

Корисна модель належить до галузей біотехнології та фармакології та може бути використана для отримання мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) для наукових досліджень та здійснення біотехнологічних процесів.

Культури МСК застосовують у доклінічних та клінічних дослідженнях як модельні об'єкти при розробці та оцінці ефективності лікарських засобів, а також у біотехнологічних процесах як продуцент біологічно активних речовин. МСК виділяють з декількох джерел, а саме зі шкіри, жирової тканини, кісткового мозку та Вартонових драглів сполучної тканини пупкового канатика (ВД-МСК). Підвищений попит на ВД-МСК в галузях біотехнології, фармакології та наукових дослідженнях зумовлений їх високою здатністю до проліферації, диференціювання та синтезу біологічно активних речовин порівняно з іншими типами МСК. В той же час, пупковий канатик (або пуповина), що є сировиною для отримання ВД-МСК, є обмеженим ресурсом, який отримують за згодою донорів. Тому актуальною є задача збільшення кількості МСК, які можна отримати з Вартонових драглів (ВД) пупкового канатика одного донора.

Відомий спосіб виділення МСК з ВД пуповини людини [Цимбалюк В.І. Фенотипові зміни і проліферативний потенціал мезенхімальних стовбурових клітин з вартонових драглів пуповини людини в умовах культивування/В.І. Цимбалюк, О.Г. Дерябіна, Н.С. Шувалова, О.О. Маслова, Я.О. Похолоenko, О.К. Топорова, С.П. Шпильова, В.М. Кирик, Л.Д. Пічкур, Ю.А., Пічкур О.Л., Кордюм В.А. Касяненко/Український нейрохірургічний журнал. - 2015. - № 2. - С. 17-2], який включає відокремлювання ВД від пупкового канатика, подрібнення ВД ножицями на фрагменти розміром (1-5) мм, розміщення фрагментів у флаконах з поживним середовищем альфа-МЕМ з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки (далі - ЕТС) та культивування в CO₂-інкубаторі (5 % CO₂) за температури 37 °C протягом 7-14 діб.

Недоліком даного способу є низька кількість МСК, яку можна отримати з Вартонових драглів пупкового канатика одного донора через втрату клітин, які не мігрували з фрагментів ВД.

Відомий спосіб виділення мезенхімальних стовбурових клітин з Вартонових драглів [патент US20160194609A1, МПК C12N 5/0775(2010.01), A01N/02 (2006.01), C12N 5/073 (2010.01), A61K 35/51], згідно з яким фрагменти пуповини переносять в центрифужні пробірки об'ємом 50 мл, що містять буферний розчин антибіотику та антимікотику, інкубують протягом ночі за температури 37 °C, після чого тричі промивають буфером по 2 хвилини, переносять в центрифужні пробірки об'ємом 50 мл, що містять 15 мл розчину колагенази типу IV 4 мг/мл в модифікованому середовищі KO-DMEM (Knockout-Dulbecco's Modified Eagle Medium), подрібнюють за допомогою ножиць на фрагменти розміром 2 мм, інкубують за температури 37 °C та струшуванні протягом ночі, після чого додають 2 мл 0,05 % розчину трипсину, інкубують 10 хвилин, потім додають рівний об'єм середовища, що містить 95 % KO DMEM і 5 % ЕТС для нейтралізації дії ферментів, центрифугують при 1800 об/хв протягом 5 хвилин за температури 18 °C, видаляють верхню водну фазу суміші, проціджують желеподібний розчин (що містить фрагменти ВД) за допомогою фільтра з діаметром пор 100 мкм у центрифужні пробірки об'ємом 50 мл, додають рівний до об'єму отриманого фільтрату об'єм повного культурального середовища (ПКС), яке містить 73 % KO DMEM, 20 % ЕТС, антибіотики і антимікотик, і центрифугують при 1800 об/хв протягом 5 хвилин. Отриманий осад ресуспендують у 5 мл ПКС, культивують у флаконах для культивування клітин з площею поверхні 25 см² у CO₂-інкубаторі (5 % CO₂) за температури 37 °C протягом 14 діб, замінюючи середовище на свіже ПКС кожні 2 доби.

Недоліком даного способу є низька кількість МСК, яку можна отримати з пупкового канатика одного донора, оскільки даний спосіб не включає етап адаптації МСК до умов культивування та їх міграцію з фрагментів ВД на поверхню флакона з ПКС.

Як найближчий аналог вибрано спосіб виділення мезенхімальних стовбурових клітин з Вартонових драглів [Zheng S., Gao Y., Chen K., Liu Y., Xia N., Fang F. A Robust and Highly Efficient Approach for Isolation of Mesenchymal Stem Cells From Wharton's Jelly for Tissue Repair//Cell Transplant 2022 Jan-Dec:31:9636897221084354. doi: 10.1177/09636897221084354], який включає подрібнювання зразка тканини ВД на фрагменти 1-2 мм, замочування в культуральному середовищі, що складається з DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12), доповненого 20 % ЕТС, 300 од/мл пеніциліну і 300 мг/мл стрептоміцину протягом 7 діб, перенос фрагментів ВД до пробірки, додавання розчину суміші колагеназ II, III і VI типів (2 мг/мл) і ДНКази I (0,1 мг/мл), інкубацію за температури 37 °C протягом 1,5 год. при перемішуванні, фільтрування через фільтр з діаметром пор 40 мкм, промивання клітин тричі буферним розчином для повного видалення ферментів, центрифугування при 700 g, ресуспендування осаду клітин в 10 мл культурального середовища, культивування в чашці Петрі діаметром 100 мм для культур тканин, покритій 0,2 % желатином, у CO₂-інкубаторі (5 % CO₂) за температури 37 °C протягом 7 діб із заміною середовища кожні 3 доби.

Недоліком даного способу є низька кількість МСК, яку можна отримати з ВД пупкового канатика одного донора, оскільки даний спосіб забезпечує лише адаптацію клітин в складі ВД до умов культивування протягом 7 діб замочування у культуральному середовищі, і не створює достатніх умов для виселення, прикріплення і міграції клітин з фрагментів ВД на культуральну поверхню флакона в цей період.

В основу корисної моделі поставлена задача усунути вище наведені недоліки, що дозволить збільшити кількість мезенхімальних стовбурових клітин до 50-60 %, яку можна ізолювати з ВД пупкового канатика одного донора.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі виділення мезенхімальних стовбурових клітин з Вартонових драглів сполучної тканини пупкового канатика включає отримання тканини ВД зі сполучної тканини пупкового канатика, подрібнення ВД на фрагменти розміром 0,5-2,0 мм, розміщення їх на поверхні культурального флакона, додавання до нього повного культурального середовища, культивування фрагментів ВД у CO₂-інкубаторі з 5 % CO₂ за температури 37 °С протягом 7 діб, їх ферментативну обробку, нейтралізацію дії ферменту шляхом додавання ПКС в співвідношенні 1:5 до ферментного розчину, культивування виділених клітин в ПКС у CO₂-інкубаторі з 5 % CO₂ за температури 37 °С протягом 7 діб, відокремлення від поверхні культурального флакона мезенхімальних стовбурових клітин, згідно з корисною моделлю, попередньо поверхню культурального флакона покривають шаром розчину желатину з концентрацією 2 г/л, а як ПКС використовують середовище у наступному складі: ембріональна теляча сироватка - 20 %, розчин пеніциліну (10000 од/мл) - 1 %, розчин стрептоміцину (10000 мг/мл) - 1 %, середовище МЕМ альфа-модифікація - 78 %, та ферментативну обробку проводять інкубацією 1 г фрагментів ВД в 3-5 мл розчину трипсину з концентрацією 0,5 г/л протягом 5 хв за температури 37 °С, після чого їх культивують разом з виділеними клітинами в 3-10 мл ПКС на 1 г фрагментів ВД з заміною ПКС кожні три доби та видаляють, а відокремлення мезенхімальних стовбурових клітин проводять трипсинізацією.

Вкриття поверхні флакона розчином желатину забезпечує прикріплення фрагментів ВД до поверхні флакона, а також створює умови для міграції та прикріплення МСК до поверхні флакона.

Культивування протягом 7 діб у повному культуральному середовищі з додаванням 20 % (ЕТС) дозволяє МСК, що містяться у фрагментах ВД, адаптуватися до умов культивування, крім того дозволяє частині МСК мігрувати з фрагментів ВД на вкрити желатином поверхню флакона та прикріплюватися до неї.

Додавання розчину трипсину забезпечує гідроліз матриксу ВД для вивільнення МСК з фрагментів ВД, а також зняття МСК, що вже мігрували на поверхню флакона. Використання лише одного ферменту, а саме трипсину, замість набору з кількох ферментів і скорочення тривалості ферментативної дії на фрагменти ВД та МСК до 5 хв забезпечує зменшення пошкоджуючого впливу на мембранні структури клітин, та, відповідно, підвищення кількості виділених МСК.

Додавання середовища з вмістом ЕТС забезпечує інгібування трипсину для попередження його негативного впливу на життєздатність МСК.

Ресуспендування осаду МСК разом з обробленими трипсином фрагментами ВД та їх подальше культивування забезпечує подовшення на 7 діб періоду міграції МСК з фрагментів ВД на поверхню флакона для культивування. Обробка фрагментів ВД трипсином стимулює міграцію МСК протягом періоду їх культивування.

В таблиці наведено кількість життєздатних клітин ВД, виділених відомими способами та способом, що запропоновано.

Таблиця

Спосіб ізоляції ВД-МСК	Аналог 1 (Цимбалюк В.І.)	Аналог 2 (US20160194609A1)	Найближчий аналог	Спосіб, що запропоновано
Кількість клітин, виділених з 1 г ВД	1,7×10 ⁶	1,8×10 ⁶	2,3 × 10 ⁶	4,2×10 ⁶

Спосіб виділення мезенхімальних стовбурових клітин з ВД сполучної тканини пупкового канатика ілюструється прикладом.

Приклад. Виділення ВД-МСК з пупкового канатика, взятого від донора.

Для виділення МСК беруть пупковий канатик, від якого відокремлюють кровоносні судини, отримуючи сполучну тканину, яка містить Вартонові драгли. У флакон для культивування клітин з площею поверхні 25 см додають 0,5 мл розчину желатину з концентрацією 2 г/л, витримують 3 години за кімнатної температури, після чого відбирають надлишок розчину за допомогою піпетки Пастера. Фрагмент ВД, масою 1 г, подрібнюють хірургічними ножицями на фрагменти розміром 0,5-2,0 мм, розкладають на внутрішню поверхню флакона для культивування клітин та додають до флакона 3 мл повного культурального середовища МЕМ альфа-модифікація, що містить 20 % ембріональної телячої сироватки та 100 од/мл пеніциліну і 100 мг/мл стрептоміцину. Флакони з фрагментами ВД поміщають у CO₂-інкубатор (CO₂-5 %) і культивують протягом 7 діб за температури 37 °С, після чого

видаляють компоненти ПКС і додають 2 мл розчину трипсину з концентрацією 0,5 г/л, інкубують протягом 5 хв за температури 37 °С та додають 0,4 мл ПКС. Отриману суспензію МСК та фрагменти ВД переносять з флакона у центрифужну пробірку об'ємом 15 мл, центрифугують 7 хв за 700 обертів за хвилину, осад МСК та фрагментів ВД ресуспендують в 3 мл ПКС та переносять у флакон для культивування клітин і культивують протягом 7 діб із заміною ПКС кожні 3 доби, після чого видаляють фрагменти ВД, видаляють компоненти ПКС, МСК знімають з поверхні додаванням 2 мл розчину трипсину (0,5 г/л). Після інкубації протягом 5 хв за температури 37 °С трипсин інгібують, додаючи 0,4 мл ПКС. Клітини осаджують центрифугуванням протягом 7 хв за 700 обертів за хвилину, осад ресуспендують в 1 мл ПКС.

У отриманій суспензії підраховують кількість життєздатних клітин за допомогою світлового інвертованого мікроскопа (CETI, Нідерланди) та камери для підрахунку клітин (2-х секційна камера Горяєва) (Таблиця).

Для оцінки здатності до спрямованого диференціювання ВД-МСК культивують в індукуючих остеогенному та адипогенному середовищах в CO₂-інкубаторі (37 °С, 5 % CO₂) протягом 21 доби із заміною середовищ на відповідні свіжі кожні 3 доби. Після закінчення періоду культивування клітини відмивають від компонентів індукуючих середовищ, додають буферний розчин формаліну (10 %, об./об), витримують з метою фіксації клітин протягом 30 хв за температури 4 °С, промивають дистильованою водою і проводять оцінку остеогенезу та адипогенезу.

Для оцінки остеогенного диференціувального потенціалу до лунок планшета з фіксованими препаратами культур ВД-МСК додають розчин барвника Alizarin Red S (1 %, об./об.), інкубують 2 хв за кімнатної температури та промивають дистильованою водою.

Для оцінки адипогенного диференціувального потенціалу фіксовані препарати культур ВД-МСК промивають водним розчином ізопропанолу (60 %, об./об.), додають до лунок свіжоприготований розчин барвника Oil Red O (30 мг/мл в 60 % ізопропанолі), витримують 1 годину за кімнатної температури та промивають дистильованою водою.

Забарвлення клітин барвниками оцінюють візуально за допомогою світлового інвертованого мікроскопа (CETI, Нідерланди).

На 21-у добу остеогенної індукції візуально виявляють забарвлення індукованих культур за допомогою барвника Alizarin Red S в червоний колір, що підтверджує факт накопичення кальцію, на підставі чого роблять висновок про наявність остеогенного диференціувального потенціалу у МСК, ізольованих з ВД способом, що заявляється.

На 21-у добу адипогенної індукції відмічають наявність ліпідних включень в цитоплазмі клітин, які забарвлюються барвником для виявлення нейтральних ліпідів Oil Red O. Це свідчить про наявність адипогенного диференціувального потенціалу у МСК, ізольованих з ВД способом, що заявляється.

Розроблено спосіб виділення мезенхімальних стовбурових клітин з Вартонових драглів сполучної тканини пупкового канатика, що дозволив збільшити кількість мезенхімальних стовбурових клітин до 50-60 %, яку можна ізолювати з ВД пупкового канатика одного донора.