

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **238286**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **428367**

(22) Data zgłoszenia: **30.12.2018**

(51) Int. Cl.

**C12N 5/02 (2006.01)**

**C12N 5/074 (2010.01)**

**C12N 5/0775 (2010.01)**

(54) **Powierzchnia do hodowli adherentnych komórek macierzystych, jej zastosowanie oraz sposób prowadzenia hodowli adherentnych komórek macierzystych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:  
**13.07.2020 BUP 15/20**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:  
**02.08.2021 WUP 18/21**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Jagielloński, Kraków, PL**  
**UNIwersytet Medyczny w Lublinie,**  
**Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**BARTOSZ JAN PŁACHNO, Kraków, PL**  
**ANNA BOGUCKA-KOCKA, Świdnik, PL**  
**JANUSZ KOCKI, Świdnik, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Rafał Witek**

**PL 238286 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest powierzchnia do hodowli adherentnych komórek macierzystych, jej zastosowanie oraz sposób hodowli ludzkich i zwierzęcych komórek macierzystych z zastosowaniem wydzieliny roślinnej otrzymanej z roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia*.

Wydzielina gatunków z rodzaju *Pinguicula rectifolia* ma postać klejącego śluzu.

W roku 1991 roku odkryto i opisano po raz pierwszy mezenchymalne komórki macierzyste (*MSC-Mesenchymal Stem Cells*) (Caplan 1991). W kolejnych latach udowodniono, że MSC w hodowlach *in vitro* po odpowiedniej stymulacji różnicują się w kierunku innych komórek: osteocytów, chondrocytów, neurocytów lub adipocytów. MSC są niezróżnicowanymi komórkami znajdującymi się w różnych tkankach człowieka i mają zdolność do samoodnowy. MSC to naturalny materiał wykorzystywany w medycynie regeneracyjnej. Terapia MSC daje nadzieję na wyleczenie różnych przewlekłych chorób człowieka.

Jednym ze źródeł pozyskiwania MSC jest krew pępowinowa i galareta Whartona pępowiny. Z powodu niewielkiej liczby MSC w materiale wyjściowym konieczne jest prowadzenie hodowli MSC *in vitro*, w celu uzyskania odpowiednio dużej liczby MSC, które po różnicowaniu można podać pacjentowi jako terapeutyczny materiał biologiczny.

Obecnie jednak największym i nierozwiązanym problemem jest uzyskanie dużej liczby MSC od pacjenta. Można je uzyskać w hodowlach komórkowych *in vitro* otrzymując materiał spersonalizowany. Dotychczas stosowane sposoby hodowli MSC są nieskuteczne ze względu na trudności MSC w kontakcie z podłożem i sąsiednimi komórkami – co uniemożliwia wzrost MSC i ich proliferację.

Nieoczekiwanie problem ten został rozwiązany w niniejszym wynalazku.

Celem wynalazku jest poprawienie wydajności hodowli komórek macierzystych prowadzonych *in vitro*.

Istota wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest powierzchnia do hodowli adherentnych komórek macierzystych znamienna tym, że stanowi powierzchnię naczynia hodowlanego pokrytą zewnętrzną powłoką zawierającą śluz wydzielany przez rośliny z gatunku *Pinguicula rectifolia*, korzystnie śluz wydzielany przez gruczoły trzoneczkowe występujące na liściach i kwiatostanach tego gatunku.

W przykładowej realizacji, powierzchnię według wynalazku otrzymuje się poprzez pokrycie powierzchni naczynia hodowlanego wspomnianym śluzem roślinnym. Przed rozpoczęciem hodowli naczynie suszy się i sterylizuje. W przykładowej realizacji, suszenie prowadzi się w warunkach sterylnych, pod ciśnieniem atmosferycznym i w temperaturze pokojowej, natomiast sterylizację można prowadzić metodą autoklawowania, przykładowo w temperaturze 121°C, pod ciśnieniem 215 kPa, przez 20 minut.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób prowadzenia hodowli adherentnych komórek macierzystych w znanych warunkach i w znanym medium hodowlanym, znamienny tym, że hodowlę prowadzi się na stałej powierzchni naczynia hodowlanego pokrytą zewnętrzną powłoką zawierającą śluz wydzielany przez rośliny z gatunku *Pinguicula rectifolia*, korzystnie śluz wydzielany przez gruczoły trzoneczkowe występujące na liściach i kwiatostanach roślin tego gatunku.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie powierzchni naczynia hodowlanego pokrytej zewnętrzną powłoką zawierającą śluz wydzielany przez rośliny z gatunku *Pinguicula rectifolia*, korzystnie śluz wydzielany przez gruczoły trzoneczkowe występujące na liściach i kwiatostanach roślin tego gatunku, do prowadzenia hodowli adherentnych komórek macierzystych.

Szczegółowy opis wynalazku

W przykładowej realizacji, hodowanymi komórkami macierzystymi są komórki ludzkie, w szczególności mezenchymalne komórki macierzyste. W przykładowych realizacjach hoduje się komórki mezenchymalne izolowane z tkanki tłuszczowej (KT) otrzymane wg standardowej procedury liposukcji, po trawieniu enzymatycznym kolagenazą typu I oraz komórki mezenchymalne z galarety Whartona (GW), otrzymane drogą eksplantów komórkowych.

Za wyjątkiem stosowania specjalnie zmodyfikowanej zgodnie z wynalazkiem powierzchni hodowlanej pozostałe parametry prowadzenia hodowli nie odbiegają od standardowych.

W przykładowych realizacjach hodowle komórkowe prowadzi się w czasie pozwalającym na uzyskanie odpowiedniej ilości komórek, zwłaszcza w czasie 21 dni w standardowych warunkach: w temp. 37°C, w stężeniu tlenu na poziomie 21% oraz 5% CO<sub>2</sub>. W szczególności, w trakcie hodowli komórki pasażuje się po osiągnięciu odpowiedniej fazy wzrostu, zwłaszcza co 3 dni, z zastosowaniem trypsyny. W przykładowych realizacjach stosuje się podłoże o następującym składzie: 10% FBS (Fetal Bovine

Serum), 0,5% penicyliny ze streptomycyną, 0,5% amfoterycyny, DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium).

Istota wynalazku polega na dostarczeniu sposobu zwiększenia przylegania (adherencji) MSC do podłoża w celu zwiększenia ich proliferacji (podziałów komórkowych). W tym celu wykorzystano śluz roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia*. Istotą sposobu prowadzenia hodowli komórkowych według wynalazku jest zastosowanie wydzieliny roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia* do pokrycia dna naczynia hodowlanego (szklanego lub plastikowego) co zwiększa adherentność MSC a przez to uzyskanie odpowiednio dużej liczby MSC jako materiału przeszczepowego.

Nieoczekiwanie ustalono, że właściwości wydzieliny roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia* poprawiają adherentność komórek macierzystych i zwiększają proliferację w hodowlach komórkowych, jednocześnie pozostając bez niepożądanego wpływu cytotoksycznego – co zostało udowodnione w przeprowadzonych testach *in vitro*.

Zastosowanie wydzieliny roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia* wywołało pozytywne efekty w hodowlach krótko- i długoterminowych komórek macierzystych człowieka.

Wydzielinę pozyskiwano z roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia*, nanoszono na podłoża stałe (szklane lub plastikowe) tworzące komórkowe naczynia hodowlane, które suszono i sterylizowano. Po zalaniu medium hodowlanym prowadzono długoterminowe hodowle komórek macierzystych pozyskanych z różnych tkanek. Do oceny sposobu hodowli komórek macierzystych z zastosowaniem wydzieliny roślinnej zastosowano znane procedury badawcze: obserwacje przyżyciowe komórek, obserwacje żywotności z zastosowaniem testu z MTT i aneksyną V/jodek propidiowy, analiza cytometryczna i ocena ekspresji wybranych genów.

Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły na stwierdzenie pozytywnego wpływu wydzieliny roślinnej na przebieg hodowli komórek macierzystych.

Ustalono, że właściwości wydzieliny roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia* nie powodują niepożądanego wpływu cytotoksycznego na ludzkie komórki macierzyste.

Nieoczekiwanie kontakt komórek macierzystych z wydzieliną roślinną wpłynął na wzrost ekspresji dwóch genów kodujących białka przylegania *AMIGO1* i *CLDN1* – odpowiedni o 7% i 28%. Zatem, wydzieliny roślin *Pinguicula rectifolia* wpływają korzystnie na ekspresję genów kodujących cząsteczki adhezyjne – zwiększające przyleganie komórek do podłoża, przez co poprawiające ich potencjał wzrostowy i proliferacyjny. Białka te również wytyczają kierunek migracji hodowanych komórek w środowisku zewnątrzkomórkowym. Jest to bardzo istotna informacja dla efektywnego prowadzenia hodowli komórek adherentnych (rosnących na podłożu a nie w zawieszynie), w tym komórek macierzystych.

Reasumując, nieoczekiwanie stwierdzono, że wydzieliny (śluz) roślin *Pinguicula rectifolia* poprawiają adherentność ludzkich komórek macierzystych.

Ponadto, nieoczekiwanie kontakt komórek macierzystych z wydzieliną roślinną wpłynął na wzrost ekspresji dwóch genów związanych z utrzymywaniem potencjału pluripotencji komórek macierzystych: *POU5F1* i *KLF4*. W ten sposób śluz roślin *Pinguicula rectifolia* wpływa pozytywnie na potencjał pluripotencji („macierzystości”) oraz przeciwdziała różnicowaniu w hodowlach komórkowych – są to bardzo korzystne właściwości efektywnego prowadzenia hodowli komórek macierzystych, nie uzyskiwane w takich samych warunkach hodowli tych samych komórek prowadzonych bez wydzieliny roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia*.

Reasumując, nieoczekiwanie stwierdzono, że wydzieliny (śluz) roślin *Pinguicula rectifolia* poprawia potencjał pluripotencji komórek macierzystych oraz przeciwdziała ich różnicowaniu się w hodowlach komórkowych.

Ponadto, nieoczekiwanie okazało się, że wydzieliny (śluzu) roślin *Pinguicula rectifolia* zwiększają ekspresję genów regulujących transkrypcję: *SOX2* i *SOX9* (kodują czynniki transkrypcyjne), utrzymujących pluripotencję komórek macierzystych. Utrzymanie pluripotencji komórek macierzystych w hodowli jest niezwykle ważne dla efektywnego prowadzenia hodowli komórek macierzystych jako źródła komórek macierzystych do przeszczepów i eksperymentów. Test na obecność antygenów powierzchniowych *CD105*, *CD73*, *CD90* charakterystycznych dla komórek macierzystych potwierdził, iż komórki w kontakcie z wydzieliną roślinną utrzymują swoje właściwości.

Reasumując, nieoczekiwanie stwierdzono, że wydzieliny (śluz) roślin *Pinguicula rectifolia* poprawiają utrzymanie pluripotencji komórek macierzystych w hodowli.

**P r z y k ł a d 1.** Otrzymywanie wydzieliny z roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia*.

W badaniach wykorzystano rośliny gatunku *Thustosz Pinguicula rectifolia* (rodzina *Lentibulariaceae*). Rośliny pochodziły z uprawy w Instytucie Botaniki UJ. *Pinguicula rectifolia* jest rośliną mięsożerną chwytającą owady za pomocą lepkich liści. Wydzielina roślin z gatunku *Pinguicula* ma postać klejącego śluzu produkowanego przez emergencje (gruczoły) trzoneczkowe występujące na liściach i kwiatostanach. Na szczytach gruczołów znajdują się krople śluzu.

Krople śluzu mogą być zbierane dowolnymi znanymi metodami.

W opisywanym przykładzie krople śluzu zbierano z powierzchni liści wykorzystując w tym celu szklaną bagietkę.

**P r z y k ł a d 2.** Nanoszenie wydzieliny roślinnej na powierzchnie do hodowli komórek macierzystych.

Wydzielinę pozyskiwano z roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia*, nanoszono za pomocą pędzelka na podłoża stałe (szklane lub plastikowe) tworzące naczynia hodowlane. Następnie naczynia hodowlane posiadające zmodyfikowane w ten sposób powierzchnie suszono w jałowej komorze laminarnej (Komora laminarna SafeFast Elite 212S) i sterylizowano w autoklawie LABOKLAV 55V.

Suszenie prowadzono w warunkach sterylnych, pod ciśnieniem atmosferycznym i w temperaturze pokojowej, natomiast sterylizację prowadzono metodą autoklawowania, w temperaturze 121°C, pod ciśnieniem 215 kPa, przez 20 minut.

Warunki suszenia: ciśnienie atmosferyczne, temp. pokojowa.

Parametry sterylizacji: temperatura 121°C, ciśnienie 215 kPa, ekspozycja 20 minut, wolne schładzanie, odpowietrzanie grawitacyjne.

**P r z y k ł a d 3.** Hodowla komórek macierzystych na powierzchniach pokrytych wydzieliną z roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia*.

W celu ustalenia wpływu zmodyfikowanej zgodnie z wynalazkiem powierzchni do hodowli komórek macierzystych na przebieg hodowli przeprowadzono testy porównujące wyniki hodowli przykładowych ludzkich komórek macierzystych w standardowych warunkach na standardowych powierzchniach naczyń hodowlanych oraz w tych samych warunkach na powierzchniach zmodyfikowanych zgodnie z wynalazkiem.

Do badań użyto dwóch rodzajów komórek macierzystych człowieka – mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej (KT) otrzymanych wg standardowej procedury liposukcji, po trawieniu enzymatycznym kolagenazą typu I oraz komórki mezenchymalne z galarety Whartona (GW), otrzymane drogą eksplantów komórkowych.

Hodowle komórkowe przeprowadzono w czasie 21 dni (z pasażowaniem co 3 dni) w inkubatorze Brunswick New Galaxy 170R w standardowych warunkach: w temp. 37°C w standardowym stężeniu tlenu na poziomie 21% oraz 5% CO<sub>2</sub>. Komórki hodowano w komercyjnie dostępnych naczyniach hodowlanych, a następnie pasażowano po osiągnięciu odpowiedniej fazy wzrostu z zastosowaniem trypsyny.

Skład podłoża: 10% FBS (Fetal Bovine Serum, firmy Sigma), 0,5% penicyliny ze streptomycyną (firmy Sigma), 0,5% amfoterycyny (firmy Sigma), DMEM (firmy Sigma).

**P r z y k ł a d 4.** Efekt hodowli komórek macierzystych na powierzchniach hodowlanych według wynalazku.

W celu ustalenia wpływu zmienionych zgodnie z wynalazkiem warunków hodowli na przebieg hodowli komórek macierzystych zastosowano następujące procedury badawcze:

- hodowle komórkowe,
- barwienie przyżyciowe komórek w celu ustalenia żywotności komórek,
- obserwacje w mikroskopie świetlnym i skaningowym mikroskopie elektronowym w celu potwierdzenia prawidłowej morfologii komórek, oraz oceny adhezji komórek do podłoża,
- ocenę ekspresji genów (izolację RNA, oznaczanie stężenia RNA, reakcją odwrotnej transkrypcji, PCR w czasie rzeczywistym).

Hodowle komórkowe. Komórki wyizolowane z galarety Whartona ze sznura pępowinowego hodowano w naczyniach hodowlanych przystosowanym do hodowli komórek adherentnych o powierzchni 25 cm<sup>2</sup> TC Flask T25 firmy Sarstedt. Komórki hodowano w podłożu hodowlanym zawierającym: pożywkę hodowlaną DMEM/F-12 50/50 1X + L-glutamine firmy Corning, 10% płodową surowicę bydlęcą FBS Good Filtered Bovine Serum firmy Pan Biotech i 1% roztwór antybiotyków Antibiotic-Antimycotic

(100X) Penicylina, Streptomycyna, Amfoterycyna B firmy Gibco. Hodowle komórkowe inkubowano w inkubatorze Galaxy 170R firmy New Brunswick w warunkach: temperatura 37°C, stężenie tlenu 4%, stężenie dwutlenku węgla 5% i wilgotność 95%. Podłoże hodowlane zmieniano co 3 dni, z mikroskopową hodowanych komórek przy użyciu mikroskopu odwróconego Olympus CX 41. Komórki przygotowywano do analizy cytometrycznej oraz izolacji RNA. Hodowle komórkowe prowadzono w czasie pozwalającym na uzyskanie odpowiedniej liczby komórek, korzystnie w czasie 21 dni w standardowych warunkach: w temp. 37°C, w stężeniu tlenu na poziomie 21% oraz 5% CO<sub>2</sub>. W trakcie hodowli komórki pasażowano po osiągnięciu odpowiedniej fazy wzrostu, zwłaszcza co 3 dni, z zastosowaniem trypsyny.

Izolacja RNA. Izolację komórkowego RNA przeprowadzono za pomocą metody Chomczyńskiego i Sacchi przy użyciu odczynników: Tri Reagent Solution firmy *Ambion*, chloroform firmy *Sigma-Aldrich*, izopropanol firmy *Sigma* i alkohol etylowy bezwodny 99,8% firmy *POCH*. Komórki umieszczono w probówkach typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml. Następnie do każdej z probówek dodano po 0,5 ml odczynnika Tri Reagent i homogenizowano komórki przy użyciu pipety, aż do uzyskania jednorodnej mieszaniny. Kolejno próby inkubowano przez 5 min. w temperaturze pokojowej, po czym do każdej próbki dodano po 100 µl chloroformu, wytrząsano ręcznie i ponownie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 min.

Spektrofotometryczne oznaczanie stężenia RNA. Następnie próbki wirowano przez 15 min w wirowce 5415R firmy *Eppendorf* z prędkością 13,2 tys. obr./min. w temperaturze 4°C. Po odwirowaniu zebrano fazę wodną do nowych probówek typu *Eppendorf* o pojemności 1,5 ml po czym dodano 250 µl izopropanolu, a kolejno próbki mieszano ręcznie, inkubowano przez 20 min w temperaturze pokojowej i wirowano przez 20 min w wirowce 5415R firmy *Eppendorf* z prędkością 13,2 tys. obr./min. w temperaturze 4°C. Po odwirowaniu pozbywano się supernatantu, a do powstałego osadu dodano 0,5 ml schłodzony 75% etanol. Po zwirowaniu supernatant zlano i pozostawiono próbki przez 10 min w celu wysuszenia osadu. Następnie próbki rozpuszczano w 12 µl wody ultraczystej i umieszczano na lodzie. Do oznaczania stężenia i czystości RNA wykorzystano 2 µl próbki. Pomiary próbek wykonano kilkakrotnie przy użyciu aparatu *NanoDrop 2000c* firmy *ThermoFisher*. Próbkę o stosunku wartości absorbancji 260/280 zawierające się w zakresie 1,8–2,0 wykorzystano do dalszych badań.

Reakcja odwrotnej transkrypcji. Po wstępnym oznaczeniu stężenia w aparacie *NanoDrop Agilent* doprowadzano próbki do koncentracji 1 µg/µl RNA. Następnie przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji polegającą na przepisaniu mRNA na komplementarne cDNA przy użyciu enzymu odwrotnej transkryptazy zgodnie z protokołem poniżej: 10x RT Buffer – 2 µl, 25x dNTP Mix (100 mM) – 0.8 µl, 10x RT Random Primers – 2.0 µl, MultiScribe Reverse Transcriptase – 1.0 µl, RNase Inhibitor – 1.0 µl i Nuclease-free H<sub>2</sub>O – 3.2 µl. Po dodaniu wszystkich odczynników z zestawu High-Capacity cDNA Transcription Kits firmy *Applied Biosystems* kolejno dodano 10 µl RNA o stężeniu 1 µg/µl, następnie próbki wymieszano przy użyciu aparatu *Vortex MS3 basic* firmy *IKA*, wirowano przez 10 s w wirowce 5415R firmy *Eppendorf* z prędkością 2 tys. obr./min po czym umieszczano w termocyklerze *Veriti* firmy *Applied Biosystems* w cyklach: 10 min w temperaturze 25°C, 2 godziny w temperaturze 37°C i 5 min w temperaturze 85°C. Po zakończonej reakcji próbki przechowywano w temperaturze -20°C.

PCR w czasie rzeczywistym. W trakcie badania, po 6 pasażach izolowano całkowity komórkowy RNA metodą Chomczyńskiego i Sacchii (Chomczyński i wsp., 1987), w celu wykonania ekspresji genów – w komórkach kontrolnych (hodowanych bez wydzieliny roślinnej) i w komórkach hodowanych na podłożu z wydzieliną roślinną. Metodami standardowymi oceniano preparaty mRNA, wykonano syntezę cDNA i analizę ekspresji genów techniką qPCR w aparacie *StepOnePlus* firmy *Applied Biosystems*, wykorzystując zestawy odczynników firmy *Applied Biosystems*, reakcje prowadzono w objętości 25 µl/dołek. Poziomy ekspresji ( $\Delta CT$ ) badanych genów obliczono według wzoru znanego z publikacji Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C(T)$ ) Method. *Methods* 2001; 25:402–408. W celu ustalenia wartości  $\Delta CT$ ,  $\Delta\Delta CT$  oraz RQ skorzystano z poniższych wzorów:

$$\Delta CT \text{ badanego genu} = CT \text{ badanego genu} - CT \text{ GAPDH}$$

$$\Delta CT \text{ genu kalibratora} = CT \text{ genu kalibratora} - CT \text{ GAPDH}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ badanego genu} - \Delta CT \text{ kalibratora,}$$

gdzie  $\Delta CT$  kalibratora stanowi średnia wyników  $\Delta CT$  genu kalibratora w grupie kontrolnej  
 $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$

Analizowano poziomy ekspresji genów związanych z procesem apoptozy oraz proliferacji, w odniesieniu do kontroli endogennej – genem referencyjnym był gen *GAPDH* (sonda Hs. Stosowano następujące sondy firmy ThermoFisher dla badanych genów: *POU5F1* (Hs00999634\_gH), *KLF4* (Hs00358836\_m1), *SOX2* (Hs04234836\_s1), *SOX9* (Hs00165814\_m1), *AMIGO1* (Hs00827030\_g1) i *CLDN1* (Hs00221623\_m1).

Zastosowane procedury te umożliwiły pozytywną ocenę wpływu wydzieliny roślinnej na przebieg hodowli komórek macierzystych, które łatwiej się przyklejały do podłoża i szybciej proliferowały.

Oceniano również testem z MTT i aneksyną V/jodek propidiowy wpływ wydzieliny roślinnej na komórki i wykluczono efekty cytotoksyczne. Jednocześnie wykonano dokumentację hodowanych komórek stosując mikroskopię świetlną i elektronową.

#### Wyniki i ich dyskusja

Wydzieliny (śluz) roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia* poprawiają adherentność ludzkich komórek macierzystych wyizolowanych z galarety Whartona pępownicy. Zbadano ekspresję wybranych genów kodujących białka błony komórkowej, które umożliwiają przyleganie komórek do siebie lub do substancji (macierzy) międzykomórkowej. Białka te również wytyczają kierunek migracji hodowanych komórek w środowisku zewnątrzkomórkowym. Wydzieliny (śluz) roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia* wpływają korzystnie na ekspresję genów kodujących cząsteczki adhezyjne – zwiększające przyleganie komórek do podłoża, przez co poprawiające ich potencjał wzrostowy i proliferacyjny.

Na Fig. 1 przedstawiono wyniki pomiaru poziomu ekspresji genów *AMIGO1* i *CLDN1* w komórkach macierzystych. Wartość LogRQ dla komórek badanych (hodowle z wydzieliną) vs. komórki kontrolne (bez wydzieliny). Zaobserwowano średni wzrost ekspresji genu *AMIGO1* o 7% (Fig. 1) – w stosunku do komórek hodowanych w tych samych warunkach bez wydzieliny roślinnej. Jednocześnie zaobserwowano średni wzrost ekspresji genu *CLDN1*, kodującego kładynę 1 o 28% (Fig. 1) – w stosunku do komórek hodowanych w tych samych warunkach bez wydzieliny roślinnej.

Nieoczekiwane kontakty komórek macierzystych z wydzieliną roślinną wpłynęły na wzrost ekspresji dwóch genów kodujących białka przylegania *AMIGO1* i *CLDN1* – odpowiedni o 7% i 28% (Fig. 1). Jest to bardzo istotna informacja dla efektywnego prowadzenia hodowli komórek adherentnych (rosnących na podłożu a nie w zawiesinie), w tym komórek macierzystych.

Stwierdzono również, że śluz roślin gatunku *Pinguicula rectifolia* zwiększa potencjał pluripotencji oraz przeciwdziała różnicowaniu w hodowlach komórkowych – są to bardzo korzystne właściwości efektywnego prowadzenia hodowli komórek macierzystych, nie uzyskiwane w takich samych warunkach hodowli tych samych komórek bez obecności wydzieliny (śluzu) roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia*.

Zasadniczy efekt techniczny uzyskiwany dzięki wynalazkowi dotyczy zwiększenia przylegania (adherencji) MSC do podłoża w celu zwiększenia ich proliferacji (podziałów komórkowych). W tym celu wykorzystano wydzieliny (śluz) roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia*. Istotą sposobu prowadzenia hodowli komórkowych według wynalazku jest zastosowanie wydzieliny roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia* do pokrycia dna naczynia hodowlanego (szklanego lub plastikowego) co zwiększa adherentność MSC a przez to uzyskanie odpowiednio dużej liczby MSC jako materiału przeszczepowego. W przeprowadzonych eksperymentach hodowlanych *in vitro* nieoczekiwanie ustalono, że właściwości wydzieliny roślin z gatunku *Drosophyllum* poprawiają adherentność komórek macierzystych i zwiększają proliferację w hodowlach komórkowych, jednocześnie pozostając bez niepożądanego wpływu cytotoksycznego.

Następnie badano wpływ wynalazku na ekspresję badanych genów związanych z utrzymywaniem potencjału pluripotencji komórek macierzystych.

Na Fig. 2 przedstawiono wyniki pomiaru poziomu ekspresji genów *POU5F1* i *KLF4* w komórkach macierzystych. Wartość LogRQ dla komórek badanych (hodowle z wydzieliną) vs. komórki kontrolne (bez wydzieliny). Nieoczekiwane kontakty komórek macierzystych z wydzieliną roślinną wpłynęły na wzrost ekspresji genu *POU5F1* – średni wzrost ekspresji o 7% (Fig. 2) – w stosunku do komórek hodowanych w tych samych warunkach bez wydzieliny roślinnej. Gen koduje białko odpowiedzialne za zachowywanie cech pluripotencji komórek macierzystych. Również nieoczekiwane kontakty komórek macierzystych z wydzieliną roślinną wpłynęły na wzrost ekspresji genu *KLF4* – średni wzrost ekspresji o 5,5% (Fig. 2) – w stosunku do komórek hodowanych w tych samych warunkach bez wydzieliny roślinnej. Gen koduje białko odpowiedzialne za zachowywanie cech macierzystości i przeciwdziała różnicowaniu komórek – co jest bardzo istotną cechą w uzyskaniu dużej liczby komórek macierzystych do przeszczepów.

Następnie badano wpływ wynalazku na ekspresję badanych genów kodujących czynniki transkrypcyjne związane z utrzymywaniem pluripotencji komórek macierzystych. Nieoczekiwane okazało

się, że wydzieliny (śluzu) roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia* zwiększają ekspresję genów regulujących transkrypcję (kodują czynniki transkrypcyjne), utrzymujących pluripotencję komórek macierzystych:

Na Fig. 3 przedstawiono wyniki pomiaru poziomu ekspresji genów SOX2 i SOX9 w komórkach macierzystych. Wartość LogRQ dla komórek badanych (hodowle z wydzieliną) vs. komórki kontrolne (bez wydzieliny). Nieoczekiwane kontakty komórek macierzystych z wydzieliną roślinną wpłynęły na wzrost ekspresji genów SOX2 i SOX9 (Fig. 3) – regulujących transkrypcję (kodują czynniki transkrypcyjne), utrzymujących pluripotencję komórek macierzystych. Wykazano średni wzrost ekspresji genu SOX2 o 38% – w stosunku do komórek hodowanych w tych samych warunkach bez wydzieliny roślinnej. Jednocześnie wykazano średni wzrost ekspresji genu SOX9 o 13% – w stosunku do komórek hodowanych w tych samych warunkach bez wydzieliny roślinnej.

Następnie, stosując technikę cytometrii przepływowej (cytometr Navios) oceniono obecność antygenów charakterystycznych dla komórek macierzystych i porównano w obu grupach hodowanych komórek: w obecności wydzieliny (śluzu) roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia* i w hodowlach bez wydzieliny (śluzu) roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia*.

Komórki te charakteryzowała obecność antygenów powierzchniowych CD105, CD73, CD90 przy jednoczesnym braku CD45, CD34, CD14. Wyniki przedstawiono w poniższej tabeli:

<b>Badany antygen</b>	<b>Średni odsetek komórek macierzystych hodowanych w obecności wydzieliny (śluzu) roślin z gatunku <i>Pinguicula</i></b>	<b>Średni odsetek komórek macierzystych hodowanych <u>bez</u> wydzieliny (śluzu) roślin z gatunku <i>Pinguicula</i></b>
<b>CD105+</b>	97,00	97,70
<b>CD73+</b>	94,30	98,60
<b>CD90+</b>	93,8	97,30
<b>CD45+</b>	0	0
<b>CD34+</b>	0	0
<b>CD14+</b>	0	0

Korzystnie, w przykładowych realizacjach hodowle komórkowe prowadzi się w czasie pozwalającym na uzyskanie odpowiedniej ilości komórek, korzystnie w czasie 21 dni w standardowych warunkach: w temp. 37°C, w stężeniu tlenu na poziomie 21% oraz 5% CO<sub>2</sub>. Korzystnie, w trakcie hodowli komórki pasażuje się po osiągnięciu odpowiedniej fazy wzrostu, zwłaszcza co 3 dni, z zastosowaniem trypsyny. Korzystnie, w przykładowych realizacjach stosuje się podłoże o następującym składzie: 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 0,5% penicyliny ze streptomycyną, 0,5% amfoterycyny, DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium).

Na Fig. 4 przedstawiono komórki macierzyste hodowane z wydzielinami (śluzami) roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia*.

#### Wnioski

W wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że właściwości wydzieliny roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia* nie powodują niepożądanego wpływu cytotoksycznego na ludzkie komórki macierzyste.

Ponadto, w wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że wydzielina z roślin *Pinguicula rectifolia* poprawia adherentność ludzkich komórek macierzystych. Nieoczekiwane kontakty komórek macierzystych z wydzieliną roślinną wpłynęły na wzrost ekspresji dwóch genów kodujących białka przylegania AMIGO1 i CLDN1 – odpowiedni o 7% i 28%. Czyli wydzieliny (śluzu) roślin *Pinguicula rectifolia* wpływają korzystnie na ekspresję genów kodujących cząsteczki adhezyjne – zwiększające przyleganie komórek do podłoża, przez co poprawiające ich potencjał wzrostowy i proliferacyjny. Białka te również wytyczają kierunek migracji hodowanych komórek w środowisku zewnątrzkomórkowym. Jest to bardzo istotna informacja dla efektywnego prowadzenia hodowli komórek adherentnych (rosnących na podłożu a nie w zawieszynie), w tym komórek macierzystych.

Ponadto, w wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że wydzielina roślin *Pinguicula rectifolia* poprawia potencjał pluripotencji („macierzystości”) oraz przeciwdziała różnicowaniu w hodowlach komórkowych. Nieoczekiwane kontakty komórek macierzystych z wydzieliną roślinną wpłynęły na wzrost ekspresji dwóch genów związanych z utrzymywaniem potencjału pluripotencji komórek macierzystych:

*POU5F1* i *KLF4*. W ten sposób (śluz) roślin *Pinguicula rectifolia* wpływa pozytywnie na potencjał pluripotencji („macierzystości”) oraz przeciwdziała różnicowaniu w hodowlach komórkowych – są to bardzo korzystne właściwości efektywnego prowadzenia hodowli komórek macierzystych, nie uzyskiwane w takich samych warunkach hodowli tych samych komórek bez wydzieliny (śluzu) roślin z gatunku *Pinguicula rectifolia*.

Ponadto, w wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że wydzieliny roślin *Pinguicula rectifolia* poprawiają utrzymanie pluripotencji komórek macierzystych w hodowli. Nieoczekiwanie okazało się, że wydzieliny roślin *Pinguicula rectifolia* zwiększają ekspresję genów regulujących transkrypcję: *SOX2* i *SOX9* (kodują czynniki transkrypcyjne), utrzymujących pluripotencję komórek macierzystych. Utrzymanie pluripotencji komórek macierzystych w hodowli jest niezwykle ważne dla efektywnego prowadzenia hodowli komórek macierzystych jako źródła komórek macierzystych do przeszczepów i eksperymentów. Test na obecność antygenów powierzchniowych CD105, CD73, CD90 charakterystycznych dla komórek macierzystych potwierdził, iż komórki w kontakcie z wydzieliną roślinną utrzymują swoje właściwości.

### Zastrzeżenia patentowe

1. Powierzchnia do hodowli adherentnych komórek macierzystych, **znamienna tym**, że stanowi powierzchnię naczynia hodowlanego pokrytą zewnętrzną powłoką zawierającą śluz wydzielany przez rośliny z gatunku *Pinguicula rectifolia*, korzystnie śluz wydzielany przez gruczoły trzoneczkowe występujące na liściach i kwiatostanach roślin tego gatunku.
2. Sposób prowadzenia hodowli adherentnych komórek macierzystych w znanych warunkach i w znanym medium hodowlanym, **znamienny tym**, że hodowlę prowadzi się na stałej powierzchni naczynia hodowlanego pokrytą zewnętrzną powłoką zawierającą śluz wydzielany przez rośliny z gatunku *Pinguicula rectifolia*, korzystnie śluz wydzielany przez gruczoły trzoneczkowe występujące na liściach i kwiatostanach roślin tego gatunku.
3. Zastosowanie powierzchni naczynia hodowlanego pokrytej zewnętrzną powłoką zawierającą śluz wydzielany przez rośliny z gatunku *Pinguicula rectifolia*, korzystnie śluz wydzielany przez gruczoły trzoneczkowe występujące na liściach i kwiatostanach roślin tego gatunku, do prowadzenia hodowli adherentnej komórek macierzystych.

## Rysunki

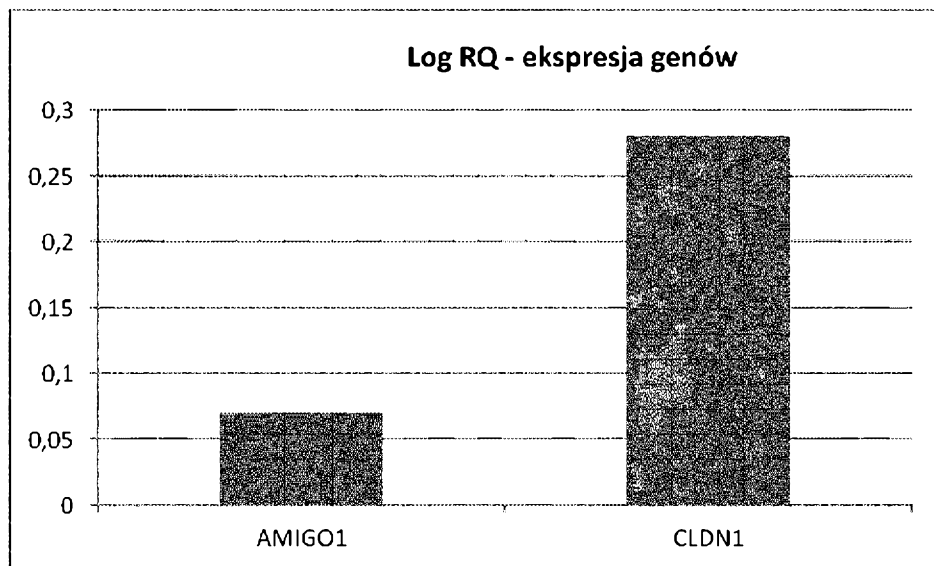


Fig. 1

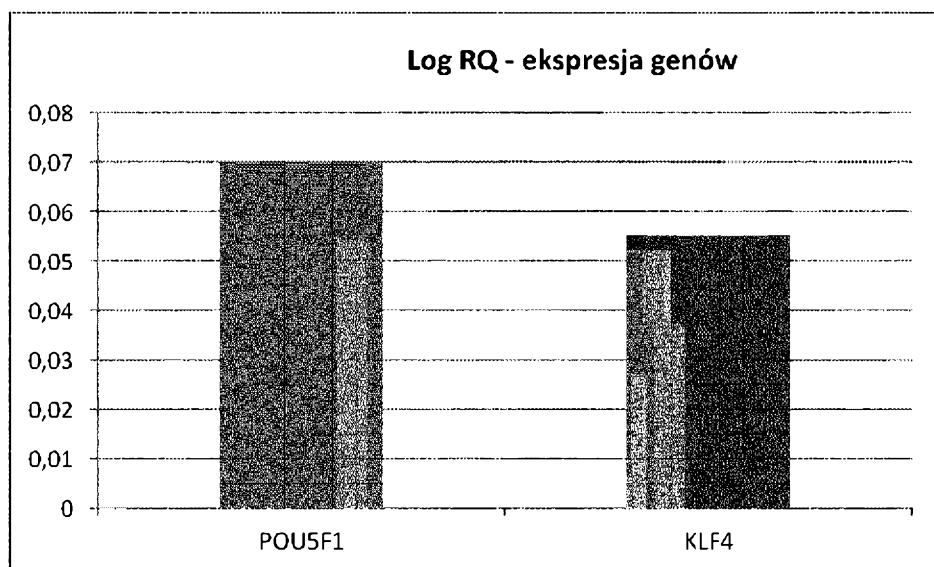


Fig. 2

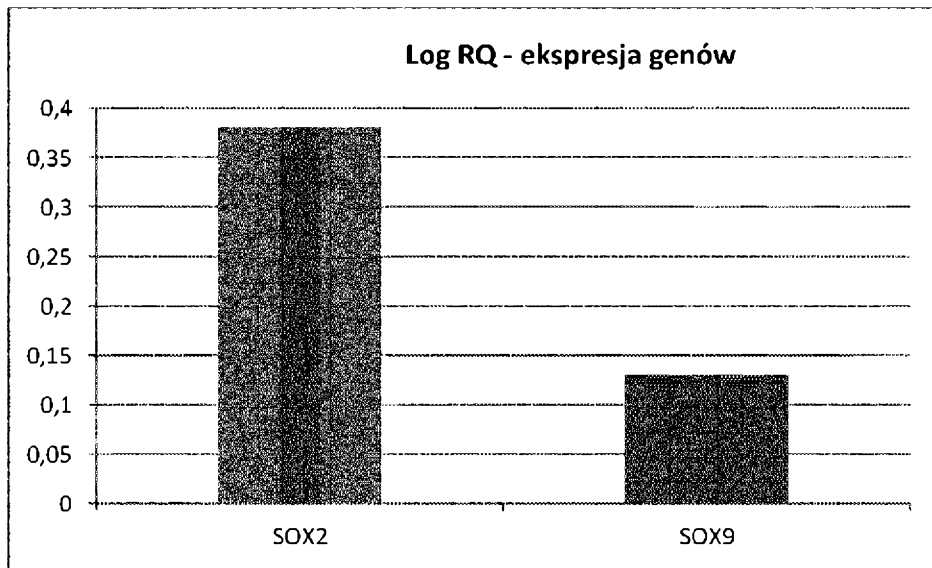


Fig. 3



Fig. 4