



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005107580/13, 21.03.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
21.03.2005

(43) Дата публикации заявки: 10.09.2006

(45) Опубликовано: 20.03.2007 Бюл. № 8

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **KENNEY N.Y. et al., Identification of stem cell units in the terminal end bud and duct of the mouse mammary gland, J. Biomed. Biotechnol., 2001, v.1, n.3, p.133-143.**  
**BIALEK R. et al., A fluorometric assay to monitor mitogenic stimulation of human lymphocytes, J. Immunol. Methods, 1991, v.144, n.2, p.223-229. RU 2247565 C2, 10.03.2005.**

Адрес для переписки:

142132, Московская обл., Подольский р-н, п.  
Дубровицы, ВНИИ животноводства, директору  
ВИЖ В.Н.Виноградову

(72) Автор(ы):

**Грезина Наталья Михайловна (RU),**  
**Зиновьева Наталия Анатольевна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Всероссийский государственный научно-исследовательский институт животноводства (ВИЖ) (RU)**

## (54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЖИВОТНЫХ IN VITRO

(57) Реферат:

Изобретение относится к клеточной инженерии. Выделяют клетки молочной железы. Культивируют их на субстрате в течение 2-3 суток. Обрабатывают клетки красителем Hoechst 33342 непосредственно на субстрате. Микроскопируют их в

ультрафиолетовом свете с длиной волны 350 нм. Способ позволяет эффективно определять стволовые клетки молочной железы in vitro с последующим учетом их морфологических признаков. 1 табл., 2 ил.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 295 565** <sup>(13)</sup> **C2**

(51) Int. Cl.

**C12N 5/00** (2006.01)

**C12N 5/14** (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2005107580/13, 21.03.2005**

(24) Effective date for property rights: **21.03.2005**

(43) Application published: **10.09.2006**

(45) Date of publication: **20.03.2007 Bull. 8**

Mail address:

**142132, Moskovskaja obl., Podol'skij r-n, p.  
Dubrovitsy, VNII zhivotnovodstva, direktoru  
VIZh V.N.Vinogradovu**

(72) Inventor(s):

**Grežina Natal'ja Mikhajlovna (RU),  
Zinov'eva Natalija Anatol'evna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Vserossijskij gosudarstvennyj nauchno-  
issledovatel'skij institut zhivotnovodstva (VIZh) (RU)**

(54) **METHOD FOR IN VITRO DETERMINATION OF ANIMAL BREAST STEM CELLS**

(57) Abstract:

FIELD: cell engineering.

SUBSTANCE: breast cells are isolated and cultivated on substrate for 2-3 days. Then cells are treated directly on substrate with Hoechst 33342 colorant and tested with microscope in

ultraviolet light with wave length of 350 nm.

EFFECT: method for effective determination in vitro of breast stem cells followed by evaluation of morphological characteristics thereof.

1 tbl, 2 dwg, 1 ex

RU 2 2 9 5 5 6 5 C 2

RU 2 2 9 5 5 6 5 C 2

Изобретение относится к клеточной инженерии, в частности к способам определения стволовых клеток молочной железы животных.

Известен способ определения стволовых клеток в органах животных по таким морфологическим признакам, как наличие диффузного хроматина в ядре, имеющем одно  
5 или несколько ядрышек, наличие большого числа свободных рибосом в цитоплазме и незначительное количество других органелл, а также присутствие у многих стволовых клеток цитоплазматических отростков (Гурвич А.Е., Егоров И.К., Кяйвяряйнен А.И. Иммуногенез и клеточная дифференцировка. - М.: Наука, 1978. - 232 с. Райцина С.С. Идентификация стволовых клеток в некоторых системах клеточных дифференцировок у  
10 млекопитающих / Успехи современной биологии, 1980, Т.90, вып. 1(4). - с.123-137.). Выявление таких клеточных особенностей в ряде случаев носит затруднительный характер, так как связано с использованием дорогостоящего оборудования, кроме того, клетки с подобным фенотипом не всегда являются стволовыми.

Известен способ определения стволовых клеток животных с использованием  
15 флуоресцентного красителя Hoechst 33342, основанный на способности стволовых клеток после обработки Hoechst 33342 флуоресцировать при прохождении света с определенной длиной волны (Goodell M. et al. Hoechst 33342 HSC Staining and Stem cell Purification Protocol. J. Exp. Med. 183, 1996. - P. 1797-1806. Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C.D. et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell  
20 transplantation // Nature. 401, 1999. - S.390-394. Jackson K.A., Mi T., Goodell M.A. Haematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 1999. - S.14482-14486.).

Известен способ определения стволовых клеток молочной железы животных посредством трансплантации ее небольшого кусочка в жировую подушку этого органа  
25 мышцы с последующим развитием полнофункциональной железы (DeOme K.B., Faulkin L.J., Bern H.A. et al. Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice // Cancer Res. 19, 1959. - P.515-520. Daniel C.W., Young L.J.T., Medina D. et al. The influence of  
30 mammatogenic hormones on serially transplanted mouse mammary gland // Exp. Geront. 6, 1971. - P.95-101.). Этот метод позволяет лишь доказать присутствие стволовых клеток в молочной железе, но не позволяет выделить их и детально охарактеризовать морфологические свойства.

Известен способ определения стволовых клеток молочной железы животных путем предварительного мечения клеток и их трансплантации в молочную железу с последующим  
35 анализом их локализации (Cordon B.C., Smith G.H. An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell // Development. 125, 1998. - P.1921-1930. Welm B.E., Tepera S.B., Venezia T. et al. Sea-<sup>1pos</sup> Cells in the Mouse Mammary Gland Represent an Enriched Progenitor Cell Population // Developmental Biology. 245, 2002. - P.42-56. Williams J.M., Daniel C.W. Mammary ductal elongation: Differentiation of  
40 myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis // Dev. Biol. 97, 1983. - P.274-290. Smith G.H., Medina D. A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland // Journal of Cell Science. 89, 1988. - P.173-183.). С помощью этого метода можно определить, в какой тип клеток происходит дифференциация стволовых клеток.

Известен способ определения стволовых клеток животных *in vitro* по повышенной  
45 активности щелочной фосфатазы (Савченкова И.П. Эмбриональные стволовые клетки в биологии: настоящее и будущее. - Дубровицы, 1999. - 95 с.). Это свойство характерно для всех стволовых клеток и часто используется для доказательства принадлежности клеток к этой группе. К недостаткам этого метода относится невозможность дальнейшей  
50 работы с клетками, так как в процессе анализа они погибают.

Известен способ определения стволовых клеток в молочной железе животных, взятый в качестве прототипа, заключающийся в том, что суспензию свежеевыделенных клеток обрабатывали Hoechst 33342, а затем на проточном цитометре отбирали клетки с

характерным свечением в ультрафиолете (УФ) (Kenney N.J., Smith G.H., Lawrence E. et al. Identification of stem cell units in the terminal end bud and duct of the mouse mammary gland // Journal of Biomedicine and Biotechnology. 1:3, 2001. - S.133-143.).

Данный метод позволяет не только идентифицировать стволовые клетки, но и сортировать их для дальнейшей работы. Однако в этом случае судить о морфологии клеток *in vitro* не представляется возможным, так как способ не позволяет осуществлять последующую селекцию стволовых клеток по морфологическим характеристикам.

При создании настоящего изобретения задача заключалась в том, чтобы разработать способ, позволяющий определять стволовые клетки *in vitro* с последующим учетом их морфологических признаков.

Технический результат изобретения заключается в том, что предложен способ определения стволовых клеток молочной железы животных *in vitro*, включающий выделение клеток молочной железы и последующую их обработку Hoechst 33342, особенностью которого является то, что после выделения клеток молочной железы проводят их культивирование, а затем, не снимая с субстрата, обрабатывают красителем Hoechst 33342.

Для прижизненной идентификации и селекции стволовых клеток в молочной железе предложено использование флуоресцентного красителя Hoechst 33342 для определения стволовых клеток молочной железы в монослое.

Пример. Стволовые клетки в монослое выявляли путем применения следующих процедур:

1) отбирали ткань молочной железы крольчих сразу после забоя животных или прижизненно методом биопсии;

2) проводили истощение тканей посредством измельчения материала и последующей обработки 0,1% раствором коллагеназы в течение 30-40 мин при 37°C, а затем 0,25% раствором трипсина в течение 10-15 мин при 37°C;

3) осаждали клетки центрифугированием при 1 тыс. об/мин в течение 5 минут;

4) полученную первично трипсинизированную культуру клеток молочной железы выращивали в среде DMEM/F-12 1:1 с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FCS), 2mM  $\alpha$ -глутамин, 10 нг/мл эпидермального фактора роста (EGF), 5 мг/мл инсулина и гентамицина с конечной концентрацией 50 мкг/мл при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>;

5) после кратковременного культивирования в течение 2-3 суток клетки, не снимая с субстрата, обрабатывали Hoechst 33342 следующим образом. Ростовую среду сливали, промывали подогретой средой DMEM без сыворотки, затем заливали клетки подогретой средой DMEM с 2% FCS и 10 mM HEPES, дополненную Hoechst 33342 с конечной концентрацией 5 мкг/мл. Окрашивание производили в течение 90 мин при 37°C. Затем клетки заливали холодным раствором Хэнкса с 2% FCS и 10 mM HEPES и микроскопировали в УФ с длиной волны 350 нм.

Клетки, окрашенные Hoechst 33342, идентифицировали по характерному красному свечению (фильтр Hoechst Red).

Контрольное использование предложенного способа для идентификации стволовых клеток в монослое показало, что Hoechst-положительные клетки идентифицировались только среди клеток со стволово-подобным фенотипом, при этом не все клетки с характерным фенотипом флуоресцировали.

В культуре клеток молочной железы кроликов было отмечено три типа клеток: крупные и мелкие круглые клетки с большим ядром и узким ободком цитоплазмы, которые интенсивно окрашивались по Гимза, фибробластоподобные клетки, имеющие веретенообразную форму. С использованием предложенного нами способа было установлено, что стволовые элементы молочной железы кролика идентифицируются среди мелких круглых клеток с большим ядром и узким ободком цитоплазмы (чертеж), причем в процессе культивирования их число снижается (табл.).

Таблица. Распределение типов клеток (%) in vitro в зависимости от пассажа.				
Пассаж	Фибробластоподобные	Крупные круглые	Мелкие круглые	
			всего	из них Hoechst - «+»
I	49,6	19,9	30,5	47,21
II	49,8	35,7	14,5	88,28
III	68,6	23,5	7,8	69,23

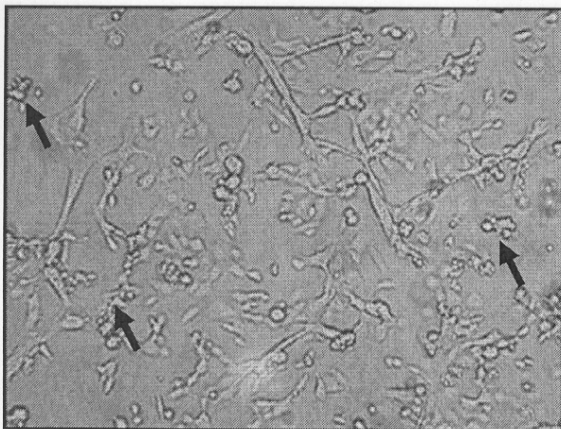
Коэффициент корреляции между числом мелких круглых клеток и Hoechst-положительных клеток был довольно высоким и составил 0,832.

Предложенный нами способ может быть использован в биотехнологии животных для витальной идентификации стволовых клеток молочной железы с целью их последующего использования для трансплантации, клонирования и т.п. Предложенный нами способ в сочетании с методом выделения Hoechst-положительных клеток, например с использованием проточной цитометрии или какого-либо другого метода, позволит повысить результативность работ в области клеточной терапии и клонирования с использованием клеток молочной железы.

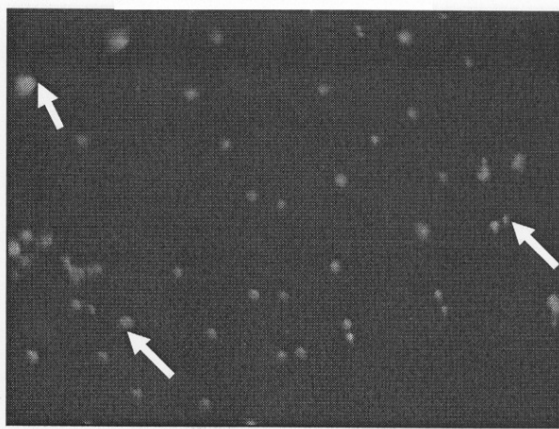
#### Формула изобретения

Способ определения стволовых клеток молочной железы животных in vitro, включающий выделение клеток молочной железы и последующую их обработку красителем Hoechst 33342, отличающийся тем, что после выделения клеток молочной железы проводят их культивирование на субстрате в течение 2-3 суток, затем обрабатывают клетки красителем непосредственно на субстрате и микроскопируют в ультрафиолетовом свете с длиной волны 350 нм.

А



Б



*Культура клеток молочной железы кролика I пассажа (Ув. х63): А – в обычном свете; Б – в УФ. Стрелками показаны одни и те же клетки.*