



MD 1584 Y 2021.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1584** (13) **Y**
(51) Int.Cl: C12N 5/071 (2010.01)

**(12) BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: s 2020 0137 (22) Data depozit: 2020.10.26	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2021.12.31, BOPI nr. 12/2021
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: JIAN Mariana, MD; NACU Viorel, MD; COBZAC Vitalie, MD; BRANIȘTE Fiodor, MD	
(73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	
(74) Mandatar autorizat: COȘNEANU Elena	

(54) Metodă de izolare a culturilor celulare**(57) Rezumat:**

1
Invenția se referă la medicina regenerativă și ingineria tisulară și poate fi utilizată pentru izolarea culturilor celulare predestinate transplantării sau testării *in vitro* a diferitor compuși sau substanțe.

Esența invenției constă în aceea că se amplasează un explant într-un vas pentru cultură celulară, în care se toarnă mediu de cultură celulară, astfel încât explantul să fie suspendat în mediu, care se incubează la temperatura de 37°C, 5% CO₂ și în mediu umed, timp de 3...4 zile, după care se schimbă mediul de cultură celulară și se toarnă un volum redus de mediu, astfel încât explantul să fie atașat la suprafața mediului de cultură și se incubează în aceleași condiții. Mediul de

2
cultură se schimbă peste fiecare 24...48 ore, apoi după apariția coloniilor celulare în jurul explantului, acesta se amplasează în altă parte a vasului de cultură cu adăugarea de mediu de cultură într-un volum pentru menținerea explantului la suprafața mediului de cultură. Numărul de schimbări a locului explantului depinde de mărimea vasului pentru cultură celulară, iar izolarea celulelor se efectuează până în momentul când timp de mai mult de 7 zile nu are loc trecerea celulelor de pe explant pe suprafața mediului cu formarea de colonii celulare.

Revendicări: 1

Figuri: 4

MD 1584 Y 2021.12.31

(54) Method for isolating cell cultures**(57) Abstract:**

1

The invention relates to regenerative medicine and tissue engineering and can be used for isolating cell cultures intended for transplantation or testing of various compounds or substances *in vitro*.

Summary of the invention consists in that the explant is placed in a cell culture vessel, into which a cell culture medium is poured, so that the explant is suspended in an environment that is incubated at 37°C, 5% CO₂ and in a humid environment for 3...4 days, after which the cell culture medium is changed and a small volume of medium is poured so that the explant is attached to the surface of the culture medium and incubated under the same

2

conditions. The culture medium is changed every 24...48 hours, then after the appearance of cell colonies around the explant, it is placed in another part of the culture vessel with the addition of the culture medium in volume to maintain the explant on the surface of the culture medium. The number of changes in explant sites depends on the size of the cell culture vessel, and the isolation of cells is carried out until, for more than 7 days, the transition of cells from the explant to the surface of the medium with the formation of cell colonies occurs.

Claims: 1

Fig.: 4

(54) Метод выделения клеточных культур**(57) Реферат:**

1

Изобретение относится к регенеративной медицине и тканевой инженерии и может быть использовано для выделения клеточных культур, предназначенных для трансплантации или тестирования различных соединений или веществ *in vitro*.

Сущность изобретения состоит в том, что помещают эксплантат в сосуд для культивирования клеток, в который наливают среду для культивирования клеток, так чтобы эксплантат суспендировался в среде, которую инкубируют при температуре 37° С, 5% CO₂ и в влажной среде, в течение 3...4 дней, после чего меняют среду для культивирования клеток и наливают небольшой объем среды так, чтобы эксплантат прикрепился к поверхности среды для культивирования и инкубируют в

2

тех же условиях. Среду для культивирования меняют через каждые 24...48 часов, затем после появления клеточных колоний вокруг эксплантата, его помещают в другую часть сосуда для культивирования с добавлением среды для культивирования в объеме для поддержания эксплантата на поверхности среды для культивирования. Количество изменения мест эксплантата зависит от размера сосуда для культивирования клеток, а выделение клеток проводят до тех пор, пока в течение более 7 дней не происходит переход клеток с эксплантата на поверхности среды с образованием клеточных колоний.

П. формулы: 1

Фиг.: 4

Descriere:

5 Invenția se referă la medicina regenerativă și ingineria tisulară și poate fi utilizată pentru izolarea culturilor celulare predestinate transplantării sau testării *in vitro* a diferitor compuși sau substanțe.

Este cunoscută metoda de utilizare a serului fetal bovin, pentru a face suprafața de cultură celulară mai aderentă, cu scop de atașare a explantului din care se dorește obținerea fibroblastelor. Serul fetal bovin se introduce în vasul de cultură celulară în volum suficient pentru acoperirea întregii suprafeți de cultură celulară. După care bucățile de explant se introduc în vasul de cultură celulară, se atașează de suprafața aderentă și se adaugă mediul de cultură în volum suficient, astfel încât fragmentele de explant să rămână atașate la suprafața vasului de cultură. În decurs de 7...10 zile în jurul explantului apar colonii celulare, iar la 2...3 săptămâni bucățile de explant se înlătură complet și se adaugă un volum de mediu de cultură celulară corespunzător vasului utilizat. Într-o perioadă de aproximativ 30 zile fibroblastele ajung la o confluență de 70...80% pe o suprafață de cultură celulară de 75 cm² [1].

Dezavantajele acestei metode sunt utilizarea unei substanțe suplimentare pentru prelucrarea suprafeței de cultură celulară cu scop de a crește adeziunea explantelor, timp suplimentar pentru pregătirea suprafeței de cultură celulară ce prezintă un potențial risc de contaminare, supraconfluența celulară din jurul explantului cu repartizarea neuniformă a celulelor prin vasul de cultură celulară, dar și durata îndelungată de cultivare celulară însoțită de riscul înalt de contaminare și infectare.

Mai este cunoscută metoda de utilizare a colagenului de tip I, gelatinei sau fibronectinei pentru prelucrarea suprafeței de cultură celulară cu scop de a crește adeziunea explantului față de ea. Aceasta constă în aceea că se toarnă într-un vas de cultură celulară a 0,5 ml de suspensie de colagen de tip I, gelatină sau fibronectină pe o suprafață de 25 cm², care este uniformă pe întreaga suprafață de cultură celulară, după care vasul de cultură celulară se incubează la temperatura de 37°C, timp de 3 ore ca suprafața să se usuce. Apoi suprafața prelucrată este spălată o dată cu soluție de tampon fosfat salin cu calciu și magneziu și o dată cu mediu de cultură celulară. Explantele pot fi obținute din tesuturile hepatic, cardiac, ovarian și testicular, iar dimensiunile acestora fiind de 1...2 mm³. După spălarea explantelor în mediu pentru cultură celulară, bucățile de explant de același tip de țesut se distribuie uniform pe suprafața prelucrată a vasului de cultură celulară, la care se adaugă volumul de mediu pentru culturi celulare specific vasului utilizat. Durata de cultivare pentru a obține pe o suprafață de 25 cm² a unui monostrat confluent de celule variază între 7 și 21 de zile în dependență de tipul țesutului utilizat în calitate de explant, substanța utilizată pentru a crește aderența la suprafața de cultură celulară și cantitatea de explante aderate la această suprafață [2].

Dezavantajele acestei metode sunt utilizarea unor substanțe suplimentare pentru prelucrarea suprafeței de cultură celulară cu scop de a crește adeziunea explantelor, costul înalt al substanțelor utilizate, timp suplimentar pentru pregătirea suprafeței de cultură celulară ce prezintă un risc potențial de contaminare, riscul înalt de detașare a explantelor, supraconfluența celulară din jurul explantului cu repartizarea neuniformă a celulelor prin vasul de cultură celulară, dar și durata îndelungată de cultivare celulară însoțită de riscul înalt de contaminare și infectare.

Mai este cunoscută metoda de izolare prin explant a celulelor epiteliale bronhiale primare, unde, pentru a face suprafața de cultură celulară mai aderentă se folosește mediul de cultură celulară. După prelucrarea minuțioasă a suprafeței de cultură celulară a vasului utilizat și aspirarea excesului de mediu, vasul de cultură celulară se incubează la temperatura de 37°C, 50% umiditate, 5% CO₂, timp de 1...2 ore ca suprafața de cultură să se usuce. Apoi pe suprafața de cultură celulară se crează defecte de care se atașează bucățile de explant și se adaugă un volum de mediu de cultură celulară corespunzător vasului utilizat. La aproximativ 4 săptămâni când celulele epiteliale acoperă o suprafață de 1...2 cm² în jurul explantului, acestea se transferă în alt vas, unde se atașează de defectele create și continuă procesul de izolare [3].

Dezavantajele acestei metode sunt necesitatea timpului suplimentar pentru pregătirea suprafeței de cultură celulară ce prezintă un risc potențial de contaminare, atașarea slabă a explantului la suprafața de cultură celulară cu posibilitatea detașării acestuia la orice mișcare a vasului de cultură celulară sau în procesul schimbării mediului de cultură, supraconfluența celulară în jurul explantului cu repartizarea neuniformă a celulelor prin vasul de cultură celulară și durata îndelungată de cultivare celulară însoțită de riscul înalt de contaminare și infectare.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unei metode care permite izolarea mai rapidă, mai ieftină și mai sigură a tipului de celule dorite prin metoda de explant.

5 Esența invenției constă în aceea că se amplasează un explant într-un vas pentru cultură celulară, în care se toarnă mediu de cultură celulară, astfel încât explantul să fie suspendat în mediu, care se incubează la temperatura de 37°C, 5% CO₂ și în mediu umed, timp de 3...4 zile, după care se schimbă mediul de cultură celulară și se toarnă un volum redus de mediu, astfel încât explantul să fie atașat la suprafața mediului de cultură și se incubează în aceleași condiții. Mediul de cultură se schimbă peste fiecare 24...48 ore, apoi după apariția coloniilor celulare în jurul explantului, acesta se amplasează în altă parte a vasului de cultură cu adăugarea de mediu de cultură într-un volum pentru menținerea explantului la suprafața mediului de cultură. Numărul de schimbări a locului explantului depinde de mărimea vasului pentru cultură celulară, iar izolarea celulelor se efectuează până în momentul când timp de mai mult de 7 zile nu are loc trecerea celulelor de pe explant pe suprafața mediului cu formarea de colonii celulare.

10 Rezultatul invenției constă în lipsa cheltuielilor suplimentare pentru achiziția diferitor substanțe, necesare pentru aderența explantului la suprafața de cultură celulară, totodată constă în prezervarea unei cantități mari de resurse ca timpul și reactivele, dar și posibilitatea de izolare a unei game vaste și numeroase de celule animale într-o perioadă scurtă de timp din țesuturi diferite în cadrul unei proceduri.

15 Avantajele metodei constau în prevenirea contaminării vasului pentru cultura celulară, lipsa necității de utilizare a unor reactivi suplimentari costisitori, aderența fermă a țesutului la suprafața de cultură celulară fără riscul detașării și izolarea stabilă a unui număr mare de celule într-o perioadă scurtă de timp dintr-o cantitate mică de țesut în cadrul unei proceduri.

Invenția se explică prin desenele din figurile 1-4, care reprezintă:

- 25 - fig. 1, multiplicarea celulelor pe suprafața explantului suspendat în mediul de cultură;
- fig. 2, trecerea celulelor pe suprafața de cultură celulară la atașarea sau aderența explantului;
- fig. 3, migrarea explantului prin vasul de cultură celulară;
- fig. 4, transferul explantului dintr-un vas de cultură celulară în altul.

30 Metoda de izolare a celulelor constă în aceea că se amplasează explantul 2 în vasul pentru cultură celulară 1, în care se toarnă un volum 4 de mediu de cultură celulară 3 (fig. 1), astfel încât explantul 2 să fie suspendat în mediu, care se introduce în incubator la temperatura de 37°C, 5% CO₂ și mediu umed, timp de 3...4 zile, după care se schimbă mediul de cultură celulară 3 și se toarnă un volum redus de mediu 5, astfel încât explantul 2 să fie atașat la suprafața mediului de cultură 3 (fig. 2) și se incubează în aceleași condiții, mediul de cultură 3 se schimbă peste fiecare 24...48 ore, apoi după apariția coloniilor celulare 7 în jurul explantului, el se amplasează în altă parte 8 a vasului de cultură 1 cu adăugarea de mediu de cultură în volumul 5 pentru a menține explantul atașat la suprafața mediului de cultură (fig. 3), schimbarea locului explantului depinde de mărimea vasului pentru cultură celulară, iar izolarea celulelor 6 se efectuează până în momentul când timp de mai mult de 7 zile nu are loc trecerea celulelor de pe explant pe suprafața mediului cu formarea coloniilor celulare 7. Odată ce numărul de colonii celulare 7 a ajuns la un număr suficient pentru o cultură celulară normală, explantul 2 se transferă 9 în alt vas de cultură celulară (fig. 4) și se repetă aceleași etape, evitând faza de suspendare a explantului 2 în mediul de cultură celulară 3.

35 Se prelevează în condiții sterile o bucată mică de țesut animal din care se vor obține explantul 2, care se introduce într-o eprubetă cu mediul de cultură celulară 3 preîncălzit. În laborator țesutul prelevat pentru obținerea explantelor se spală cu soluții de tampon și mediu de cultură celulară calde. Se introduce într-o cutie Petri și se mărunțește până la dimensiuni de 0,5x1x2...5x10x10 mm, după care se introduce în vasul de cultură celulară 1, unde se toarnă mediul de cultură celulară 3 într-un volum suficient 4, care să asigure suspendarea explantului 2. Vasul de cultură celulară 1 se introduce în incubator la temperatura de 37°C, 5% CO₂ și mediu umed, pentru a asigura multiplicarea celulelor 6 de pe suprafața explantului 2. Peste 3...4 zile se schimbă mediul de cultură celulară 3 și se adaugă un volum suficient 5, ca nivelul mediului 3 să nu permită detașarea explantului 2 și să-l mențină atașat la suprafața mediului de cultură celulară. Vasul 1 se incubează în aceleași condiții, iar mediul se schimbă peste fiecare 24...48 ore. Volumul mediului 3 se mărește până la valori corespunzătoare volumului specific vasului de cultură celulară 1 utilizat, în cazul în care explantul 2 aderă la suprafața mediului de cultură celulară. Atunci când în jurul explantului 2 apare un număr suficient de celule formatoare de colonii 7, explantul 2 este amplasat în altă parte 8 a vasului de cultură celulară 1, după care se adaugă un volum mic 5 de mediu de cultură celulară 3, astfel încât nivelul acestuia să asigure atașarea explantului 2 la vasul pentru cultură celulară 1. După schimbul 8 de 2...5 ori a explantului 2 prin vasul de cultură

celulară 1, cu obținerea unui număr suficient de celule formatoare de colonii 7, explantul 2 se transferă 9 în alt vas de cultură celulară, unde se adaugă un volum suficient 5 de mediu de cultură celulară 3, încât nivelul acestuia să nu detașeze explantul 2 de pe suprafața de cultură celulară. Izolarea celulelor prin control volumetric și migrare a explantului are loc până la momentul când timp de mai mult de 7 zile nu are loc trecerea celulelor de pe explant cu formarea de colonii celulare 7. Deci, cu cât mai mare va fi numărul de transferuri dintr-un vas în altul 9, cu atât va fi mai mare numărul de celule izolate.

Exemplu

Pentru izolarea fibroblastelor, în condiții sterile, sub anestezie generală de la un iepure s-a prelevat o bucată de piele și s-a introdus în mediul de cultură specific fibroblastelor preîncălzit. Eprubeta s-a dus în laborator, iar după prelucrare cu antiseptice s-a introdus în hota cu flux laminar de aer. Țesutul dermal s-a spălat de 3 ori cu HBSS și mediu de cultură, după care a fost introdus într-o cutie Petri și secționat în 2 bucăți de aproximativ 2x4x5 mm fiecare. Apoi bucățile de explant s-au introdus într-o cutie Petri din plastic de 60 mm în diametru, în care s-au turnat 6 ml de mediu de cultură pentru cultura fibroblastelor. Cutia Petri cu bucățile de țesut au fost incubate la temperatura de 37°C, 5% CO₂ și mediu umed, timp de 3 zile, ulterior mediul de cultivare a fost schimbat, iar volumul turnat înapoi a fost redus până la 2 ml, după care cutia Petri s-a introdus în incubator în aceleași condiții. Peste 2 zile mediul de cultură s-a schimbat, adăugând 5 ml și s-a incubat repetat. La 2 zile s-a examinat sub microscop, determinând lângă explante multe celule formatoare de colonii, după care explantele au fost mutate spre polii opuși ai cutiei Petri și incubate cu 2 ml de mediu de cultură pentru 2 zile în aceleași condiții. După examinarea microscopică, au fost iarăși depistate celule formatoare de colonii, iar explantele au fost transferate în altă cutie Petri cu 2 ml de mediu de cultură, iar în cutia Petri cu colonii de fibroblaste s-au adăugat 5 ml de mediu de cultură pentru cultivarea fibroblastelor, care au fost cultivate până la o confluență de 70...80%, timp de 4 zile. Apoi fibroblastele au fost subcultivate într-un flacon de 75 cm², timp de 3 zile, obținând 3,32 x 10⁶ fibroblaste, care la rândul lor au fost subcultivate repetat în 4 flaconane de 75 cm², timp de 3 zile. Astfel, obținând la un termen de 19 zile de la începutul izolării fibroblastelor în al 3-lea pasaj 1,28 x 10⁷ celule. Din bucățile de explant s-au izolat fibroblaste pe parcursul a 3 pasaje consecutive.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Butnaru M., Luca A. Cultura de celule animale: Tehnici uzuale și tehnici speciale. Iasi, 2014, p. 34 Editura PIM ISBN: 978-606-13-2199-5
2. Nanda P. K., Swain P., Nayak S. K., Behera T., Jayasankar P., Dhama K. Evaluation of Different Coating Factorsto Establish Cell Culture from Tissue Explants of Indian Major Carp, *Cirrhinus mrigala*. In: Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. 2014, no 9, p. 395-404
3. Yaghi A., Zaman A., Dolovich M. Primary Human Bronchial Epithelial Cells Grown from Explants. In: JoVE. 2010, no 37. Găsit: <http://www.jove.com/details.php?id=1789>, doi: 10.3791/1789

(57) Revendicări:

Metodă de izolare a culturilor celulare, care constă în aceea că se amplasează un explant într-un vas pentru cultură celulară, în care se toarnă mediu de cultură celulară, astfel încât explantul să fie suspendat în mediu, care se incubează la temperatura de 37°C, 5% CO₂ și în mediu umed, timp de 3..4 zile, după care se schimbă mediul de cultură celulară și se toarnă un volum redus de mediu, astfel incat explantul să fie atașat la suprafața mediului de cultură și se incubează în aceleași condiții; mediul de cultură se schimbă peste fiecare 24..48 ore, apoi după apariția coloniilor celulare în jurul explantului, acesta se amplasează în altă parte a vasului de cultură cu adăugarea de mediu de cultură într-un volum pentru menținerea explantului la suprafața mediului de cultură, iar numărul de schimbări a locului explantului depinde de mărimea vasului pentru cultură celulară, iar izolarea celulelor se efectuează până în momentul când timp de mai mult de 7 zile nu are loc trecerea celulelor de pe explant pe suprafața mediului cu formarea de colonii celulare.

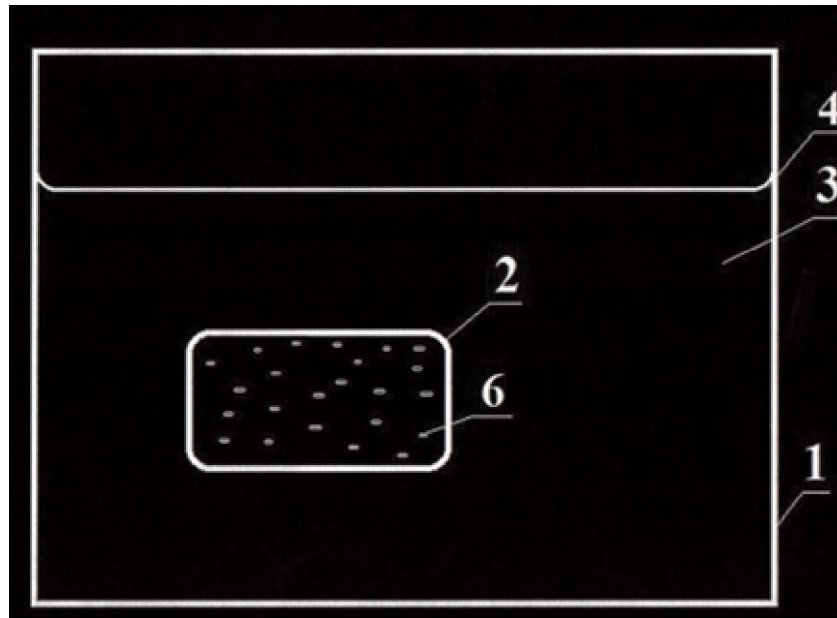


Fig. 1

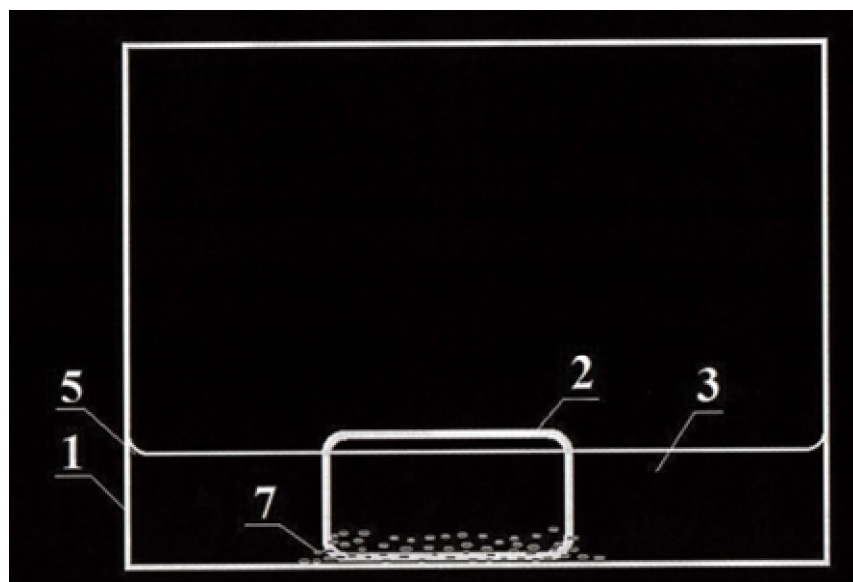


Fig. 2

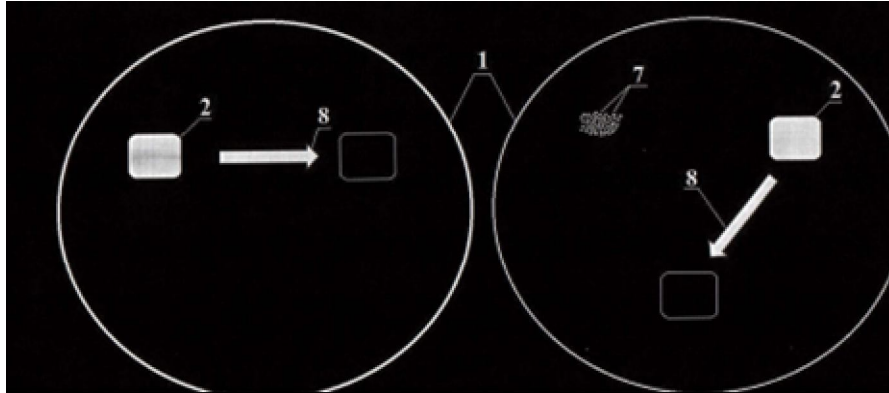


Fig. 3

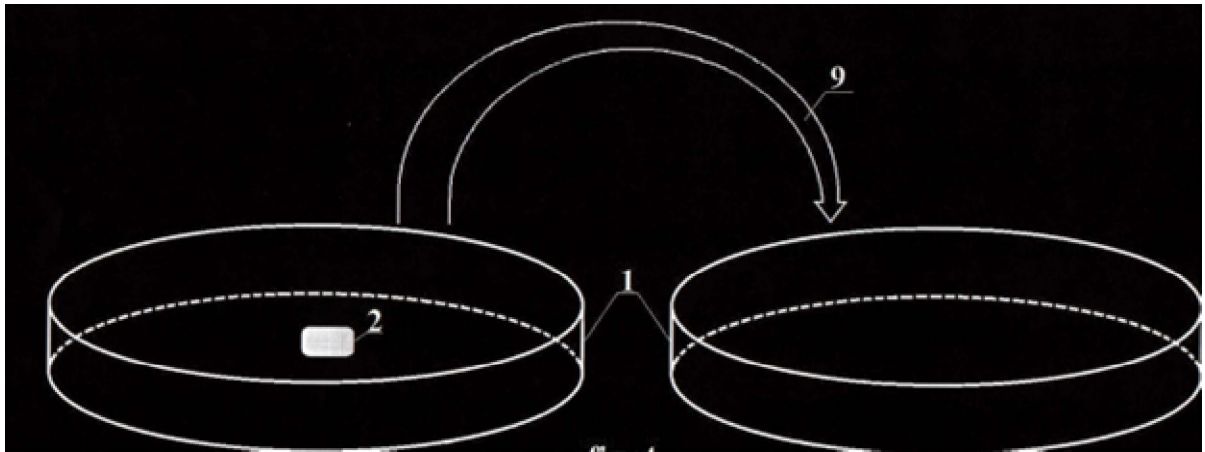


Fig. 4