



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **145824**

(13) **U**

(51) МПК

C12N 5/07 (2010.01)

G01N 21/64 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2020 04359	(72) Винахідник(и): Моїсєєв Антон Ігорович (UA), Божок Галина Анатоліївна (UA), Горіна Ольга Леонідівна (UA), Ахатова Юлія Сергіївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 13.07.2020	
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 07.01.2021	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 06.01.2021, Бюл.№ 1	(73) Володілець (володільці): ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61016 (UA)

(54) СПОСІБ СТАНДАРТИЗАЦІЇ РОЗМІРІВ ТРИВИМІРНИХ СФЕРОЇДІВ З ФІБРОБЛАСТІВ

(57) Реферат:

Спосіб стандартизації тривимірних сфероїдів з фібробластів включає посів клітин у культуральний посуд, оброблений розчином агару, і культивування. Клітини висівають у концентрації 2×10^5 кл/мл. Культивування проводять протягом 7-16 діб.

UA 145824 U

Корисна модель належить до галузі тканинної інженерії і може бути використана в фармакології, радіобіології, регенеративній і замісній клітинній терапії.

Для скринінгу лікарських препаратів та дослідження впливу радіонуклідів направленої дії на клітини пухлин в останні роки використовують тривимірні сфероїди (ТС), оскільки вони мають ряд значних переваг порівняно з моношаровими культурами, включаючи імітування мікросередовища *in vivo* [1]. При цьому постає проблема контролю розмірів сформованих сфероїдів, що впливають на ступінь дифузії поживних речовин, і відповідно, на життєздатність клітин у складі ТС [1, 2].

Відомий спосіб стандартизації ТС, який включає дезагрегацію моношару або зразка тканини до одиничних клітин, посів клітин в концентрації $2-8 \times 10^5$ кл/мл в ємкості, що обертаються, культивування при обертанні і ручний відбір ТС оптимального розміру [3].

Основними недоліками цього способу є те, що він не дозволяє отримувати ТС однакових розмірів, в результаті чого виникає необхідність додаткового відбору ТС, а також механічне пошкодження клітин в процесі оборотного руху ємкості і ручного сортування, що призводить до втрати матеріалу, погіршує стандартизацію та надійність результатів.

Найбільш близьким аналогом корисної моделі є спосіб отримання ТС [4], згідно з яким на першому етапі здійснюють посів клітин у концентрації 5×10^5 кл/мл в культуральний посуд, поверхня якого оброблена 1 % розчином агару, а на другому етапі культивують протягом 3-5 діб, після чого проводять ручний відбір ТС необхідного розміру та пересівають їх у культуральний посуд для подальшого росту.

Недоліками цього способу є неможливість отримання ТС однакового розміру і діаметром 50-100 мкм, а також його складність, пов'язана з 2-етапним посівом клітин і необхідністю ручного відбору сфероїдів.

В основу корисної моделі поставлена задача створити такий спосіб отримання ТС з фібробластів, який би дозволив отримувати сфероїди одного розміру із заданим діаметром 50-100 мкм, а також спростити процес стандартизації ТС з фібробластів.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі стандартизації тривимірних сфероїдів з фібробластів, який включає посів клітин у культуральний посуд, оброблений розчином агару, і культивування, згідно з корисною моделлю, клітини висівають у концентрації 2×10^5 кл/мл, а культивування проводять протягом 7-16 діб.

За рахунок зменшення посівної концентрації фібробластів і збільшення строку їх культивування спосіб дозволяє отримувати близько 80 % ТС з фібробластів однакового розміру з діаметром 50-100 мкм, при цьому життєздатність та функціональна активність фібробластів знаходяться на рівні, близькому до нативного. Крім цього, у зв'язку з виключенням етапів ручного відбору ТС з фібробластів та пересіву клітин, зменшується ступінь їх механічного пошкодження і спосіб спрощується.

Спосіб здійснюють таким чином.

Фібробласти культивують протягом 4 пасажів у стандартних умовах, згідно з протоколом, після чого для ініціації формування ТС з фібробластів клітини у концентрації 2×10^5 кл/мл висівають у посуд для культивування, оброблений 1-2 % розчином агару, та культивують протягом 7-16 діб.

Спосіб пояснюється прикладами.

Приклад 1

Деконсервовану культуру фібробластів перещеплюваної лінії L929 культивували протягом 4 пасажів із використанням живильного середовища DMEM/F12, що містило 200 Од/мл бензилпеніциліну, 200 мкг/мл стрептоміцину та 10 % фетальної телячої сироватки при 37°C в атмосфері з 5 % CO_2 в пластикових флаконах для культивування. Для отримання ТС з фібробластів використовували низькоадгезивну поверхню, для чого культуральну поверхню обробляли 1-2 %-м розчином агару. Посівна концентрація фібробластів становила 2×10^5 кл/мл. Культивування проводили протягом 7 діб, після чого оцінювали розмір, кількісне співвідношення ТС різного діаметру, кількість нежиттєздатних клітин, кількість клітин, здатних до адгезії, та індекс проліферації.

Діаметр ТС з фібробластів вимірювали за допомогою конфокального лазерного скануючого мікроскопа та програмного забезпечення LSM 510 та LSM Image Examiner.

Оцінку кількості нежиттєздатних (некротичних) клітин у складі ТС з фібробластів проводили із використанням флуоресцентних барвників Hoechst 33342 та йодиду пропідію (PI) за інструкцією виробника. Інтенсивність флуоресценції реєстрували за допомогою конфокального лазерного скануючого мікроскопа, візуалізацію та підрахунок забарвлених клітин проводили за допомогою програми LSM 510 та LSM Image Examiner.

Здатність клітин зі складу ТС з фібробластів до адгезії оцінювали після перенесення їх у культуральний посуд з адгезивною поверхнею: культивували 48 год., після чого підраховували кількість клітин, що не прикріпилися до поверхні культивування, за допомогою мікроскопа "AmScope IN300T-FL" (США) та виражали у відсотках.

Індекс проліферації клітин в ТС з фібробластів вираховували за відношенням кількості отриманих клітин до посіяних.

Статистичний аналіз даних проводили за непараметричним критерієм Манна-Уїтні.

Встановлено, що при культивуванні ТС з фібробластів із використанням посівної концентрації 2×10^5 кл/мл на 7 добу утворюються переважно округлі сфероїди діаметром 50-100 мкм. При цьому функціональні показники досліджуваних клітин залишалися на рівні, близькому до нативного (Таблиця 1).

Отримані результати доводять, що для отримання з фібробластів ТС діаметром 50-100 мкм необхідно використовувати посівну концентрацію 2×10^5 кл/мл. Розмір ТС з фібробластів при діаметрі 50-100 мкм є оптимальним, оскільки дозволяє зберегти життєздатність, проліферативну активність клітин і їх здатність до адгезії. Крім цього, такий розмір ТС забезпечує оптимізацію процесу живлення клітин у їх складі та запобігає розвитку некрозу центральних ділянок сфероїдів.

Приклад 2

Спосіб здійснювали аналогічно Прикладу 1, за винятком того, що використовували посівну концентрацію фібробластів 1×10^5 , 2×10^5 та 5×10^5 кл/мл.

Із Таблиці 2 видно, що при використанні посівної концентрації фібробластів 1×10^5 кл/мл формуються переважно дрібні сфероїди діаметром 20-40 мкм, при цьому індекс проліферації зменшується у 4,25 рази, що свідчить про низький рівень проліферативної активності клітин.

При збільшенні посівної концентрації до 5×10^5 кл/мл більшість сформованих сфероїдів - крупні, діаметром 100-300 мкм. За такого діаметра ТС з фібробластів порушується процес дифузії поживних речовин між клітинами, що призводить до розвитку некрозу центральних ділянок сфероїдів. Це підтверджується тим, що за таких умов культивування ТС з фібробластів статистично значимо збільшується кількість нежиттєздатних клітин, зменшується адгезивність та індекс проліферації (Таблиця 2).

В результаті порівняльної серії досліджень встановлено, що для формування ТС з фібробластів діаметром 50-100 мкм із функціонально повноцінними клітинами в їх складі посівна концентрація фібробластів 2×10^5 кл/мл є оптимальною.

Приклад 3

Для оцінки залежності розміру ТС з фібробластів, сформованих при посівній концентрації 2×10^5 кл/мл, від строків культивування спосіб здійснювали аналогічно Прикладу 1. Термін культивування складав 7-20 діб.

Результати показали, що при збільшенні терміну культивування зростає кількість ТС з фібробластів оптимального розміру. Із Таблиці 3 видно, що найбільша кількість ТС з фібробластів із діаметром 50-100 мкм утворюється в період з 16 по 20 добу культивування. Однак, культивування протягом 20 діб є не доцільним, оскільки кількість ТС з фібробластів оптимального розміру вірогідно не відрізняється від 16 діб.

Таким чином, термін культивування фібробластів до 16 діб за умови використання посівної концентрації 2×10^5 кл/мл сприяє формуванню ТС з фібробластів необхідного діаметра, що забезпечує ефективне стандартування ТС з фібробластів за розмірами.

Таблиця 1

Характеристика ТС, сформованих фібробластами у посівній концентрації 2×10^5 кл/мл на 7 добу культивування (n=6)

Параметри, що характеризують ТС		Показники
Розмір ТС	діаметр 20-40 мкм	21,2±2,7 %
	діаметр 50-100 мкм	65,6±8,2 %
	діаметр 100-300 мкм	12,6±2,3 %
Функціональні показники	Кількість нежиттєздатних клітин, %	13,1±5,1 %
	Кількість клітин, здатних до адгезії, %	85,0±2,2 %
	Індекс проліферації	5,1±0,3

Таблиця 2

Характеристика ТС, сформованих фібробластами за умови різних посівних концентрацій на 7 добу культивування (n=6)

Параметри, що характеризують ТС		Показники		
		Для посівної концентрації 1 × 10 ⁵ кл/мл	Для посівної концентрації 2 × 10 ⁵ кл/мл	Для посівної концентрації 5 × 10 ⁵ кл/мл
Розмір ТС	діаметр 20-40 мкм	53±4,9*	21,2±2,7 %	9,8±2,9*
	діаметр 50-100 мкм	22,8±4,9*	65,6±8,2 %	28,2±3,2*
	діаметр 100-300 мкм	24±1,8*	12,6±2,3 %	62±2,1*
Функціональні показники фібробластів у складі ТС	Кількість нежиттєздатних клітин, %	20,2±3,2	13,1±5,1 %	40,6±4,2*
	Кількість клітин, здатних до адгезії, %	72,3±2,1	85,0±2,2 %	35,4±4,47*
	Індекс проліферації	1,2±0,2*	5,1±0,3	1,2±0,2*

M ± стандартна похибка; * - P<0,05 порівняно з відповідним показником для фібробластів у посівній концентрації 2 × 10⁵ кл/мл

Таблиця 3

Розміри ТС, сформованих фібробластами у посівній концентрації 2 × 10⁵ кл/мл, залежно від строків культивування (n=6)

Строки культивування	Кількість ТС, %		
	d 20-40 мкм	d 50-100 мкм	d 100-300 мкм
7 доба	21,2±2,7*	65,6±3,7	12,6±2,3*
10 доба	15,4±2,06*	60±7,0	24,6±4,5*
13 доба	9,6±1,8*	62,2±4,6	28,2±4,5*
16 доба	8,6±1,9*	79,6±2,5	11,8±1,7*
20 доба	2±0,7*	85,6±1,4	13,2±0,6*

M ± стандартна похибка; * - P<0,05 порівняно з кількістю ТС з фібробластів діаметром 50-100 мкм.

Джерела інформації:

1. Gupta N, Liu JR, Patel B, Solomon DE, Vaidya B, Gupta V. Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research. Bioeng Transl Med. - 2016. - 1(1). - 63-81.
2. Cui X, Hartanto Y, Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. J R Soc Interface. - 2017. - 14(127). - 20160877.
3. He H, He Q, Xu F, Zhou Y, Ye Z, Tan WS. Dynamic formation of cellular aggregates of chondrocytes and mesenchymal stem cells in spinner flask. Cell Prolif. - 2019. - 52(4). - e12587.
4. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. - С. 493-496.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб стандартизації тривимірних сфероїдів з фібробластів, який включає посів клітин у культуральний посуд, оброблений розчином агару, і культивування, який **відрізняється** тим, що клітини висівають у концентрації 2×10⁵ кл/мл, а культивування проводять протягом 7-16 діб.