



(51) МПК
B01D 61/42 (2006.01)
B01D 61/48 (2006.01)
C12M 3/06 (2006.01)
C12N 5/0775 (2010.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
B01D 61/422 (2019.08); *B01D 61/48* (2019.08); *C12M 3/06* (2019.08); *C12N 5/0652* (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2019112915, 26.04.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 26.04.2019

Дата регистрации:
 28.10.2019

Приоритет(ы):
 (22) Дата подачи заявки: 26.04.2019

(45) Опубликовано: 28.10.2019 Бюл. № 31

Адрес для переписки:
 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2,
 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.
 Сеченова, технопарк

(72) Автор(ы):
 Решетов Игорь Владимирович (RU),
 Истранов Андрей Леонидович (RU),
 Старцева Олеся Игоревна (RU),
 Мельников Дмитрий Владимирович (RU),
 Иванов Семен Ильич (RU),
 Нечаев Александр Николаевич (RU),
 Апель Павел Юрьевич (RU),
 Дмитриев Сергей Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):
 федеральное государственное автономное
 образовательное учреждение высшего
 образования Первый Московский
 государственный медицинский университет
 имени И.М. Сеченова Министерства
 здравоохранения Российской Федерации
 (Сеченовский Университет) (ФГАОУ ВО
 Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
 Минздрава России (Сеченовский
 Университет) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: РЕШЕТОВ И.В. и др., Разработка
 мембранного каскадного электродиализатора
 для сепарации стволовых клеток и факторов
 роста с использованием функциональных
 микро- и нанобиопористых мембран // *Анналы
 пластической, реконструктивной и
 эстетической хирургии*, N 1, 2016, стр.106-108.
 US 2008/0067070 A1, 20.03.2008. US 5733442 A,
 31.03.1998. US 5340449 A, (см. прод.)

(54) КАСКАДНЫЙ ЭЛЕКТРОДИАЛИЗАТОР ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ФАКТОРОВ РОСТА ИЗ СОДЕРЖАЩЕЙСЯ В АНАЛИТЕ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

(57) Реферат:

Полезная модель относится к электродиализаторам, и предназначено для выделения/разделения /обогащения/ концентрирования популяции клеток-мишеней из клеточной суспензии или образца, содержащего, по меньшей мере, два типа

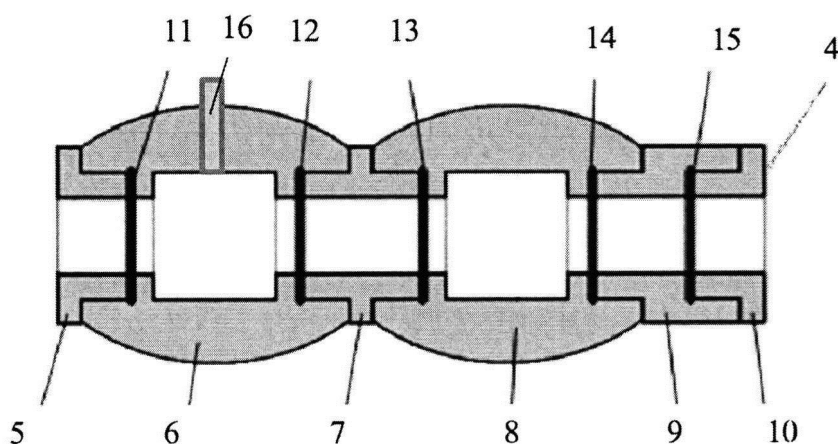
популяций клеток, с использованием мембранного электрофореза в сочетании с высоко специфической сорбцией клеточного компонента CD45⁺ и CD31⁺ поверхностными антителами, иммобилизованным на разделяющей мембране. Устройство включает емкость для размещения

RU 193393 U1

RU 193393 U1

буферного раствора, в которой расположены анод и катод, выполненные с возможностью подключения к источнику тока, и размещенный между ними картридж-диализатор, содержащий шесть сообщающихся между собой камер, расположенных в отдельных разъемных корпусах, разделенных трековыми мембранами. При этом вторая по удаленности от катода камера предназначена для размещения анализата с жировой тканью и выделения не дифференцированных стволовых клеток CD45⁺ и CD31⁺, третья предназначена для концентрирования дифференцированных стволовых клеток CD45⁻ и CD31⁻ и их отделения от низкомолекулярных фракций биологически

активных веществ, включая факторы роста клеток, четвертая предназначена для концентрирования и отделения низкомолекулярных фракций биологически активных веществ - гемоглобина, альбумина, иммуноглобулина от факторов роста, пятая - для концентрирования и выделения факторов роста, первая и шестая камеры - являются ограничительными, предотвращающими попадание клеток и биологически активных веществ в емкость с буферным раствором, и выполнены сообщающимися с емкостью для размещения буферного раствора, с одной стороны, и картриджем-диализатором, с другой.
1 з.п. ф-лы, 8 ил.



Фиг.1

(56) (продолжение):
23.08.1994. US 2017252701 A1, 07.09.2017.

RU 193393 U1

RU 193393 U1

Область техники

Полезная модель относится к электродиализаторам, в которых использована каскадная мембранная технология электрофореза для выделения/разделения/обогащения/концентрирования популяции клеток-мишеней из клеточной суспензии или образца, содержащего, по меньшей мере, два типа популяций клеток.

Полезная модель может быть использована в медицине, а именно, в регенеративной, пластической реконструктивной и эстетической хирургии для получения целевых клеточных компонентов для последующего использования при реконструкции тканей и органов. В качестве клеточных компонентов (клеток-мишеней) могут быть использованы, например, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), источником которых может быть жировая ткань. Помимо жировой ткани, ММСК могут быть получены из костного мозга и ряда других тканей с хорошим кровоснабжением.

Заявляемая полезная модель не предназначена для получения эмбриональных стволовых клеток.

Уровень техники

Клеточные популяции, обогащенные стволовые клетки (СК), часто требуются в лабораторных исследованиях или терапии. Основными источниками СК являются костный мозг, вся периферическая кровь, продукты лейкофереза или афереза особенно из «мобилизованных» доноров, или другие менее распространенные источники, такие как жировые клетки, пуповинная кровь и тканевые или органые суспензии. Обогащение СК проводится различными способами. Типичные методы обогащения включают выделение с использованием градиента плотности среды, центрифугирование, лизис эритроцитов при помощи гипотонического шока и различные комбинации этих способов. Например, очистка СК костного мозга требует устранения эритроцитов и гранулоцитов, что часто достигается при помощи центрифугирования в градиенте плотности среды.

Из уровня техники известны три категории методов и устройств для выделения / разделения / очистки / обогащения или удаления популяции клеток из суспензии (Kumar and Lykke, 1984, Pathology, (1): 53-62.): методы, основанные на использовании физических различий между популяциями клеток (плотность клеток, размер ячейки, заряд клеток, оптические свойства), например, центрифугирование, электрофорез, фазовое расслоение и др.; методы, в которых разделение основано на различиях в свойствах поверхности клетки, например, магнитные методы и др.; методы, основанные на функциональных характеристиках клеток, таких как пролиферация, фагоцитоз, распознавание антигена.

Применение стволовых клеток требует усовершенствованных методов и устройств их разделения. Различные мультипотентные СК и клетки предшественники находятся в тканях и органах взрослого организма для замены утраченных или поврежденных клеток, и они почти не отличаются от эмбриональных СК в отношении их способности к дифференцировке в различные ткани *in vitro* и *in vivo*. Применение этих клеток требует модифицированных методов для их изоляции (отделения). СК обычно присутствуют только в малых количествах в тканях и органах взрослого организма, и качественное отделение СК от других клеток с сохранением их жизнеспособности является достаточно сложной задачей. Клетки являются живыми и постоянно изменяющимися, их жизнеспособность зависит в т.ч. от условий окружающей среды (температуры, pH, физических параметров среды, сохранение стерильности при работе с клетками и т.д.). Наиболее предпочтительным является очистка гематопозитических клеток с помощью каскадных электродиализаторов (КЭД) на трековых мембранах, для последующего клинического использования.

Из уровня техники известно устройство для электрофоретического выделения клеток из образца/смеси на основе электрофореза (патент US 8088265), содержащее две камеры для размещения электролита (первую и вторую) и две камеры для образцов (первую и вторую), при этом камеры для образцов размещены между камерами для электролита и отделены от них ионопроницаемыми барьерами (например, мембранами); и электроды, расположенные в первой и второй камерах электролита, соединенные с источником питания. Устройство дополнительно может содержать резервуар для электролита, резервуар для образца, средство для подачи электролита из резервуара электролита в камеры электролита, средство для подачи образца или жидкости из резервуара для образца в камеру для образца, средство отбора проб. Устройство может быть использовано для выделения из образца одного типа клеток (целевого компонента), например, стволовых, или нескольких типов. Целевой компонент может быть сосредоточен во время электрофореза в первой или второй камерах в зависимости от используемой технологии выделения. Трансбарьерная миграция целевого типа клеток происходит при приложении электрического потенциала к электродам.

Предпочтительные значения напряжения находятся в диапазоне от 1 до 200 В. Время проведения электрофореза составляет от 2 до 60 минут. Результаты экспериментов показали, что оптимальным для проведения процесса разделения/выделения целевых клеток является напряжение 60 В, время проведения электрофореза - 10 мин.

Используемые мембраны имеют характерный средний размер и распределение пор с отсечкой макромолекул с молекулярной массой около 5 кДа. При этом первая мембрана, разделяющая камеры для образца, имеет больший размер пор, например, от 0,01 до 1,00 мкм или от 1 до 10 мкм, в зависимости от размера разделяемых клеток, и может быть изготовлена из поликарбоната, полиакриламида, поливинилового спирта (ПВА), полиэфирсульфона (ПЭУ), поливинилиденфторида (PVDF), нейлона, акрилового сополимера, основанного на виниловом полимере, полисульфона, целлюлозы, триацетата целлюлозы, сложных эфиров целлюлозы, полипропилена, силикатов, боросиликатов и/или стекловолокна. Мембраны, разделяющие камеры для электролита и камеры для образца, представляют собой рестрикционные (разделительные) мембраны с размерами пор, меньшими, чем у первой мембраны (с отсечкой макромолекул меньшей молекулярной массы, по сравнению с первой мембраной), которые предпочтительно выполнены из полиакриламида, поливинилового спирта, сшитого с глутаральдегидом (PVAI+glut). В одном из вариантов осуществления изобретения мембрана выполнена из триацетата целлюлозы (СТА) с номинальной отсечкой макромолекул с молекулярной массой 5, 10 или 20 кДа. В качестве буферного раствора (электролита) могут быть использованы биологические буферы, совместимые с клетками, в т.ч. HEPPS, HEPES, BisTris, хлорид натрия, фосфатные буферные соли, сахароза, глюкоза и маннит. Концентрация буфера/электролита составляет от 100 до 400 мМ. Оптимальным является буфер с концентрацией 270 мМ, содержащий HEPPS, BisTris, NaCl, сахарозу и глюкозу. Около 50%, по меньшей мере, одного типа клеток остается жизнеспособным после разделения с помощью известного устройства.

Однако в известном устройстве используются полимерные мембраны сетчатой структуры, которые характеризуются широким распределением пор по размерам, значительной толщиной (более 100 мкм), высокоразвитой поверхностью, обеспечивающей высокие адсорбционные потери целевых биологически активных компонентов.

Из уровня техники известен также электрофоретический аппарат, разработанный фирмой Gradipore Limited, Австралия (Gradiflow™) (см. патенты AU 738361, US 5039386,

US 5650055), содержащий картридж, в котором расположены несколько мембран, образующих, по меньшей мере, две камеры, катод и анод в соответствующих электродных камерах, соединенных с источником питания, резервуары для образцов, буферов и электролитов, насосы для прохождения образцов, буферов и электролитов и охлаждающих средств для поддержания образцов, буферов и электролитов при требуемой температуре во время электрофореза. Картридж содержит, по меньшей мере, три плоские мембраны, расположенные с образованием двух камер, через которые пропускают образец. Разделительная мембрана расположена между двумя наружными мембранами (называемыми также рестрикционными, поскольку их отсечки молекулярной массы обычно меньше, чем отсечка разделительной мембраны). Рестрикционные мембраны расположены рядом с электродом.

Из уровня техники известно устройство для микродиализа / электроконцентрации небольших объемов проб белка, нуклеиновой кислоты, пептида и других биомолекул (патент US 5733442, US 5340449), содержащее одну, две или более герметично соединенные между собой камеры, разделенные между собой мембранами с одинаковой или различной пористостью. При этом, согласно решению, представленному в US 5340449, камера может быть образована отдельной емкостью с отверстиями, расположенными с противоположных сторон, через которые камера соединена с отдельными полыми винтами, снабженными полупроницаемыми мембранами. При этом первая мембрана (первого винта) может быть выполнена с размерами пор, больше размеров целевых макромолекул, вторая мембрана (второго винта) выполнена с размерами пор, обеспечивающими номинальную отсечку макромолекул. Таким образом, макромолекулы мигрируют через электрофоретическое поле и концентрируются в объеме камеры на мембране второго винта. Объем камеры может составлять составляет 10 мкл-1 мл или более. После получения концентрата макромолекул камеру отвинчивают от верхнего винта и закрывают другим винтом без отверстия, полученное устройство погружают в буфер для диализа. После диализа в течение заданного времени нижний винт с мембраной и жидкость из камеры удаляют.

Однако известные решения, основанные на мембранном электрофорезе, обеспечивают отделение клеток от низкомолекулярных биологически активных веществ с высоким разрешением, но не обеспечивают высокоселективное (характерное для аффинной хроматографии) разделение близких по размеру одноименно заряженных биологически активных веществ или клеток с близкими молекулярными массами или, в случае клеток, размерами.

Наиболее близким к заявляемому устройству является мембранный каскадный электродиализатор для сепарации стволовых клеток и факторов роста с использованием функциональных микро- и нанобиопористых мембран (И.В. Решетов, О.И. Старцева, А.Л. Истранов, Д.В. Мельников, С.И. Иванов, Журнал «Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии», №1, 2016, с. 106-108.), содержащий каскад микро- и нанобиопористых мембран (МНМ) с модифицированной пространственной конфигурацией. КЭД сочетает в себе принципы диализа, электрофореза и мембранного концентрирования, и состоит из камеры диализатора, в которую помещается разделяемый биологический материал, соединительных камер, запорных крышек и набора трековых мембран. КЭД позволяет концентрировать макромолекулы (в том числе белки и нуклеиновые кислоты) из геля или других полимерных носителей (а также из раствора) в фиксированном объеме (от 10 мкм до 1 мл и больше). Электрофорез обеспечивается посредством создания электрического поля на противоположных концах плотного геля-носителя, состоящего предпочтительно из агарозы и/или

полиакриламида, ацетата целлюлозы. Образец (обычно белок или нуклеиновая кислота) помещается с одной стороны геля и подвергается электрофорезу. В зависимости от различных физико-химических характеристик образец перемещается в электрическом поле с определенной скоростью. Применение КЭД позволяет проводить электроолюцию гелей из растворов; электродиализ в течение 5-10 мин; on-line электродиализ; электроконцентрирование; селективную электрофльтрацию; фракционирование по размеру; удаление праймеров, солей; детергентов, терминирующих красителей. Для сепарации СК из разных биологических сред с максимальной степенью очистки от балластных элементов посредством КЭД используют следующие мембраны:

5
10
15

микроструктурированные изотропные трековые мембраны (ТМ) с диаметром пор 7-8 мкм для отделения / обогащения СК от эритроцитарной массы; наноструктурированные асимметричные трековые мембраны с диаметром пор 20 нм для концентрирования и диализа факторов роста; наноструктурированные изотропные трековые мембраны с диаметром пор 50-70 нм для отделения БАВ (гемоглобин, альбумин, иммуноглобулины) от факторов роста.

Однако, известное решение не позволяет вести дифференциацию клеток и эффективно лишь при сепарации факторов роста. Используемые трековые мембраны с диаметром пор 8 мкм являются непроницаемыми для СК всех типов и не позволяют в процессе диализа стромальной сосудистой фракции выделять дифференцированные стволовые клетки с фенотипом CD45- и CD31-.

20

Технической проблемой является создание устройства, обеспечивающего устранение перечисленных выше недостатков, а именно, создание устройства, основанного на возможности использования мембранного электрофореза в сочетании с высоко специфической (аффинной) сорбцией клеточного компонента с использованием аффинных по отношению к не дифференцированным стволовым клеткам трековых мембран, обеспечивающего повышение селективности разделения, существенного снижения адсорбционных потерь и деликатного (без повреждений) разделения целевых компонентов экстрактов жировой ткани. Заявляемое устройство предназначено для выделения/разделения/обогащения/концентрирования популяции клеток-мишеней из клеточной суспензии или образца, содержащего, по меньшей мере, два типа популяций клеток, с использованием мембранного электрофореза в сочетании с высоко специфической сорбцией клеточного компонента CD45+ и CD31+ поверхностными антителами, иммобилизованным на разделяющей мембране.

25
30

Раскрытие полезной модели

Техническим результатом, на достижение которого направлена заявленная полезная модель, является обеспечение высокоселективного разделения (с использованием трековых мембран) близких по размеру или молекулярной массе одноименно заряженных биологически активных клеток или веществ, из содержащейся в анализе жировой ткани, с адсорбционными потерями, не превышающими 20-30%.

Технический результат обеспечивается посредством создания каскадного электродиализатора для выделения мезенхимальных клеток и факторов роста из содержащейся в анализе жировой ткани, включающего емкость для размещения буферного раствора, в которой расположены анод и катод, выполненные с возможностью подключения к источнику тока, и размещенный между ними картридж-диализатор, содержащий шесть сообщающихся между собой камер, расположенных в отдельных разъемных корпусах, разделенных трековыми мембранами, при этом вторая по удаленности от катода камера предназначена для размещения анализа с жировой тканью и выделения не дифференцированных стволовых клеток CD45⁺ и CD31⁺, третья

40
45

предназначена для концентрирования дифференцированных стволовых клеток CD45⁻ и CD31⁻ и их отделения от низкомолекулярных фракций биологически активных веществ, включая факторы роста клеток, четвертая предназначена для концентрирования и
 5 отделения низкомолекулярных фракций биологически активных веществ - гемоглобина, альбумина, иммуноглобулина от факторов роста, пятая - для концентрирования и выделения факторов роста, первая и шестая камеры - являются ограничительными, предотвращающими попадание клеток и биологически активных веществ в емкость с
 10 буферным раствором и выполнены сообщающимися с емкостью для размещения буферного раствора, с одной стороны, и картриджем-диализатором, с другой, при этом вторая и третья камеры разделены трековой мембраной, выполненной из полиэтилентерефталата (ПЭТФ) толщиной 10-30 мкм с размерами пор 15-20 мкм, плотностью пор порядка 10^4 см^2 , и модифицированной антителами, аффинными к
 15 выделяемым не дифференцированным стволовым клеткам CD45⁺ и CD31⁺, ковалентно связанными с матрицей трековой мембраны; третья и четвертая камеры разделены трековой мембраной, выполненной из ПЭТФ толщиной 10-30 мкм с размерами пор 0,5-2 мкм и плотностью пор порядка $10^6 \text{ см}^2 - 10^8 \text{ см}^2$; четвертая и пятая камеры разделены трековой мембраной, выполненной из ПЭТФ толщиной 10-30 мкм с
 20 размерами пор 0,1-0,2 мкм и плотностью пор порядка $1-5 \times 10^8 \text{ см}^2$; первая и вторая камеры, а также пятая и шестая камеры разделены трековыми мембранами, выполненными из ПЭТФ толщиной 20-30 мкм с размерами пор 0,01-0,02 мкм и плотностью пор порядка $1-3 \times 10^9 \text{ см}^2$.

В электродиализаторе камера для размещения анализита с жировой тканью и выделения
 25 не дифференцированных стволовых клеток может быть снабжена штуцером для подключения к насосу для обеспечения непрерывной подачи анализита в камеру.

Таким образом, заявляемое решение основано на совокупности параметров используемых конструктивных элементов, составляющих КЭД, обеспечивающих
 30 получение качественных СК из жировой ткани, а именно: набором трековых мембран с заданной структурой, профилем и размерами пор; использованием трековой мембраны, поверхность которой модифицирована антителами, аффинными к выделяемым не дифференцированным стволовым клеткам CD45⁺ и CD31⁺; количеством и
 последовательностью расположения камер и трековых мембран. Совокупность
 35 указанных признаков обеспечивает требуемый коэффициент селективности разделения, существенное снижение адсорбционных потерь и деликатное (без повреждений) разделение целевых компонентов экстрактов жировой ткани.

Краткое описание чертежей

Полезная модель поясняется чертежами, где на фиг. 1 представлена схема картриджа (блока) КЭД, на фиг. 2 представлена фотография общего вида установки КЭД, которая
 40 была изготовлена для проведения экспериментальных работ, на фиг. 3 представлен вариант возможного соединения камер, которое может быть реализовано по аналогии с соединением, описанным в патенте US 5733442, на фиг. 4 представлена принципиальная схема выделения клеток, на фиг. 5 представлена электронная микрофотография трековой мембраны, на фиг. 6 представлены микрофотографии, демонстрирующие загрязнение
 45 стромальной сосудистой фракции CD45⁺ и CD31⁺, и помеченные соответствующими моноклональными антителами с флюоресцином. Стрелками отмечены не дифференцированные клетки, на фиг. 7 представлена микрофотография дифференцированных стволовых клеток, на фиг. 8 - микрофотография фибробластов,

полученных после 7 дней культивирования дифференцированных СК.

Позициями на фигурах обозначены: 1 - емкость для размещения буферного раствора; 2 - анод, 3 - катод, 4 - картридж-диализатор, 5-10 - камеры каскадного блока (картриджа), 11-15 - трековые мембраны, 16 - штуцер.

5 Осуществление полезной модели

Ниже представлено более подробное описание конструкции заявляемого устройства, способа изготовления КЭД и трековых мембран, а также способа получения с использованием заявляемой конструкции концентрата СК и ФР.

10 Устройство (см. фиг. 1, 2) содержит емкость 1 для размещения буферного раствора, в которой расположены анод 2 и катод 3, и размещенный между ними картридж-диализатор 4 (каскадный блок).

Картридж-диализатор 4 содержит шесть камер 5-10, размещенных в отдельных корпусах, соединенных между собой через полупроницаемые трековые мембраны (ТМ) 11-15. Соединение камер может быть реализовано по аналогии с принципом, описанным в патенте US 5733442 (см. фиг. 3). Объем камер может составлять 50-1000 мкл.

15 Корпусы камер картриджа могут быть изготовлены из любого материала, являющегося инертным по отношению к используемым буферным растворам/электролитам и образцам, например, полимерного материала или стекла, включая TEFLON®, акрилы и т.д. Внешняя поверхность картриджа, составленная из герметично соединенных между собой отдельных корпусов, может иметь цилиндрическую или прямоугольную форму.

20 Ближайшие к аноду или катоду камеры 5, 10 являются ограничительными, предотвращающими попадание клеток и биологически активных веществ в емкость с буферным раствором и выполнены сообщающимися с емкостью 1 для размещения буферного раствора с, одной стороны, и картриджем-диализатором 4, с другой. Камеры 5, 10 отделены от соседних камер 6, 9 ограничительными мембранами 11 и 15, соответственно. При этом мембраны 11, 15 выполнены из ПЭТФ толщиной 20-30 мкм с размерами пор 0,01-0,02 мкм и плотностью пор порядка $1-3 \times 10^9 \text{ см}^2$.

30 Вторая по удаленности от катода камера 6 предназначена для размещения анализа с жировой тканью и выделения не дифференцированных стволовых клеток CD45⁺ и CD31⁺. Третья по удаленности от анода камера 7 предназначена для концентрирования дифференцированных стволовых клеток CD45⁻ и CD31⁻ и их отделения от низкомолекулярных фракций биологически активных веществ, включая факторы роста клеток. Четвертая камера 8 предназначена для концентрирования и отделения низкомолекулярных фракций биологически активных веществ - гемоглобина, альбумина, иммуноглобулина от факторов роста, а пятая 9 - для концентрирования и выделения факторов роста. Камера 7 отделена от камеры 6 и камеры 8 трековыми мембранами 12 и 13, соответственно. При этом мембрана 12 выполнена из полиэтилентерефталата (ПЭТФ) толщиной 10-30 мкм с размерами пор 15-20 мкм, плотностью пор порядка 10^4 см^2 , и модифицирована антителами, аффинными к выделяемым не дифференцированным стволовым клеткам CD45⁺ и CD31⁺, ковалентно связанными с матрицей трековой мембраны (например, посредством полиэтиленимина или глутарового альдегида).

45 Трековая мембрана 13 выполнена из ПЭТФ толщиной 10-30 мкм с размерами пор 0,5-2 мкм и плотностью пор порядка $10^6 \text{ см}^2 - 10^8 \text{ см}^2$.

Камера 9 отделена от камер 8 и 10 трековыми мембранами 14 и 15, соответственно. При этом мембрана 14 выполнена из ПЭТФ толщиной 10-30 мкм с размерами пор 0,1-

0,2 мкм и плотностью пор порядка $1-5 \times 10^8 \text{ см}^2$, а мембрана 15 - из ПЭТФ толщиной 20-30 мкм с размерами пор 0,01-0,02 мкм и плотностью пор порядка $1-3 \times 10^9 \text{ см}^2$.

Трековые мембраны могут быть выполнены диаметром 10-25 мм.

Изготовления КЭД и трековых мембран

Сборка картриджа-диализатора 4 может быть осуществлена следующим образом.

На прижимную плоскость винта фиксаторного камеры диализатора универсального (камера 5) помещают мембрану 11, навинчивают корпус камеры 6 ($V=1000$; 50 мкл).

Во внутренний объем камеры 6 помещают разделяемую суспензию. На верхнюю прижимную плоскость камеры 6 помещают мембрану 12 и вкручивают корпус соединительной камеры 7. Заполняют внутренний объем камеры 7 буферным раствором.

Помещают на верхнюю прижимную плоскость камеры 7 мембрану 13, сверху навинчивают корпус камеры 8 ($V=1000$; 50 мкл) и заполняют внутреннее пространство камеры буферным раствором. На верхнюю прижимную плоскость камеры 8 помещают мембрану 14, вкручивают винт фиксаторный соединительной камеры 9 и заполняют внутренний объем камеры 9 буферным раствором. На верхнюю прижимную плоскость камеры 9 помещают мембрану 15 и фиксируют сверху винтом фиксаторным камеры диализатора универсальным (камера 10). Собранный картридж помещают в емкость с буферным раствором (буферную ванну), ориентируя его мембраной 11 к катоду.

Промышленно производимая трековая мембрана с диаметром пор 8 мкм является непроницаемой для СК всех типов. Для устранения данного недостатка в предлагаемом устройстве используется трековая мембрана из ПЭТФ с диаметром пор 15-20 мкм.

Трековые мембраны с данным размером пор могут быть получены согласно способу, описанному в патенте RU 2542300 (Апель П.Ю., Дмитриев С.Н., Иванов О.М., Нечаев А.Н. Способ изготовления моно и олигопоровых мембран).

Для получения моно, олиго, полипористых трековых мембран, т.е. трековых мембран с низкой плотностью пор, площадью 6 см^2 , осуществляли облучение движущейся пленки пучком ускоренных ионов через диафрагму с отверстием и последующее травление. Облучение проводили на ускорителе ИЦ-100 ЛЯР (лаборатории ядерных реакций)

ионами $^{132}\text{Xe}^{+26}$, энергия иона 2 МэВ/нуклон, флюенс $1,2 \cdot 10^6 \text{ см}^{-2}$. Облучение велось через алюминиевую диафрагму с набором различных отверстий с диаметрами 30 (диафрагма 1), 15 (2), 1000 (3), 180 (4), 200 (5) мкм. Химическую индикацию проводили следующим образом. Полученную после облучения мембрану в виде листа укладывали

на пропитанную фенолфталеином фильтровальную бумагу. Места скопления пор обнаруживали при помощи ватного тампона, смоченного разбавленным раствором щелочи. Каждая дорожка индицированных пор соответствовала номеру диафрагмы. Было проведено определение пор в образцах ТМ на каждой из дорожек методом РЭМ (растровой электронной микроскопии). Было установлено, что для получения

полипоровых ТМ с количеством пор порядка 10^4 см^2 облучение нужно вести через диафрагму с диаметром отверстия 1000 мкм. После облучения пленки с экспозицией - диафрагма 1000 мкм, осуществляли травление участков пленки в 6М NaOH, при температуре 90°C в течение 10 мин. Данные условия обеспечивают получение ТМ с диаметром пор 15-20 мкм и плотностью пор порядка 10^4 см^2 (фиг. 5).

Для получения аффинных трековых мембран по отношению к недифференцированным СК, осуществляют иммобилизацию поверхности трековых мембран FITC (флюоресцин)-анти-CD31 и FITC (флюоресцин)-анти-CD45 антителами с целью получения аффинных по отношению к нежелательным эндотелий (CD31+) и

лейкоциты (CD45⁺) клеткам, например, посредством связывания с полиэтиленгликолем или глутаровым альдегидом. Иммунизация антител к трековым мембранам может быть осуществлена в соответствии с (Tijssen, P. Practice and theory of enzyme immunoassays in Laboratory technique in biochemistry and molecular biology / Vol. 15. Ed / R.H. Burdon and P.H. van Knipperberg, new York, Elsevier, Biomedical, 1985).

Мембраны 11, 15 могут быть получены согласно способу, описанному в патенте RU 2327510 (Асимметричная трековая мембрана и способ ее изготовления).

Работа устройства

Заявляемое устройство было использовано для отделения стромальных СК от эндотелиальных клеток и лейкоцитов, полученных после предочистки стромальной сосудистой фракции (ССФ). Для чего собирали картридж из отдельных камер с трековыми мембранами, размещали в емкости 1 с буферным раствором между анодом 2 и катодом 3, подключенными к источнику питания. Трансбарьерная миграция клеток происходит при приложении электрического потенциала к электродам.

Предпочтительные напряжения находятся в диапазоне от 4 до 24 В. Время проведения электрофореза может составлять от 15 до 60 минут.

Дифференцируемые СК с фенотипом CD45⁻CD31⁻ под действием разницы потенциала свободно проходят через мембрану 12 с диаметром пор 15-20 мкм и собираются в камере 7 диализатора, а не дифференцируемые клетки - нежелательный эндотелий (CD31⁺) и лейкоциты (CD45⁺), сорбируются по принципу связи антиген-антитело на аффинной к ним мембране 12, не проникая в камеру 7. Клетки CD31⁺ и CD45⁺ маркируют антителами, мечеными FITC (флуоресцеин изотиоцианат), с анти-CD31 и анти-CD45.

Под действием разницы потенциала дифференцируемые стволовые клетки CD31⁻ и CD45⁻ концентрируются на мембране 13, а биологически активные вещества (БАВ) и факторы роста проходят через мембрану 13 в камеру 8, из камеры 8 факторы роста попадают в камеру 9, проходя через мембрану 14, и концентрируются на мембране 15. После разделения, мембраны извлекают из картриджа и осуществляют промывку в буферном растворе с извлечением дифференцированных клеток и факторов роста стандартными методами.

Для подтверждения эффективности каскадного отделения СК и ФР был изготовлен экспериментальный образец КЭД для каскадного выделения молодых клеток из липоаспирата с их обработкой, диализом суспензии клеток на трековых мембранах и контрольным культивированием.

В качестве модели была использована жировая ткань, которая содержит большое количество стромальных стволовых клеток. В частности, в жировой ткани в основном содержатся клетки с поверхностным фенотипом CD45⁻CD31⁻CD34⁺CD105⁺, которые могут быть дифференцированы по нескольким клеточным линиям, включая остеогенную, хондрогенную, адипогенную и неврогенную. При выделении стволовых клеток из жировой ткани получали стволовые клетки с фенотипом CD45⁻CD31⁻ и удаляли нежелательный эндотелий (CD31⁺) и лейкоциты (CD45⁺).

В качестве основной методики пробоподготовки использовалась известная технология (Y.-G. Hlouz and A. Sterodimas (eds.), Adipose Stem Cells and Regenerative Medicine, 13 DOI: 10.1007/978-3-642-20012-0_2, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011) Принципиальная схема выделения стволовых клеток и фактора роста SCF из жировой ткани человека отражена на фиг.4. При этом в технологии получения клеток, представленной на фиг.4, этап 8 (Отделение стромальных клеток методом магнитной

сепарации) был заменен на фильтрацию с помощью КЭД, что позволило помимо СК, выделить ФР.

Подтверждение эффективности полученных СК и ФР проводилось с использованием известных методик [Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell 2002; 13:4279-4295.; Zuk PA, Benhaim P and Hedrick MH. Stem cells from adipose tissue. Handbook of stem cells 2006; 2:425-447; Збили М., Гей К. Использование культур клеток для коррекции морщин. Эстетическая медицина 2003; 2(1):75-80].

Пример. Липоаспирация, инкубация, центрифугирование, разделение стромальной сосудистой фракции, выделение (дифференциация) мезенхимальных стволовых клеток.

Сбор и хранение липоасpirата

Стромальные стволовые клетки выделяли из липоасpirата, забранного из нескольких областей тела, включая бока, бедро и живот. Участниками исследования явились 10 пациенток, практически здоровых, не имеющих противопоказаний к операции, прошедших хирургическую коррекцию контура тела путем липоасpirации. Возраст пациенток был от 31 до 60 лет. Все подписали информированное согласие на использование их биоматериала согласно требованиям ЛЭК. Для исследования собирали не менее 300 мл липоасpirата в стерильный контейнер, чтобы выделить некультивируемые стволовые клетки в значительном количестве (миллион и более).

Было выделено до 10^7 жировых стромальных стволовых клеток с более чем 95% чистотой из 300 мл липоасpirата.

Разделение стромальной сосудистой фракции.

Отмывка липоасpirата.

Липоасpirат интенсивно промывали для удаления большинства эритроцитов и лейкоцитов. Для этого выполняли следующие процедуры при асептических условиях: помещали максимум 300 мл липоасpirата в используемую стерильную бутылку, выдерживали до момента, когда жировая ткань поднимется выше фракции крови, удаляли кровь, используя стерильную пипетку на 25 мл, далее добавляли эквивалентный объем HBSS с антибиотиками и фунгицидом и плотно закрывали крышкой, затем энергично встряхивали в течение 5-10 секунд. Бутылку клали и позволяли жировой ткани всплыть выше HBSS. Это занимало 1-5 минуты в зависимости от образца. Тщательно удаляли HBSS, используя пипетку на 50 мл. Повторяли вышеупомянутую процедуру промывки три раза. Питательная среда после заключительной промывки должна быть прозрачной.

Расщепление коллагеназы

Диспергирование жировой ткани достигается расщеплением коллагеназы.

Коллагеназа имеет преимущество перед другими пищеварительными ферментами в том, что она может эффективно диспергировать жировую ткань, поддерживая высокую жизнеспособность клеток.

Приготавливали раствор коллагеназы до расщепления. Конечный требуемый объем необходим вдвое меньше объема промытой жировой ткани. Добавляли измельченную до состояния порошка коллагеназу к HBSS до концентрации 0.2%. Растворяли необходимое количество коллагеназы в 40 мл HBSS, затем стерилизовали фильтрацией в оставшемся рабочем объеме. Добавляли антибиотики и фунгицид.

Добавляли вымытую жировую ткань в большую бутылку для клеточных культур (100 мл на 162 см² бутылки). Наливали раствор коллагеназы, после чего повторно растворяли жировую ткань, энергично взбалтывая бутылку в течение 5-10 секунд. Инкубировали при 37°C на шейкере в течение 1-2 ч, вручную энергично взбалтывая

бутыль в течение 5-10 секунд каждые 15 минут.

Во время расщепления готовили градиенты сахарозы Histopaque-1077 (Sigma), распределив 15 мл Histopaque-1077 в пробирки на 50 мл. Два градиента требуются на каждые 100 мл промытой жировой ткани. Градиенты были уравновешены при комнатной температуре перед использованием. Приготавливали 200 мл питательной среды, состоящей из HBSS, содержащего 2%-й коллагеназы, антибиотики и фунгицион. По завершении периода расщепления жировая ткань напоминала по консистенции суп. Чтобы остановить действие коллагеназы добавляли сыворотку - FBS до концентрации 10%.

10 Разделение стромальной сосудистой фракции (ССФ)

Способность адипоцитов, заполненных жиром после расщепления, плавать, используется, чтобы отделить их от стромальной сосудистой фракции. Для этого распределяли расщепленную коллагеназой ткань в пробирки на 50 мл. Избегая попадания в пробирку нерасщепленной ткани. Центрифугировали при комнатной температуре при ускорении 400x в течение 10 минут. После центрифугирования использовали пипетку на 50 мл, чтобы удалить плавающие адипоциты, жиры и питательную среду. Сгустки ССФ оставляли в пробирке.

Выделение стромальных стволовых клеток из ССФ

ССФ преимущественно содержит эритроциты, лейкоциты, эндотелиальные клетки и стромальные стволовые клетки. Эритроциты удаляют первыми, используя буфер для лизиса.

Удаление эритроцитов

Повторно растворяли каждый сгусток ССФ в 20 мл буфера для лизиса при комнатной температуре. Инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут.

25 Центрифугировали при 300x в течение 10 минут и удаляли буфер.

Удаление скоплений клеток и остающейся нерасщепленной ткани

Получали клеточную суспензию, свободную от нерасщепленной ткани и клеточных скоплений, используя принципы отделения на основе силы тяжести, фильтрования клеток и градиентного разделения. Повторно полностью растворяли сгустки ССФ в 2 мл питательной среды, используя пипетки на 1 мл. Раствор перемешивали пипеткой для уменьшения скоплений клеток. Помещали сгустки в две пробирки на 50 мл. Позволяли нерасщепленным скоплениям ткани осесть под действием силы тяжести в течение ~1 минуты. Далее отбирали и пропускали клеточную суспензию через клеточные фильтры на 100 мкм. А затем пропускали полученную суспензию через клеточные фильтры на 40 мкм. Добавляли дополнительно промывочный буфер так, чтобы конечный объем был эквивалентен объему градиента (т.е., для 4 растворов, объем клеток в промывочном буфере должен составить 60 мл). Держали каждую пробирку, содержащую Histopaque, под углом 45 градусов и аккуратно добавляли клеточную суспензию по внутренней стенке пробирки при скорости потока ~1 мл в секунду.

40 Добивались осторожного расслоения клеток по градиентам, что является важным для успешного разделения. Центрифугировали градиенты точно при 400x в течение 30 минут. Тщательно удаляли питательную среду (~10 мл) выше белого скопления клеток, найденных на поверхности раздела градиента. Аккуратно удаляли белое скопление клеток (~5 мл) осторожной аспирацией и помещали в новые пробирки на 50 мл. Далее добавляли эквивалентный объем промывочной среды и центрифугировали при 300x в течение 10 минут. Удаляли и повторно растворяли каждый шарик в 25 мл питательной среды. Центрифугировали при 300x в течение 10 минут.

При использовании стандартной методики разделения потери целевого компонента

составляли порядка 30-40%.

В качестве альтернативы описанному выше способу для отделения стромальных СК от эндотелиальных клеток и лейкоцитов, полученных после предочистки стромальной сосудистой фракции, была использована каскадная мембранная фильтрация с помощью заявляемого устройства - КЭД.

Отделение стромальных стволовых клеток от эндотелиальных клеток и лейкоцитов сортировкой клеток с использованием каскадного электродиализатора на базе аффинных трековых мембран.

Выполняли сепарацию СК на базе КЭД в следующей последовательности.

Осевшие сгустки ССК перерастворяли и добавляли в 10 мл колоночного буфера (PBS, содержащая 2 мМ ЭДТА и 0.5% BSA). Удаляли все оставшиеся скопления клеток, пропустив суспензию через клеточный фильтр на 40 мкм. Выполняли подсчет количества клеток. Переносили клетки в пробирку на 15 мл и центрифугировали при 300х г в течение 10 минут при 4°C. Повторно растворяли сгустки клеток в электрофоретическом буфере - 20 мМ Na₃PO₄ (рН=7.5, эл. проводимость 3.5 СМ, Dowfax2A1 (концентрации С=0,01%)).

Проводили иммобилизацию поверхности трековых мембран FITC (флюоресцин) -анти-CD31 и FITC (флюоресцин)-анти-CD45 антителами с целью получения аффинных по отношению к нежелательным эндотелий (CD31+) и лейкоциты (CD45+) клеткам. Промывали аффинные трековые мембраны в 20 мл PBS-буфера, чтобы удалить не связавшиеся антитела. Выполняли сборку картриджа КЭД по конструктивной схеме (фиг. 1). В качестве элементов сборки использовали камеры диализатора объем 1000 мкл, винты соединительные объемом 1000 мкл. В качестве мембран в сборке использовали не модифицированные трековые мембраны 11, 15 (D пор 0,015 мкм, толщина 20 мкм, плотность пор $2 \cdot 10^9$ см²), мембрана 13 (D пор 1 мкм, толщина 10 мкм, плотность пор 10^6 см²), мембрана 14 (D пор 0,1 мкм, толщина 12 мкм, плотность пор $5 \cdot 10^8$ см²), и модифицированная аффинная трековая мембрана 12 (D пор 20 мкм, толщина 12 мкм, плотность пор 10^4 см²). Выбор максимального диаметра пор мембраны 12 обусловлен исходя из отсутствия стерических затруднений при прохождении СК через мембрану. При использовании мембран меньшего диаметра стерические затруднения возможны исходя из морфологических особенностей стромальных стволовых клеток. Как дифференцированные, так и не дифференцированные клетки в ССФ жировой ткани имеют размеры от 7 до 15 мкм.

Заливали в емкость 1 для буфера КЭД рабочий буферный раствор: 20 мМ Na₃PO₄ (рН=7.5, эл. проводимость 3.5 СМ/см) или Трис-глицин (рН=8.3, эл. проводимость 0.7 СМ/см). Для снижения адсорбции и прилипания к пластиковым деталям КЭД в буферный раствор может быть добавлен ПАВ, например, Dowfax2A1 (концентрации С=0,01%).

Устанавливали платиновые электроды 2 и 3 в емкости, расстояние между электродами составляло 18 см. Между электродами размещали картридж-диализатор 4 с разделительными камерами (ячейками). Устанавливали напряжение между электродами 15 В.

Клеточную суспензию, расположенную в камере 6 (в начальной концентрации порядка $1-5 \cdot 10^6$ ед/мл), пропускали через разделительные камеры 7, 8, 9 (ячейки) КЭД. Время разделения составляло 30 мин. После разделения отключали напряжение, подаваемое на КЭД, извлекали картридж из емкости 1 (диализной ванны) и последовательно разбирали картридж в порядке, обратном порядку сборки, удаляя микропипеткой буферный раствор. После чего смывали немаркированные клетки с мембраны, дважды добавляя 5 мл колоночного буфера (PBS; рН 7.2, FBS на 0.5%, 2

мМ ЭДТА), собирали общее количество элюента. Проверляли на чистоту стволовые клетки. При необходимости более высокой чистоты, центрифугировали собранные клетки при 300х в течение 10 минут при 4°С и повторяли разделение в КЭД, выполняли подсчет количества клеток, повторно центрифугировали клетки при 300х в течение 10 минут при 4°С. Полученные клетки использовали или замораживали согласно стандартным протоколам. Проводили проверку наличия и количественный анализ фактора роста стволовых клеток SCF.

После проведения вышеописанных операций получены следующие результаты.

У всех образцов биоматериала, полученного в результате хирургической коррекции контура тела пациентки удалось провести каскадное выделение мезенхимальных стволовых клеток.

Проведен микроскопический анализ стромальной сосудистой фракции перед разделением. В 100 мкл ССФ введены по 10 мкл Anti-CD45 флюоресцин изоционат FITC и Anti-CD31 FITC. Благодаря наличию флюоресцентной метки достаточно легко и точно в поле эпифлюоресцентного микроскопа определить процентное соотношение дифференцированных стволовых клеток (CD45⁻ и CD31⁻) и не дифференцированных клеток (CD45⁺ и CD31⁺). Анализ показал, что в ССФ порядка 8-12% составляют клетки CD45⁺ и CD31⁺, и 88-92% CD45⁻ и CD31⁻, соответственно. На фиг. 6 представлены фотографии идентификации загрязнения ССФ CD45⁺ и CD 31⁺ и помеченные соответствующими моноклональными антителами с флюоресцином. Бары, 20 мкм.

Титр СК всех типов составляет 10⁵. После процедуры сепарации 80-90% СК фенотипа CD45⁻ и CD31⁻ сконцентрировано в разделительной камере 7. СК типа CD45⁻ и CD31⁻ после добавления флуоресцентной метки не обнаружено. Порядка 85% целевых СК, находящихся в камере 7, адсорбировано на мембране 13. Это значительно упрощает последующую процедуру культивации СК. Смыв СК с мембраны осуществлялся буфером PBS; pH 7.2, FBS - 0.5%, 2 мМ ЭДТА. Таким образом, с использованием заявляемого устройства, из выделенного пассажа получено поколение стабильных стромальных стволовых клеток (фиг. 7). После 7 дней культивирования, стромальные СК приобретали морфологию фибробласта (фиг. 8), что свидетельствует о их биологической сохранности. Бар, 20 мкм.

В камере 6 диализа СК практически не обнаружено. Все стволовые клетки фенотипа CD45⁺ и CD31⁺ сконцентрированы на мембране 12 с иммобилизованными антителами к СК фенотипа CD45⁺ и CD31⁺. Проведен смыв клеток буфером PBS; pH 7.2, FBS - 0.5%, 2 мМ ЭДТА. В смыв добавлено 10 мкл флуоресцирующей метки FITC. Основное количество клеток, выделенных с мембраны, окрашивается, но порядка 20% от всего числа не окрашиваются, что свидетельствует о наличии на мембране адсорбированных клеток фенотипа CD45⁻ и CD31⁻.

Проведен также иммуно-ферментный анализ факторов роста СК из жировой ткани (по методике, описанной ниже). Фактор роста SCF это гемопоэтический ростовой фактор, получаемый из фибробластов. Этот фактор (называемый фактор роста стволовых клеток или mast cell ростовой фактор) стимулирует примитивные гемопоэтические клетки mast cell и комитированные предшественники клеток. Очищенный SCF сильно гликолизированная димерная молекула с мол. весом 15-20 кДа. Растворимая форма SCF стимулирует пролиферацию гемопоэтических клеток и функционирует как лиганд для поддержания межклеточной адгезии.

По итогам анализа было обнаружено, что фактор роста сконцентрирован в камере

9, при этом в камере не были обнаружены молекулы балластных белков альбумина и гемоглобина. Данные молекулы были сконцентрированы в камере 8.

Были проведены эксперименты с различными трековыми мембранами, которые показали эффективность предложенного устройства при выделении дифференцированных стволовых клеток с фенотипом CD45- и CD31- и факторов роста из содержащейся в анализе жировой ткани, при этом результаты по адсорбционным потерям варьировались в пределах не более 20-30%.

Также были проведены эксперименты с использованием в качестве мембраны 12 - не модифицированной ТМ с диаметром пор 20 мкм. После завершения процесса диализа ССФ в камере 7 были обнаружены стволовые клетки дифференцированные и недифференцированные в количестве порядка $3 \cdot 10^4$ ед/мл. В камере 6 также обнаружено незначительное количество СК (менее 50 ед/мл). Часть СК была адсорбирована на поверхности мембраны 12. Была также проведена проверка наличия и количественный анализ фактора роста стволовых клеток SCF. Концентрация SCF в образцах определялась путем сравнения О. D. (оптической плотности) образца для стандартной калибровочной кривой поглощения. В камере 9 разделительной ячейки КЭД был обнаружен SCF. Концентрация его составила 54 пг/мл.

Увеличение времени разделения до 60 мин не привело к существенному изменению концентрации в камере 7 разделения диализатора. Основная масса не прошедших клеток была сконцентрирована на мембране 13. Таким образом, более 70% СК всех типов беспрепятственно проходят через ТМ с диаметром пор 15-20 мкм в процессе электродиализа. Достаточно высокими являются потери СК в результате адсорбции на ТМ. Проведена проверка выделенных СК в камере 7 сборки КЭД на «стромальность» с использованием микроскопического визуального контроля. Дифференцированные СК имеют округлый фенотип, а недифференцированные фенотип близкий к фибробластам. В камере 7 обнаружены оба типа, однако в камере 6 разделения дифференцированных СК практически не обнаружено. Практически процентное соотношение при 30% потери титра клеток остается на уровне не сепарированной ССФ. Только не дифференцированные СК адсорбируются на трековой мембране, т.е. частичное обогащение происходит, но оно недостаточно для эффективного культивирования СК.

Оценка чистоты стволовых клеток

Оценку чистоты стволовых клеток проводили с использованием флуоресцентной микроскопии. Для этого помещали 5 мкл собранной фракции клеток на предметное стекло. Смотрели стекла под белым светом. У стромальных стволовых клеток наблюдался равномерно круглый фенотип, в то время как у эндотелиальных клеток неправильная форма.

Проверка выделения стволовых клеток клеточной культурой

Культура может также использоваться для подтверждения успешного выделения стромальных стволовых клеток из жировой ткани. При культивации стромальные стволовые клетки прилипают к пластмассе и приобретают морфологию, подобную фибробласту. Процесс изменения морфологии всех прилипших клеток может занять несколько дней. В результате проведенного исследования было обнаружено, что эффективность посева может существенно меняться между донорами. Для увеличения сцепления, делали посев выделенных стволовых клеток в питательной среде, содержащей 50%-й FBS в объеме, достаточном для распределения по всей питательной среде и поверхности бутылки для клеточных культур.

Повторно растворяли 10^5 недавно выделенных стромальных стволовых клеток в 2

мл питательной среды DMEM:F12, содержащей 50%-й FBS, антибиотики и фунгизон. Добавляли клеточную суспензию к 25 см² бутылки для клеточной культуры. Смазывали клеточную суспензию по всей поверхности, качая колбу. Инкубировали во влажном инкубаторе при 37°C, 5% CO₂. Наблюдали клетки ежедневно, используя

5 инвертированный фазово-контрастный микроскоп.

Обычно требуется несколько дней для тех клеток, которые формируют морфологию фибропласта, для старта деления. Оценивали процент клеток, которые прилипли к пластмассовой поверхности, и форму подобную морфологии фибробласта после 7 дней культивирования.

10 Поколение стабильной линии стромальных стволовых клеток

Поколение стабильных линий жировых стволовых клеток необходимо оценивать по их способности к дифференцированию и пролиферации. Для этого осуществляли хранение линии стволовых клеток произведенными вышеупомянутыми способами выделения более 6 месяцев без потерь в результате старения. После минимум 7 дней культивирования заменяли питательную среду на DMEM:F12, содержащую антибиотики, 20% FBS и не содержащую фунгизон. Использовали стандартные методы обработки трипсином, клетки пересейанной культуры после дальнейшей недели культивирования сформировали стабильную клеточную линию. Разделяли клетки еженедельно в

15 отношении 1:3.

20 Для оценки "стволовости" установленных линий жировых стволовых клеток, была проведена дифференцировка клетки по направлению к различным мезодермальным линиям. Для адипогенного дифференцирования, предложено инкубировать культуру в питательной среде DMEM:F12, содержащей 10%-й FBS, 0.5 мкМ 1-метил-3-изобутилксантин, 1 мкМ дексаметазона, 10 мкг/мл инсулина и 100 мкМ индометацина

25 в течение 3 недель. Меняли питательную среду каждые 4 дня. Чтобы визуализировать капельки жира, фиксировали клетки 4%-м формалином и окрашивали масляным красным O. Для остеогенного дифференцирования инкубировали клетки в питательной среде DMEM:F12, содержащей 10%-й FBS, 100 нМ дексаметазона, 10 мМ β-глицерофосфата и 0.05 мМ L-аскорбил-2-фосфат в течение 3 недель. Меняли питательную

30 среду каждые 4 дня. Минерализация внеклеточной матрицы визуализировалась, окрашиваясь ализариновым красным.

Проверка наличия и количественный анализ фактора роста стволовых клеток SCF

35 Принцип теста на наличие SCF, применяемый в комплекте Quatikine SCF immunoassay, является принцип сэндвич-иммуоферментного анализа. Микротитровальный планшет в комплекте поставки был предварительно покрыт специфическими антителами к фактору роста стволовых клеток (SCF). Образцы добавлялись в соответствующие микротитровальные колодцы планшета с биотин-конъюгированным антителом, специфичным для SCF. Далее, авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (ПХ)

40 добавляли в каждый микроколодец и инкубировали. После ТМВ раствор добавляли только в те колодцы, которые содержали SCF. Биотин-конъюгированные антитела и фермент, конъюгированный авидином, демонстрировали изменение цвета. Реакция фермент-субстрат прекращается путем добавления раствора серной кислоты и изменение цвета измерено спектрофотометрически на длине волны 450 нм ± 10 нм с использованием микропланшетного фотометра. Концентрация SCF в образцах определялась путем

45 сравнения O. D. образца для стандартной калибровочной кривой поглощения.

Таким образом, заявляемое устройство предназначено для проведения процесса разделения и концентрирования клеток с поверхностными фенотипами методом электродиализа в буфере, которое может быть рекомендовано для использования в

биохимических, клинико-диагностических и научных лабораториях для очистки стромальных стволовых клеток и фактора роста SCF из жировой ткани человека, костной ткани и крови. На модельной ткани, в качестве которой была использована жировая ткань доноров, была показана высокая селективность отделения СК от других
 5 клеток тканевой суспензии наряду с сохранением их стерильности, клеточной жизнеспособности и регенеративной и клеточной активности. Решена проблема удаления других клеточных популяций, имеющих схожий размер. Таким образом, заявляемое устройство обеспечивает получение из биологических сред качественного продукта - СК и факторов роста, для их дальнейшего использования в реконструктивной хирургии.

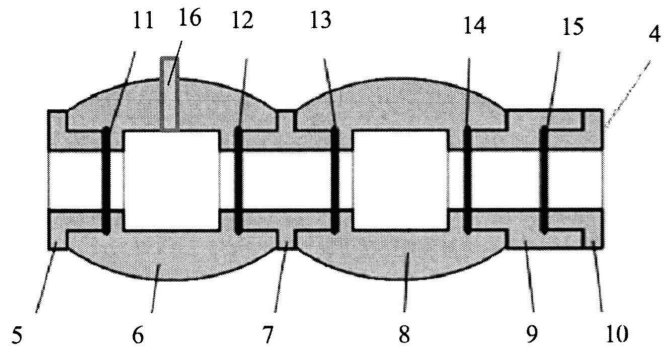
10

(57) Формула полезной модели

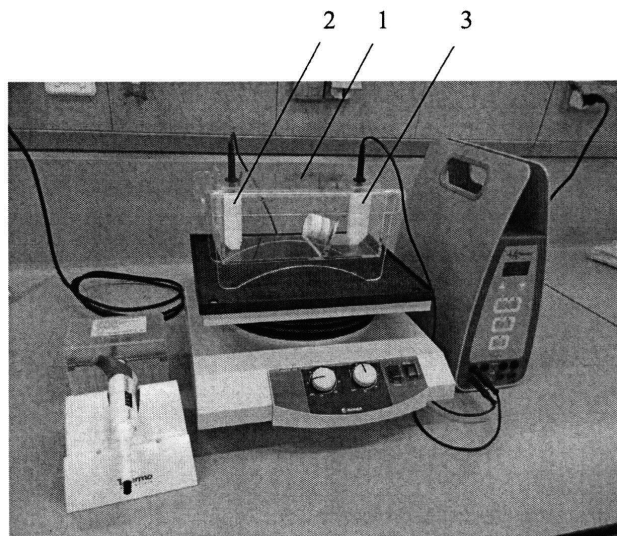
1. Каскадный электродиализатор для выделения мезенхимальных клеток и факторов роста из содержащейся в анализе жировой ткани, включающий емкость для размещения буферного раствора, в которой расположены анод и катод, выполненные с
 15 возможностью подключения к источнику тока, и размещенный между ними картридж-диализатор, содержащий шесть сообщающихся между собой камер, расположенных в отдельных разъемных корпусах, разделенных трековыми мембранами, при этом вторая по удаленности от катода камера предназначена для размещения анализа с жировой тканью и выделения не дифференцированных стволовых клеток CD45⁺ и CD31⁺, третья
 20 предназначена для концентрирования дифференцированных стволовых клеток CD45⁻ и CD31⁻ и их отделения от низкомолекулярных фракций биологически активных веществ, включая факторы роста клеток, четвертая предназначена для концентрирования и отделения низкомолекулярных фракций биологически активных веществ - гемоглобина,
 25 альбумина, иммуноглобулина от факторов роста, пятая - для концентрирования и выделения факторов роста, первая и шестая камеры являются ограничительными, предотвращающими попадание клеток и биологически активных веществ в емкость с буферным раствором и выполнены сообщающимися с емкостью для размещения буферного раствора, с одной стороны, и картриджем-диализатором, с другой, при этом
 30 вторая и третья камеры разделены трековой мембраной, выполненной из полиэтилентерефталата (ПЭТФ) толщиной 10-30 мкм с размерами пор 15-20 мкм, плотностью пор порядка 10⁴ см², и модифицированной антителами, аффинными к выделяемым не дифференцированным стволовым клеткам CD45⁺ и CD31⁺, ковалентно связанными с матрицей трековой мембраны; третья и четвертая камеры разделены
 35 трековой мембраной, выполненной из ПЭТФ толщиной 10-30 мкм с размерами пор 0,5-2 мкм и плотностью пор порядка 10⁶ см² - 10⁸ см²; четвертая и пятая камеры разделены трековой мембраной, выполненной из ПЭТФ толщиной 10-30 мкм с размерами пор 0,1-0,2 мкм и плотностью пор порядка 1-5 × 10⁸ см²; первая и вторая
 40 камеры, а также пятая и шестая камеры разделены трековыми мембранами, выполненными из ПЭТФ толщиной 20-30 мкм с размерами пор 0,01-0,02 мкм и плотностью пор порядка 1-3 × 10⁹ см².

2. Электродиализатор по п. 1, характеризующийся тем, что камера для размещения анализа с жировой тканью и выделения не дифференцированных стволовых клеток
 45 снабжена штуцером для подключения к насосу для обеспечения непрерывной подачи анализа в камеру.

1

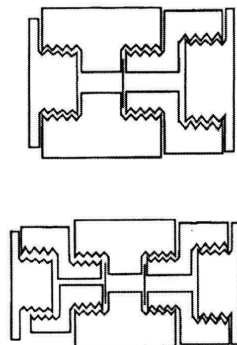


Фиг.1

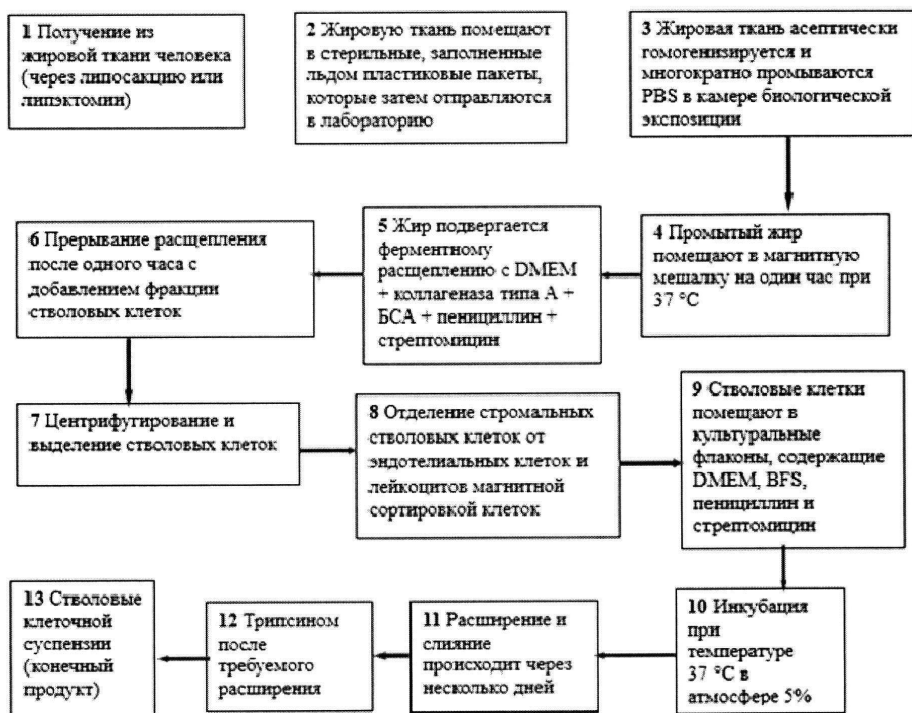


Фиг.2

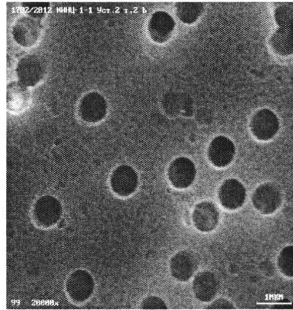
2



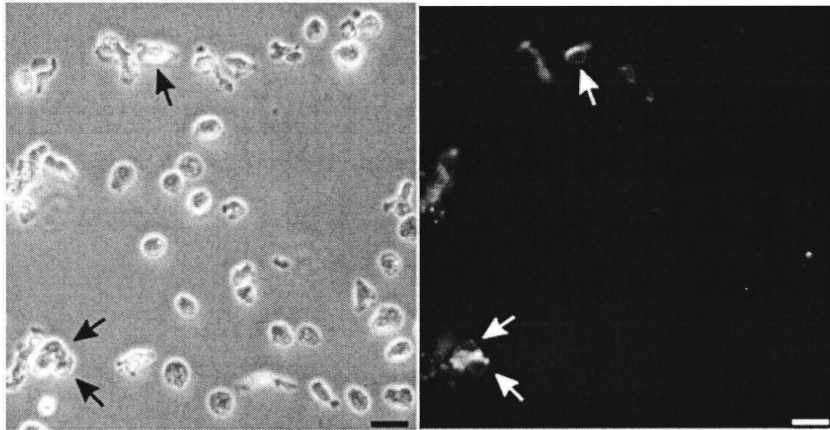
Фиг.3



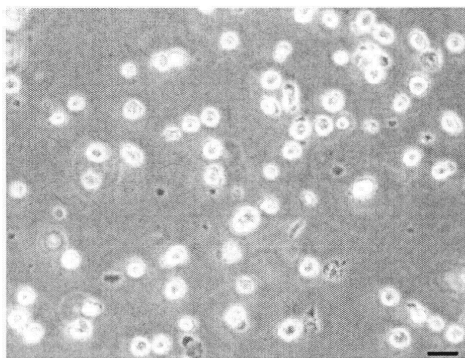
Фиг.4



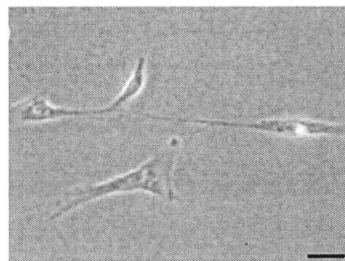
Фиг.5



Фиг.6



Фиг.7



Фиг.8