



УКРАЇНА

(19) UA (11) 51214 (13) U
(51) МПК (2009)
C12N 5/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН, ОТРИМАНИХ З ПУПОВИНИ ЛЮДИНИ

1

2

(21) u200913444

(22) 23.12.2009

(24) 12.07.2010

(46) 12.07.2010, Бюл.№ 13, 2010 р.

(72) ДЕРЯБІНА ОЛЕНА ГРИГОРІВНА, МАСЛОВА
ОЛЬГА ОЛЕКСАНДРІВНА, СУХОРАДА ОЛЕНА
МИХАЙЛІВНА, КОРДЮМ ВІТАЛІЙ АРНОЛЬДОВИЧ
(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕНЕТИ-
ЧНОЇ ТА РЕГЕНЕРАТИВНОЇ МЕДИЦИНИ АМН
УКРАЇНИ"(57) Спосіб культивування мезенхімальних стов-
бурових клітин, отриманих з пуповини людини,
який включає ведення МСК на поживному середо-
вищі DMEM та тромбоцитарному лізаті, який **від-
різняється** тим, що додатково додають середо-
вище, модифіковане Ісковим (Is) у співвідношенні
1:1, і відібраний з пуповинної крові тромбоцитар-
ний лізат.

Корисна модель належить до клітинної терапії та регенеративної медицини і може бути викорис-
тана для культивування та підтримання у дедифе-
ренційованому стані мезенхімальних стовбурових
клітин (МСК), отриманих з Вартонівського гелю
пуповини людини.

Відомі способи культивування МСК, суть яких
полягає у веденні культури клітин на стандартних
поживних середовищах, найчастіше - середовище
Ігла, модифіковане Дюльбекко (DMEM), що містять
різноманітні ростові добавки, такі як ембріональна
теляча сироватка чи сироватка новонароджених
телят. Такі добавки здатні забезпечити поживне
середовище необхідними речовинами [1].

Проте, всі ці способи мають недоліки. Викори-
стання середовища DMEM не є оптимальним для
довготривалого культивування та підтримання у
диференційованому стані МСК, отриманих зі
сполучної тканини пуповини людини. Оскільки ці
клітини потребують умов, що забезпечували б їх
максимальним набором поживних речовин, доста-
тнім для довготривалого самовідтворення та са-
мовідновлення клітин, проте не провокували б
передчасне старіння, трансформацію чи спонтан-
ну диференціацію МСК. Головними недоліками
використання стандартних тваринних додатків є:
внесення ксеногенної компоненти у середовище,
нестандартизованість складу та потенційне підви-
щення вірогідності контамінації культури і канцero-
генезу. Також важливим є економічний аспект -
тваринні сироватки, які використовують при цьому,
належать до дорогих реактивів [2-4].

Також відомий і спосіб культивування МСК
людини, що передбачає використання алогенних

матеріалів - сироваток, плазми. Суть цього спосо-
бу полягає у тому, що МСК, отримані з кісткового
мозку пацієнтів, вирощують у поживному середо-
вищі DMEM з додаванням сироватки та алогенно-
го тромбоцитарного лізату (ТЛ) [5].

Недоліком даного способу є використання
усе ж таки алогенного, тобто чужорідного і не ціл-
ком оптимального джерела поживних речовин та
лише стандартного культурального середовища
DMEM.

Існує також запатентований спосіб культиву-
вання, який заключається у веденні МСК, отрима-
них з кісткового мозку, в поживне середовище
DMEM з додаванням аутологічного ТЛ, який
отриманий з крові дорослих людей, які потребують
лікування за допомогою МСК [6].

Недоліком даного способу є відносно неве-
ликий вихід клітин та обмежене коло їхнього за-
стосування. Клітини, культивовані згідно з даним
способом є придатними лише для аутотрансплан-
тацій, тобто для лікування самого донора клітин
та ТЛ. Під час культивування використовується
лише стандартне середовище DMEM, що є недо-
статнім для повноцінного культивування МСК.

В основу даної корисної моделі поставлено
завдання удосконалити спосіб культивування ме-
зенхімальних стовбурових клітин, отриманих з
пуповини людини шляхом ведення МСК на збага-
ченому поживному середовищі, що дозволить
отримати велику кількість клітин, що мають типо-
вий для МСК фенотип та забезпечити їм найопти-
мальніші умови для довготривалого ведення у
культури у дедиференційованому стані.

(13) U
(11) 51214
(19) UA

Поставлене завдання досягається тим, що в способі, який включає ведення МСК на поживному середовищі DMEM та тромбоцитарному лізаті, згідно з данною корисною моделлю, додатково додають середовище, модифіковане Ісковим (Is) у співвідношенні 1:1, та тромбоцитарний лізат який відбирають із пуповинної крові.

Авторами доведено, що культивування МСК, отриманих з пуповини з використанням суміші середовищ DMEM та Is є зручним та приводить до отримання однорідної культури, що зберігає фенотипові ознаки стовбуровості, тому придатної для алотрансплантацій. Співвідношення 1:1 є оптимальним і забезпечує МСК як достатньою кількістю органічних та неорганічних речовин, так і запобігає передчасному старінню, трансформації та спонтанній диференціації цих клітин. Додавання аутологічного ТЛ, тобто отриманого з тієї самої пуповини, що і культивовані клітини, замість тваринних сироваток та алогенних людських матеріалів (сироваток та тромбоцитарних продуктів) робить дане середовище унікальним та забезпечує найвищий вихід клітин, підтримує їх у фенотипово стовбуровому стані, тобто створює оптимальні умови культивування МСК. У нашому випадку аутологічний ТЛ отримується з кордової крові та додається у середовище DMEM + Is (1:1). Автори вважають, що середовище Is є найбільш поживним для даного типу клітин, проте у зв'язку з підвищенням інтенсивності метаболізму, клітини, вирощені виключно на цьому середовищі швидше старішають та схильні до диференціації в адипоцити. Тому найефективнішим є використання суміші DMEM та Is.

Згідно з літературними даними, МСК отримані з Вартонівського гелю пуповини людини відрізняються від МСК з кісткового мозку за рядом параметрів: антигенним портретом, потенціалом диференціації, ступенем імуногенності та особливостями культивування [3, 7, 8]. Відомо, що отримання МСК з кісткового мозку є потенційно небезпечним, оскільки передбачає хірургічне втручання. Ми вважаємо більш ефективним використовувати у регенеративній медицині МСК, які отримані з пуповини людини - це джерело не передбачає хірургічного втручання та містить клітини, що знаходяться на більш ранньому етапі розвитку, тобто є більш дедиференційованими та менш імуногенними. Але стандартний підхід до культивування цих клітин не є, на думку авторів, оптимальним.

Спосіб виконується наступним чином:

МСК отримують з Вартонівського гелю за типовою ензиматичною методикою з використанням 0,1% колагенази.

Отриманий матеріал висівається на пластиковий посуд у стандартне середовище DMEM з додаванням середовища Is у співвідношенні 1:1 та з додаванням ТЛ, що отримується паралельно з клітинами з пуповини, та культивують у термостаті при 37°C, 5% CO₂, до поживного середовища додають антибіотики: пеніцилін та стрептоміцин.

Кордова кров відбирається зі свіжої пуповини. У антикоагульованому стані кров зберігається завдяки додаванню гепарину. З цільної крові відо-

кремлюють тромбоцитарну масу за класичною двоетапною методикою. Плазма крові центрифугується до утворення "збагаченої тромбоцитами пасти" або "тромбоцитарного гелю", до якого додається тромбін та хлорид кальцію (у кількості, яка є еквівалентною кількості антикоагулянта), що стимулює вивільнення ростових факторів, а також коагулює фібриноген. Утворену речовину вдруге центрифугують для досягнення високої концентрації кров'яних пластинок, а потім відбирають жовтато-рожеву рідину, що містить активовані тромбоцити.

При початковому висіві матеріалу на середовище DMEM+10% ETC та на DMEM+Is+ТЛ спостерігається різниця лише у швидкості адгезії - клітини у присутності Is та ТЛ адгезуються до субстрату швидше. Після 72год культивування з'являються відмінності і у клітинному складі культур (Фіг.1-2). На середовищі з додаванням Is та ТЛ спостерігається більше фібробластоподібних та дрібних голковидних клітин. Яскрава різниця відмічається починаючи з 1 пасажу (Фіг.3-4). Далі у пасажах було помітно значно більшу кількість фібробластоподібних клітин в умовах додавання Is та ТЛ. Вже на 2 пасажі у середовищі DMEM з додаванням ETC починають переважати поліморфні клітини. Клітини ж у середовищі з Is та ТЛ зберігають фенотип, характерний для МСК: фібробластоподібну форму. При пасажуванні на DMEM з ETC, клітини вже на 3 пасажі переходять до спонтанної диференціації, цитоплазма клітин стає більш гетерогенною, з'являються різноманітні вакуолі, додавання ТЛ затримує настання спонтанної диференціації. На 5 пасажі клітини у ETC-вмісному середовищі DMEM формують нетиповий для МСК моношар, спостерігається велика кількість атипичних клітин, що втратили мезенхімальний фенотип (Фіг.5). Додавання Is та ТЛ дозволяє попередити це явище (Фіг.6). Культури, що були вирощені у DMEM з додаванням ETC, показали схильність до спонтанної диференціації у хондроцити (Фіг.7) та адипоцити (Фіг.8) починаючи з 3 пасажу.

Таким чином даний спосіб культивування дозволяє отримати здорову та однорідну популяцію клітин, що зберігають свій потенціал диференціації та є придатними для трансплантацій.

Список літератури:

1. Johansson L., Klinth J., Holmqvist O., Ohlson S. Platelet lysate: a replacement for fetal bovine serum in animal cell culture? //Journal Cytotechnology. - 2003. - Vol. 42, №2. - P.67-74.
2. Dominici M., Blanc K.L., Mueller I., Horwitz E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement //Cytotherapy. - 2006. - Vol. 8. - P. 315-317.
3. Kern S., Eichler H., Stoeve J., Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue //Stem Cells. - 2006. - Vol. 24. - P. 1294-1301.
4. Silva L., Arnold M. In Search of the In Vivo Identity of MesenchymaJ Stem Cells //Stem Cells. - 2008. - Vol. 26. - P. 2287-2299.
5. US 20050059152A1, C12N5/08, 435/372, In vitro culture of mesenchymal stem cells (MSC) and a

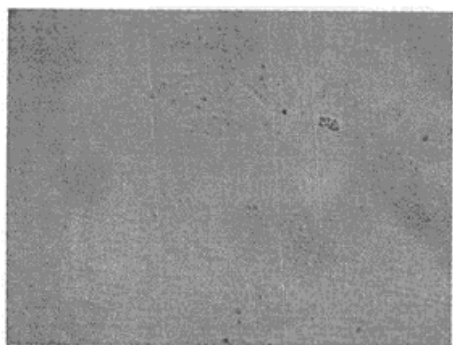
process for the preparation thereof for therapeutic use /V. Tanavde, Mumbai (IN), P. Rai, Mumbai (IN), K. Soli Bharacha, Mumbai (IN); заявник: V. Tanavde, патентовласник: Reliance Life Sciences Pvt. Ltd., Mumbai (IN); - 10/853,077; заявл: 25.05.2004; опубл: 17.03.2005.

6. Прототип: US 20090018962A1, C12N5/06, 424/93.7, Methods and compositions for optimized expansion and implantation of mesenchymal stem cells /C.J. Centeno, C. Keohan; заявник: C.J.

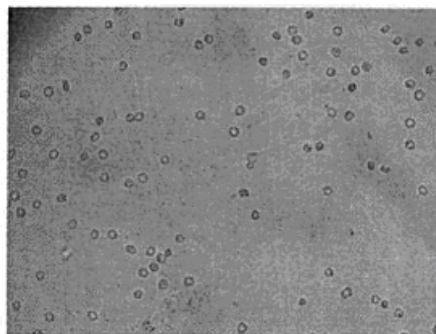
Centeno; патентовласник: C.J. Centeno; - 11/773,774; заявл: 05.07.2007; опубл: 08.01.2009.

7. Secco M., Zucconi E., Cerqueira A., Zatz M. Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord Is Richer than Blood! //Stem Cells. - 2008. - Vol. 26. - P. 146-150.

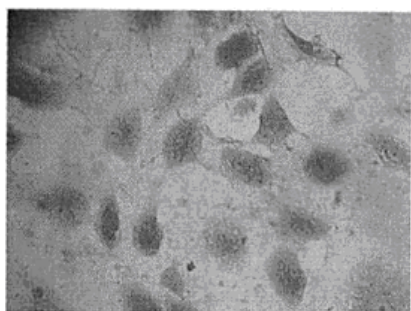
8. Qiao C., Xu W., Zhu W., Hu J., Qian H. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord //Cell Biology International. - 2008. - Vol.32. - P.8-15.



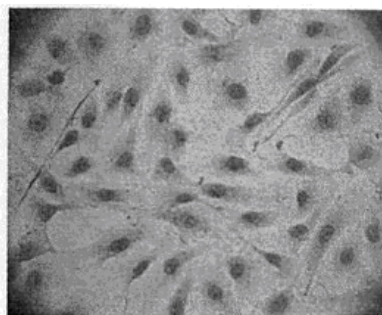
**Мікрофотографія МСК, 0 пасаж (+ЕТС), живі незабарвлені клітини, збільшення ×80.
Fig.1**



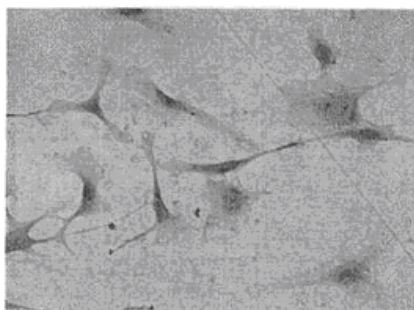
**Мікрофотографія МСК, 0 пасаж (+36ТП), живі незабарвлені клітини, збільшення ×80.
Fig.2**



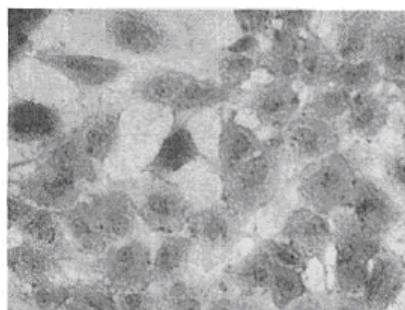
**Мікрофотографія МСК, 1 пасаж (+ЕТС), забарвлення гематоксилін-еозином, збільшення ×80.
Fig.3**



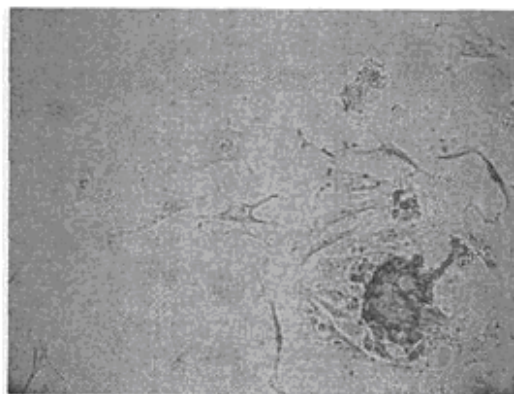
**Мікрофотографія МСК, 1 пасаж (+36ТП), забарвлення гематоксилін-еозином, збільшення×80.
Fig.4**



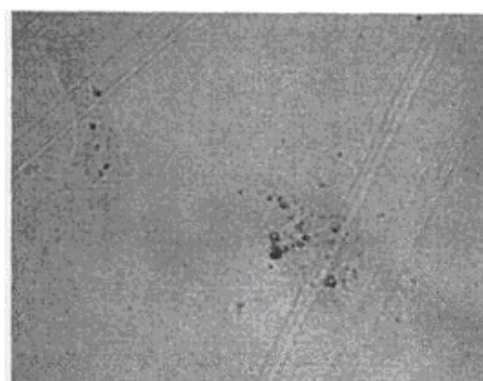
**Мікрофотографія МСК, 5 пасаж (+36ТП), забарвлення гематоксилін-еозином, збільшення ×80.
Fig.5**



**Мікрофотографія МСК, 5 пасаж (+ЕТС), забарвлення гематоксилін-еозином, збільшення ×80.
Fig.6**



**Мікрофотографія МСК, 3 пасаж (+ЕТС), початок хондрогенезу забарвлення альціановим синім, збільшення $\times 80$.
Fig.7**



**Мікрофотографія МСК, 3 пасаж (+ЕТС), початок адипогенезу забарвлення Суданом чорним, збільшення $\times 80$.
Fig.8**