188).

Найбільш близьким до заявленого способу є спосіб приготування поживного середовища для розмноження МСК кісткового мозку з заміною фетальної бичачої сироватки на збагачену тромбоцитами плазму (Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells

and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics / J. P. Vogel [et al.] // J of Biomat. Application. - 2006. - Vol. 17, № 7. P. 462-469).

Але недоліком цього способу є те, що для приготування достатньої кількості середовища для розмноження МСК у пацієнта необхідно забрати велику кількість крові для отримання  
5 необхідної кількості збагаченої тромбоцитами плазми (ОТП). Так, для отримання 3 мл ОТП, необхідно взяти не менше 20 мл крові. В результаті можна отримати не більше 20-30 мл культурального середовища. Таким чином, для виробництва в культурі 5 млн. стовбурових клітин треба буде взяти у пацієнта 300 мл венозної крові. Це малоефективно при виробництві терапевтичних доз МСК.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу приготування поживного середовища для розмноження мезенхімальних стовбурових клітин людини та їх похідних, в якому за рахунок зміни поживного середовища досягається підвищення ефективності виробництва мезенхімальних клітин в культурі у 3 рази і виключення зі складу середовища дорогих ксеногенних добавок у вигляді фетальної бичачої сироватки або  
15 рекомбінантних факторів росту, замінюючи їх аутологічною сироваткою крові пацієнта і факторами росту, що виділяються в культуральне середовище аутологічними тромбоцитами крові пацієнта.

Поставлена задача вирішується в способі приготування поживного середовища для розмноження мезенхімальних стовбурових клітин людини та їх похідних, що включає додавання  
20 до поживного середовища для культивування *in vitro* еукаріотичних клітин аутологічної сироватки крові людини, в якому, згідно з корисною моделлю, комплекс ростових факторів додають в середовище шляхом його кондиціювання на культурі аутологічних тромбоцитів, введених в фібриновий гель, сформований з аутологічної плазми крові людини.

Заявлений спосіб відрізняється від найближчого аналога тим, що замість додавання в культуральне середовище 10 % збагаченої тромбоцитами плазми крові застосовують  
25 кондиціювання поживного середовища з 7 % сироватки крові пацієнта на культурі аутологічних тромбоцитів, укладених в фібринову матрицю, сформовану з плазми крові пацієнта. Перевагою даного способу є те, що таким способом з тієї ж кількості крові пацієнта можна отримати в 10-20 разів більше культурального середовища, збагаченого ростовими факторами, які виділяються в  
30 нього тромбоцитами при культивуванні.

Крім того, приготоване цим способом поживне середовище дозволяє отримати за 10 днів культивування в 3 рази більше МСК, ніж середовище з додаванням 10 % FBS (SIGMA-ALDRICH).

Тромбоцити являють собою дрібні, без'ядерні елементи крові, які відіграють основну роль в процесах гемостазу. Тромбоцити містять різні білки, цитокіни та інші біоактивні фактори, які стимулюють і регулюють основні ланки загоєння пошкоджень. У нормі кількість тромбоцитів у крові знаходиться в межах 150000-300000 на мікролітр цільної крові. Плазма - це рідка частина крові, що містить фактори згортання, інші білки і іони. Збагачена тромбоцитами плазма (ОТП) - це плазма, яка містить близько 1000000 тромбоцитів на 1 мікролітр плазми. В ОТП міститься в  
40 3-5 разів більше факторів зростання, ніж в цільній крові. Збагачена тромбоцитами плазма потенційно може поліпшити загоєння за рахунок різних факторів росту і цитокінів, що секретуються з  $\alpha$ -гранул тромбоцитів. Основні цитокіни, виявлені в тромбоцитах, містять трансформуючий фактор росту бета (TGF- $\beta$ ), тромбоцитарний фактор росту (PDGF), інсуліноподібний фактор росту (IGF-I, IGF-II), фактор росту фібробластів (FGF), епідермальний фактор росту, фактор росту ендотелію судин (VEGF) і фактор росту ендотеліальних клітин. Ці природні фактори росту знаходяться в біологічно зумовлених співвідношеннях. Все це відрізняє багату тромбоцитами плазму від рекомбінантних факторів росту. У природному згустку містяться фібрин, фібронектин та витронектин - адгезивні молекули. Ці цитокіни відіграють важливу роль у процесах клітинної проліферації, хемотаксису, диференціації та ангіогенезу.  
50 Біологічно активні фактори тромбоцитів також містяться в їх щільних гранулах. Вони містять серотонін, гістамін, допамін, аденозин і іони кальцію. Дані фактори не належать до ростових, але відіграють роль в процесах загоєння. Оскільки багату тромбоцитами плазму отримують з власної крові пацієнта, вона абсолютно безпечна з точки зору перенесення інфекційних захворювань, наприклад ВІЛ або вірусного гепатиту.

Одним із способів активації тромбоцитів є використання "фібринової матриці". Фібринова матриця формується з аутологічного фібрину, який утворюється з фібриногену під дією власного тромбіну, що утворюється в результаті додавання до ОТП хлориду кальцію ( $\text{CaCl}_2$ ). Хлорид кальцію додається перед другим центрифугуванням, що в результаті призводить до утворення щільної фібринової матриці. Інтактні тромбоцити взаємодіють з фібриновою мережею  
60 і активуються. Дана методика активування ОТП характеризується низьким рівнем утворення

тромбіну і, таким чином, зниженням активації тромбоцитів. В результаті тромбоцити досить повільно виділяють фактори росту, і цей процес може тривати до 7 днів.

Заявлений спосіб приготування середовища для культивування МСК здійснюється наступним способом:

- 5       Всі етапи приготування середовища проводять у ламінарному боксі. Для отримання сироватки крові пацієнта в стерильну центрифужну пробірку (50 мл) набирають 40 мл венозної крові пацієнта і центрифугують її при 450 g протягом 15 хвилин. 20-25 мл сироватки відбирають і переносять в стерильний пластиковий контейнер. Для отримання плазми крові пацієнта з тромбоцитами в стерильну центрифужальну пробірку (50 мл) з антикоагулянтом (2 мл 3,8 % розчину цитрату натрію) набирають 40 мл венозної крові пацієнта і центрифугують її при 250 g
- 10       протягом 7 хвилин. 20 мл тромбоцитарної плазми переносять за допомогою серологічної піпетки у стерильний пластиковий контейнер. Готують 300 мл культурального середовища: DMEM/F12 (1:1) (SIGMA-ALDRICH) з додаванням 7 % сироватки крові пацієнта, 2 mM L-glutamine (SIGMA-ALDRICH), 50 мкг/мл гентаміцину (KRKA, Словенія). 20 мл тромбоцитарної плазми
- 15       змішують з 20 мл фізіологічного розчину і додають 10 % розчин  $\text{CaCl}_2$  до кінцевої концентрації в розчині 0,3 %. Отриману суміш швидко розливають на 4 чашки Петрі ( $d=100$  mm) і інкубують протягом 15 хвилин при 37 °C до утворення в них фібринового гелю з вставленими в нього живими тромбоцитами. Після цього в кожен чашку Петрі наливають по 15 мл культурального середовища з 7 % сироватки крові пацієнта і інкубують їх в  $\text{CO}_2$ -інкубаторі протягом 24 годин.
- 20       Кондиційоване ростовими факторами тромбоцитів середовище через 24 години збирають з чашок Петрі в центрифужальні пробірки, центрифугують при 450 g, фільтрують через 0,22 мкм фільтр і отримане середовище використовують для культивування мезенхімальних стовбурових клітин і фібробластів. Завдяки тому, що фібриновий гель з тромбоцитами отриманий в результаті додавання до плазми іонів кальцію, тромбоцити виділяють фактори росту рівномірно
- 25       повільно протягом 7 днів. Тому до фібринового гелю в чашках можна додавати нові порції середовища не менше 5 разів і через кожні 24 години знову отримувати кондиційоване середовище. У результаті за 5 днів можна отримати 300 мл культурального середовища, збагаченого факторами зростання з аутологічних тромбоцитів пацієнта і використовувати його для виробництва 15 млн. МСК або фібробластів пацієнта. Невикористане середовище
- 30       розливають у пробірки по 60 мл і зберігають у морозильній камері при -20 °C.

Приклад. Спосіб апробований при розмноженні в культурі мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку людини.

- 30.05.2014. Для розмноження використовували деконсервовані МСК кісткового мозку людини. Для розмноження клітин використовували 3 варіанти культуральних середовищ: 1-DMEM/F12 (1:1) + 10 % FBS (fetal bovine serum); 2-DMEM/F12 (1:1) + 7 % СКП (сироватка крові пацієнта); 3 - КТС (кондиційоване тромбоцитами середовище). КСТ готували так, як описано в заявленому способі приготування поживного середовища. У культуральні чашки Петрі ( $d=35$  mm) розсіювали по 10 тис. МСК в 3 мл середовища/чашку. Для кожного варіанта середовища клітини культивували у 12 чашках Петрі. Кількість клітин в чашках оцінювали через 3, 6 і 10 діб
- 40       після початку культивування в 4 чашках на кожен варіант середовища і визначали середню кількість клітин в чашці на даний момент. Клітини знімали з дна чашок Петрі після послідовної інкубації їх у розчинах Версену і Трипсину. Суспензію клітин переносили в центрифужальні пробірки, осаджували при 450 g протягом 10 хвилин. Осад ресуспендували в 1 мл розчину Хенкса і рахували кількість клітин на чашку Петрі з допомогою камери Горяєва.

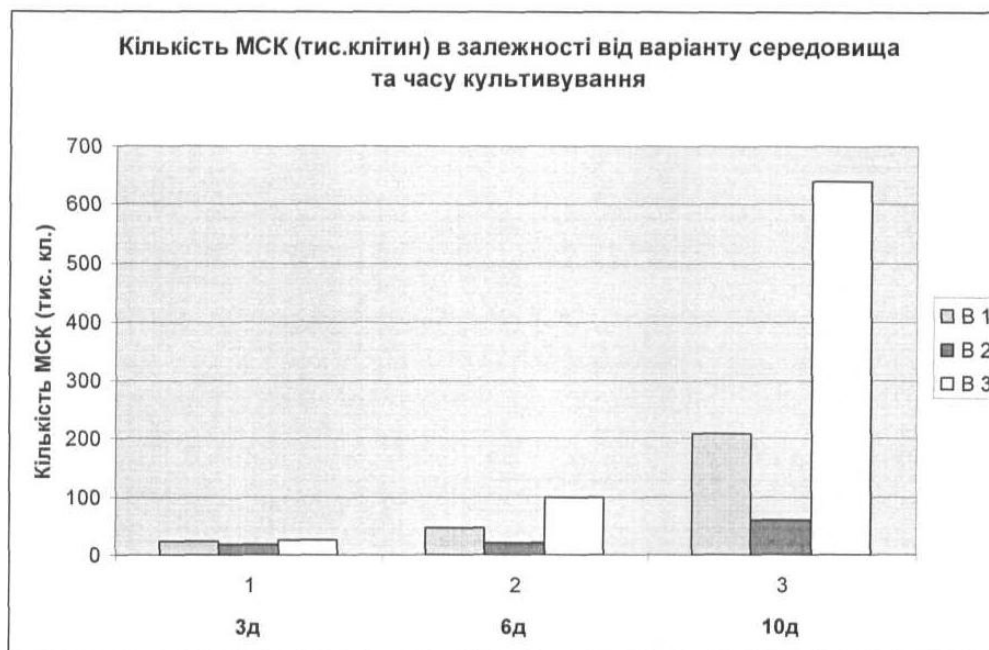
- 45       Результати дослідів представлені на діаграмі.

- Таким чином, порівняльний аналіз розмноження МСК в трьох варіантах середовищ протягом 10 днів дозволяє зробити висновок, що застосування поживного середовища № 3 з аутологічної сироваткою крові пацієнта, кондиційованого на культурі аутотромбоцитів, введених в фібриновий гель, збільшує вихід МСК в 3 рази порівняно з середовищем з додаванням 10 %
- 50       фетальної бичачої сироватки та майже в 6 разів порівняно з середовищем з додаванням сироватки крові пацієнта.

- Запропонований спосіб знайде широке застосування в біотехнологічних лабораторіях центрів регенеративної медицини завдяки підвищенню ефективності виробництва мезенхімальних стовбурових клітин та їх похідних, збільшенню безпеки клітинних препаратів і
- 55       здешевленню компонентів поживного середовища.

# ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб приготування поживного середовища для розмноження мезенхімальних стовбурових клітин людини та їх похідних, що включає додавання до поживного середовища для культивування *in vitro* еукаріотичних клітин аутологічної сироватки крові людини, який **відрізняється** тим, що комплекс ростових факторів додають в середовище шляхом його кондиціювання на культурі аутологічних тромбоцитів, введених в фібриновий гель, сформований з аутологічної плазми крові людини.



Комп'ютерна верстка О. Рябко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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