



УКРАЇНА

(19) UA (11) 52266 (13) U
(51) МПК (2009)
A61K 35/30
A61K 35/54 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОVBУРОВИХ КЛІТИН

1

(21) u201000019
(22) 11.01.2010
(24) 25.08.2010
(46) 25.08.2010, Бюл.№ 16, 2010 р.
(72) ПЕТРЕНКО ЮРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ
(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІО-
МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ
(57) Спосіб одержання мезенхімальних стовбу-
рових клітин, що включає забір тканини, що є джере-

2

лом мезенхімальних стовбурових клітин, з плоду
людини, приготування суспензії клітин головного
мозку, культивування в живильному середовищі і
виділення мезенхімальних стовбурових клітин,
який відрізняється тим, що як джерело мезенхі-
мальних стовбурових клітин використовують фе-
тальний головний мозок людини, що отриманий як
утильний матеріал після планового переривання
вагітності на першому триместрі гестації.

Корисна модель належить до галузі клітинної
біології, біотехнології і може бути використана в
трансплантології для отримання медичних препа-
ратів.

В даний час мезенхімальні стовбурові клітини
(МСК) є об'єктом численних досліджень в галузі
біології розвитку, клітинної біології, генної інжене-
рії, експериментальної і клінічної медицини. З їх
терапевтичним застосуванням пов'язують перспек-
тиву лікування ряду некурабельних спадкових
захворювань, а також придбаних функціональних
порушень органів і тканин людини. Особлива ува-
га до цих клітин приділяється у зв'язку з їхнім ви-
соким проліферативним потенціалом, здатністю
до самопідтримки, мультилінійним потенціалом до
диференціювання і низькою імуногенністю.

Відомий спосіб виділення препарату МСК з кі-
сткового мозку [1]. Відповідно до способу суспен-
зію клітин вимивають з аспіратів кісткового мозку,
після чого роблять очищення від еритроцитів шля-
хом лізису еритроцитів з використанням хлористо-
го амонію.

Недоліком цього способу є велика втрата МСК
при центрифугуванні, яке проводиться для відми-
вання хлористого амонію, присутність якого нега-
тивно впливає на структуру і функцію інших типів
клітин.

Відомі способи виділення МСК з ряду інших
тканин дорослого організму, таких як жир, шкіра,
м'язи [2, 3]. Дані способи включають подрібнення
тканин і наступну ферментативну обробку з вико-
ристанням колагенази і/або трипсину протягом 1-3

годин. Отримана таким чином суспензія клітин
піддається обробці хлористим амонієм для вида-
лення еритроцитів, що негативно відбивається на
інших типах клітин. Крім того, недоліками цих спо-
собів є їх складність і трудомісткість, а також не-
обхідність використання коштовного обладнання
та реактивів.

Останнім часом велика увага приділяється
отриманню МСК з тканин плоду людини. МСК, що
отримані з тканин плоду людини, характеризують-
ся більш високим вмістом стовбурових клітин та їх
проліферативним і диференціальним потенціалом
у порівнянні з дорослими тканинами.

Відомий спосіб одержання МСК з тканини пе-
чінки плоду людини [4]. Відповідно до способу
здійснюють забір печінки з плоду людини та отри-
мання суспензії клітин шляхом продавлювання
печінки в живильне середовище крізь отвори з
діаметром 70мкм. Далі із суспензії клітин видаля-
ють еритроцити шляхом інкубації в розчині лізису -
хлористому амонію протягом 10хв при 4°C. Потім
розчин хлористого амонію та зруйновані еритро-
цити видаляють 2-кратним центрифугуванням,
після чого клітини культивують при 37°C у 5% CO₂.
Через 72год неприкріплені клітини видаляють, а ті,
що прикріпилися, культивують з пересівом після
досягнення 80% конфлуєнта.

Недоліком способу є його складність, яка по-
в'язана з тим, що він включає трудомісткий етап
лізису еритроцитів. Крім цього, при заборі складно
диференціювати тканину печінки, оскільки вона не
значно відрізняється від інших тканин плоду.

(19) UA (11) 52266 (13) U

В основу корисної моделі поставлено задачу спростити відомий спосіб отримання МСК шляхом використання альтернативного джерела.

Ця задача вирішується тим, що в способі отримання МСК, що включає забір тканини, що є джерелом МСК, приготування суспензії клітин, культивування в живильному середовищі і виділення МСК, згідно з корисною моделлю, як джерело МСК використовують головний мозок плоду людини.

Головний мозок легко візуально виявляється після розтину черепа, тому не виникає проблем з його одержанням. Тканина головного мозку не містить еритроцитів, що дозволяє виключити етап лізису еритроцитів. Таким чином, головний мозок плоду людини може використовуватися як альтернативне джерело МСК, при цьому процедура отримання МСК набагато простіше, ніж з інших тканин плода. Приклад здійснення способу

Головний мозок плодів людини виділяли, промивали фізіологічним розчином і готували суспензію, шляхом продавлювання тканини в живильне середовище, через отвори з діаметром 70мкм. Суспензію клітин головного мозку ресуспендували в живильному середовищі з сироваткою і поміщали в культуральні флакони при 37°C та 5% CO₂. Середовище замінювали 2 рази на тиждень. Після досягнення 80% конфлуенту клітини знімали за допомогою суміші версен - трипсину, у співвідношенні 1:4 і пересіювали у флакони більшого розміру. Надалі проводили 4-5 пасажів культивування до досягнення уніфікації морфології культивованих клітин. Після 4-5 пасажів проводили імунофенотипічний аналіз і визначали потенціал до диференціювання.

Для проведення імунофенотипічного аналізу клітини офарбовували моноклональними антитілами CD29-PE, CD45-PE, CD105-FITC (Serotec), CD34 Class II-FITC, CD 38-RPE (DAKO, Голландія), CD44-FITC, CD73-PE (BD Biosciences) відповідно до інструкції виробника, двічі відмивали центрифугуванням при 200g протягом 10хв у сольовому середовищі Дюльбекко і аналізували на проточному цитометрі FACS Calibur (BD Biosciences, США). Результати проточної цитометрії аналізували з використанням програми WinMDI v 2.8. Так, клітини головного мозку, отримані в результаті культивування, були позитивні за мезенхімальними мар-

керами CD29, CD44, CD90, CD105 і негативні за маркерами гемопоєзу CD45, CD34.

Для визначення диференціального потенціалу суспензії клітин розводили середовищем культивування з 10% сироватки ембріонів великої рогатої худоби (ЕС) і вносили в лунки 24-лункового планшета. Остеогенне диференціювання індукували культивуванням в живильному середовищі, що містило 10% ЕС, 100нМ дексаметазону, 10мМ β-гліцерофосфату, 0,2мМ L-аскорбінової кислоти-2-фосфату (всі виробництва Sigma, США). В ході тритижневого індукованого диференціювання вони утворювали клітини кістки (що визначалось офарбовуванням на лужну фосфатазу (набір Fast Blue RR Salt, Naphtol AS-MX Phosphate Alkaline Solution kit №85 (Sigma, США)) та накопичували позаклітинний кальцій, оцінений за методом ван Косса.

Середовище для індукції адіпогенного диференціювання складалось з середовища культивування, доповненого 10% Adipogenic Stimulatory Supplements №05403 (StemCell Inc., Канада). Клітини культивували при 37°C/95% вологості в атмосфері з 5% CO₂ протягом 3-4 тижнів. В результаті спостерігалось накопичення внутрішньоклітинних нейтральних ліпідів, які позитивно забарвлювались Oil Red O (Sigma, США).

Наведені дані свідчать про те, що клітини, виділені з головного мозку плоду людини, проявляють властивості мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин.

Джерела інформації:

1. Fredenstein AJ, Chailakhyan RK, Lalykina KS The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells//Cell Tissue Kinet. - 1970. - №3. - P.393-403.
2. Zuk PA, Zhu M., Ashjian P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // Mol. Biol. Cell. - 2002. - Vol.13, №12. - P.4279-4295.
3. Shih DT, Lee DC, Chen SC et al. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue // Stem Cells. - 2005. - Vol.23, №7. - P.1012-1020.
4. Campagnoli C., Roberts IAG, Kumar S., et al. Identification of mesenchymal stem / progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow//Blood. - 2001. - 98, №8. - P.2396-2402.