



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **66086** (13) **U**  
(51) МПК (2011.01)  
C12N 5/00ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ**ОПИС**  
**ДО ПАТЕНТУ**  
**НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під  
відповідальність  
власника  
патенту**(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН - ПОХІДНИХ НЕРВОВОГО ГРЕБЕНЯ З БУЛЬБАРНОГО РЕГІОНУ ВОЛОСЯНОГО ФОЛІКУЛА ДОРОСЛИХ ССАВЦІВ**

1

2

(21) u201106227

(22) 18.05.2011

(24) 26.12.2011

(46) 26.12.2011, Бюл.№ 24, 2011 р.

(72) ВАСИЛЬЄВ РОМАН ГЕННАДІЙОВИЧ, РОДНИЧЕНКО АНЖЕЛА ЄВГЕНІВНА, ЛАБУНЕЦЬ ІРИНА ФЕДОРІВНА, БУТЕНКО ГЕННАДІЙ МИХАЙЛОВИЧ  
(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕНЕТИЧНОЇ ТА РЕГЕНЕРАТИВНОЇ МЕДИЦИНИ НАМН УКРАЇНИ"

(57) Спосіб культивування мультипотентних стовбурових клітин - похідних нервового гребеня з бульбарного регіону волосяного фолікула дорослих ссавців, який включає мікрохірургічну ізоляцію бульбарних регіонів та культивування їх на обробленій колагеном поверхні в ростовому середовищі, який **відрізняється** тим, що як базальне середовище використовують DMEM:F12 з додаванням 1 % поживної добавки B27 та 1 % стократного розчину вітамінів MEM з проведенням подальшого субкультивування.

Корисна модель належить до біології та медицини, а саме до клітинної біології, біотехнології та регенеративної медицини, та може бути використана для культивування мультипотентних стовбурових клітин, клітинної терапії та тканинної інженерії.

Нервовий гребінь - транзиторна структура під час ембріонального розвитку, представлена популяцією ектодермальних клітин, які лежать у вигляді тяжів з обох сторін нервової трубки. Мультипотентні стовбурові клітини - похідні нервового гребеня (МСК-ПНГ) характеризуються детермінованою їх походженням пластичністю (здатністю генерувати широкий спектр диференційованих нащадків) та активною міграційною активністю. З огляду на ці властивості, МСК-ПНГ являють собою велими перспективний об'єкт як для вивчення фундаментальних механізмів біології клітини, так і для їх використання в регенеративній медицині.

Відомий спосіб одержання культури МСК-ПНГ з біоптату шкіри дорослих ссавців (Toma J. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin / J. Toma // Nature. - 2001. - Vol. 3. - P. 778-784). Спосіб базується на обробці біоптатів ферментами з наступним культивуванням одержаної клітинної суспензії в пластиковому культуральному посуді з обов'язковим додаванням до складу ростового середовища двох екзогенних факторів росту - основного фактора росту фібробластів та епідермального фактора росту. У цьому випадку фібробласти, меланоцити та кератиноцити ростуть як прикріплені до субстрату клітини, а

МСК-ПНГ формують флотуючі сфери. Утворені сфери переносяться до нового культурального посуду, де культивуються без домішок клітин інших типів.

До недоліків даного методу можна віднести наступне:

1) ферментативну обробку тканини, яка призводить до одержання гетерогенної популяції клітин різного типу та впливає на життєздатність клітин;

2) обов'язкове використання екзогенних факторів росту, що значно збільшує вартість культивування;

3) повільний ріст сфер;

4) значна гетерогенність клітинного складу сфер, з невеликим вмістом власно МСК-ПНГ та великою часткою комітованих та диференційованих клітин.

Останнє обумовлено тим, що культивування стовбурових клітин (СК) у вигляді тривимірних агрегатів імітує процес гістогенезу, тобто відбувається не тільки самовідновлення СК, але і інтенсивна генерація диференційованих нащадків. Також цей спосіб культивування ускладнює морфологічний аналіз, вивчення проліферації та диференціювання клітин.

Також відомий спосіб одержання МСК-ПНГ, який взятий за прототип. Даний спосіб базується на мікрохірургічній ізоляції бульбарних регіонів волосяних фолікулів (ВФ) з наступним їх культивуванням у вигляді експлантатів на обробленій колагеном поверхні в середовищі  $\alpha$ -MEM яке містить 10 % ембріональної телячої сироватки та 5 % ем-

(13) **U**  
(11) **66086**  
(19) **UA**

бріонального курячого екстракту (Sieber-Blum M. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle / M. Sieber-Blum // Dev. Dynamics. -2004. - Vol. 231. - P.258-269). У цьому випадку на третю добу культивування починається інтенсивна еміграція та проліферація МСК-ПНГ. Після отримання достатньої для подальшого культивування кількості клітин експлантати вилучають. Проміжок часу, в який необхідно вилучати експлантати є варіабельним (7-9 діб культивування). Передчасне вилучення експлантатів з первинної культури (5-7 доба) не дозволяє одержати достатню кількість МСК-ПНГ для їх подальшого культивування, а тривале культивування експлантатів значно підвищує ймовірність контамінації культур кератиноцитами.

Однак запропонований авторами спосіб культивування має істотні недоліки:

1) використання трудомісткого в одержанні та нестандартизованого компонента середовища - курячого ембріонального екстракту;

2) ростове середовище, що описане, не є селективним для МСК-ПНГ та підтримує ріст кератиноцитів, що призводить до контамінації культур клітинами даного типу. При цьому критичним моментом для одержання чистих культур МСК-ПНГ є своєчасне вилучення експлантатів у інтервалі часу між еміграцією МСК-ПНГ та початком проліферації кератиноцитів.

В основу запропонованої нами даної корисної моделі поставлено задачу удосконалити спосіб культивування мультипотентних стовбурових клітин - похідних нервового гребеня з бульбарного регіону волоссяного фолікула дорослих ссавців шляхом заміни складу повного ростового середовища з вилученням нестандартизованого компонента (курячого ембріонального екстракту), що дозволить одержувати чисті культури (без контамінації кератиноцитами).

Поставлена задача вирішується тим, що в способі, який включає мікрохірургічну ізоляцію бульбарних регіонів та культивування їх на обробленій колагеном поверхні в ростовому середовищі, згідно з даною корисною моделлю, як базальне середовище використовують DMEM:F12 з додаванням 1 % поживної добавки B27 та 1 % стократного розчину вітамінів MEM.

Новизна даного рішення полягає в тому, що як базальне середовище замість  $\alpha$ MEM автори використовують DMEM:F12 з додаванням замість 5 % курячого ембріонального екстракту 1 % поживної добавки B27 та 1 % стократного розчину вітамінів MEM, що дозволяє одержати чисті культури (без контамінації кератиноцитами). Крім того, з його

складу вилучається складний в отриманні та нестандартизований компонент (курячий ембріональний екстракт).

Спосіб здійснюється наступним чином.

Ізоляція ВФ та одержання експлантатів бульбарного регіону здійснюється згідно з методом M. Sieber-Blum (Sieber-Blum M. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle / M. Sieber-Blum // Dev. Dynamics. - 2004. - Vol. 231. - P.258-269.). Експлантати поміщають у покритий колагеном культуральний посуд. Після прикріплення експлантатів протягом години їх заливають повним ростовим середовищем. При цьому, дане ростове середовище містить базальне середовище DMEM:F12, 10 % ембріональної телячої сироватки, 1 % поживної добавки B27 (за формулою Bottenstein and Sato; Bottenstein J.E. Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium / J.E. Bottenstein and G.H. Sato // PNAS. - 1979. - Vol.76. - P. 514-517.) та 1 % стократного розчину вітамінів MEM.

Через добу проводиться заміна половини середовища. В подальшому ростове середовище змінюють 2-3 рази на тиждень в залежності від швидкості росту культури.

Через 48-72 години після початку культивування спостерігається міграція клітин з експлантату. Первинна культура росте 11 діб до отримання кількості клітин, достатньої для подальшого субкультивування. Після цього експлантати вилучають та клітини пересівають в покритий колагеном культуральний посуд. В подальшому культуру (у міру досягнення субконфлюентного стану) пасерують з коефіцієнтом 1:10. За місяць культивування з одного бульбарного експлантату одержують до 50 млн. клітин (3-й пасаж). Клітини добре ростуть включно до 15-го пасажу. При цьому за морфологічними ознаками, міграційною активністю та проліферативному потенціалу клітини, які вирощують при даному способі культивування відповідають МСК-ПНГ з бульбарного регіону волоссяного фолікула, які були описані раніше.

Таким чином, як видно з табл., використання запропонованого способу дозволяє відтворювати одержувати чисті культури МСК-ПНГ від експериментальних тварин різних ліній та віку.

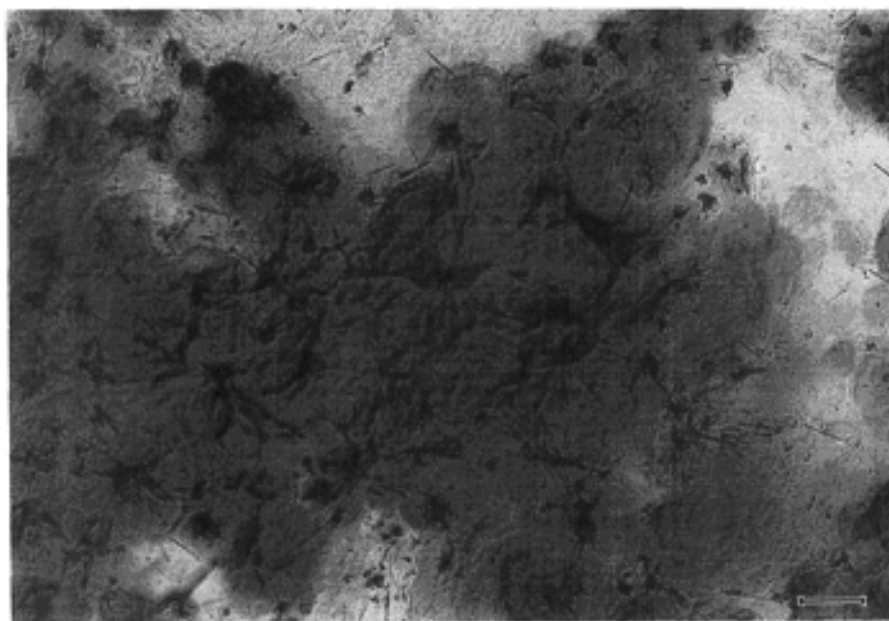
МСК-ПНГ характеризуються значним проліферативним потенціалом, здатністю до росту за умов клональної щільності та самовідновленням при їх субклонуванні. Мультипотентність даного типу клітин була підтверджена їх здатністю до диференціювання у остеогенному та адипогенному напрямках (Фіг. 1, 2).

Таблиця

Отримання культур МСК-ПНГ з бульбарного регіону волосяного фолікула мишей різних ліній та віку

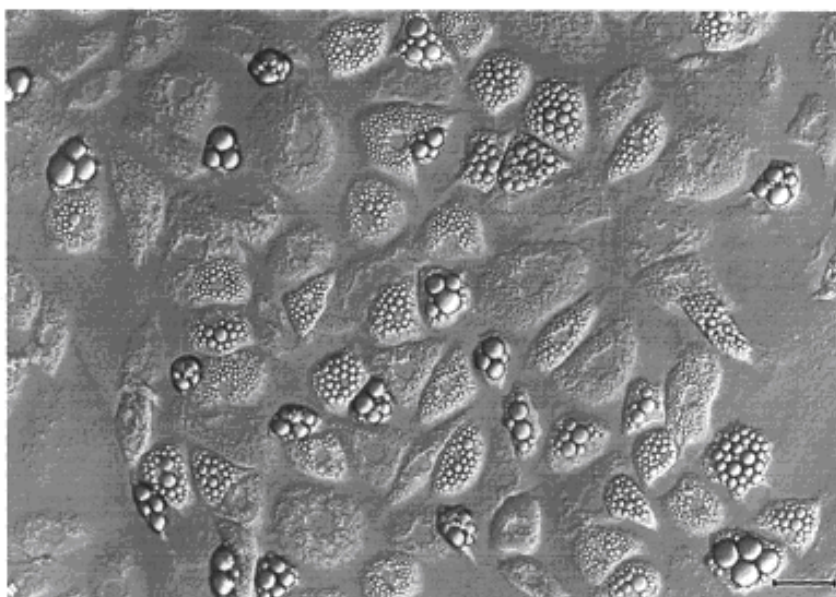
Лінія мишей	Вік (міс)	Кількість днів перебування експлантатів в первинній культурі	Кількість експлантатів	Кількість експлантатів, які дали ріст МСК-ПНГ*	Кількість експлантатів, які дали ріст кератиноцитам
СВА	3	11	20	20	0
СВА	6	11	15	14	0
СВА	12	11	20	17	0
FVB	3	11	20	20	0
FVB	6	11	21	19	0
FVB	12	11	15	12	0
C57b1/6	3	11	21	21	0

\* Відсутність росту пов'язана або з відкріпленням експлантату на початку культивування, або зі значним пошкодженням бульбарного регіону під час ізоляції.



Остеогенне диференціювання МСК-ПНГ. x100, фарбування Alizarine Red S.

**Фіг.1**



Адипогенне диференціювання МСК-ПНГ. x100, фазовий контраст.

**Fig.2**