



(19)

LATVIJAS REPUBLIKAS
PATENTU VALDE

(11) LV 15712 B1

(51)

Starpt.pat.kl. C12Q 1/68
G01N 15/02

Latvijas patents izgudrojumam
2007g. 15.februāra Latvijas Republikas likums

(12) **Īsziņas**

(21) Pieteikuma numurs:	LVP2022000096	(71) Īpašnieks(i):	RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE, Ķīpsalas iela 6A, Rīga, LV
(22) Pieteikuma datums:	06.12.2022	(72) Izgudrotājs(i):	Hermanis SOROKINS (LV) Jurijs DEHTJARS (LV) Sergejs NIKUĻŠINS (LV) Uldis BĒRZIŅŠ (LV)
(43) Pieteikuma publikācijas datums:	20.02.2023	(74) Pilnvarnieks vai pārstāvis:	Jevgeņijs FORTŪNA, FORAL Intelektuālā īpašuma aģentūra, SIA, Kalēju iela 14 - 7, Rīga, LV
(45) Patenta publikācijas datums:	20.05.2023		

(54) Izgudrojuma nosaukums:

PAŅĒMIENS DZĪVU, NEIEZĪMĒTU ŠĪNU IDENTIFICĒŠANAI UN ŠĶIROŠANAI PĒC TELOMĒRU GARUMA
A TECHNIQUE FOR IDENTIFYING AND SORTING LIVE, UNLABELED CELLS BY TELOMERE LENGTH

(57) Kopsavilkums:

Izgudrojums attiecas uz paņēmienu dzīvu, neiezīmētu šūnu identificēšanai un šķirošanai pēc telomēru garuma, kas ir pielietojams, piemēram, reģeneratīvajā medicīnā un kosmetoloģijā. Piedāvātais paņēmiens ietver dzīvu, neiezīmētu mezenhimālo cilmes šūnu sagrupēšanu iepriekš noteikta skaita grupās pēc šūnu izmēra un dzīvu, neiezīmētu mezenhimālo cilmes šūnu atdalīšanu no heterogēnas cilmes šūnu populācijas, kur šūnu atdalīšanu veic pēc telomēru garuma ar dielektroforēzes palīdzību, polarizējot šūnas elektriskā lauka gradienta ietekmē. Atdalīta dzīvu cilmes šūnu subpopulācija ar garām telomērām var tikt izmantota terapeitiskos nolūkos kā izejmateriāls orgānu 3D-modeļu veidošanai uz biočipa, lai pētītu orgānu novecošanās procesus, izstrādātu jaunas zāles, kā arī pētītu ar vecumu saistītās slimības.

IZGUDROJUMA APRAKSTS

Tehnikas nozare

[001] Izgudrojums attiecas uz paņēmienu dzīvu, neiezīmētu šūnu identificēšanai un šķirošanai pēc telomēru garuma, kas ir pielietojams piemēram, reģeneratīvajā medicīnā, kosmetoloģijā un farmācijā, gatavojot jaunievietas terapijas zāles vai to derivātus.

Zināmais tehnikas līmenis

[002] No taukaudiem izdalītas mezenhimālās cilmes šūnas (AdMSC) ir nozīmīgs šūnu resurss somatisko šūnu terapijai tādu smagu slimību ārstēšanai kā miokarda infarkts, konvencionālai medicīnai rezistentas autoimūnas saslimšanas, brūču reģenerācija/dzīšana [1, 2, 3]. Cilmes šūnu telomēru garumam ir būtiska nozīme šūnu potencei: dalīties, migrēt un diferencēties, veidot starpšūnu matriksu un kopumā spējai sekmēt audu reģenerāciju [4]. Telomēru garuma saīsināšanās šūnu dalīšanās procesā izraisa ar vecumu saistītas saslimšanas, tādas kā sirds un asinsvadu slimības un vēzi [5, 6].

[003] Lai labāk izprastu vecuma patoģenēzes mehānismus, izstrādātu zāles pret šūnu novecošanās, piemēram, senolītiķus, ir nepieciešams izmantot dzīvas cilmes šūnas ar dažāda garuma telomērām. Lai modelētu vecu un jaunu orgānu funkcijas uz biočipa, ir iespēja izmantot cilmes šūnas no agrīnām un vēlīnām pasāžām, pieņemot apgalvojumu, ka agrīnās pasāžās cilmes šūnām ir garākas telomēras (replikatīvi jaunas šūnas), bet vēlākās pasāžās – īsākas telomēras (replikatīvi vecas šūnas).

[004] Bet šāda pieeja nav pietiekoši precīza, jo jebkura cilmes šūnu populācija gan sākuma, gan beigu pasāžās pēc telomēru garuma ir heterogēna. Cilmes šūnu populācijā vienlaicīgi ir cilmes šūnas ar dažādiem telomēru garumiem, jo cilmes šūnu dalīšanās nenotiek vienlaicīgi [7, 8].

[005] Ir zināmas šūnu telomēru garuma mērīšanas metodes [9, 10, 11], kas ietver telomēru marķēšanu tādā veidā, kas ievērojami samazina šūnu dzīvotspēju vai pat nogalina šūnas, kuru telomēras tiek mērītas. Līdz ar to ar zināmajām metodēm pēc šūnu telomēru garumu noteikšanas šūnas nav derīgas tālākai orgānu uz biočipa veidošanai.

Izgudrojuma mērķis un būtība

[006] Šī izgudrojuma mērķis ir izstrādāt paņēmienu, ar kuru var sašķirot cilmes šūnas pēc telomēru garuma, nebojājot šūnas, ņemot vērā noteiktu šūnu parametru kopumu. Izvirzītais

mērķis tiek sasniegts ar piedāvāto paņēmienu, kas ietver dzīvu, neiezīmētu mezenhimālo cilmes šūnu sagrupēšanu iepriekš noteikta skaita grupās pēc šūnu izmēra un dzīvu, neiezīmētu mezenhimālo cilmes šūnu atdalīšanu no heterogēnas cilmes šūnu populācijas, kur šūnu atdalīšanu veic pēc telomēru garuma ar dielektroforēzes palīdzību, polarizējot šūnas elektriskā lauka gradienta ietekmē, vai ar dzīvu šūnu plūsmas citometriju.

Izgudrojuma detalizēts izklāsts

[007] Piedāvātais paņēmiens dzīvu, neiezīmētu šūnu identificēšanai un šķirošanai ietver dzīvu, neiezīmētu mezenhimālo cilmes šūnu sagrupēšanu iepriekš noteikta skaita grupās pēc šūnu izmēra un dzīvu, neiezīmētu mezenhimālo cilmes šūnu atdalīšanu no heterogēnas cilmes šūnu populācijas, kur šūnu atdalīšanu veic pēc telomēru garuma ar dielektroforēzes palīdzību, polarizējot šūnas elektriskā lauka gradienta ietekmē. Saskaņā ar piedāvāto izgudrojumu, cilmes šūnas tiek kontrolēti *in vitro* pavairotas. Saskaņā ar vēlamo izgudrojuma izpausmi, dzīvas, neiezīmētas mezenhimālas cilmes šūnas ir no taukaudiem izdalītas mezenhimālas cilmes šūnas. Saskaņā ar vēl vienu vēlamo izgudrojuma izpausmi, šūnu polarizāciju elektriskā lauka gradienta ietekmē veic vidē ar konduktivitāti 10 – 100 mS/m, 35-40 °C temperatūrā (optimāli 10 mS/m, pie 37 °C); vides sastāvā PBS, DMEM-F12 un citas šūnu ekspansijas vides. Turklāt elektrisko spriegumu izvēlās diapazonā 3-50 V (optimāli 20 V) un elektriskā sprieguma frekvenci no 10 kHz līdz 100 MHz.

[008] Cilvēkiem un pasāžām ir atšķirīgi cilmes šūnu izmēri. Cilmes šūnu izmēru ietekmē ekspansijas (šūnu kultivēšanas) apstākļi. Tāpēc cilmes šūnu sadalījums trīs grupās (liela, vidēja un maza izmēra - 33%:33%:33%) ir relatīvs un veicams katrai populācijai pirms šķirošanas. Pirms šķirošanas apseko 1-5000 šūnas, līdz rodas priekšstats par populācijas izmēru diapazonu, –proti, uz iegūtās informācijas pamata par šūnu populācijas izmēru robežām, nosaka šķirojamo populāciju izmēru diapazonu. Izmanto tikai 1/3 no populācijas: 1/3 no populācijas ar mazu izmēru, ja nepieciešama populācija ar garākām telomērām, un 1/3 liela izmēra, ja nepieciešamas populācijas cilmes šūnas ar īsākām telomērām. No populācijas izmanto 1/3, bet 2/3 neizmanto.

[009] Piedāvātais paņēmiens dod iespēju sadalīt dzīvās šūnas suspensijā pēc plūsmas citometriski noteicamiem parametriem, t.sk. pēc izmēra, un citometriski pētīt telomēru garumu diskriminētajās populācijās.

Izgudrojuma īstenošanas piemērs

[010] Pirms dzīvu, neiezīmētu šūnu mērīšanas dielektroforēzes (DEP)-biočips tiek kalibrēts ar dielektroforēzes (DEP)-vidi un dielektroforēzes (DEP)-lodītēm. AdMSC tiek mazgātas DEP-vidē divas reizes un sekojoši mērītas. Tiek noteikti parametri, pie kuriem DEP ir 0 (*Crossover frequencies*), noteikts *ClausiusMossotti* faktors ($Re[f_{cm}]$). Ar DEP metodi optimizācijas ceļā tiek atdalītas mirušās šūnas,. Ar DEP metodi tiek noteikti dielektriskie parametri. Ekspansētās (kontrolēti *in vitro* pavairostās) cilmes šūnas tiek sašķirotas pēc šūnu izmēra trīs grupās (relatīvā izmēra): maza izmēra, vidēja izmēra, liela izmēra. Šķirošana veikta ar fluorescences aktivēto šūnu šķirošanu (FACS), bet var tikt veikta arī ar citām metodēm: optiski (mikroskopējot) mērot, dielektroforētiski. Tātad, lai pierādītu šūnu izmēra korelāciju ar šūnu relatīvo telomēru garumu, tiek veikta šūnu analīze ar “Telomere PNA Kit”. Rezultāts – būtiski mazāka izmēra šūnas ir ar garākām telomērām nekā liela izmēra šūnas.

[011] Šķirošana ar FACS. Mezenhimālās CS6-P5 un CS8-P8 cilmes šūnu kultūras tika resuspendētas PBS buferī koncentrācijā $20 \times 10^3/\mu\text{L}$ [22]. Tika veikta šūnu suspensijas šķirošana ar iekārtu FACS Aria (Becton-Dickinson, USA) pēc parametra *Forward scatter* (FS, taisnā izkļiede), kas tieši korelē ar šūnu izmēru. Tika atlasītas divas apakšpopulācijas – 33 % šūnu ar viszemāko FS (“mazas šūnas”) un 33 % šūnu ar vislielāko FS (“lielas šūnas”). Iekārtas kalibrācijai un šūnu savākšanai tika pielietota FACSDiva programmatūra (versija 9.0).

[012] Pēc šķirošanas katras populācijas relatīvais telomēru garums (RTG) tika noteikts ar plūsmas citometrijas metodi ar iekārtu FACS Aria (Becton-Dickinson, USA) un reaģentu komplektu *Telomere PNA Kit/FITC for Flow Cytometry* (Dako, Glostrup, Denmark, kods K5327) atbilstoši ražotāja rekomendācijām. Turklāt šūnu līnija ATCC/LGC Standards (Boras, Sweden) tika izmantota kā iekšējā kontrole. Specifiskā telomēru fluorescence tika noteikta FL1-FITC kanālā (525 nm), kopējais ar PI krāsotas DNS daudzums – FL3 -PC5 kanālā (660 nm). Katram testam tika izmeklētas vismaz 20.000 šūnas. Iekārtas kalibrācija, fluorescences kompensāciju aprēķins, plūsmas citometrijas rezultātu analīze un datu eksportēšana uz MS Excel tika veikta ar FACSDiva programmatūru (versija 9.0).

[013] Testu dati tika eksportēti uz MS Excel, RTG tika aprēķināts pēc formulas:

$$RTG \% = \frac{(krāsotu \ šūnu \ mediāna - nekrāsotu \ šūnu \ mediāna) * kontroles \ šūnu \ DNS \ indekss * 100}{(krāsotu \ kontroles \ šūnu \ mediāna - nekrāsotu \ kontroles \ šūnu \ mediāna) * šūnu \ DNS \ indekss}$$

[014] Šķirotajā CS6-P5 mazu šūnu populācijā RTG bija augstāks (40,3 %) salīdzinājumā ar lielāku šūnu populāciju (30,4 %); starpība bija statistiski ticama ($p < 0,001$, *Mann-Whitney U* tests, MS SPSS v.21).

Šķirotajā CS8-P8 mazu šūnu populācijā RTG bija augstāks (21,66 %) salīdzinājumā ar lielāku šūnu populāciju (13,20 %); starpība bija statistiski ticama ($p < 0.001$, *Mann-Whitney U* tests, MS SPSS v.21).

[015] Atdalītā dzīvu, neiezīmētu cilmes šūnu subpopulācija ar garām telomērām var tikt izmantota terapeitiskos nolūkos, jo no tās var tikt atdalītas replikatīvi vecas šūnas (ar īsām telomērām), kurām piemīt zema potence, ir lielāka toksicitāte un ir palielināts onkogenitātes risks. Pēc telomēru garuma atdalītās cilmes šūnu subpopulācijas (gan ar garākām telomērām, gan ar īsākām) arī ir izmantojamas kā izejmateriāls orgānu 3D-modeļu veidošanai uz biočipa, lai pētītu orgānu novecošanās procesus, piemēram, ādas (“*Skin-on-a-chip*”, “*Organ-on-a-chip*” modeļos); izstrādātu jaunas zāles, piemēram, senolītiķus; kā arī pētītu ar vecumu saistītās slimības, piemēram, sirds asinsvadu mazspēju, diabētu, vēža veidošanos.

Izmantotie literatūras avoti

1. Gathier, W., Türktaş, Z., & Duckers, H. J. (2016). *Adipose-Derived Stem Cells. Stem Cell and Gene Therapy for Cardiovascular Disease*, 119–135. doi:10.1016/b978-0-12-801888-0.00010-2;
2. Miana, V. V., & Prieto González, E. A. (2018). *Adipose tissue stem cells in regenerative medicine. Ecancermedalscience*, 12. doi:10.3332/ecancer.2018.822;
3. Li, P., & Guo, X. (2018). *A review: therapeutic potential of adipose-derived stem cells in cutaneous wound healing and regeneration. Stem Cell Research & Therapy*, 9(1). doi:10.1186/s13287-018-1044-5;
4. Lee, S., & Schmitt, C. A. (2019). *The dynamic nature of senescence in cancer. Nature [16] Cell Biology*, 21(1), 94–101. doi:10.1038/s41556-018-0249-2
5. Herrmann, M., Pusceddu, I., 2/25/2020 450 Metode dzīvu, neiezīmētu šūnu identificēšanai un... - Postdoc <https://postdoc.viaa.gov.lv/#/manager/project-application/print/1837508> 3/14
6. März, W., & Herrmann, W. (2018). *Telomere biology and age-related diseases. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 56(8), 1210–1222. doi:10.1515/cclm-2017-0870
7. Hoffmann, J., & Spyridopoulos, I. (2011). *Telomere length in cardiovascular disease: new challenges in measuring this marker of cardiovascular aging. Future Cardiology*, 7(6), 789–803. doi:10.2217/fca.11.55;
7. Whitfield, M. J., Lee, W. C. J., & Van Vliet, K. J. (2013). *Onset of heterogeneity in culture-expanded bone marrow stromal cells. Stem Cell Research*, 11(3), 1365–1377. doi:10.1016/j.scr.2013.09.004

8. Scherf, N., Franke, K., Glauche, I., Kurth, I., Bornhäuser, M., Werner, C., ... Roeder, I. (2012). *On the symmetry of siblings: automated single-cell tracking to quantify the behavior of hematopoietic stem cells in a biomimetic setup*. *Experimental Hematology*, 40(2), 119–130.e9. doi:10.1016/j.exphem.2011.10.009;
9. Lai, T.-P., Wright, W. E., & Shay, J. W. (2018). *Comparison of telomere length measurement methods*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1741), 20160451. doi:10.1098/rstb.2016.0451
10. Behrens, Y. L., Thomay, K., Hagedorn, M., Ebersold, J., Henrich, L., Nustede, R., ... Göhring, G. (2017). *Comparison of different methods for telomere length measurement in whole blood and blood cell subsets: Recommendations for telomere length measurement in hematological diseases*. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 56(9), 700–708. doi:10.1002/gcc.22475;
11. Montpetit, A. J., Alhareeri, A. A., Montpetit, M., Starkweather, A. R., Elmore, L. W., Filler, K., ... Jackson-Cook, C. K. (2014). *Telomere Length*. *Nursing Research*, 63(4), 289–299. doi:10.1097/nnr.0000000000000037.
12. Liu, Y., Jiang, A., Kim, E., Ro, C., Adams, T., Flanagan, L., ... Hayes, M. A. (2019). *Identification of Neural Stem and Progenitor Cell Subpopulations using DC Insulator-based Dielectrophoresis*. *The Analyst*. doi:10.1039/c9an00456d.
13. Yoshioka, J., Ohsugi, Y., Yoshitomi, T., Yasukawa, T., Sasaki, N., & Yoshimoto, K. (2018). *Label-Free Rapid Separation and Enrichment of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells from a Heterogeneous Cell Mixture Using a Dielectrophoresis Device*. *Sensors*, 18(9), 3007. doi:10.3390/s18093007.
14. Gascoyne, P., & Shim, S. (2014). *Isolation of Circulating Tumor Cells by Dielectrophoresis*. *Cancers*, 6(1), 545–579. doi:10.3390/cancers6010545.
15. Pethig, R. (2010). *Review Article—Dielectrophoresis: Status of the theory, technology, and applications*. *Biomicrofluidics*, 4(2), 022811. doi:10.1063/1.3456626.
16. Pethig, R., Menachery, A., Pells, S., & De Sousa, P. (2010). *Dielectrophoresis: A Review of Applications for Stem Cell Research*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 1–7. doi:10.1155/2010/182581.
17. Velugotla, S., Pells, S., Mjoseng, H. K., Duffy, C. R. E., Smith, S., De Sousa, P., & Pethig, R. (2012). *Dielectrophoresis based discrimination of human embryonic stem cells from differentiating derivatives*. *Biomicrofluidics*, 6(4), 044113. doi:10.1063/1.4771316.

18. Markx, G. H., Talary, M. S., & Pethig, R. (1994). Separation of viable and non-viable yeast using dielectrophoresis. *Journal of Biotechnology*, 32(1), 29–37. doi:10.1016/0168-1656(94)90117-1.
19. Yildizhan, Y., Erdem, N., Islam, M., Martinez-Duarte, R., & Elitas, M. (2017). Dielectrophoretic Separation of Live and Dead Monocytes Using 3D Carbon-Electrodes. *Sensors*, 17(11), 2691. doi:10.3390/s17112691.
20. Erdem, N., Yildizhan, Y., Elitas, M. (2017). A Numerical Approach for Dielectrophoretic Characterization and Separation of Human Hematopoietic Cells. *International Journal of Engineering and Technical Research* 6(04):1079-1082. doi: 10.17577/IJERTV6IS040730.
21. Adams, T. N. G., Jiang, A. Y. L., Vyas, P. D., & Flanagan, L. A. (2018). Separation of neural stem cells by whole cell membrane capacitance using dielectrophoresis. *Methods*, 133, 91– 103. doi:10.1016/j.ymeth.2017.08.016
22. Legzdina, D., Romanauska, A., Nikulshin, S., Kozlovska, T., & Berzins, U. (2016). Characterization of Senescence of Culture-expanded Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Stem Cells*, 9(1), 124–136. doi:10.15283/ijsc.2016.9.1.124.
23. Hoettges, K. F. et.al. (2019). Ten-Second Electrophysiology: Evaluation of the 3DEP Platform for high-speed, high-accuracy cell analysis. *Scientific Reports*, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-55579-9

PRETENZIJAS

1. Paņēmiens dzīvu, neiezīmētu šūnu identificēšanai un šķirošanai, kas ietver dzīvu, neiezīmētu mezenhimālo cilmes šūnu sagrupēšanu iepriekš noteikta skaita grupās pēc šūnu izmēra un dzīvu, neiezīmētu mezenhimālo cilmes šūnu atdalīšanu no heterogēnas cilmes šūnu populācijas, kur šūnu atdalīšanu veic pēc telomēru garuma ar dielektroforēzes palīdzību, polarizējot šūnas elektriskā lauka gradienta ietekmē.
2. Paņēmiens saskaņā ar 1.pretenziju, kur cilmes šūnas ir kontrolēti *in vitro* pavairotas.
3. Paņēmiens saskaņā ar 1.pretenziju, kur dzīvas, neiezīmētas mezenhimālas cilmes šūnas ir no taukaudiem izdalītas mezenhimālas cilmes šūnas.
4. Paņēmiens saskaņā ar 1.pretenziju, kur šūnu polarizāciju elektriskā lauka gradienta ietekmē veic vidē ar konduktivitāti 10 – 100 mS/m, 35 – 40 °C temperatūrā, ar elektrisko spriegumu 3-50 V un elektriskā sprieguma frekvenci no 10 kHz līdz 100 MHz.