

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **238285**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **428366**

(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 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 238285 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest powierzchnia do hodowli adherentnych komórek macierzystych oraz sposób hodowli ludzkich i zwierzęcych adherentnych komórek macierzystych z zastosowaniem wydzieliny roślinnej otrzymanej z roślin z gatunku *Drosophyllum lusitanicum*.

Wydzielina gatunków z rodzaju *Drosophyllum lusitanicum* 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 nieodróżnionymi 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 charakteryzująca się tym, że stanowi powierzchnię naczynia hodowlanego pokrytą zewnętrzną powłoką zawierającą śluz wydzielany przez rośliny z gatunku *Drosophyllum lusitanicum*, korzystnie śluz wydzielany przez emergencje znajdujące się na liściach roślin tego gatunku

Korzystnie, powierzchnię według wynalazku otrzymuje się poprzez pokrycie powierzchni naczynia hodowlanego wspomnianym śluzem roślinnym. Przed rozpoczęciem hodowli naczynie suszy się i sterylizuje. Korzystnie suszenie prowadzi się w warunkach sterylnych, pod ciśnieniem atmosferycznym i w temperaturze pokojowej, natomiast sterylizację prowadzić metodą autoklawowania, korzystnie 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 charakteryzujący się tym, że hodowlę prowadzi się na stałej powierzchni naczynia hodowlanego pokrytą zewnętrzną powłoką zawierającą śluz wydzielany przez rośliny z gatunku *Drosophyllum lusitanicum*, korzystnie śluz wydzielany przez emergencje znajdujące się na liściach roślin tego gatunku.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie powierzchni naczynia hodowlanego pokrytej zewnętrzną powłoką zawierającą śluz wydzielany przez rośliny z gatunku *Drosophyllum lusitanicum*, korzystnie śluz wydzielany przez emergencje znajdujące się na liściach roślin tego gatunku, do prowadzenia hodowli adherentnych komórek macierzystych.

Szczegółowy opis przykładowych realizacji

W przykładowej realizacji, hodowanymi komórkami macierzystymi są komórki ludzkie, zwłaszcza mezenchymalne komórki macierzyste. Korzystnie, 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.

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% CO₂. 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).

W przykładowej realizacji opisano sposób zwiększenia przylegania (adherencji) MSC do podłoża w celu zwiększenia ich proliferacji (podziałów komórkowych). W tym celu wykorzystano śluz roślin z gatunku *Drosophyllum lusitanicum*. Istotą opisanego sposobu prowadzenia hodowli komórkowych jest zastosowanie wydzieliny roślin z gatunku *Drosophyllum lusitanicum* 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 *Drosophyllum lusitanicum* 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 *Drosophyllum lusitanicum* wywołało pozytywne efekty w hodowlach krótko- i długoterminowych komórek macierzystych człowieka.

Wydzielinę pozyskiwano z roślin z gatunku *Drosophyllum lusitanicum*, 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 propidiiowy, 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 *Drosophyllum lusitanicum* 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 9% i 35%. Zatem, wydzieliny (śluz) roślin *Drosophyllum lusitanicum* 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 zawiesinie), w tym komórek macierzystych.

Reasumując, nieoczekiwanie stwierdzono, że wydzieliny (śluz) roślin *Drosophyllum lusitanicum* 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 *Drosophyllum lusitanicum* 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 *Drosophyllum lusitanicum*.

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

Ponadto, nieoczekiwanie okazało się, że wydzieliny (śluzu) roślin *Drosophyllum lusitanicum* 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 *Drosophyllum lusitanicum* poprawiają utrzymanie pluripotencji komórek macierzystych w hodowli.

P r z y k ł a d 1. Otrzymywanie wydzieliny z roślin z gatunku *Drosophyllum lusitanicum*.

W badaniach wykorzystano rośliny gatunku *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link (rodzina *Drosophyllaceae*). Rośliny pochodziły z uprawy w Instytucie Botaniki UJ. *Drosophyllum lusitanicum* jest rośliną mięsożerną chwytającą owady za pomocą lepkich liści. Wydzielina roślin z gatunku *Drosophyllum lusitanicum* ma postać klejącego śluzu produkowanego przez emergencje (gruczoły) trzoneczkowe występujące na liściach i kwiatostanach. W rezultacie na wierzchołku każdej emergencji znajduje się kropla śluzu. Zostało to przedstawione na fig. 1.

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 *Drosophyllum lusitanicum*, 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 *Drosophyllum lusitanicum*.

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% CO₂. 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, reakcję 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 cm² TC Flask T25 firmy Sarstedt. Komórki hodowano w podłożu hodowlanym zawierającym: pożywkę hodowlaną DMEM/F-12 50/50 IX + L-glutamine firmy Corning, 10% płodową surowicę bydlęcą FBS Good Filtrated 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% CO₂. 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 próbkach 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 próbki 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 komplementarną 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 H₂O – 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 Sacchi (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 prowadziło w objętości 25 µl/dolek. Poziomy ekspresji (ΔCT) 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(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25:402–408. W celu ustalenia wartości ΔCT , $\Delta\Delta CT$ 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 ΔCT kalibratora stanowi średnia wyników ΔCT 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 propidiiowy 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 *Drosophyllum lusitanicum* poprawiają adherentność ludzkich komórek macierzystych wyizolowanych z galarety Whartona pępowiny. 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 *Drosophyllum lusitanicum* wpływają korzystnie na ekspresję genów kodujących cząsteczki adhezyjne – zwiększające przyleganie komórek do podłoża, przez co poprawiające ich potencjał wzrostowy i proliferacyjny.

Na Fig. 2 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 9% (Fig. 2) – w stosunku do komórek hodowanych w tych samych warunkach bez wydzieliny roślinnej. Jednocześnie zaobserwowano średni wzrost ekspresji genu CLDN1, kodującego kładynę 1 o 35 % (Fig. 2) – 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 – odpowiednio o 9% i 35% (Fig. 2). 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 *Drosophyllum lusitanicum* 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 *Drosophyllum lusitanicum*.

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 *Drosophyllum lusitanicum*. Istotą sposobu prowadzenia hodowli komórkowych według wynalazku jest zastosowanie wydzieliny roślin z gatunku *Drosophyllum lusitanicum* 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* nieoczekiwano 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. 3 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 10% (Fig. 3) – 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 2,5% (Fig. 3) – w stosunku do komórek hodowanych w tych samych warunkach bez wydzieliny roślinnej. Gen koduje białko odpowiedzialne za zachowywanie cech macierzystości i przeciwdziałanie 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. Nieoczekiwano okazało

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

Na Fig. 4 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 kontakt komórek macierzystych z wydzieliną roślinną wpłynął na wzrost ekspresji genów SOX2 i SOX9 (Fig. 4) – regulujących transkrypcję (kodują czynniki transkrypcyjne), utrzymujących pluripotencję komórek macierzystych. Wykazano średni wzrost ekspresji genu SOX2 o 45% – w stosunku do komórek hodowanych w tych samych warunkach bez wydzieliny roślinnej. Jednocześnie wykazano średni wzrost ekspresji genu SOX9 o 17% – 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 *Drosophyllum lusitanicum* w hodowlach bez wydzieliny (śluzu) roślin z gatunku *Drosophyllum lusitanicum*.

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

Badany antygen	Średni odsetek komórek macierzystych hodowanych w obecności wydzieliny (śluzu) roślin z gatunku <i>Drosophyllum lusitanicum</i>	Średni odsetek komórek macierzystych hodowanych bez wydzieliny (śluzu) roślin z gatunku <i>Drosophyllum lusitanicum</i>
CD105+	99,78	99,84
CD73+	96,43	98,05
CD90+	95,61	97,21
CD45+	0	0
CD34+	0	0
CD14+	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% CO₂. Korzystnie, w trakcie hodowli komórki pasażuje się po osiągnięciu odpowiedniej fazy wzrostu, zwłaszcza co 3 dni, z zastosowaniem tripsyny. 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. 5 i 6 przedstawiono komórki macierzyste hodowane z wydzielinami (śluzami) roślin z gatunku *Drosophyllum lusitanicum*.

Wnioski

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

Ponadto, w wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że wydzielina z roślin *Drosophyllum lusitanicum* poprawia adherentność ludzkich komórek macierzystych. Nieoczekiwane kontakt komórek macierzystych z wydzieliną roślinną wpłynął na wzrost ekspresji dwóch genów kodujących białka przylegania *AMIGO1* i *CLDN1* – odpowiedni o 9% i 35%. Czyli wydzieliny (śluzu) roślin *Drosophyllum lusitanicum* 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 zawiesinie), w tym komórek macierzystych.

Ponadto, w wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że wydzielina roślin *Drosophyllum lusitanicum* poprawia potencjał pluripotencji („macierzystości”) oraz przeciwdziała różnicowaniu w hodowlach komórkowych. Nieoczekiwane 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 *Drosophyllum lusitanicum* 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 *Drosophyllum lusitanicum*.

Ponadto, w wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że wydzieliny roślin *Drosophyllum lusitanicum* poprawiają utrzymanie pluripotencji komórek macierzystych w hodowli. Nieoczekiwanie okazało się, że wydzieliny roślin *Drosophyllum lusitanicum* 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 *Drosophyllum lusitanicum*, korzystnie śluz wydzielany przez emergencje znajdujące się na liściach 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 *Drosophyllum lusitanicum*, korzystnie śluz wydzielany przez emergencje znajdujące się na liściach roślin tego gatunku.
3. Zastosowanie powierzchni naczynia hodowlanego pokrytej zewnętrzną powłoką zawierającą śluz wydzielany przez rośliny z gatunku *Drosophyllum lusitanicum*, korzystnie śluz wydzielany przez emergencje znajdujące się na liściach roślin tego gatunku, do prowadzenia hodowli adherentnych komórek macierzystych.

Rysunki

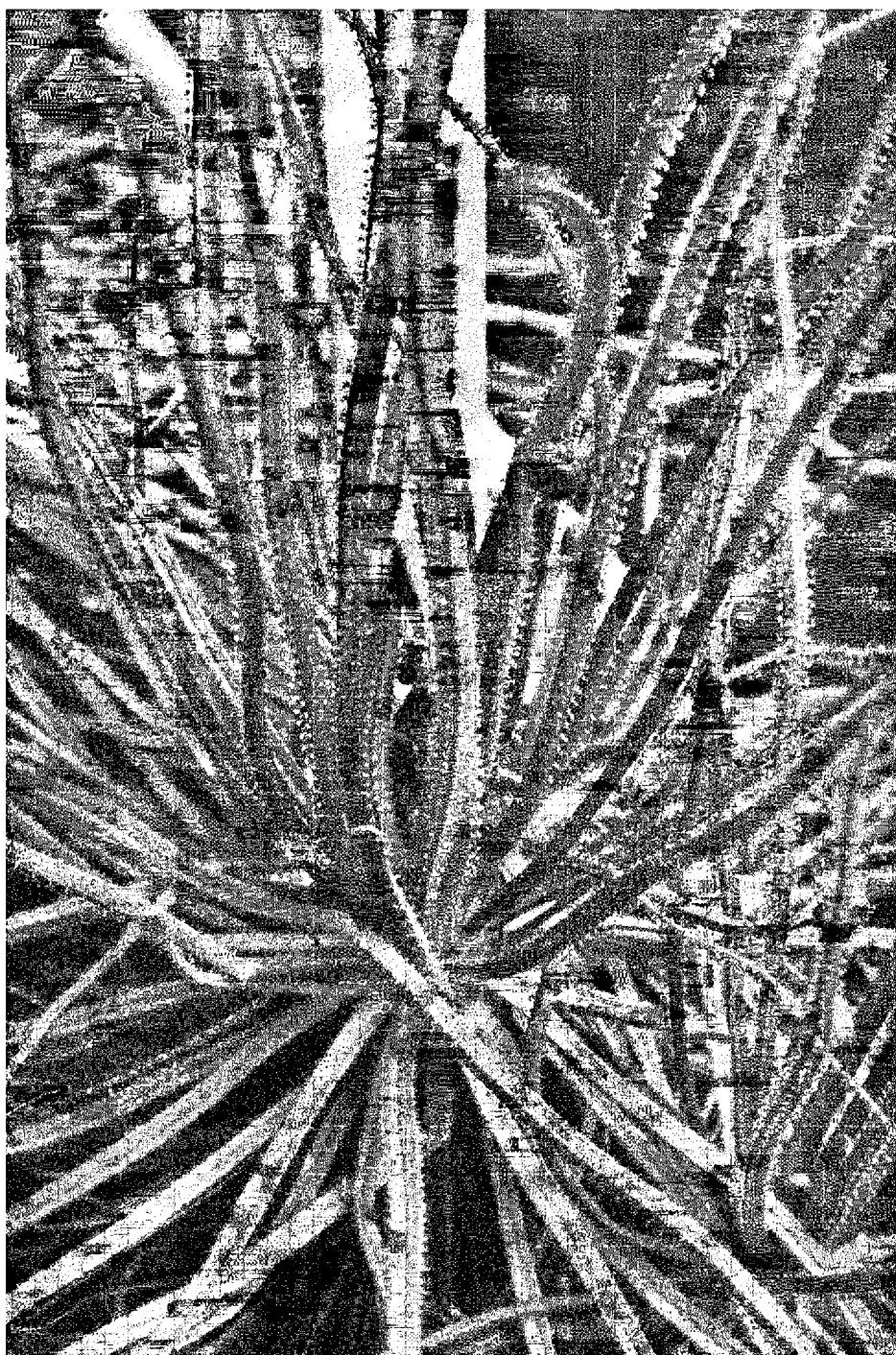


Fig. 1

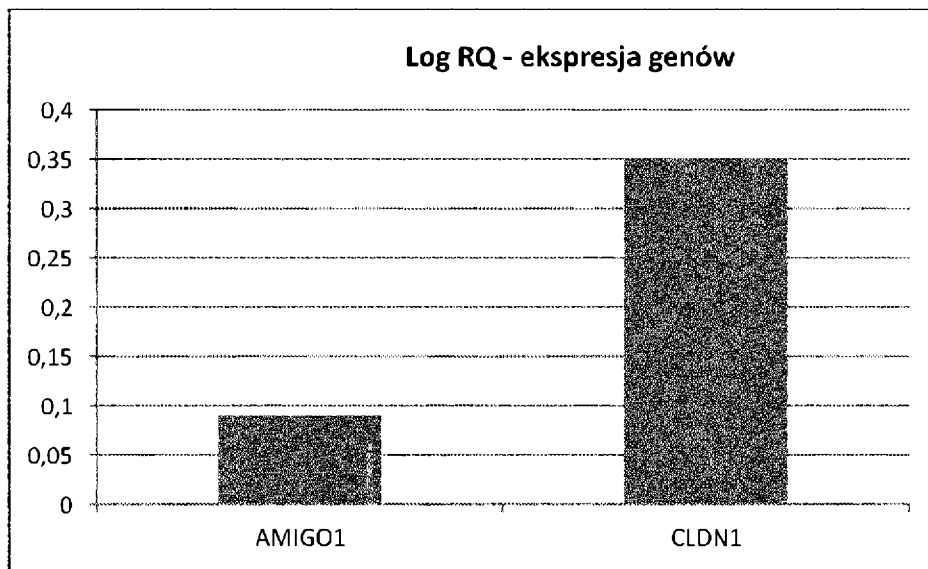


Fig. 2

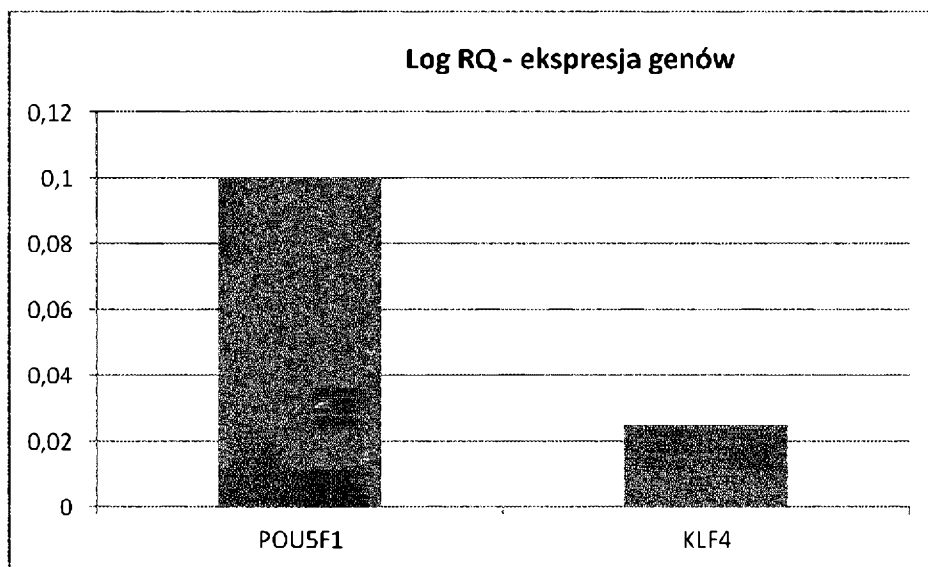


Fig. 3

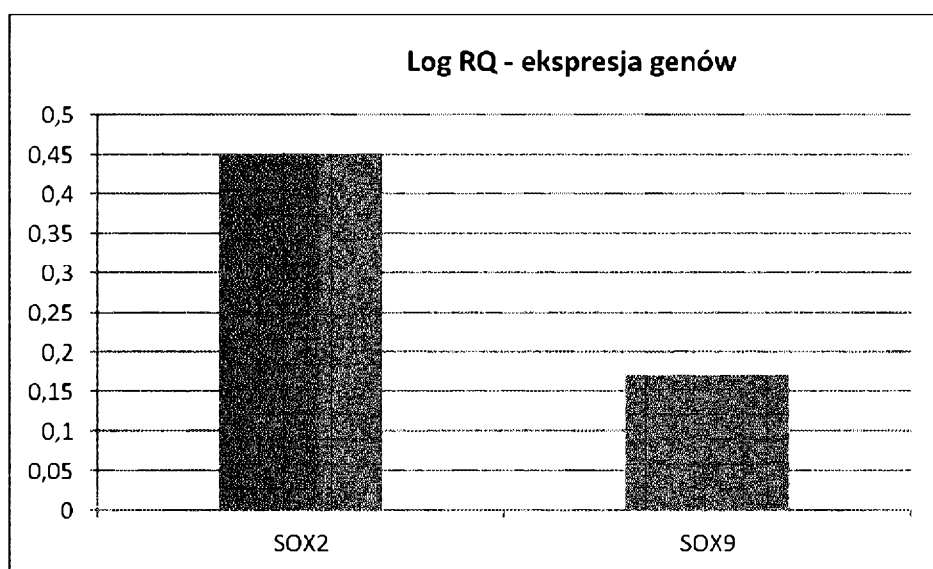


Fig. 4

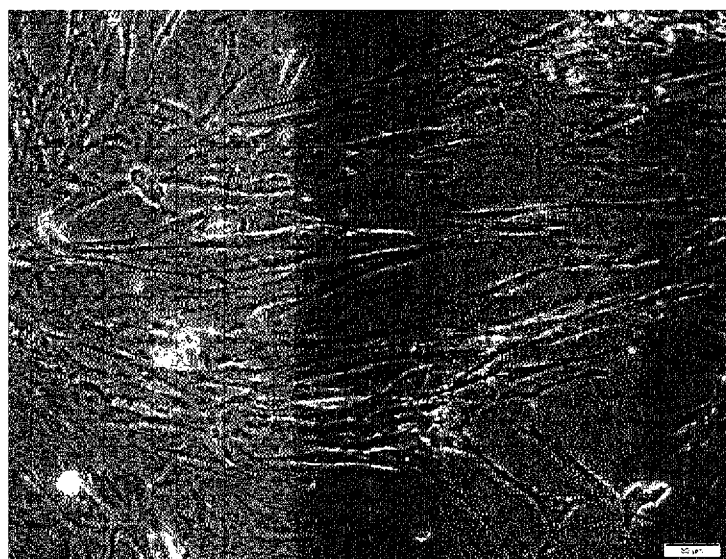


Fig. 5

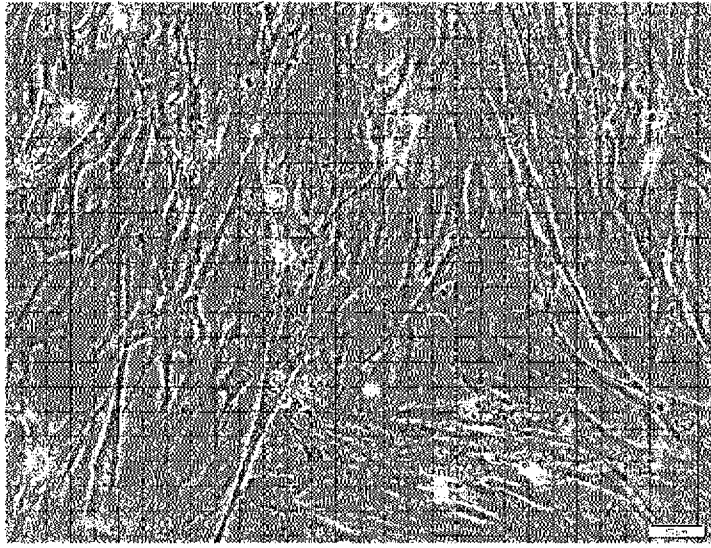


Fig. 6