



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **47783** (13) **U**  
(51) МПК (2009)  
A61K 35/28МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ**ОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під  
відповідальність  
власника  
патенту**(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ФРАКЦІЇ МОНОНУКЛЕАРНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ КОТІВ ІЗ ВИСОКОЮ ПРОЛІФЕРАТИВНОЮ АКТИВНІСТЮ**

1

2

(21) u200908607

(22) 14.08.2009

(24) 25.02.2010

(46) 25.02.2010, Бюл.№ 4, 2010 р.

(72) МАЗУРКЕВИЧ АНАТОЛІЙ ЙОСИПОВИЧ, МА-  
ЛЮК МИКОЛА ОЛЕКСІЙОВИЧ, КОВПАК ВІТАЛІЙ  
ВАСИЛЬОВИЧ, ДАНИЛОВ ВАСИЛЬ БЕНЕДИКТО-  
ВИЧ, ХАРКЕВИЧ ЮРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУР-  
СІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ(57) Спосіб отримання фракції мононуклеарних  
клітин кісткового мозку котів із високою проліфера-

тивною активністю, що включає отримання аспіра-  
ту кісткового мозку, розбавлення його у фосфатно-  
буферному розчині, центрифугування у градієнті  
щільності та відмивання отриманих мононуклеар-  
них клітин, який **відрізняється** тим, що проводять  
12-годинну холодну трипсинізацію аспірату кістко-  
вого мозку kota, розбавляють його у фосфатно-  
буферному розчині у співвідношенні 1:7 та здійс-  
нюють центрифугування у градієнті щільності  
 $q=0,078$  і відцентровій силі 300g.

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

За певних умов МСК здатні диференціюватися в різноманітні типи клітин мезенхімальної та екто-дермальної тканин, що експериментально дове-дено багатьма дослідниками *in vivo* та *in vitro* [див. Yuehua Jiang, Balkrishna N. Jahagirdar, R. Lee Reinhardt et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature (2002) 418: 41-49]. Мононуклеарна фракція складає незначну кількість від усіх клітин кісткового мозку та включає макрофаги, ендотеліальні клітини, лімфоцити, адипоцити. І лише 0,001-0,01% від мононуклеарів складає МСК [див. Кос O.N. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite succesful 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 мононуклеарних клітин кісткового мозку людини, збагаченої мезенхімальними стовбуровими клітинами, який включає отримання аспірату кісткового мозку, його розбавлення у фосфатно-буферному розчині у

співвідношенні 1:4 та центрифугування у градієнті щільності  $q=0,073$  при відцентровій силі центрифугування 950g. [див. Чупикова Н.И. Получение и биологическая характеристика мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека и создание на их основе костных структур. Дис. канд. биол. наук. - Москва, 2007. - 133с.].

Проте, при апробуванні даної методики на ко-тах, не було отримано очікуваного результату.

Метою корисної моделі є розробка способу отримання фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку котів, збагаченої популяцією МСК, який може бути використаний для напрацювання біологічного матеріалу з метою подальшого його засто-сування при корекції репаративних процесів в тва-ринному організмі.

Поставлене завдання досягається тим, що у способі отримання фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку котів із високою проліферативною активністю включає отримання аспірату кісткового мозку, розбавлення його у фосфатно-буферному розчині, центрифугування у градієнті щільності та відмивання отриманих мононуклеарних клітин, згідно корисної моделі, проводять 12-годинну хо-лодну трипсинізацію аспірату кісткового мозку ко-та, розбавляють його у фосфатно-буферному роз-чині у співвідношенні 1:7 та здійснюють центрифугування у градієнті щільності  $q=0,078$  і відцентровій силі 300g.

(13) **U**(11) **47783**(19) **UA**

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

Запропонований 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  $15\text{см}^3$  та поставити на 12-годинну холодну трипсинізацію (температура  $2-4^\circ\text{C}$ ) в  $0,25\%$  р-ні трипсину у співвідношенні 1:3. Потім необхідно трипсинізований жовтий кістковий мозок розпіпетувати та профільтрувати через 2 шари стерильної марлевої серветки для видалення клітинних агрегатів. Отриману суспензію клітин відцентрифугувати при  $300g$  протягом 5хв. Злити надосадову рідину (розчин трипсину), до осаду клітин додати  $1\text{см}^3$  фосфатно-буферного розчину, клітини розпіпетувати.

До суспензії отриманих клітин додати фосфатно-буферний розчин або середовище для культивування клітин у співвідношенні 7:1 ( $6\text{см}^3$  фосфатно-буферного розчину чи культурального середовища +  $1\text{см}^3$  суспензії клітин). Потім обережно нашарувати  $7\text{см}^3$  розведеної суспензії клітин на розчин фіколу ( $\rho=1,078$ ) об'ємом  $2\text{см}^3$ , попере-

дньо внесеного в стерильну центрифужну пробірку об'ємом  $15\text{см}^3$ . Відцентрифугувати при  $300g$  протягом 25хв. Після центрифугування зняти верхній шар надосадової рідини, не порушуючи цілісності розташованого нижче шару моноклеарних клітин. Обережно перенести шар моноклеарних клітин в нову стерильну пробірку, додавши до нього  $10\text{см}^3$  фосфатно-буферного розчину. Клітини розпіпетувати та відцентрифугувати при  $300g$  протягом 5хв. Для подальшого застосування ресуспендувати осад клітин у відповідній кількості поживного середовища.

При проведенні досліду, було апробовано градієнти щільності  $q=0,078$ ;  $q=0,076$ ;  $q=1,074$ ;  $q=0,072$ ;  $q=0,070$ ) при різній відцентровій силі центрифугування ( $300g$ ;  $1200g$ ).

Фракції моноклеарних клітин, отриманих при різних параметрах центрифугування, культивували у живильному середовищі (DMEM - 80%, ембріональна сироватка теляти - 20%). Оцінку результату досліду здійснювали через 12 діб культивування на основі проліферативної активності отриманих фракцій клітин. Параметри центрифугування з градієнтом щільності  $q=0,078$  та відцентровою силою  $300g$  забезпечують отримання фракції клітин з найвищою проліферативною активністю.