



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **49229** (13) **U**
(51) МПК (2009)
A61K 35/28МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ СТВОРЕННЯ БІОЛОГІЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТУ НА ОСНОВІ ІНДУКОВАНИХ В ОСТЕОГЕННОМУ НАПРЯМКУ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОVBУРОВИХ КЛІТИН СОБАК IN VITRO**

1

2

(21) u200910454

(22) 15.10.2009

(24) 26.04.2010

(46) 26.04.2010, Бюл.№ 8, 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 біологічного трансплантату
на основі індукованих в остеогенному напрямку
мезенхімальних стовбурових клітин собак in vitro,

що включає попередню індукцію направленої диференціації Мезенхімально стовбурових клітини (МСК) в остеогенному напрямку за допомогою DMEM з додаванням 50мкг/см³ аскорбінової кислоти, β-гліцерофосфату та подальшу іммобілізацію клітин в біологічному матриксі, який **відрізняється** тим, що для індукції направленої диференціації Мезенхімально стовбурових клітини (МСК) до DMEM додають 5мМ β-гліцерофосфату, 10⁻⁸ М дексаметазону, а іммобілізацію клітин здійснюють в 14%-му желатиновому матриксі.

Корисна модель відноситься до біотехнології та клітинної інженерії і може бути використана як метод культивування клітин з використанням бюсумісного носія та для створення in vitro 3-х мірно-організованої клітинної структури для дослідження репаративної здатності МСК собак.

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) при культивуванні в стандартних умовах in vitro активно проліферують, не вступаючи в стадію диференціювання. Тривала експозиція в культуральному середовищі з ембріональною сироваткою теляти провокує диференціювання МСК в комітовані попередники, нащадки яких проходять термінальне диференціювання. В системі in vitro вдається направити цей процес в задане русло. Так, в присутності дексаметазону, ІЗ-гліцерофосфату та аскорбінової кислоти мезенхімальні МСК здатні диференціюватися в остеобласти (Iraj Ragerdi Kashani, Arash Zaminy, Mohammad Barbarestani. In vitro osteogenesis of rat adipose-derived stem cells: comparison with bone marrow stem cells. Arch Med Sci 2009; 5, 2. pp.149-155).

Відомий спосіб індукції остеогенної диференціації МСК людини з їх подальшим використанням, в якому для диференціації здійснюють культивування МСК в середовищі Ігла модифікованому Дюльбеко (DMEM) з додаванням 10% ембріональної сироватки теляти, 10мМ В-гліцерофосфату, 50мкг/см³ аскорбінової кислоти а іммобілізацію

клітин здійснюють в "Matrigel™" або колагені (Yuan-di C. Halvorsen. Differentiation of adipose stromal cells into osteoblast and uses thereof. United States Patent Application Publication № US 2002/0119126 A1, Aug. 29.2002.).

Проте, при апробуванні даної методики на МСК собак було відмічено необхідність довготривалої індукції - 25-30 днів - до виявлення фенотипових змін (зміна морфології клітин, поява фокусів мінералізації). Крім цього, використання у якості іммобілізаційного матеріалу для МСК "Matrigel™" та колагену позначається високою вартістю досліджень.

Метою корисної моделі є розробка способу отримання біологічного трансплантату на основі індукованих в остеогенному напрямку МСК собак, що може бути використаний для проведення досліджень корекції репаративних процесів кісткової тканини тварин.

Поставлене завдання досягається тим, що у способі отримання біологічного трансплантату на основі індукованих в остеогенному напрямку мезенхімальних стовбурових клітин собак in vitro, що включає попередню індукцію направленої диференціації Мезенхімально стовбурових клітини (МСК) в остеогенному напрямку за допомогою DMEM з додаванням 50мкг/см³ аскорбінової кислоти, β-гліцерофосфату та подальшу іммобілізацію клітин в біологічному матриксі, згідно корисної

(13) **U**(11) **49229**(19) **UA**

моделі, для індукції направленої диференціації Мезенхімально стовбурових клітини (МСК) до DMEM додають 5мМ β -гліцерофосфату, 10^{-8} М дексаметазону, а іммобілізацію клітин здійснюють в 14%-му желатиновому матриксі.

Таким чином запропонований спосіб дає змогу: провести направлену диференціацію *in vitro* МСК собак в остеогенному напрямку та здійснити іммобілізацію Індукованих в остеогенному напрямку МСК собак у біологічний матрикс.

Спосіб отримання біологічного трансплантату на основі індукованих в остеогенному напрямку мезенхімальних стовбурових клітин собак *in vitro*, полягає в культивуванні МСК кісткового мозку собак при посадковій концентрації 10тис. клітин на cm^2 культурального посуду в DMEM, доповненому 15%-ми ембріональної сироватки теляти, 10мкл/ cm^3 антибіотика-антимікотика (вміст $\text{CO}_2=5\%$, $t=37^\circ\text{C}$). Через 24 год. після постановки на культивування необхідно замінити культуральне середовище на індукційне: DMEM (вміст глюкози 4,5гр/л), в яке додавали 10%-ів ембріональної сироватки теляти, 50мкг/ cm^3 аскорбінової кислоти, 5мМ β -гліцерофосфату, 10^{-8} М дексаметазону та антибіотик для пригнічення розвитку мікрофлори. Заміну індукційного середовища здійснювати кожних три дні. На 14-20 день культивування повинна відбутись зміна морфології клітин. Гістохімічним аналізом за допомогою барвника алізаринового

червоного можна підтвердити позаклітинне відкладення солей кальцію.

За допомогою розчину трипсин/ЕДТА (0,5/0,2%) зняти клітинний моношар. Суспензію клітин розпіпетувати, перенести в центрифужну пробірку та відцентрифугувати при 300g протягом 5хв. Злити надосадову рідину, а до клітинного осаду додати культуральне середовище (DMEM, доповнене 15%-ми ембріональної сироватки теляти, 10мкл/ cm^3 антибіотика-антимікотика) в об'ємі 1cm^3 . Здійснити підрахунок клітин в камері Горяєва. Вмістиме пробірки повторно відцентрифугувати при 300g протягом 5хв., злити надосадову рідину.

Іммобілізацію клітин здійснити з допомогою 14%-го желатинового матриксу, який готують наступним чином: до культурального середовища об'ємом 10cm^3 (DMEM, доповнене 15%-ми ембріональної сироватки теляти та антибіотиком) поступово внести 1,4г желатину (gelatin from bovine skin, type B), розмішуючи при цьому на магнітній мішалці ($t=35-40^\circ\text{C}$) до повного розчинення гранул желатину. Приготовлену суспензію профільтрувати через нітроцелюлозний фільтр з діаметром пор 0,22мкм.

До клітинного осаду додати желатиновий матрикс ($t=35-38^\circ\text{C}$) з розрахунку 1cm^3 матриксу на 4млн. клітин, та розпіпетувати до утворення однорідної суспензії.