



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **46600** (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 ОТРИМАННЯ ФРАКЦІЇ МОНОНУКЛЕАРНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ КРОЛІВ ІЗ ВИСОКОЮ ПРОЛІФЕРАТИВНОЮ АКТИВНІСТЮ

1

2

(21) u200907829

(22) 24.07.2009

(24) 25.12.2009

(46) 25.12.2009, Бюл.№ 24, 2009 р.

(72) МАЗУРКЕВИЧ АНАТОЛІЙ ЙОСИПОВИЧ, МА-
ЛЮК МИКОЛА ОЛЕКСІЙОВИЧ, КОВПАК ВІТАЛІЙ
ВАСИЛЬОВИЧ, ХАРКЕВИЧ ЮРІЙ ОЛЕКСАНДРО-
ВИЧ, СУШКО МИКОЛА ІВАНОВИЧ

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУР-
СІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

(57) Спосіб отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку кролів із високою проліферативною активністю, що включає отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку, який **відрізняється** тим, що проводять попередню 12-годинну холодну трипсинізацію аспірату кісткового мозку, а центрифугування здійснюють у градієнті щільності 1,072 та відцентровій силі 300 g.

Корисна модель відноситься до біотехнології та клітинної інженерії і може бути використана для збагачення популяції клітин кісткового мозку кроля моноклеарами з високою проліферативною активністю (до яких відносяться мезенхімальні стовбурові клітини (МСК)).

За певних умов МСК здатні диференціюватися в різноманітні типи клітин мезенхімальної та ектодермальної тканин, що експериментально доведено багатьма дослідниками in vivo та in vitro [Yuehua Jiang, Balkrishna N. Jahagirdar, R. Lee Reinhardt et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature (2002) 418: 41-49].

Моноклеарна фракція складає незначну кількість від усіх клітин кісткового мозку та включає макрофаги, ендотеліальні клітини, лімфоцити, адипоцити. І лише 0,001-0,01 відсотки від моноклеарів складає МСК [Koc O.N. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patient with lysosomal and peroxisomal storage diseases /O.N. Koc, C. Peters, P. Aubourg et al. //Exp. Hematol.-1999.- №127.-P.1675-1681]. Висока проліферативна активність МСК є відмінною ознакою від решти типів клітин.

Відомий спосіб отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку людини, збагаченої мезенхімальними стовбуровими клітинами [див. Isolation of mononuclear cells from human bone marrow aspirates by density gradient centrifugation. Який обрано за прототип. http://www.miltenyibiotec.com/download/protocols_sample_preparation_en/1394/SP_MC_BM_density_gradient.pdf].

Проте, при апробуванні даної методики на кролях, не було отримано очікуваного результату.

Метою корисної моделі є розробка способу отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку кроля, збагаченої популяцією МСК, який може бути використаний для напрацювання біологічного матеріалу з метою подальшого його застосування при вивченні впливу МСК на регенеративні процеси в тваринному організмі.

Поставлене завдання досягається тим, що у способі отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку кролів із високою проліферативною активністю, що включає отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку, згідно корисної моделі, проводять попередню 12-годинну холодну трипсинізацію аспірату кісткового мозку, а центрифугування здійснюють у градієнті щільності 1,072 та відцентровій силі 300g.

Запропонований спосіб дає змогу: відділити моноклеарні клітини від еритроцитів; отримати фракцію моноклеарних клітин з високою проліферативною активністю.

Запропонований нами спосіб полягає в отриманні аспірату кісткового мозку. Після чого в умовах стерильного боксу потрібно відмити в фосфатно-буферному розчині жовтий кістковий мозок від червоного. Жовтий кістковий мозок перенести в пробірку об'ємом 15 см³ та поставити на 12-годинну холодну трипсинізацію (температура 2-4°C) в 0,25% р-ні трипсину у співвідношенні 1:3. Потім необхідно трипсинізований жовтий кістковий мозок розпіпетувати та профільтрувати через 2

(13) **U**
(11) **46600**
(19) **UA**

шари стерильної марлевої серветки для видалення клітинних агрегатів. Отриману суспензію клітин відцентрифугувати при 300g протягом 5 хв. Злити надосадову рідину (розчин трипсину), до осаду клітин додати 1 мл фосфатно-буферного розчину, клітини розпіпетувати.

До суспензії отриманих клітин додати фосфатно-буферний розчин або середовище для культивування клітин у співвідношенні 7:1 (6 см³ фосфатно-буферного розчину чи культурального середовища + 1 см³ суспензії клітин). Потім обережно нашарувати 7 см³ розведеної суспензії клітин на розчин фіколу ($\rho = 1,072$) об'ємом 2 см³, попередньо внесеного в стерильну центрифужну пробірку об'ємом 15 см³. Відцентрифугувати при 300g протягом 25 хв. Після центрифугування зняти верхній шар надосадової рідини, не порушуючи цілісності розташованого нижче шару мононуклеарних клітин. Обережно перенести шар мононуклеарних клітин в нову стерильну пробірку, додавши

до нього 10 см³ фосфатно-буферного розчину. Клітини розпіпетувати та відцентрифугувати при 300 g протягом 5 хв. Для подальшого застосування ресуспензувати осад клітин у відповідній кількості поживного середовища.

При проведенні досліду, було апробовано градієнти щільності 1,080; 1,078; 1,076; 1,074; 1,072; 1,070; 1,068, при різній відцентровій силі центрифугування (300g; 1200g).

Фракції мононуклеарних клітин, отриманих при різних параметрах центрифугування, культивували у живильному середовищі (DMEM - 80 %, ембріональна сироватка теляти - 20%). Оцінку результату досліду здійснювали через 9 діб культивування на основі проліферативної активності отриманих фракцій клітин. Параметри центрифугування з градієнтом щільності 1,072 та відцентровою силою 300g забезпечують отримання фракції клітин з найвищою проліферативною активністю.