



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **50905** (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 СОБАК ІЗ ВИСОКОЮ ПРОЛІФЕРАТИВНОЮ АКТИВНІСТЮ

1

2

(21) u200913880

(22) 29.12.2009

(24) 25.06.2010

(46) 25.06.2010, Бюл.№ 12, 2010 р.

(72) МАЗУРКЕВИЧ АНАТОЛІЙ ЙОСИПОВИЧ, МАЛЮК МИКОЛА ОЛЕКСІЙОВИЧ, КОВПАК ВІТАЛІЙ ВАСИЛЬОВИЧ, ХАРКЕВИЧ ЮРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ, СУШКО МИКОЛА ІВАНОВИЧ

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

(57) Спосіб отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку собак із високою проліфе-

ративною активністю, що включає отримання аспірату кісткового мозку, розбавлення його у фосфатно-буферному розчині, центрифугування у градієнті щільності та відмивання отриманих моноклеарних клітин, який **відрізняється** тим, що проводять 12-годинну холодну трипсинізацію аспірату кісткового мозку собак, розбавляють його у фосфатно-буферному розчині у співвідношенні 1:7 та здійснюють центрифугування у градієнті щільності 1,074 і відцентровій силі 1200 g.

Корисна модель відноситься до біотехнології та клітинної інженерії і може бути використана для збагачення популяції клітин кісткового мозку собак 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 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 моноклеарних 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 1,073 при відцентровій силі центрифугування 950g (див. Н.И. Чупикова. 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 кістковому мозку собак, отримувана нами фракція клітин не володіла високою проліферативною активністю.

Завданням корисної моделі є розробка способу отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку собак, збагаченої популяцією МСК, який може бути використаний для напрацювання біологічного матеріалу з метою подальшого його застосування при корекції репаративних процесів в тваринному організмі.

Поставлене завдання досягається тим, що у способі отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку собак із високою проліферативною активністю, що включає отримання аспірату кісткового мозку, розбавлення його у фосфатно-буферному розчині, центрифугування у градієнті щільності та відмивання отриманих моноклеарних клітин, згідно корисної моделі, проводять 12-годинну холодну трипсинізацію аспірату кісткового мозку собак, розбавляють його у фосфатно-буферному розчині у співвідношенні 1:7 та здійс-

(13) **U**
(11) **50905**
(19) **UA**

нюється центрифугування у градієнті щільності 1,074 і відцентровій силі 1200g.

Отже, згідно запропонованого способу можна відділити моноклеарні клітини від еритроцитів; отримати фракцію моноклеарних клітин з високою проліферативною активністю; отримати аспірат кісткового мозку.

Спосіб здійснюють наступним чином: в умовах стерильного боксу потрібно відмити в фосфатно-буферному розчині жовтий кістковий мозок від червоного. Жовтий кістковий мозок перенести в пробірку об'ємом 15см³ 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 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 1см³ фосфатно-буферного розчину, клітини розпіпетувати.

До суспензії отриманих клітин додати фосфатно-буферний розчин або середовище для культивування клітин у співвідношенні 7:1 (6см³ фосфатно-буферного розчину чи культурального середовища +1см³ суспензії клітин). Потім обережно нашарувати 7см³ розведеної суспензії клітин на розчин фіколу з градієнтом щільності 1,074 та об'ємом 2см³, попередньо внесеного в стерильну центрифужну пробірку об'ємом 15см³. Відцентрифугувати при 1200g протягом 25хв. Після центри-

фугування зняти верхній шар над осадовою рідиною, не порушуючи цілісності розташованого нижче шару моноклеарних клітин. Обережно перенести шар моноклеарних клітин в нову стерильну пробірку, додавши до нього 10см³ фосфатно-буферного розчину. Клітини розпіпетувати та відцентрифугувати при 300g протягом 5хв. Для подальшого застосування ресуспензувати осад клітин у відповідній кількості поживного середовища.

При проведенні досліду, було апробовано градієнти щільності (1,078; 1,076; 1,074; 1,072; 1,070) 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 1,074 та відцентровою силою 1200g забезпечують отримання фракції клітин з найвищою проліферативною активністю.

Таким чином, розроблено спосіб отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку собак, збагаченої популяцією МСК, який може бути використаний для напрацювання біологічного матеріалу з метою подальшого його застосування при корекції репаративних процесів в тваринному організмі.