



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 157237

(13) U

(51) МПК

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

C12N 5/095 (2010.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2024 01536	(72) Винахідник(и): Петренко Олександр Юрійович (UA), Труфанова Наталя Анатоліївна (UA), Труфанов Олег Вікторович (UA), Прокопюк Володимир Юрійович (UA), Губеня Олександра Сергіївна (UA), Оберемок Руслана Андріївна (UA), Ревенко Олена Борисівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 25.03.2024	
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 19.09.2024	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 18.09.2024, Бюл.№ 38	(73) Володілець (володільці): ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015 (UA)

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОVBУРОВИХ КЛІТИН З ВАРТОНОВИХ ДРАГЛІВ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ ПУПКОВОГО КАНАТИКА**(57) Реферат:**

Спосіб виділення мезенхімальних стовбурових клітин з вартонових драглів (ВД) 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 (ПКС), культивування фрагментів ВД у CO₂-інкубаторі з 5 % CO₂ за температури 37 °C 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 °C протягом 7 діб, відокремлення від поверхні культурального флакона мезенхімальних стовбурових клітин. Попередньо поверхню культурального флакона покривають шаром розчину желатину з концентрацією 2 г/л. Як ПКС використовують середовище у наступному складі: ембріональна теляча сироватка - 20 %, розчин пеніциліну (10000 од/мл) - 1 %, розчин стрептоміцину (10000 мг/мл) - 1 %, середовище MEM альфа-модифікація - 78 %. 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 °C. Після цього їх культивують разом з виділеними клітинами в 3-10 мл ПКС на 1 г фрагментів ВД з заміною ПКС кожні три доби та видаляють. Відокремлення мезенхімальних стовбурових клітин проводять трипсинізацією.

UA 157237 U

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 °С 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 °С, 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 °С 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 °С, 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 °С 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 °С 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 °С 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 достатні умови 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 °C 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 °C 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 стрептомицину (10000 мг/мл) - 1 %, середовище MEM 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 °C, 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 вкриту 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	$1,7 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$

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 °C, після чого видаляють компоненти ПКС і додають 2 мл розчину трипсину з концентрацією 0,5 г/л, інкубують протягом 5 хв за температури 37 °C 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 °C 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 °C, 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 °C, промивають дистильованою водою і проводять оцінку остеогенезу та адипогенезу.

Для оцінки остеогенного диференціовального 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 диференціовального 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 диференціовального 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 диференціовального 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.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виділення мезенхімальних стовбурових клітин з вартонових драглів (ВД) сполучної тканини пупкового канатика, що 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 (ПКС), культивування фрагментів ВД у CO₂-інкубаторі з 5 % CO₂ за температури 37 °C 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 °C протягом 7 діб, відокремлення від поверхні

культурального флакона мезенхімальних стовбурових клітин, який **відрізняється** тим, що 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 MEM 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.

10