



УКРАЇНА

(19) UA (11) 40805 (13) U
(51) МПК (2009)
A61K 35/28

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПРИЖИТТЄВОГО ОТРИМАННЯ СТРОМАЛЬНИХ СТОVBУРОВИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ТВАРИН

1

2

(21) u200813659

(22) 26.11.2008

(24) 27.04.2009

(46) 27.04.2009, Бюл.№ 8, 2009 р.

(72) МАЗУРКЕВИЧ АНАТОЛІЙ ЙОСИПОВИЧ, UA,
МАЛЮК МИКОЛА ОЛЕКСІЙОВИЧ, UA, ТКАЧЕНКО
СЕРГІЙ МИХАЙЛОВИЧ, UA, КОВПАК ВІТАЛІЙ
ВАСИЛЬОВИЧ, UA

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУР-
СІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ, UA

(57) Спосіб прижиттєвого отримання стромальних
стовбурових клітин кісткового мозку тварин, що

включає операційну аспірацію, який відрізняється
тим, що аспірацію кісткового мозку проводять че-
рез отвір стегнової кістки за допомогою катетера і
шприца, після чого проводять відмивання жовтого
кісткового мозку від червоного у чашці Петрі, за
допомогою фосфатно-буферного розчину без Ca і
Mg, причому жовтий кістковий мозок піддають хо-
лодній трипсинізації, а осад клітин суспендують в
стандартному поживному середовищі із 5 % вмі-
стом ембріональної сироватки теляти та додаван-
ням пеніциліну та стрептоміцину по 100 ОД/мл
кожного.

Корисна модель відноситься до ветеринарної
медицини, зокрема до експериментальної клітин-
ної біології, і може бути використана для клітинної
терапії.

Сучасний стан розвитку медико-біологічних
наук характеризується пошуком нових методів
лікування патологічних станів, які зводили б до
мінімуму екзогенні втручання та ґрунтувались на
відновленні внутрішніх ресурсів організму. Одним
із таких методів є застосування стовбурових клітин
з позитивним ефектом на дослідних тварин при
лікуванні гострої печінкової недостатності, цирозу,
різноманітних міодистрофій, уражень шкіри, м'язів,
слизової оболонки, хрящів, очей, проблематичних
переломів та дефектів кісткової тканини тощо [див.
Е.Б. Владимирская, О.А. Майорова, С.А. Румянцев,
А.Г. Румянцев. Биологические основы и пер-
спективы терапии стволовыми клетками. Медпрак-
тика. - Москва, 2005. - С. 391]. При цьому
отримання мультипотентних стовбурових клітин
дорослого організму для подальшого культиву-
вання in vitro проводилось із значною травматиза-
цією тварин.

Відомий спосіб отримання мультипотентних
стромальних (мезенхімальних) стовбурових клітин
тваринного організму [див. Н.С. Николаенко, Н.В.
Цупкина, Г.П. Пинаев и др. Выделение и культи-
вирование стромальных клеток костного мозга с
целью их дальнейшего использования в лечении
дефектов костной ткани // Трансплантология. -
2003. - Том 4, №1. - С. 169-171], який обрано за
прототип. Згідно відомого способу кістковий мозок

виділяли із тазових кінцівок дорослих кроликів.
Кістки видаляли під кетаміновим наркозом (1мг на
1кг), промивали в поживному середовищі з гента-
міцином, розтинали, старанно вискоблювали ска-
льпелем і вимивали кістковий мозок за допомогою
поживного середовища. Отриману таким чином
суспензію агрегатів клітин осаджували центрифугу-
ванням.

Недоліком відомого способу є оперативно-
травматичне пошкодження у вигляді видалення
задніх кінцівок. Цей метод можна використовувати
у ветеринарній медицині під час алогенної та ге-
терогенної клітинної трансплантації тільки з експе-
риментальною метою. Але застосування відомого
способу не доцільне, з метою клітинної терапії, на
дрібних та продуктивних тваринах у зв'язку із над-
то великою травматизацією тварин, особливо це
стосується аутогенної клітинної трансплантації.

Корисною моделлю ставиться завдання роз-
робити спосіб, в якому буде зменшено рівень тра-
вматизації тварин за умов прижиттєвого отриман-
ня стромальних стовбурових клітин дорослого
організму. Який буде доступним, простим у вико-
нанні, і забезпечить через невеликий проміжок
часу культивування, утворення моношару гетеро-
генних стовбурових клітин.

Поставлено корисною моделлю завдання до-
сягається тим, що кістковий мозок отримують че-
рез отвір у стегновій кістці, який виконаний хірургі-
чним свердлом. При цьому кістковий мозок
отримують за допомогою катетера і шприца, до-
тримуючись правил асептики і антисептики. Після

UA (19) 40805 (13) U

чого в стерильному боксі у чашках Петрі проводять відмивання жовтого кісткового мозку від червоного за допомогою фосфатно-буферного розчину (Gibco) без Ca і Mg. Процедуру здійснюють три рази, після чого жовтий кістковий мозок піддають ферментативній дисоціації за допомогою холодної трипсинізації. Осадок клітин суспендують в стандартному поживному середовищі із 5% вмістом ембріональної сироватки теляти, та додаванням пеніциліну та стрептоміцину по 100ОД/мл кожного.

Приклад здійснення способу.

Під час проведення оперативного втручання на кроликах використовували загальну анестезію (ксілазін-кетаміновий) наркоз в дозі 1мл на 10кг живої маси тварини. Місцеву анестезію проводили 0,5% новокаїном. Обробляли оперативне поле 5% йодом. Розтин робили в області дистально-латеральної ділянки стегна. При цьому, пошарово розтинали шкіру, підшкірну клітковину та напружувач широкої фасції, а головку двухголового та чотирьохголового м'язу розшаровували тупим методом до кістки.

Отвір у компактній кістці робили за допомогою хірургічного свердла, яке відповідало діаметру кістково-мозкового каналу. Отвір робили під кутом 45° по відношенню до кістки для полегшення вве-

дення катетеру (венозний катетер відповідного діаметру). При цьому, катетер із голкою вводили у кістково-мозковий канал на незначну глибину, після чого голку виймали і за допомогою шприца з антикоагулянтом (гепарином) аспірували вміст кістково-мозкового каналу стегнової кістки, при чому рухали катетер в проксимальному напрямку на всю довжину кістково-мозкового каналу. Відмивання жовтого кісткового мозку від червоного проводили у чашках Петрі за допомогою фосфатно-буферного розчину без Ca і Mg. Процедуру здійснювали три рази.

Після чого жовтий кістковий мозок піддавали ферментативній дисоціації за допомогою холодної трипсинізації. Суміш клітин суспендували в стандартному поживному середовищі із 5% вмістом ембріональної сироватки теляти із додаванням пеніциліну та стрептоміцину по 100ОД/мл кожного. При цьому мезенхімальні клітини осідали, прикріплювались і розпластувались на поверхні скляних чашок Петрі або культуральних флаконів.

Таким чином, аспірацію кісткового мозку, з метою отримання стромальних стовбурових клітин, проводять через отвір стегнової кістки за допомогою катетера і шприца, з мінімальною травматизацією для тварин.