



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **104927** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
A61B 17/88 (2006.01)
A61P 19/00
A61K 35/12 (2015.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 08531	(72) Винахідник(и): Кирик Віталій Михайлович (UA), Клименко Павло Павлович (UA), Устименко Аліна Миколаївна (UA), Луценко Тамара Миколаївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 02.09.2015	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.02.2016	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.02.2016, Бюл.№ 4	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕНЕТИЧНОЇ ТА РЕГЕНЕРАТИВНОЇ МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", вул. Вишгородська, 67, м. Київ, 03150 (UA)

(54) СПОСІБ ВІДНОВЛЕННЯ ПОШКОДЖЕНОЇ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ У ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН

(57) Реферат:

Спосіб відновлення пошкодженої кісткової тканини у лабораторних тварин включає трансплантацію в ділянку дефекту кістки об'ємних носіїв з диференційованими в остеогенному напрямку мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами. При цьому клітини трансплантують у вигляді об'ємних трансплантатів культури мікромаси мезенхімальних стромальних клітин підшкірної жирової клітковини, попередньо направлено диференційованої in vitro в остеогенному напрямку, діаметром відповідно розміру змодельованого дефекту кістки.

UA 104927 U

Корисна модель належить до експериментальної медицини, зокрема до галузі клітинних та тканинних технологій, і може використовуватись для відновлення пошкодженої кісткової тканини у мишей для подальшої розробки нових методів лікування пошкоджень кісткової тканини у людини.

Розробка нових ефективних методів лікування патології опорно-рухового апарату є актуальною задачею сучасної медицини. Новітні біотехнологічні підходи включають застосування стовбурових клітин для прискорення регенерації різних тканин організму, в тому числі і кісткової, та базуються на експериментальних дослідженнях на лабораторних тваринах. Однак, в експерименті виникає проблема при виборі типу клітин та способу їх трансплантації для зменшення строків відновлення та отримання максимального ефекту регенерації.

За останні роки в Україні методи клітинної терапії пошкоджень кісток активно розроблялись в Інституті невідкладної та відновної хірургії ім. В.К. Гусака НАМН України, Інституті травматології та ортопедії НАМН України та деяких приватних лабораторіях. Для регенерації пошкоджень кісткової тканини за допомогою стовбурових клітин в експерименті та клініці застосовують кілька підходів.

Зокрема, відомі способи застосування комбінації різних типів клітин, наприклад метод регенерації кісткової тканини з використанням культур мезенхімальних стовбурових та епітеліальних клітин [20070160584A1 US, МПК А61К 35/32; А61Л 27/38; С12Н 5/077; С12Н 5/0775. Method of bone regeneration / Ueda, Minoru (JP) Ando, Yusuke (JP) Ohara, Takayuki (JP) Kagami, Hideaki (JP); заявник та власник патенту Minoru Ueda (JP), Yusuke Ando (JP), Takayuki Ohara (JP), Hideaki Kagami (JP). - № 10/567926; заявл. 08/10/2004; опубл. 07/12/2007 <http://www.freepatentsonline.com>]. Однак, цей спосіб включає використання мезенхімальних стовбурових клітин та епітеліальних клітин з пульпи зуба, що є малодоступним джерелом, і потребує використання носіїв для клітин.

Відомий спосіб стимуляції репаративної регенерації кісткової тканини при пародонтиті [Пат. 19148U Україна, МПК (2006.01) А61Н 2/00. Спосіб стимуляції репаративної регенерації кісткової тканини при пародонтиті / Яриніч-Бучинська Наталія Петрівна (UA); Скрипніков Петро Миколайович (UA); Богашова Лідія Яківна (UA); Боброва Нелля Олександрівна (UA); Кайдашев Ігор Петрович (UA); заявник та власник патенту Яриніч-Бучинська Наталія Петрівна (UA); Скрипніков Петро Миколайович (UA); Богашова Лідія Яківна (UA); Боброва Нелля Олександрівна (UA); Кайдашев Ігор Петрович (UA). № u200602926; заявл. 20.03.2006; опубл. 15.12.2006, бюл. № 12, <http://base.uipv.org>], але він потребує використання як остеопластичного матеріалу гранул коллапану з попередньо нанесеними на них мезенхімальними стовбуровими клітинами крові та призначення в післяопераційному періоді антибіотиків.

Також відомий спосіб застосування ін'єкції клітин в гелі для лікування пошкоджень кісток [Пат. CN102232970A US, МПК А61К 35/28, А61Р 19/08. Cell injection for treating bone injury and preparation method thereof / Yunhai Dong (CN); заявник та власник патенту Yunhai Dong (CN). - № CN20101152461; заявл. 22/04/2010; опубл. 09/11/2011 <http://www.worldwide.espacenet.com>]. Недоліками даного способу є необхідність отримання клітин з кісткового мозку; потреба в спеціальному термочутливому гелі та додатковому виділенні з крові трофічних факторів, що ускладнює процедуру.

Як найближчий аналог авторами взятий спосіб регенерації кістки за допомогою мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин [Пат. 2311471 (A2) EP, МПК А61F 2/28; А61К 35/12; А61К 35/28; А61К 38/18; А61Л 27/00; А61Л 27/12; А61Л 27/20; А61Л 27/38; А61Л 27/58; С12М 1/00; С12Н 5/00; С12Н 5/071; С12Н 5/077; С12Н 5/0775; А61F 2/00. Regeneration and augmentation of bone using mesenchymal stem cells / Kadiyala Sudha (US), Bruder Scott (US), Muschler George (US); заявник та власник патенту Osiris Therapeutics Inc (US). - № EP20100011227; заявл. 17.04.1997; опубл. 20.04.2011 <http://worldwide.espacenet.com>], який включає трансплантацію в ділянку дефекту об'ємних носіїв стовбурових клітин, які містять фактори остеогенного диференціювання (BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6 та BMP-7). Проте, він має недоліки: необхідність отримання клітин з кісткового мозку, що є травматичною процедурою, яка несе багато ризиків; необхідність використання синтетичних компонентів носіїв, які можуть викликати реакції відторгнення; потреба в спеціальному обладнанні для приготування носіїв заданої форми; необхідність застосування високовартісних морфогенетичних білків як остеоіндуктивних факторів; тривалість відновлення кісткової тканини більше 4 тижнів.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити надійний та ефективний спосіб відновлення пошкодженої кісткової тканини у мишей, який би дозволив використовувати доступне і безпечне джерело стовбурових клітин, зменшити строки відновлення пошкодженої

кісткової тканини, не викликав потенційних ускладнень, не потребував високовартісних реагентів та обладнання.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі, який включає трансплантацію в ділянку дефекту кістки об'ємних носіїв з диференційованими в остеогенному напрямку мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами, згідно з корисною моделлю, клітини трансплантують у вигляді об'ємних трансплантатів культури мікромаси мезенхімальних стромальних клітин підшкірної жирової клітковини, попередньо направлено диференційованої *in vitro* в остеогенному напрямку, діаметром відповідно розміру змодельованого дефекту кістки.

Технічний результат, який досягається при застосуванні даного способу, полягає в тому, що завдяки використанню об'ємної культури мікромаси мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин підшкірної жирової клітковини можна заповнити дефект кісткової тканини різної форми. Культивування клітин перед трансплантацією в об'ємній культурі під дією факторів остеогенного диференціювання забезпечує контактну взаємодію клітин та продукцію ними екстрацелюлярного матриксу, що сприяє формуванню нової кісткової тканини. Підшкірна жирова клітковина є доступним і безпечним джерелом мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин. При застосуванні даного способу не використовуються синтетичні та ксеногенні трансплантати, а тому ризик реакцій відторгнення є меншим. При даному способі зменшується час лікування та кількість витратних матеріалів.

Спосіб здійснюють наступним чином.

Під загальною анестезією після обробки операційного поля за допомогою хірургічних інструментів проводять розріз шкіри в середній третині стегна миші і розводять передню та медіальну групи м'язів для оголення змодельованого раніше дефекту стегової кістки діаметром 1 мм глибиною до ендосту.

Клітинний препарат культури мікромаси мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин підшкірної жирової клітковини мишей, направлено диференційованих в остеогенному напрямку, отримують за методикою, описаною для культури клітин кісткового мозку [Кучук О.В., Цупиков О.М., Кирик В.М. Культивирование и направленная остеогенная дифференцировка мультипотентных стромальных клеток костного мозга в культуре микромассы // Проблемы остеологии. - 2010. - Т. 13, № 4. - С. 36-41].

Отриманий трансплантат культури мікромаси діаметром до 1 мм, відповідно до діаметра змодельованого дефекту кістки, трансплантують в ділянку дефекту. Кістку прикривають м'язами і розріз шкіри ушивають П-подібним швом.

Приклад.

Самцям мишей лінії FVB віком 4 міс. було змодельовано пошкодження стегових кісток та через 24 години на праву кістку проведено трансплантацію культури мікромаси мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин підшкірної жирової клітковини за даним способом. Пошкодження лівої стегової кістки слугувало контролем природної регенерації тканини.

Тварини підлягали евтаназії через 3 тижні від початку експерименту. Вирізали стегові кістки і проводили гістологічне дослідження зони пошкодження.

При макроскопічному дослідженні через 21 добу після трансплантації клітин змодельований дефект стегової кістки був заповнений щільною тканиною, в той час як в контрольних препаратах без застосування клітин розміри дефекту на 80 % відповідали початковим, як по діаметру, так і по глибині пошкодження.

При гістологічному дослідженні ділянок пошкоджень стегових кісток в зоні трансплантації культури мікромаси виявлено формування грануляційної тканини із наступним заміщенням дефектів новоутвореною кістковою тканиною з потовщенням окістя та компактною речовини кістки, подібно до кісткового мозоля при регенерації переломів.

Показано, що об'ємні трансплантати культури мікромаси мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин підшкірної жирової клітковини, направлені диференційовано в остеогенному напрямку, сприяють регенерації пошкодженої кісткової тканини.

Таким чином, даний спосіб доступний дозволяє використовувати безпечне джерело стовбурових клітин, не потребує високовартісних реактивів та обладнання, забезпечує прискорення регенерації кісткової тканини і може використовуватись в експериментальній медицині.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб відновлення пошкодженої кісткової тканини у лабораторних тварин, який включає трансплантацію в ділянку дефекту кістки об'ємних носіїв з диференційованими в остеогенному

- напрямку мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами, який **відрізняється** тим, що клітини трансплантують у вигляді об'ємних трансплантатів культури мікромаси мезенхімальних стромальних клітин підшкірної жирової клітковини, попередньо направлено диференційованої *in vitro* в остеогенному напрямку, діаметром відповідно розміру змодельованого дефекту кістки.
- 5

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601