



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2010 00986**

(22) Data de depozit: **18.10.2010**

(41) Data publicării cererii:  
**28.10.2011** BOPI nr. **10/2011**

(71) Solicitant:  
• **UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" DIN CLUJ-NAPOCA, STR. EMIL ISAC NR.13, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(72) Inventatori:  
• **MIHU CARMEN MIHAELA, STR. GALACTION LIVIU MUNTEANU NR.9, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**  
• **ȘORITĂU OLGA, STR. SOMEȘUL RECE NR.1233C, GILĂU, CJ, RO;**  
• **RUS CIUCA DAN FLORIN, CALEA DOROBANȚILOR NR.39-41, BL.A, SC.2, AP.12, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**

• **SUSMAN VALERIU SERGIU, STR. CLOȘCA NR.1, BL.C2, AP.4, ALBA IULIA, AB, RO;**  
• **MIHU DAN, STR. GALACTION LIVIU MUNTEANU NR.9, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;**  
• **IRIMIE ALEXANDRU, STR.ADY ENDRE NR.40, CLUJ NAPOCA, CJ, RO;**  
• **COLCEAR DOINA, STR. HAȚEG NR.28, BL.K2, AP.36, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO**

(74) Mandatar:  
**CABINET DE PROPRIETATE INDUSTRIALĂ CIUPAN CORNEL, STR. MESTECENILOR NR. 6, BL. 9E, AP. 2, CLUJ NAPOCA, JUDEȚUL CLUJ**

(54) **METODĂ IN VITRO DE OBȚINERE CONCOMITENTĂ A PROGENITORILOR HEPATOCITARI ȘI PANCREATICI DIN CELULELE STEM IZOLATE DIN PLACENTA UMANĂ**

(57) Rezumat:

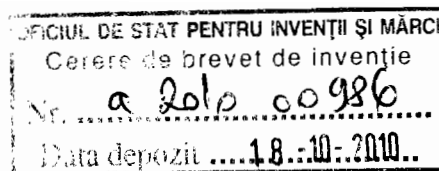
Invenția se referă la o metodă de obținere a progenitorilor hepatocitari și pancreatici, utilizați în terapia celulară. Metoda conform invenției constă din aceea că celulele stem, izolate din porțiunea corionică sau membrana a placentei, sunt cultivate în condiții uzuale de laborator, după care are loc expansiunea celulelor stem nediferențiate și caracterizarea acestora, în continuare,

se cultivă pe un substrat de colagen și în prezența unui mediu de diferențiere, rezultând o schimbare a morfologiei celulelor și diferențierea în trei etape a celulelor stem mezenchimale placentare spre celule progenitori comuni hepatic-pancreatic.

Revendicări: 8

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





## **METODA IN VITRO DE OBTINERE CONCOMITENTA A PROGENITORILOR HEPATOCITARI SI PANCREATICI DIN CELULELE STEM IZOLATE DIN PLACENTA UMANA**

Invenția se referă la o metodă de obținere concomitentă a celulelor hepatice și pancreatice din celulele stem izolate din placenta umană cu posibilități de utilizare în tratamentul celular.

Deși cunoștințele legate de biologia, comportamentul, potențialul aplicațiilor celulelor stem în clinica umană a luat un avânt substanțial în ultimii ani, definiția termenului de “celula stem” este încă controversată, fiind încă un concept în dezvoltare.<sup>1,2</sup> *Celulele stem* sunt definite generic ca celule nediferențiate, capabile de autoregenerare precum și de diferențiere în celule specifice de linieaj. Autoregenerarea poate fi menținută de-a lungul a numeroase generații, amplificând numărul acestora dar și dând naștere la celule –fiice din ce în ce mai diferențiate, numite și celule progenitoare sau precursoră. Acestea din urmă sunt capabile să continue diferențierea dar nu sunt capabile și de autoregenerare.

S-au delimitat astfel următorii termeni legați de capacitatea de proliferare și diferențiere a celulelor stem<sup>3</sup>: *celulele stem totipotente*: care au potențialul genetic de a se diferenția în orice tip de celulă din organism, inclusiv în celule placentale și țesuturi extra-embriionice, având astfel toate proprietățile necesare obținerii unui întreg făt uman. *Celulele stem pluripotente*-ce pot fi izolate din masa internă a blastocistului sunt capabile de a forma țesuturile cu originea în cele 3 foițe embrionare (endoderm, mesoderm și ectoderm), mai puțin celulele placentare și țesuturile extra-embriionare. *Celulele stem multipotente* sunt celule ce pot da naștere doar unui număr limitat de tipuri celulare sau țesuturi, restricționate doar la o anumită foaie embrionară, care pot fi identificate la făt și în dezvoltare și la organismele adulte. *Celulele stem unipotente* sunt celule ce pot da naștere unui singur tip de celulă.

Celulele stem mai pot fi clasificate după stadiul de dezvoltare al organismului în care sunt obținute: celule stem embrionare derivate din masa celulară internă a blastocistului de preimplantare sunt celule stem pluripotente; celulele stem fetale-cum sunt celulele recoltate din lichidul amniotic, care sunt pluripotente și celule stem adulte, care sunt obținute postnatal

<sup>1</sup> Parker M.A., Cotanche D.A.: "The potential use of stem cells for cochlear repair" *Audiol. Neurootol.* 2004;9:72-80

<sup>2</sup> Parolini O., Soncini M.: "Human placenta: A source of progenitor/stem cells?" *J. Reproduktionsmed. Endocrinol.* 2006;3:117-126

<sup>3</sup> Fortier L.A.: *Stem Cells: Classifications, Controversies and Clinical Applications. Vet. Surg.*; 2005; (34): 415-423

de la organisme, din tesuturi de origine endodermala, mezodermala si ectodermala. Aceste celule sunt pluripotente si nu exprima markerii specifici celulelor totipotente si nu formeaza teratoame.<sup>4</sup>

Terapia celulara implica manipularea celulelor vii, sisteme complexe si cu un comportament imprezibil in conditii de transplantare. Pentru a implementa terapia cu celule stem in clinica umana sunt necesare studii aprofundate asupra biologiei celulelor stem. Manipularea celulelor stem ridica numeroase probleme atat etice cat si tehnice iar translatia de la cercetarea preclinica la cercetarea clinica a acestora impune indeplinirea unor conditii esentiale :

- obtinerea unui numar suficient de mare de celule
- metode de izolare si purificare neinvazive
- capacitate sporita de expansiune( proliferare)
- controlul diferentierii acestora .
- caracterizarea imunologica
- caracterizare moleculara si functionala
- reproductibilitatea experimentelor
- san nu dauneze organismului gazda

Sursele actuale de celule stem sunt : celulele stem embrionare si celulele stem de tip adult. Ambele surse au avatajele si dezavantajele lor. Obtinerea unui numar sporit de celule stem embrionare este limitat de inducerea fenomenului de diferentiere spontana, precum si de posibilitatile restranse de a controla o diferentiere dirijata spre un anumit tip celular. Un alt dezavantaj al cultivarii celulelor stem embrionare umane il reprezinta rata foarte scazuta de stabilizare de linii celulare<sup>10</sup>. In anul 2005 erau stabilizate in jur de 100 de linii celulare in toata lumea, fara o caracterizare suficient de riguroasa.<sup>5</sup> Un alt obstacol in utilizarea celulelor stem embrionare il reprezinta riscul inducerii de teratoame.

Celulele stem de tip adult, nu prezinta probleme etice pentru ca sunt izolate de la nivelul organismelor adulte. Aceste celule se afla in numar foarte mic dar suficient pentru a asigura reinnoirea tesuturilor si de fi mobilizate pentru repararea leziunilor dintr-un organ sau tesut. In aceste conditii celulele stem prolifereaza si se diferentiaza spre celulele tesutului lezat. Dupa epuizarea stocului de celule stem endogene are loc un proces de recrutare a celulelor stem

---

<sup>4</sup> Mahendera S.R.: Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. Stem Cells and Development, 2004, 13:452-455

<sup>5</sup> Tiina Matikainen, Jarmo Laine:" Placenta-an alternative source of stem cells. Review" Toxicology and Applied Pharmacology( 2005); 207: S544-S549

non-hematopetice din sangele periferic si maduva osoasa. Acest intreg proces necesita eliberarea de citokine si alti factori de crestere.<sup>5</sup>

Dezavantajul major al celulelor stem adulte este ca au un potential de diferentiere mult mai scazut fata de celulele stem embrionare precum faptul ca sunt celule rare ( $1:10^7-10^8$  din totalul celulelor).<sup>2</sup> Celulele stem mezenchimale sunt celule stem multipotente care se pot diferentia intr-o varietate de tipuri celulare in afara de celulele hematopoietice: osteoblasti, condrocite, miocite, adipocite, celule neuronale. In ultimul deceniu s-a constatat o evolutie neasteptata in studiul biologiei celulei stem prin faptul ca se acumuleaza tot mai multe dovezi ce demonstreaza o plasticitate mult mai mare a celulelor stem adulte decat criteriile stabilite prin definitia impusa de celulele stem embrionare.<sup>6</sup> In acelasi timp se depun eforturi pentru descifrarea mecanismelor moleculare care dicteaza plasticitatea acestor celule precum si elaborarea unor modalitati de exploatare in terapia celulara. In clinica umana cea mai obisnuita sursa de CSM este maduva osoasa adulta. Procentul de CSM in maduva osoasa este destul de scazut (0,001-0,01%)<sup>7</sup>, si acesta scade si mai mult cu varsta. Inconvenientul acestei surse mai este si faptul ca recoltarea de maduva osoasa este o manevra invaziva.

O alternativa este deja mult exploatata este sangele ombilical, dar de asemenea procentul de CSM este foarte scazut. Dintr-un numar total de celule nucleate obtinute de  $1-2 \times 10^9$  numarul celulelor CD34+ este de  $2-3 \times 10^6$ .<sup>10</sup> Celulele stem hematopoietice izolate din sangele ombilical sunt folosite ca o metoda alternativa in transplantul de maduva osoasa in malignitatile hematologice. Dezavantajul major al utilizarii sangelui ombilical ca sursa de celule stem este reprezentat de numarul redus de celule ce poate fi obtinut. Mult mai bogat in CSM este lichidul amniotic, ce contine o populatie heterogena de celule de origine fetala.

**Placenta** este una din sursele cele mai avantajoase, mult studiată in ultimul timp, indeplinind cele 2 deziderate principale ale terapiei celulare: obtinerea unui numar cat mai mare de celule si folosirea unor metode neinvazive pentru recoltarea acestora.

Formarea placentei este esentiala pentru ca sarcina sa evolueze normal. Dupa fertilizare implantarea necesita diferentierea trofoblastului urmata de o asamblare rapida a celulelor embrionare intr-o placenta functionala.<sup>10</sup> Celulele ectodermale, numite si citotrofoblast vor ancora placenta la circulatia intrauterina, permitand transportul nutrientilor si a gazelor sanguine precum si eliminarea toxinelor. Placenta indeplineste si rolul de organ extramedular hematopoetic in timpul embriogenezei timpurii. In afara de celulele stem

---

<sup>6</sup> Phinney G.D., Prokop D.J.: "Concise review: Mesenchymal stem/pluripotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current" Stem Cells, 2007;25:2896-2902

<sup>7</sup> Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., et al "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells": Science, 1999; 284: 143-147

hematopetice placenta contine si o populatie de celule stem multipotente, ce exprima o parte din markeri celulelor stem embrionare: c-kit, Oct 4, Sox 2, SSEA-1 , SSEA-3, 4 si fosfataza alcalina. Aceste celule se aseamana cu celulele stem mezenchimale si prin faptul ca pot fi differentiate in celule hepatice, endoteliale, pancreatice, neuronale.<sup>8</sup>

Bolile hepatice insotite de insuficienta hepatica reprezinta o problema importanta a patologiei clinice, iar una din optiunile de terapie cu tentative de curabilitate o reprezinta transplantul de organ, metoda dificila ce presupune prezenta unui donator compatibil. De aceea se cauta alternative la transplantul de organ, cum sunt terapiile bazate pe transplantul de hepatocite sau implantarea de constructe hepatocelulare. Cultura primara a hepatocitelor normale este extrem de pretentioasa pornind inca de la procedeul de recoltare intraoperator, la acordarea importantei semnalelor micromediului , ale matricei extracelulare, si mediatorii solubili. Astfel construirea unei platforme de inginerie tisulara hepatica presupune o cunoastere in profunzime si o reconstituire controlata a acestor factori de mediu complexi.<sup>9</sup>

Principalul scop, in ceea ce priveste tratamentul diabetului zaharat este de a realiza un nivel optim al glicemiei, evitand episoadele hipoglicemice. Experimentele realizate prin transplantarea celulelor beta la pacientii diabetici, au dovedit partial ca acest tip de tratament poate fi o solutie. Deoarece celulele beta isolate de la nivelul pancreasului sunt in cantitate limitata, noi surse de celule stem din care sa se obtina celule producatoare de insulina si noi protocoale sunt necesare. Rezultate promitatoare, dar care au inca nevoie de imbunatatiri au fost obtinute utilizand ca sursa celulele stem embrionare si cele de tip adult.

In ceea ce priveste celulele embrionare, s-au folosit o serie de protocoale de diferentiere, toate cu rezultate variabile<sup>10 11</sup>. Trebuie spus ca si in acest caz, ca de altfel in toate cazurile care folosesc celule embrionare ca acestea prezinta avantaje, dar si o serie de dezavantaje. Deosebita lor plasticitate le face deosebit de greu de controlat, atunci cand se doreste sa se obtina un anumit tip de celula specializata, pentru ca aceste presupune controlul tuturor cailor de semnalizare intracelulare, lucru imposibil pentru cercetatori astazi. Astfel se explica rezultatele partiale si unele controversate obtinute utilizand celulele stem embrionare

---

<sup>8</sup> Strom S., Miki T.: "Placental derived stem cells and uses thereof" United States Patent Application Publication US 2003/0235563A1

<sup>9</sup> Culture of Cells for Tissue Engineering Gordana Vunjak-Novakovic, R. Ian Freshney, 2006Wiley-Liss , Chap. 15 :417-473 Tissue Engineering of the Liver

<sup>10</sup> Kodama M et al ( 2009) Embryonic Stem Cell Transplantation Correlates With Endogenous Neurogenin 3 Expression and Pancreas Regeneration in Streptozotocin-injured Mice .J Histochem Cytochem

<sup>11</sup> Parekh VS et al (2009) Differentiation of human umbilical cord blood-derived mononuclear cells to endocrine pancreatic lineage., Differentiation 24: 105-227

cat si discrepanta intre potentialul lor teoretic si rezultatele practice concrete in ceea ce priveste utilizarea lor in terapie<sup>12</sup>.

In ceea ce priveste placenta ca sursa de celule pentru obtinerea ce celule secretoare de insulina, numarul studiilor este mult mai redus. In principal exista doua studii, ambele apartinand cercetatorilor chinezi. In primul dintre ele Sun NZ<sup>13</sup> utilizeaza un protocol extrem de simplu, cel putin in ceea ce declara. Mediul este clasic, DMEM cu concentratie mare de glucoza, cu 10% FBS si 1%NEA, beta-mercaptoetanol si glutamina la care adauga doar bFGF. Celulele sunt pasate la 2-3 zile si observate la microscopul in faza inversata zilnic. Desi protocolul este extrem de simplu in comparatie cu celelalte protocele utilizate, cercetatorii afirma ca au obtinut o expresie genica pentru Pdx1, *insulin1* si *insulin2* la 7 si 14 zile.

Tot utilizand celule izolate din placenta Chang CM<sup>14</sup> utilizeaza un protocol mai complex : mediul este DMEM/F12 1 :1, cu ITS, 0.6 % glucoza, 25g/ml insulina 100g /ml transferina, 20nM progesterona, putrescina, 30nM clorura de seleniu, 2mM glutamina, 3mM bicarbonat de sodiu, 20ng/ml EGF, 20ng/ml bFGF, 20ng/ml HGF.

Problema tehnica pe care o rezolvă inventia propusă este de a realiza o metoda de obținere concomitentă a celulelor hepatice si pancreatice din celulele stem izolate din placenta umana care să ofere posibilitatea de obtinere a unui numar suficient de mare de celule, cu capacitate sporita de proliferare, cu diferentiere controlata, și cu o bună caracterizare imunologica, moleculara si functionala astfel încât să poata fi utilizate în terapiua celulară.

Metoda *in vitro* de obtinere concomitenta a progenitorilor hepatocitelor si celulelor pancreatice din celulele stem izolate din placenta umana, elimina dezavantajele metodelor cunoscute prin aceea că utilizează cea mai avantajoasă sursă de obținere, prin metode neinvazive, de celule stem, acestea fiind izolate din portiunea corionica sau membrana a placentei, după care are loc expansiunea în cultura a celulelor stem și caracterizarea lor, iar apoi, printr-o cultivare pe substrat de colagen și în prezența unui mediu de diferentiere se produce o schimbare a morfologiei celulelor și diferentierea celulelor stem mezenchmale placentare spre celule progenitori comuni hepatic-pancreatic.

---

<sup>12</sup> Jenifer M et al (2008) On the origin of the beta cells, Genes and Development 22:1998-2021

<sup>13</sup> Sun NZ et al, (2009) In vitro differentiation of human placenta-derived adherent cells into insulin-producing cells J Int Med Res 37 (2): 400-6

<sup>14</sup> Chang CM et al. (2007) Placenta-derived multipotent stem cells induced to differentiate into insulin-positive cells. Biochem Biophys Res Commun 357: 414-20

Prezentam aici o metoda de diferentiere *in vitro* a celulelor stem placentare ce produce o rata crescuta si omogena de celule progenitori comuni cu potential dublu de diferentiere atat spre hepatocite cat si spre cellule beta pancreatice functionale.

Metoda presupune mai multe etape:

1. **izolarea celulelor** stem din placenta ( din portiunea corionica sau membranara)
2. **expansiunea acestora** in cultura si caracterizarea lor (exprimarea markerilor de pluripotenta, capacitatea de proliferare , imunogenicitatea)
3. **diferentierea celulelor stem mezenchmale placentare spre celule progenitori comuni hepato-pancreatici** printr-o cultivare pe substrat de colagen (etapa de 16-48 ore) in prezenta de mediu de diferentiere H1. Se insamanteaza  $2-3 \times 10^5$  celule stem pe placile cu substrat de colagen. Mediul de cultivare pana la atingerea confluentei este mediul usual de cultivare al celulelor stem nediferentiate ( DMEM 4,5g/l: F-12 raport 1:1, 15% FCS, 1% Glutamina, 1% penicilina-streptomicina, 1% acizi neesentiali). In momentul atingerii confluentei se face schimabarea de mediu cu mediu H1: DMEM 1g/l:MCDB201 raport 1:1, 1%BSA, 4,7  $\mu$ g/ml acid linoleic, 1% ITS(insulina -transferina-seleniu), PDGF 10ng/ml, EGF 10ng/ml, 10nM dexametazona, 10mM acid ascorbic, 1% Glutamina, 1% penicilina-streptomicina, 1% acizi neesentiali.

#### *Prepararea substratelor*

- **Colagen:** se prepara o solutie de colagen de tip IV , la o concentratie finala de 15 $\mu$ g/ml. Am folosit godeuri si placi Petri cu diametrul de 6 cm. Solutia finala pentru colagen este plasata in placi cu 6 godeuri , cate 1ml/godeu si lasate timp de 1 ora in nisa cu flux laminar. Surplusul de solutie se arunca, ramanand doar o lama fina de lichid pe fundul placii. Placile sunt lasate sa se usuce dupa care se sterilizeaza la etilenoxid.
  - **Laminina :** solutia stock de 1mg/ml pastrata la -20°C se dezgheata la 2-8 °C. Dilutia se efectueaza in PBS, aducandu-se la o solutie de 100 $\mu$ g/ml. Se calculeaza cantitatea necesara de solutie pentru fiecare suprafata astfel la la final concentratia sa fie de 2  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>. Placile acoperite cu colagen sterilizate se incubeaza 2 ore la 37 °C, apoi se spala 2X cu PBS si se pregatesc pentru insamantarea cu celule.
4. **Diferentierea spre progenitori hepatici.**

Dupa expunerea la mediul H1 se produce o schimbare a morfologiei celulelor cu rotunjirea formei precum si desprinderea unor grupuri celulare ce formeaza agrgate sferice. Dupa 16-48 ore de ore se schimba mediul, cu preluarea celulelor in

suspensie ce vor fi transferate in placile cu collagen+laminina pentru inducerea diferentierii pancreatice. Celulele aderate din placile cu collagen vor fi supuse celei de a doua etape de diferentiere spre hepatocit , in prezenta mediului **H2**, mediu identic cu H1 la care se adauga ca factori de crestere suplimentari 4 ng/ml HGF si 4 ng/ml Oncostatin, 1% Glutamina, 1% penicilina-streptomicina, 1% acizi neesentiali. Aceasta etapa dureaza 3-4 saptamani cu schimbarea de mediu H2 la fiecare 3-4 zile.

5. **Diferentierea spre progenitori pancreatici** se desfasoara in 3 etape:

a.) Suspensia celulara preluata de pe placile cu collagen se centrifugheaza 4min la 500 rpm, iar peletul celular este resuspendat in mediu P1 si insamantat pe placile cu collagen+laminina. Perioada de cultivare este de 4-7 zile. Celulele raman in suspensie dar morfologia acestora se modifica, agregatele celulare devin mai dense , mai condensate cu o forma sferica de mai mari dimensiuni.

**Mediul P1** este compus din high glucose-DMEM /MCDB201 (cantitatea finala de glucoza 6,5g/l) , 1%BSA, 1% Supliment N1, 0,5% B27, 10ng/ml EGF, 10 ng/ml bFGF, HGF (4 ng/ml), heparina, 1% ITS, 1% Glutamina, 1% penicilina-streptomicina, 1% acizi neesentiali .

b.) Suspensia celulara astfel cultivata este preluata si centrifugata si resuspendata in mediul P2 si insamantata pe alte placi cu collagen+laminina. Cultivarea in mediul P2 este de 6-7 zile.

**Mediul P2** este compus din low glucose DMEM /MCDB 201( concentratie de glucoza de 1g/l) , 10%FCS, 10mM nicotinamida, 1% Glutamina, 1% penicilina-streptomicina, 1% acizi neesentiali.

c.) Suspensia celulara astfel cultivata este preluata si centrifugata si resuspendata in mediul P3 si insamantata pe alte placi cu collagen+laminina. Cultivarea in mediul P3 este de 6-7 zile.

**Mediul P3 este compus din** low glucose DMEM/MCDB201(gluc 1g/l), 10%FCS, 10mM exendin 4, 1% Glutamina, 1% penicilina-streptomicina, 1% acizi neesentiali. La sfarsitul celor 6-7 zile se adauga in mediu glucagon si TGF  $\beta$ .

Aplicarea inventiei aduce urmatoarele avantaje:

- folosirea celulelor stem izolate din placenta care reprezinta o sursa acceptata si elimina neajunsurile celorlalte surse de celule stem ( prelevare neinvaziva , imunogenicitate scazuta, posibilitatea obtinerii unui numar mare de celule stem adulte inca din faza de izolare)
- obtinerea concomitenta de celule progenitoare comune pentru lineajul hepatic si pancreatic.



- metoda dureaza 21-28 zile pana la obtinerea unor celule complet diferite si functionale.

- nu necesita conditii speciale de cultivare, se poate efectua in conditiile unui laborator clasic de culturi de celule, fara a necesita aparatura aditionala costisitoare.

- permite modularea diferentierii si a stadiului dorit in functie de necesitati

## REVENDICĂRI

1. Metoda *in vitro* de obtinere concomitentă a progenitorilor hepatocitari și pancreatici din celulele stem izolate din placenta umană, **caracterizată prin aceea că**, utilizează celule stem izolate din porțiunea corionică sau membrana a placentei, după care are loc expansiunea în cultura a celulelor stem și caracterizarea lor, iar apoi, printr-o cultivare pe substrat de colagen și în prezența unui mediu de diferențiere se produce o schimbare a morfologiei celulelor și diferențierea celulelor stem mezenchimale placentare spre celule progenitori comuni hepato-pancreatici.
2. Metoda *in vitro* de obtinere concomitentă a progenitorilor hepatocitari și pancreatici din celulele stem izolate din placenta umană, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, expansiunea celulelor stem nediferențiate se face pe un mediu de cultivare compus din DMEM 4,5g/l: F-12 raport 1:1, 15% FCS, 1% Glutamina, 1% penicilina-streptomicina, 1% acizi neesențiali, (dacă există condiții speciale se revendică !!!).
3. Metodă *in vitro* de obtinere concomitentă a progenitorilor hepatocitari și pancreatici din celulele stem izolate din placenta umană, conform revendicărilor 1 și 2, **caracterizată prin aceea că**, pentru diferențierea celulelor stem mezenchimale placentare spre celule progenitori comuni hepato-pancreatici, pe plăcile cu substrat de colagen se însămânțează  $2-3 \times 10^5$  celule stem, mediul de cultivare până la atingerea confluenței fiind mediul usual de cultivare al celulelor stem nediferențiate (DMEM 4,5g/l: F-12 raport 1:1, 15% FCS, 1% Glutamina, 1% penicilina-streptomicina, 1% acizi neesențiali), iar în momentul atingerii confluenței se face schimbarea de mediu, cu **mediul H1** care produce o schimbare a morfologiei celulelor cu rotunjirea formei precum și desprinderea unor grupuri celulare ce formează agregate sferice, apoi după 16-48 de ore se schimbă mediul, cu preluarea celulelor în suspensie ce vor fi transferate în plăcile cu colagen+laminina pentru inducerea diferențierii pancreatice, celulele aderente din plăcile cu colagen vor fi supuse celei de a doua etape de diferențiere spre hepatocit, în prezența **mediului H2**, etapa ce durează 3-4 săptămâni cu schimbarea de mediu H2 la fiecare 3-4 zile.
4. Metodă *in vitro* de obtinere concomitentă a progenitorilor hepatocitari și pancreatici din celulele stem izolate din placenta umană, conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că**, mediul H1 conține DMEM 1g/l:MCDB201 raport 1:1, 1%BSA, 4,7 μg/ml acid

linoleic, 1% ITS(insulina –transferina-seleniu), PDGF 10ng/ml, EGF 10ng/ml, 10nM dexametazona, 10mM acid ascorbic, 1% Glutamina, 1% penicilina-streptomicina, 1% acizi neesentiali, iar mediul H2 se obtine din mediul H1 la care se adauga, ca factori de crestere suplimentari, 4 ng/ml HGF si 4 ng/ml Oncostatin, 1% Glutamina, 1% penicilina-streptomicina, 1% acizi neesentiali.

5. Metodă in vitro de obtinere concomitenta a progenitorilor hepatocitari si pancreatici din celulele stem izolate din placenta umana, conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că**, diferentierea spre progenitori pancreatici se desfasoara in 3 etape:
- a.) suspensia celulara preluata de pe placile cu collagen se centrifugheaza 4 min la 500 rpm, iar peletul celular este resuspendat in mediu P1 si insamantat pe placile cu collagen+laminina, perioada de cultivare este de 4-7 zile, celulele raman in suspensie, dar morfologia acestora se modifica, agregatele celulare devin mai dense, mai condensate, cu o forma sferica de mai mari dimensiuni.
  - b.) suspensia celulara astfel cultivata este preluata si centrifugata si resuspendata in mediul P2 si insamantata pe alte placi cu collagen+laminina, perioada de cultivare in mediul P2 fiind de 6-7 zile.
  - c.) suspensia celulara astfel cultivata este preluata si centrifugata si resuspendata in mediul P3 si insamantata pe alte placi cu collagen+laminina, perioada de cultivare in mediul P3 fiind de 6-7 zile.
6. Metodă in vitro de obtinere concomitenta a progenitorilor hepatocitelor si celulelor beta pancreatice din celulele stem izolate din placenta umana, conform revendicării 5, **caracterizată prin aceea că, mediul P1** este compus din high glucose-DMEM /MCDB201 (cantitatea finala de glucoza 6,5g/l) , 1%BSA, 1% Supliment N1, 0,5% B27, 10ng/ml EGF, 10 ng/ml bFGF, HGF (4 ng/ml), heparina, 1% ITS, 1% Glutamina, 1% penicilina-streptomicina, 1% acizi neesentiali, iar mediul P2 este compus din low glucose DMEM /MCDB 201( concentratie de glucoza de 1g/l) , 10%FCS, 10mM nicotinamida, 1% Glutamina, 1% penicilina-streptomicina, 1% acizi neesentiali, mediul P3 fiind alcătuit din low glucose DMEM/MCDB201(gluc 1g/l), 10%FCS, 10mM exendin 4, 1% Glutamina, 1% penicilina-streptomicina, 1% acizi neesentiali. La sfarsitul celor 6-7 zile se adauga in mediu glucagon si TGF β.

7. Metodă in vitro de obtinere concomitenta a progenitorilor hepatocitari si pancreatici din celulele stem izolate din placenta umana, conform revendicărilor 3 și 5, **caracterizată prin aceea că**, mediul *Colagen* constă într-o solutie de colagen de tip IV, la o concentratie finala de 15μg/ml, solutia finala pentru colagen este plasata in placi Petri cu diametrul de 6 cm, cu 6 godeuri, cate 1ml/godeu si lasate timp de 1 ora in nisa cu flux laminar, surplusul de solutie se arunca, ramanand doar o lama fina de lichid pe fundul placii, după care placile sunt lasate sa se usuce, iar apoi se sterilizeaza la etilenoxid.

8. Metodă in vitro de obtinere concomitenta a progenitorilor hepatocitari si pancreatici din celulele stem izolate din placenta umana, conform revendicărilor 3 și 5, **caracterizată prin aceea că**, *Laminina* consta într-o solutie stock de 1 mg/ml pastrata la -20°C și apoi dezghețată la 2-8 °C, care se diluează în PBS, aducandu-se la o solutie de 100μg/ml, cantitatea de solutie necesara pentru fiecare suprafata se calculeaza astfel ca la final concentratia sa fie de 2 μg/cm<sup>2</sup>, placile acoperite cu colagen sterilizate se incubeaza 2 ore la 37 °C, apoi se spala de două ori cu PBS si se pregatesc pentru insamantarea cu celule.