



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **79270** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
C12N 5/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	а 2011 13698	(72) Винахідник(и):	Гольцев Анатолій Миколайович (UA), Дубрава Тетяна Георгіївна (UA), Рассоха Ірина Вікторівна (UA), Останкова Людмила Василівна (UA), Останков Максим Вадимович (UA), Гордієнко Євген Олександрович (UA), Сафонов Володимир Йосипович (UA), Зикова Анна Веніаміновна (UA)
(22) Дата подання заявки:	21.11.2011		
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	25.04.2013		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.05.2012, Бюл.№ 9	(73) Власник(и):	ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.04.2013, Бюл.№ 8		

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОVBУРОВИХ КЛІТИН

(57) Реферат:

Спосіб культивування мезенхімальних стовбурових клітин передбачає внесення клітин кісткового мозку у ростове середовище, культивування на підкладці з покриттям, одержання первинної культури МСК і її пасивування. Як покриття використовують оксид алюмінію (Al_2O_3) із шорсткістю 20 нм.

UA 79270 U

Корисна модель належить до експериментальної медицини і може бути використана для одержання мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) із заданим функціональним потенціалом, зокрема імуносупресивною активністю, для подальшого застосування в клінічній практиці.

МСК, завдяки здатності до самовідновлення, мультилінійного диференціювання і прояву імунорегуючих властивостей, привертають увагу фахівців в галузі клітинної біології, експериментальної і клінічної медицини. Особлива увага звертається на імуносупресивну активність цих клітин, що вже знайшло своє відображення в дослідженнях, що стосуються терапії різних захворювань [1].

Експериментальне і наступне клінічне застосування МСК вимагає розробки нових і удосконалення традиційних методів їхнього культивування, що дозволяють не тільки зберегти морфо-функціональні властивості клітин, але й одержати їх у кількості, необхідній для медичного використання.

Відомий спосіб культивування МСК людини на пластикових культуральних підкладках [2] протягом декількох циклів (приблизно 40 діб) до одержання ефективної терапевтичної дози (5×10^7 - 10^8 кл.).

Недоліком способу є тривалий період часу, необхідний для одержання біомаси клітин, що потребується. Велика імовірність того, що тривале культивування може привести до спонтанної трансформації МСК, у результаті якої вони придбають онкогенний потенціал.

Відомий спосіб культивування МСК людини шляхом тривалого пасивування на матрацах до виділення однорідної по фенотипічних маркерах CD45⁻, CD34⁻, CD44⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD106⁺ популяції [3].

Недоліком даного способу є той факт, що він не дозволяє після тривалої експансії in vitro одержувати МСК, які б зберігали хомінг-потенціал при введенні в організм [4].

Відомий спосіб культивування МСК людини на пластику [5] з додаванням у середовище культивування фактора росту фібробластів-2 (FGF-2), що інгібує спонтанне диференціювання МСК і скорочує тимчасові параметри одержання потрібної терапевтичної дози.

Недоліком такого способу є необхідність додавання в середовище культивування FGF-2, що може змінити їх потенціал диференціювання [6]. Крім того, вимагає додаткових фінансових вкладень.

Відомий спосіб культивування МСК на пластику [7], що полягає у виділенні морфологічно однорідної популяції протягом послідовних пасажів (до 7-й пасажів).

Недоліком даного способу культивування МСК є те, що вже після 3-го пасажу відзначається зниження коефіцієнта приросту і перевага клітинної загибелі над проліферацією, а також спонтанне остео- і адипо-диференціювання.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб культивування МСК пацієнтів [8]. Згідно зі способом КМ, одержаний зі стегнових кісток безпородних пацієнтів, вносять в ростове середовище, яке використовують для культивування клітин пацієнтів α -MEM або DMEM з 10 % ембріональної телячої сироватки (ЕТС) і поміщають на підкладки (пластикові флакони або чашки Петрі), покриті желатином. Через 2 доби перебування в CO₂-інкубаторі при 37 °C здійснюють заміну середовища, видаляючи клітини, що не прикріпилися. При досягненні 80-90 % моношару первинну культуру пересівають. Пасивування роблять з щільністю посадки $1,5 \times 10^3$ кл/см². Середовище змінюють через кожні 3 доби. Трипсинізацію при пасивуванні проводять розчином, що містить 0,02 % трипсину і 0,05 % ЕДТА.

Недоліком способу є те, що він не забезпечує стимуляції функціонального потенціалу МСК [8, стор. 43].

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити відомий спосіб культивування МСК шляхом заміни покриття підкладки, що забезпечить стимуляцію функціонального потенціалу МСК.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі культивування МСК, що передбачає внесення клітин КМ у ростове середовище, культивування на підкладці з покриттям, одержання первинної культури МСК і її пасивування, який відрізняється тим, що як покриття використовують оксид алюмінію (Al₂O₃) із шорсткістю 20 нм.

Використання покриття Al₂O₃ із шорсткістю 20 нм замість желатинового забезпечує стимуляцію функціонального потенціалу МСК: коефіцієнт приросту після 1-ого пасажу підвищується в 1,6 разу, після 2-ого пасажу-у 1,9 разу.

Спосіб пояснюється наступними прикладами.

Приклад 1.

Для одержання МСК клітини кісткового мозку (КМ) виділяли зі стегнових кісток мишей лінії СВА/Н робочим середовищем 199 з додаванням 3 % ЕТС і 2 % цитрату натрію. Однорідну суспензію клітин одержували шляхом багаторазового пропущення через голки зменшеного

діаметру (0,8-0,5 мм), а потім через капроновий фільтр для видалення конгломератів. Виділені клітини вносили в ростове середовище Iscov c 10 % ETC, 100 од./мл пеніциліну, 100 од./мл стрептоміцину і культивували на скляних підкладках (чашки Петрі, d-3 см) з покриттям Al_2O_3 із шорсткістю 20 нм і без нього (контроль). Щільність посіву складала $0,5-1 \times 10^6$ кл/см².

Через 2 доби культивування визначали відсоток клітин КМ, що прикріпилися (адгезивний потенціал) на склі з покриттям Al_2O_3 і без нього. Клітини КМ культивували протягом 18-20 діб. Заміну ростового середовища робили кожні 3 доби до досягнення субконфлюентного моношару, потім культуру виводили на 1-ий пасаж. Пасивування МСК здійснювали при щільності посіву $0,5-1 \times 10^4$ кл/см². Наприкінці кожного пасажу клітини знімали розчином трипсин-ЕДТА (Sigma) за стандартною методикою [9], інактивували середовищем, що містить 10 % ETC, робили відмивання і підрахунок.

Наприкінці кожного пасажу визначали функціональний потенціал МСК (адгезивна здатність; коефіцієнт приросту МСК; вміст транскриптів гена індоламін-2,3-діоксигенази (ідо) методом ЗТ-ПЛР; фенотипічні характеристики з використанням моноклональних антитіл, мічених флуоресцеїнізотіоціанатом (FITC) або фікоєритрином (PE) (BD Bioscience, США), до маркерів CD73, CD 106, CD90, CD44 на проточному цитофлюориметрі FACS Calibur (Becton Dickinson, США). Результати наведені в табл. 1. З табл. 1 видно, що при культивуванні МСК на склі з Al_2O_3 коефіцієнт їхнього приросту вірогідно вище в порівнянні з відповідним пасажем на склі без покриття.

Імуномодулюючий потенціал МСК визначається геном ідо, експресія якого супроводжується наростом ферменту індоламін 2, 3-діоксигенази (ІДО), що бере участь в активації супресорної ланки імунітету [11]. Виходячи з цього, була проведена оцінка вмісту транскриптів гена ідо в МСК, що культивували на різних підкладках (скло з покриттям Al_2O_3 і без) у залежності від пасажу. Було відзначено збільшення вмісту транскриптів гена ідо після культивування МСК на Al_2O_3 у порівнянні з МСК, що культивували на склі: після 1-ого пасажу в 3,6 разу і після 2-ого - у 7 разів. Слід зазначити і той факт, що ступінь експресії досліджуваного гена в МСК, що культивували на склі без покриття, на 2-ому пасажі знижувався в 2 рази, тоді як на склі з Al_2O_3 - зберігався на досить високому рівні.

Подібна ситуація спостерігалася і при ідентифікації фенотипічних маркерів, характерних для МСК. Кількість CD73^+ і CD106^+ клітин, що володіють найбільшим потенціалом до проліферації [10], отриманих при пасивуванні на Al_2O_3 , було також вірогідно вище, ніж на склі. Цей факт переконливо свідчить про здатність покриття Al_2O_3 із шорсткістю 20 нм селективно збагачувати культури КМ клітинами, що експресують маркери МСК.

Збільшення вмісту транскриптів гена ідо в клітинах, що культивували на Al_2O_3 , є закономірним, оскільки збільшується вміст клітин з фенотипічними маркерами МСК, а саме вони в гетерогенній популяції КМ є продуцентами ІДО. Даний факт свідчить про вплив покриття на функціональний потенціал МСК, зокрема, по виробленню ІДО, що визначає їх імуносупресивну активність,

Приклад 2

Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що культивування проводили на скляній підкладці, покритою Al_2O_3 з різною шорсткістю: 20, 200 і 400 нм (табл. 2).

Шорсткість 20 нм була вибрана, виходячи з того, що скло має приблизно таку ж топографію поверхні. При культивуванні МСК на Al_2O_3 із шорсткістю 20 нм була відзначена тенденція до збільшення відсотка адгезії в порівнянні з контролем ($7,19 \pm 0,8$ % - Al_2O_3 ; $7,07 \pm 0,4$ % - контроль), збільшення шорсткості приводило до достовірного зниження даного показника в 1,5 і 1,8 разу, відповідно.

Приклад 3

Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що паралельно культивування МСК проводили на пластику з покриттям Al_2O_3 та желатином і на склі з желатином. Достовірних відмінностей у коефіцієнті приросту МСК на пластику з Al_2O_3 у порівнянні з культивуванням на склі з Al_2O_3 ми не спостерігали (табл. 3). Даний факт говорить про те, що матеріал підкладки не впливає на функціональний потенціал МСК. Однак як підкладку нами було вибране скло, виходячи з необхідності стерилізації культуральної посудини при 220 °C, що для пластика є неприйнятним.

Культивування МСК на желатиновому покритті як на склі, так і на пластику не приводило до стимуляції їхнього функціонального потенціалу, у той час як культивування на цих підкладках з Al_2O_3 стимулювало функціональний потенціал МСК: коефіцієнт приросту після 1-ого пасажу збільшувався в 1,6 разу; після 2-ого пасажу - у 1,9 разу.

На підставі отриманих результатів можна зробити висновок, що запропонований спосіб культивування МСК на покритті Al_2O_3 із шорсткістю 20 нм забезпечує стимуляцію їх

функціонального потенціалу (проліферативна і імуносупресивна активності), при цьому він дозволяє протягом 2-ох пасажів одержати збагачену по фенотипічних маркерах популяцію МСК, що надалі може бути базисом для розшифрування їхнього терапевтичного ефекту з метою розширення спектра клінічного застосування.

5

Таблиця 1

Показники, що характеризують структурно-функціональний стан МСК.

Підкладка	Пасаж	Коефіцієнт приросту МСК, абс. од.	Вміст транскриптів гена <i>ido</i> , нг/мл	Фенотипічні маркери МСК, %			
				CD73 ⁺ клітини	CD106 ⁺ клітини	CD90 ⁺ клітини	CD44 ⁺ клітини
Скло (контроль)	1	2,07±0,25	0,46±0,02	15,28±2,35	19,18±2,00	24,45±3,28	64,02±
	2	2,31±0,15	0,24±0,01	30,86±4,63	33,56±2,25	78,66±5,25	85,12±7,25
Скло + Al ₂ O ₃ (шорсткість, 20 нм)	1	3,12±0,12*	1,67±0,03*	22,89±3,14*	27,18±1,05*	25,92±1,69	66,35±4,43
	2	4,26±0,37*	1,75±0,04*	44,95±5,25*	44,33±3,37*	80,15±6,25	88,56±7,82

Примітка: * результати мають достовірні відмінності в порівнянні контрольними показниками відповідного пасажу (P≤0,05).

Таблиця 2

Адгезивний потенціал клітин на скляній підкладці, що покрита Al₂O₃ з різною шорсткістю.

Підкладка	Адгезія, %
Скло (контроль)	7,07±0,4
Скло + Al ₂ O ₃ (шорсткість 20 нм)	7,19±0,8
Скло + Al ₂ O ₃ (шорсткість 200 нм)	4,84±1,8*
Скло + Al ₂ O ₃ (шорсткість 400 нм)	3,94±1,2*

Примітка: * результати мають достовірні відмінності в порівнянні з контрольним показником (P≤0,05).

Таблиця 3

Коефіцієнт приросту МСК при культивуванні		на різних покриттях.
Підкладка	Пасаж	Коефіцієнт приросту МСК, абс. од.
Скло (контроль)	1	2,07±0,25
	2	2,31±0,15
Скло + Al ₂ O ₃	1	3,12±0,12*
	2	4,26±0,37*
Скло + желатин	1	1,90±0,18
	2	2,12±0,16
Пластик (контроль)	1	1,96±0,20
	2	2,21±0,10
Пластик + Al ₂ O ₃	1	3,08±0,12*
	2	3,98±0,32*
Пластик + желатин	1	1,89±0,24
	2	2,08±0,14

Примітка: * результати мають достовірні відмінності в порівнянні з контрольним показником кожної підкладки відповідного пасажу (P≤0,05).

Джерела інформації:

1. Dazzi F. A., M. Jacob, van Laar, A. Cope. Cell therapy for autoimmune diseases // *Arthritis Res Ther.*-2007. - Vol. 9, № 2. - P. 206-212.

2. Патент РФ 2323252, МПК C12N 5/08, Публикация 27.04.2008. Способ культивирования мезенхимальных стволовых клеток человека *ex vivo*.

3. Патент РФ 2303632, МПК C12N 5/06, Публикация 27.07.2007. Способ получения мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга млекопитающих и популяция популяция мезенхимальных стволовых клеток, полученная этим способом.

4. Lee RH, Hsu SC, Munoz J., et al. A subset of human rapidly-self renewing marrow stromal cells (MSCs) preferentially engraft in mice // *Blood.*-2006. - Vol. 107. - P. 2153-2161.

5. Banfi A., MuragHa A., Dozin B., et al., Proliferation kinetics and differentiation potential of *ex vivo* expanded human bone marrow stromal cells: Implication for their use in cell therapy // *Exp. Haematol.*-2000. - Vol. 28. - P. 707-715.

6. Kopen G.C., Prockop D.J., Phinney D.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*-1999. - Vol. 96. - P. 10711-10716.

7. Сергеева Н.С., Свиридова И.К., Кирсанова В.А. и др. Исследование параметров роста и возможностей дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга крысы в экспериментах *in vitro* // *Клеточные технологии в биологии и медицине.*-2006. - № 2. - С. 102-107.

8. Анохина Е.Б., Буравкова Л.Б. Гетерогенность стромальных клеток-предшественников, выделенных из костного мозга крыс // *Цитология.*-2007. - Т. 49, № 1. С. 40-47.

9. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P. G... Bone marrow stromal cells: nature, biology and potential applications // *Stem Cells.*-2001. - Vol. 19. - P. 180-192.

10. Романов Ю.А., Даревская А.Н., Кабаева Н.В., Антонова О.А. Выбор оптимальных условий культивирования мезенхимальных клеток-предшественников костного мозга и жировой ткани человека // *Клеточные технологии в биологии и медицине.*-2006. - №4. - С. 206-211.

11. Mellor A.L., Chandler P., Kook L.G. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase, immunosuppression and pregnancy // *Journal of Reproductive Immunology.*-2002. Vol. 57. - P. 143-150.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб культивування мезенхімальних стовбурових клітин, що передбачає внесення клітин кісткового мозку у ростове середовище, культивування на підкладці з покриттям, одержання первинної культури МСК і її пасивування, який **відрізняється** тим, що як покриття використовують оксид алюмінію (Al_2O_3) із шорсткістю 20 нм.