



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **150669**

(13) **U**

(51) МПК

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/48** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ"

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

|                                                                                              |                                                                                                                                                 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2021 05531</b>                                                | <b>(72)</b> Винахідник(и):<br><b>Амінов Руслан Флузович (UA),<br/>Фролов Олександр Кирилович (UA),<br/>Амінова Аліна Сергіївна (UA)</b>         |
| <b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>30.09.2021</b>                                           |                                                                                                                                                 |
| <b>(24)</b> Дата, з якої є чинними<br>права інтелектуальної<br>власності: <b>10.03.2022</b>  | <b>(73)</b> Володілець (володільці):<br><b>ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ<br/>УНІВЕРСИТЕТ,<br/>вул. Жуковського, 66, м. Запоріжжя, 69600<br/>(UA)</b> |
| <b>(46)</b> Публікація відомостей<br>про державну<br>реєстрацію: <b>09.03.2022, Бюл.№ 10</b> |                                                                                                                                                 |

**(54) СПОСІБ КОРОТКОЧАСНОГО ЗБЕРЕЖЕННЯ КІСТКОВОГО МОЗКУ**

**(57) Реферат:**

Спосіб короткочасного збереження кісткового мозку включає отримання кісткового мозку, згідно з корисною моделлю, поетапно охолоджують кістковий мозок або кістку до температури  $6\pm 2$  °C та зберігають їх при температурі  $6\pm 2$  °C протягом 2 год.

**UA 150669 U**

UA 150669 U

Корисна модель належить до кріобіології, експериментальної біології, ветеринарії та біотехнології і може бути використана для короткочасного збереження кісткового мозку.

Відомий спосіб збереження кісткового мозку [Пат. № 2722266 Росія, МПК А61К 35/32; А61F 2/28; А61L 27/54; А01N 1/02. Лиофилизированный биологический биodeградируемый минерализованный костнопластический материал и способ его изготовления / Божкова С.А., Тихилов Р.М., Лабутинов Д.В., Антипов А.П. / заявка № 2019129034. Заявл. 13.09.2019. Опубл. 28.05.2020], що включає одноразове заморожування і зберігання вилучених у ході операції головок стегнової кістки при температурі від -80 до -85 °С; механічну очистку з фракціонуванням та первинною експозицією в 3 % слабokonцентрованому розчині перекису водню; циклічне фізико-хімічне очищення матеріалу в ультразвуковому кавітаторі та орбітальному шейкері при експозиції 10-20 хв, у розчині бікарбонату натрію на дистильованій воді 15 хв; потім 15 хв у 3 % розчині перекису водню в 70 % етанолі з промиванням проточною водою під тиском, з наступним просушуванням і заморожуванням при температурі - 80 до - 85 °С, з подальшим проведенням стадії імпрегнації водорозчинного антибіотика, стійкого до іонізуючого випромінювання, і біологічно активної речовини, обраної з морфогенетичних білків, з додаванням природного полімеру, вибраного з колагену, желатину, целюлози, полівінілпіролідону або розчину диметилсульфоксиду; ліофілізацію й упаковку матеріалу; стерилізацію його іонізуючим випромінюванням.

Недоліками цього способу є те, що він складний та потребує багато часу, використання наднизьких температур та значної кількості хімічних речовин та обладнання, які можуть нашкодити фізіологічному стану клітин і знизити достовірність результатів.

Ознаками, спільними з рішенням, що заявляється, є вилучення стегнових кісток, взяття кісткового мозку після зберігання.

Як найближчий аналог вибрано спосіб зберігання кісткового мозку [Пат. № 11956 Україна, МПК А61В 6/00. Среда для криоконсервирования мезенхимальных стволовых клеток и биотрансплантат с ее использованием / Кругляков П.В., Полицев Д.Г., Вийде С.К., Кислякова Т.В. / заявка № 2006117109/13. Заявл. 19.05.2006. Опубл. 27.07.2007.], що включає забір кісткового мозку з головки стегнової кістки; виділення клітин кісткового мозку з живильним середовищем за допомогою центрифугування, розведення до необхідної концентрації, додавання криоконсервувальної рідини, охолодження до +4 -+8 °С, з послідовним поетапним заморожуванням до -140 °С, зберігання протягом двох років.

Недоліком способу є довготривалість процесу, використання криоконсервувальної рідини та наднизьких температур, що може призвести до порушення нормального фізіологічного стану клітин.

Спільними ознаками з рішенням, що заявляється, є отримання кісткового мозку з вилученої кістки.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб короткочасного збереження кісткового мозку, який шляхом вилучення кісток або кісткового мозку та зберігання отриманого матеріалу при низькій позитивній температурі дає змогу зберегти нормальний фізіологічний стан клітин кісткового мозку протягом 2 год., що дозволяє збільшити час для аналізу кісткового мозку.

Суттєвими ознаками способу є:

вилучення кісткового мозку або кісток;

поетапне охолодження отриманого матеріалу до температури  $+6\pm 2$  °С;

зберігання кісток при температурі  $+6\pm 2$  °С протягом 1-2 год.

Відмінними від найближчого аналога ознаками є:

поетапне охолодження отриманого матеріалу до температури  $+6\pm 2$  °С;

зберігання кісток при температурі  $+6\pm 2$  °С протягом 1-2 год.;

Спосіб здійснюють так.

Вилучають кістковий мозок або кістки одразу після декапітації тварин, звільняють їх від м'язів, поетапно охолоджують отриманий матеріал до температури  $+6\pm 2$  °С та зберігають при температурі  $+6\pm 2$  °С протягом 1-2 год.

Запропонований спосіб дозволяє здійснювати аналіз функціональної активності кісткового мозку, отриманого у живої тварини, не використовувати процес декапітації тварин, що сприяє підвищенню точності результатів. І дозволяє досліджувати дію біологічно активних речовин та корегувати фізіологічний стан тварин.

Для підтвердження збереження нормального функціонального стану клітин кісткового мозку кістки було здійснено серію дослідів:

1. Порівнювали значення показників мітотичного індексу кісткового мозку тварин безпосередньо після декапітації зі значеннями показників мітотичного індексу кісткового мозку тварин, отриманого із кісток тварини, що зберігалися при температурі  $+6\pm 2^\circ\text{C}$ .

2. Порівнювали значення показників мітотичного індексу кісткового мозку тварин після декапітації безпосередньо і кісткового мозку тварини після декапітації та зберігання при температурі  $+6\pm 2^\circ\text{C}$ .

Для дослідження відбирали кістковий мозок безпосередньо у тварин або з вилучених кісток, які розрізали вздовж і вимивали кістковий мозок. Додавали теплий гіпотонічний 0,9 % розчин цитрату натрію у стерильну пробірку. Отриману клітинну суспензію інкубували у гіпотонічному середовищі протягом 10 хв за температури тіла досліджуваного об'єкта. Центрифугували отриману суспензію протягом 5 хв при 1 000 об/хв і збирали осад у пробірку. Клітини кісткового мозку фіксували протягом 60 хв при температурі  $+6\pm 2^\circ\text{C}$  у суміші метилового спирту з крижаною оцтовою кислотою (3:1).

За 60 хв фіксації при температурі  $+6\pm 2^\circ\text{C}$  тричі змінювали фіксатор із проміжним ресуспензуванням осаду та наступним центрифугуванням. В останньому фіксаторі осад ресуспензували та наносили на стерильне прохолодне  $+6^\circ\text{C}$  предметне скло. Скло швидко проводили через полум'я пальника, щоб фіксатор запалав, але не допускаючи перегрівання. Аналізували 3 000 клітин, серед яких визначали такі, що перебували у мітозі. У результаті порівняння мітотичних індексів кісткового мозку у першій та другій серії дослідження дані були статистично однакові порівняно з реферативними значеннями табл. 1, що свідчить про нормальний фізіологічний стан клітин, які зберігалися за запропонованим способом.

Таблиця 1

Мітотичний індекс кісткового мозку тварин

| Статевозрілі лабораторні щури |                      |                       | Показник мітотичного індексу, % |
|-------------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------------|
| Перша серія дослідів          | Реферативні значення |                       | 15,14 $\pm$ 1,3                 |
|                               | 1 група              | Запропонований спосіб | 13,79 $\pm$ 1,1                 |
|                               | 2 група              | Найближчий аналог     | 10,13 $\pm$ 1,3                 |
| Друга серія дослідів          | Реферативні значення |                       | 14,71 $\pm$ 1,4                 |
|                               | 1 група              | Запропонований спосіб | 13,92 $\pm$ 1,2                 |
|                               | 2 група              | Найближчий аналог     | 9,46 $\pm$ 1,1                  |

#### Приклад 1.

Для дослідження було використано 16 статевозрілих щурів віком 6 місяців. Вони були розподілені на 2 групи порівну. Першу групу становили щури, у яких брали кістковий мозок запропонованим способом, другу - за способом - аналогом

У першій групі тварин вилучали стегна, звільняли від м'язів, зберігали їх при температурі  $+8^\circ\text{C}$  протягом 2 год.

Для порівняння отриманих результатів розрізали вздовж кістки і вимивали кістковий мозок теплим гіпотонічним 0,9 % розчином цитрату натрію у стерильну пробірку. Отриману клітинну суспензію інкубували в гіпотонічному середовищі протягом 10 хв при температурі тіла тварини. Центрифугували отриману суспензію протягом 5 хв при 1 000 об/хв і залишали небагато осаду у пробірці. Клітини фіксували у охолодженій фіксувальній суміші при температурі  $+6^\circ\text{C}$ : метиловий спирт з крижаною оцтовою кислотою (3:1). За 60 хв фіксації при температурі  $+6^\circ\text{C}$  тричі змінювали фіксатор із проміжним ресуспензуванням осаду та наступним центрифугуванням. У кінцевому фіксаторі осад ресуспензували та наносили на стерильне прохолодне  $+6^\circ\text{C}$  предметне скло. Скло швидко проводили через полум'я пальника, щоб фіксатор запалав, але не допускали перегрівання. Аналізували 3 000 клітин, серед яких визначали такі, що перебували у мітозі.

У другій групі здійснювали забір кісткового мозку з головки стегнової кістки щурів. Виділяли клітини кісткового мозку з живильним середовищем за допомогою центрифугування, розводили отриману суспензію, додавали кріоконсервувальну рідину, охолоджували при температурі  $+8^\circ\text{C}$ , потім поетапно заморожували до наднизьких температур, потім розморожували і аналізували 3000 клітин, що перебували у мітозі.

Зберігання кісткового мозку понад 2 год. призводить до зниження точності аналізу показника мітотичного індексу кісткового мозку у зв'язку з початком порушень функціонального стану клітин за рахунок відновлення надшвидкої зміни стадій мітозу.

Приклад 2.

5 У дослідженні були залучені 18 тварин, віком 2 місяця, які були розподілені на 2 рівні групи. Дослідження здійснювали аналогічно прикладу 1, але за запропонованим способом, як в другій серії дослідів. Перша група тварини, у яких отримували кістковий мозок безпосередньо після декапітації, друга група – тварини, у яких після отримання кістковий мозок зберігався при температурі +6 °С, протягом 2 год. У результаті дослідження у способі аналогу було виявлено

10 зниження мітотичного індексу порівняно з реферативними значеннями. Вилучення кісток або кісткового мозку та зберігання отриманого матеріалу при низькій позитивній температурі за запропонованим способом дає змогу зберегти нормальний фізіологічний стан клітин кісткового мозку протягом 2 год., тим самим збільшити час для аналізу кісткового мозку. Спосіб дозволяє зберегти всі стадії мітозу у первинному стані, що забезпечує

15 точність способу.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

20 Спосіб короткочасного збереження кісткового мозку, що включає отримання кісткового мозку, який **відрізняється** тим, що поетапно охолоджують кістковий мозок або кістку до температури  $6 \pm 2$  °С та зберігають їх при температурі  $6 \pm 2$  °С протягом 2 год.