



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 35/28 (2024.01)

(21)(22) Заявка: 2023129756, 16.11.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.11.2023

Дата регистрации:
02.05.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.11.2023

(45) Опубликовано: 02.05.2024 Бюл. № 13

Адрес для переписки:
308015, г.Белгород, ул. Победы, 85, НИУ
"БелГУ", Токтарева Татьяна Михайловна

(72) Автор(ы):

Наеждин Сергей Викторович (RU),
Даниленко Антон Павлович (RU),
Наеждина Наталья Анатольевна (RU),
Даниленко Людмила Михайловна (RU),
Покровский Михаил Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

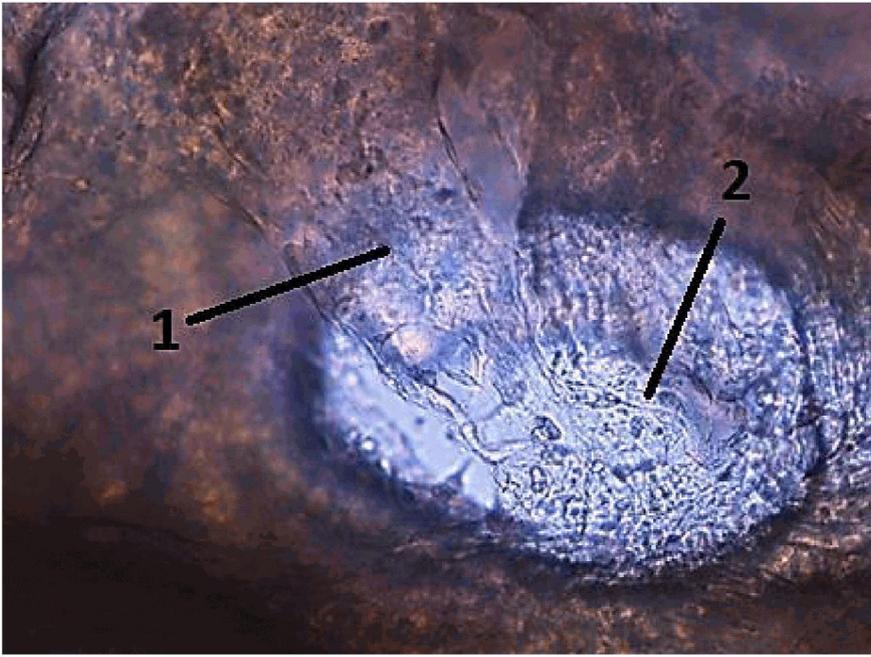
(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: PARK Y. et al. Trabecular bone
organoid model for studying the regulation of
localized bone remodeling, *Sci Adv*, 2021, vol. 7,
N. 4, eabd6495. BARRIENTOS F.J. et al. Bone
regeneration with autologous adipose-derived
mesenchymal stem cells: A reliable experimental
model in rats, *MethodsX*, 2020, vol. 7, 101137. RU
2615439 C2, 04.04.2017.

(54) Способ формирования трабекулярного костного органоида

(57) Реферат:

Изобретение относится к области клеточных технологий и тканевой инженерии. Предложен способ формирования трабекулярного костного органоида, который представляет собой трехмерную самообновляющуюся и самоорганизующуюся прекостную микроткань, построенную на основе биоактивной деминерализованной губчатой костной матрицы

и мезенхимных стволовых клеток (МСК), дифференцированных в остеогенные и ангиогенные клетки. Предложенный способ применим в доклинических исследованиях *in vitro* перспективных субстанций и новых лекарственных средств для оценки их остеоиндуктивного/остеогенного и эндотелиогенного действия. 4 ил.



Фиг.1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
A61K 35/28 (2024.01)

(21)(22) Application: **2023129756, 16.11.2023**

(24) Effective date for property rights:
16.11.2023

Registration date:
02.05.2024

Priority:

(22) Date of filing: **16.11.2023**

(45) Date of publication: **02.05.2024** Bull. № 13

Mail address:
**308015, g.Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",
Toktareva Tatyana Mikhajlovna**

(72) Inventor(s):

**Nadezhdin Sergei Viktorovich (RU),
Danilenko Anton Pavlovich (RU),
Nadezhdina Natalia Anatolevna (RU),
Danilenko Liudmila Mikhailovna (RU),
Pokrovskii Mikhail Vladimirovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia "Belgorodskii gosudarstvennyi
natsionalnyi issledovatel'skii universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) **METHOD OF FORMING TRABECULAR BONE ORGANOID**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to cell technologies and tissue engineering. Disclosed is a method of forming a trabecular bone organoid, which is a three-dimensional self-renewing and self-organizing periosteal microtissue, built on the basis of bioactive demineralised spongy bone matrix and mesenchymal

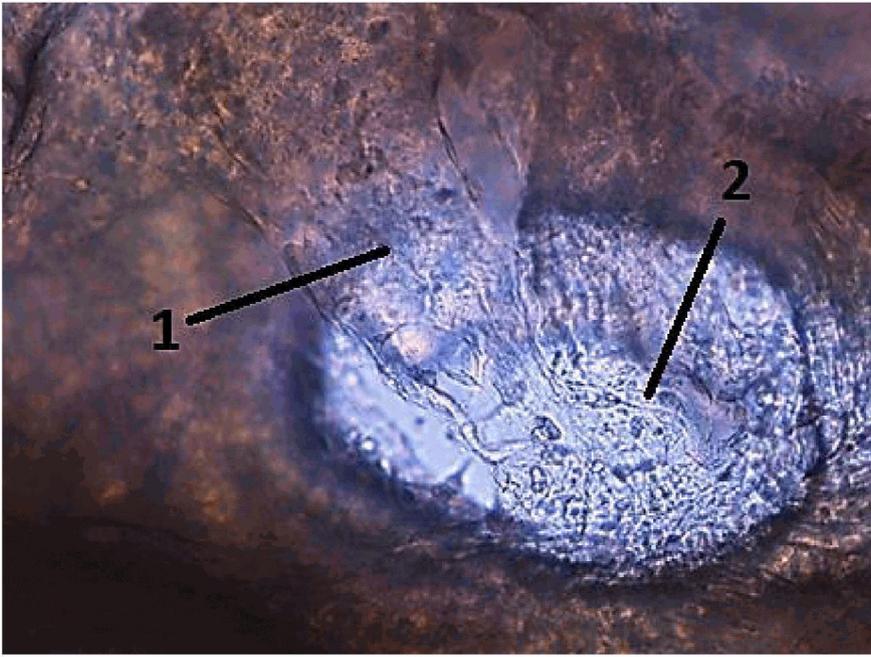
stem cells (MSC), differentiated into osteogenic and angiogenic cells.

EFFECT: disclosed method is applicable in preclinical studies in vitro of promising substances and new drugs for assessing their osteoinductive/osteogenic and endotheliogenic action.

1 cl, 4 dwg

RU 2 818 357 C1

RU 2 818 357 C1



Фиг.1

Изобретение относится к области клеточных технологий и тканевой инженерии, а именно, к формированию трабекулярного костного органоида, который представляет собой трехмерную самообновляющуюся и самоорганизующуюся прекостную микроткань, построенную на основе биоактивной деминерализованной губчатой костной матрицы и мезенхимных стволовых клеток (далее МСК), дифференцированных в остеогенные и ангиогенные клетки.

В настоящее время органоиды являются новой концепцией организации опытов *in vitro*, реализуемой с помощью клеточных технологий и тканевой инженерии. Органоиды создаются для моделирования различных заболеваний человека и животных, для разработки тест-систем новых лекарственных препаратов, изучения процессов регенерации и старения. В основе создания любого органоида лежит правильный выбор источника МСК, каркаса – носителя клеток, питательной среды и добавок для обеспечения пролиферации и дифференцировки МСК в заданные типы клеток. Известно, что МСК выделенные как из жировой ткани, так и костного мозга обладают сходным пролиферативным и дифференцировочным потенциалами (Li, H.; Nawaz, H.A.; Masieri, F.F.; Vogel, S.; Hempel, U.; Bartella, A.K.; Zimmerer, R.; Simon, J.-C.; Schulz-Siegmund, M.; Hacker, M.; et al. Osteogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue, Bone Marrow and Hair Follicle Outer Root Sheath in a 3D Crosslinked Gelatin-Based Hydrogel. *Int.J.Mol.Sci.* 2021, 22, 5404. <https://doi.org/10.3390/ijms22105404>). Сложным в создании является органоид костной ткани, так как для его создания необходимо учитывать весь спектр вышеперечисленных условий.

В связи с вышеизложенным, растет спрос на разработку органоидов костной ткани, которые позволят смоделировать фазы регенерации костной ткани при нарушении ее целостности. Наиболее значимой фазой регенерации костной ткани является ангио-мезенхимная фаза восстановления – фиброваскулярная, которая определяется ремоделированием сосудов (ангиогенез) и привлечением МСК в зону повреждения с последующей их дифференцировкой в остеобласты (Bahney C.S, Zondervan R.L, Allison P. et al. Cellular biology of fracture healing. *J Orthop Res.* 2019 Jan;37 (1). P. 35-50. <https://doi.org/10.1002/jor.24170>). Однако на пролиферацию и дифференцировку МСК как в остеобласты, так и эндотелиоциты оказывает влияние комплекс факторов (Chen Q, Shou P, Zheng C. et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death Differ* 23, 1128–1139 (2016). <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.168>), которые сложно контролировать и регулировать при культивировании МСК с целью их дифференцировки в остеобласты и эндотелиоциты особенно при совместном культивировании.

Анализ открытых источников показал, что для формирования костного трабекулярного органоида могут использоваться МСК, выделенные из костного мозга человека, которые высаживают на каркас, изготовленный из фиброина шелка, где они формируют минерализованный внеклеточный матрикс. Каркас в виде дисков диаметром 5 мм и высотой 3 мм смачивают питательной средой DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (далее ЭТС) и 1% антибиотиков, затем наносят 1×10^6 МСК и культивируют 90 минут в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. В дальнейшем формирование трабекулярного органоида производят в биореакторе диаметром 36 мм и высотой 80 мм с вихревым перемешиванием при помощи магнитной мешалки в течение 5 недель. Для дифференцировки МСК используют остеогенную добавку β-глицерофосфат натрия, дексаметазон и аскорбиновую кислоту. В итоге исследователи получили каркас, заселенный остеобластами и остеоцитами, которые формировали минерализованный внеклеточный матрикс, создавая органоид ранней стадии формирования костной ткани (Akiva A, Melke J, Ansari S, et al. Hofmann An organoid for woven bone. *Adv. Funct. Mater.*,

31 (17) (2021), p. 2010524 <https://doi.org/10.1002/adfm.202010524>).

Недостатками аналога является отсутствие предшественников других типов клеток, например, эндотелиоцитов, а также отсутствие при формировании органоида дополнительного внесения в каркас нативных МСК, которые могут формировать фиброваскулярные островки и совместно с остеобластами образовывать более полноценный костный трабекулярный органоид характерный для фиброваскулярной фазы внутримембранозного остеогенеза. Необходимо отметить, что в ходе культивирования МСК в биореакторе с вихревым перемешиванием на клетки существенное влияние оказывает напряжение сдвига питательной среды, возникающее при перемешивании, что способствует дифференцировке МСК в остеобласты, но затрудняет дифференцировку в другие типы клеток, которые появляются в зоне регенерации при ангио-мезенхимной фазе восстановления костной ткани (Bahney C.S, Zondervan R.L, Allison P. et al. Cellular biology of fracture healing. J Orthop Res. 2019 Jan;37 (1). P. 35-50. <https://doi.org/10.1002/jor.24170>).

Известен способ формирования модели органоида, построенного из остеобластических и остеокластических клеток, посеянных на микротрабекулы. Выделенные из костной ткани МСК – предшественники остеобластов культивировали в базовой среде, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (далее ФБС), 0,1% гентамицинсульфат-амфотерицин В и 0,1% аскорбиновую кислоту. Для дифференцировки МСК в остеобласты в питательную среду дополнительно добавляли гемисукцинат гидрокортизона 21 и β-глицерофосфат. Предшественники остеокластов были выделены из костной ткани и культивировались в базовой среде, содержащей 10% ФБС, 1% пенициллин-стрептомицин, 1% L - глутамин, 0,1% rhM-CSF и 2 мкг растворимого лиганда RANK. В качестве основы для получения органоидов использовались фрагменты микротрабекул в виде крошки гидроксиапатитового минерала размером 500–1000 мкм, которые были получены из головок бедренных костей ксеногенных источников. На фрагментах микротрабекул культивировали отдельные остеобластические, преостеокластические и смешанные клеточные популяции. Концентрации клеток регулировали перед смешиванием используя 500 предшественников остеокластов: 1250 остеобластов (1:2,5) и 350:1250 соответственно (1:3,5). Клетки высевали на поверхность трабекул и инкубировали в течение 48 часов методом перевернутой капли, а именно, 10 мкл капли содержали костную крошку и клеточную суспензию. Затем капли наносили на внутреннюю поверхность чашки Петри диаметром 60 мм, а на дно чашки добавляли 5 мл физиологического раствора для создания влажной среды. Органоиды обрабатывали питательной средой путем аспирации с помощью микропипетки в течение 14 дней. Таким образом был создан прототип раннего костного органоида, который позволяет изучать процессы ремоделирования кости (Iordachescu A, Hughes E.A.B, Joseph S. et al. Trabecular bone organoids: a micron-scale ‘humanised’ prototype designed to study the effects of microgravity and degeneration. npj Microgravity 7, 17 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41526-021-00146-8>).

Однако, сформированный по прототипу трабекулярный органоид не отражает фаз процесса регенерации костной ткани, кроме того, не указаны составы базовой среды, в которой культивировались только предшественники остеобластов и остеокластов. Наряду с этим для создания костного органоида использованы только остеобластические и остеокластические клетки. Известно, что в процессе формирования новой костной ткани ключевая роль отводится МСК, которые активно пролиферируют, а затем дифференцируются в остеобласты, а при добавлении фактора роста эндотелия сосудов МСК дифференцируются в эндотелиоциты, без которых также невозможно

дальнейшее формирование и восстановление костной ткани (Pfeiffenberger M, Damerau A, Lang A, et al. Fracture Healing Research—Shift towards In Vitro Modeling? *Biomedicines*. 2021; 9(7):748. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070748>). Созданный по данному способу органоид демонстрирует только локальные процессы резорбции костной матрицы остеокластами с последующей пролиферацией остеобластов, формирующих кальцифицированный матрикс. Наряду с этим для создания органоида используется костная крошка, представляющая собой фрагменты микротрабекул, которые хаотично будут двигаться при замене питательной среды и препятствовать формированию многоклеточных центров окостенения с островками эндотелиальных вершечных клеток – зачатков кровеносных капилляров (Hendriks M, Ramasamy S.K. *Blood Vessels and Vascular Niches in Bone Development and Physiological Remodeling*. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020; 8:602278. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.602278>).

Из уровня техники не выявлен способ формирования трабекулярного костного органоида из жировой ткани.

Задачей предлагаемого изобретения является разработка нового способа формирования трабекулярного костного органоида, который соответствует фиброваскулярной фазе внутримембранозного остеогенеза, что позволяет в дальнейшем его использовать в доклиническом исследовании *in vitro* для оценки остеоиндуктивного/остеогенного и эндотелиогенного действия перспективных субстанций и новых лекарственных средств.

Технический результат – возможность формирования трабекулярного костного органоида из жировой ткани, позволяющего создавать модель фиброваскулярной фазы внутримембранозного остеогенеза, которую можно использовать в доклиническом исследовании для оценки остеоиндуктивного/остеогенного и эндотелиогенного действия лекарственных средств, что позволит снизить издержки и стоимость работ на начальных этапах разработки лекарственных препаратов.

Технический результат достигается в ходе предложенного двухэтапного процесса культивирования МСК. Так, на первом этапе процесса культивирования суспензию МСК, полученную из жировой ткани содержащую $1,0 \times 10^6$ клеток в криовиале добавляют в культуральный флакон площадью 25 см^2 и культивируют в питательной среде DMEM-F12 с глутамином, содержащей 10% ЭТС, 1% антибиотиков, а также добавленную на третий день остеоиндуктивную добавку 10 мМ β -глицерофосфат натрия, 100 нМ дексаметазон, 50 мкг/мл аскорбиновую кислоту (Pittenger M.F, Mbalaviele G. Black M, Mosca J.D, Marshak D.R. *Mesenchymal stem cells*. Human cell culture. Vol. V. Primary Mesenchymal Cells. Koller MR, Palsson BO. eds. Kluwer Academic Publishers. 2001. P. 189-207). В другой культуральный флакон площадью 25 см^2 вносят суспензии МСК содержащую $1,0 \times 10^6$ клеток и культивируют в питательной среде DMEM-F12 с глутамином, содержащей 10% ЭТС, 1% антибиотиков, а также добавленную на третий день эндотелиоиндуктивную добавку 10 ng/mL фактора роста фибробластов - FGF и 50 g/mL фактора роста эндотелия сосудов – VEGF (Khan S, Villalobos M.A, Choron R.L. et al. *Fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor play a critical role in endotheliogenesis from human adipose-derived stem cells*. *J Vasc Surg*. 2017 May; 65 (5):1483-1492. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2016.04.034>). Культивирование осуществляют в инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 в течении 21 дня, заменяя питательную среду на свежую каждый 3 день культивирования.

На втором этапе процесса МСК снимают с флаконов при помощи трипсина-ЭДТА 0,05% с солями Хенкса и наносят с двух сторон на каркасы выполненные в виде пластин

4x4 мм и толщиной не более 1 мм и изготовленные из высокоочищенного ксеноколлагена I типа, который представляет собой частично декальцинированные губчатые фрагменты костной ткани (производитель ЗАО «ОЭЗ «ВЛАДМИВА», Россия) в количестве $0,04 \times 10^6$ клеток на один каркас. Перед нанесением МСК упомянутые каркасы помещают в лунки 96-луночных планшетов, смачивают питательной средой DMEM-F12 с глутамином, 10% ЭТС, 1% антибиотиков и выдерживают в течение 24 часов в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂.

Сначала на каркасы наносят МСК, культивированные в питательной среде, содержащей остеоиндуктивную добавку. Причем после нанесения МСК на поверхность одной стороны каркаса, выдерживают клетки 60 минут, и затем наносят МСК на поверхность второй стороны каркаса. Через 60 минут на первую сторону каркаса наносят МСК, культивированные в питательной среде, содержащей эндотелиоиндуктивную добавку, выдерживают клетки на поверхности 60 минут и наносят указанные МСК на поверхность второй стороны каркаса. Далее МСК культивируют в течение 27 дней в питательной среде DMEM-F12 с глутамином, 10% ЭТС, 1% антибиотиков, заменяя питательную среду на свежую каждый 3 день культивирования при помощи пипеточного дозатора. На 9 день культивирования к МСК на каркасах добавляют нативные МСК в количестве $0,04 \times 10^6$ клеток с заменой среды в лунках 96-луночного планшета на питательную среду DMEM-F12 с глутамином, 10% ЭТС, 1% антибиотиков с остеоиндуктивной добавкой 10 мМ β-глицерофосфат натрия, 100 нМ дексаметазона и 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты. Далее продолжают заменять питательную среду каждый 3 день культивирования на свежую среду без добавок. Затем на 18 день к МСК на каркасах добавляют нативные МСК в количестве $0,04 \times 10^6$ клеток с заменой среды в лунках 96-луночного планшета на питательную среду DMEM-F12 с глутамином, 10% ЭТС, 1% антибиотиков с эндотелиоиндуктивной добавкой 10 ng/mL фактора роста фибробластов - FGF и 50 g/mL фактора роста эндотелия сосудов – VEGF и продолжают обновление питательной среды без добавок каждый третий день до окончания культивирования.

Графические изображения, полученные при помощи инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа DIGITAL ECLIPSE C1 plus (производитель NIKON, Япония) представлены на фигурах:

Фиг. 1. Фотограмма фрагмента сформированного трабекулярного костного органоида, где представлена сформированная трабекулярная пластинка 1 сросшаяся с фиброваскулярной соединительно-тканной прослойкой 2, которая заполняет просвет каркаса. Ув.Х200.

Фиг. 2. Фотограмма фрагмента сформированного трабекулярного костного органоида, где представлена сформированная фиброваскулярная соединительно-тканная прослойка 1, заполняющая просвет каркаса. Ув.Х200

Фиг. 3. Фотограмма – оптический срез фрагмента каркаса, зеленая флуоресценция RUNX2 у остеобластов, культивированных на каркасе. Ув.Х200.

Фиг. 4. Фотограмма – оптический срез фрагмента каркаса, красная флуоресценция CD31 у эндотелиоцитов, культивированных на каркасе. Ув.Х200.

Изобретение осуществляется следующим образом.

МСК были получены из жировой ткани человека (производитель ООО "БиолоТ", Россия) и хранились в морозильной камере в криосреде (среда КриоМед-М на основе ДМСО, производитель ООО НПП «ПанЭко», Россия) при температуре минус 80°C. Криопробирку извлекли из морозильной камеры, разморозили суспензию МСК,

отобрали суспензию с содержанием количества клеток в криовиале $2,0 \times 10^6$ и разделили ее на две равные части.

Первую часть суспензии МСК, содержащую $1,0 \times 10^6$ клеток добавили в культуральный флакон площадью 25 см^2 (производитель SPL LIFE SCIENCE CO., LTD. Южная Корея), который содержал 5 мл питательной среды DMEM-F12 с глутамином (производитель ООО НПП «ПанЭко», Россия), 10% ЭТС (производитель Biosera, Франция), 1% раствор пенициллина-стрептомицина (производитель ООО НПП «ПанЭко», Россия). После 3 дней культивирования в питательную среду добавили остеоиндуктивную добавку, содержащую 10 мМ β -глицерофосфат натрия (производитель ООО НПП «ПанЭко», Россия), 100 нМ дексаметазон (производитель ОАО Дальхимфарм, Россия), 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты (производитель ОАО Дальхимфарм, Россия). Вторую часть суспензии МСК, содержащую $1,0 \times 10^6$ клеток, добавили в другой культуральный флакон площадью 25 см^2 (производитель SPL LIFE SCIENCE CO., LTD. Южная Корея), который содержал 5 мл питательной среды DMEM-F12 с глутамином (производитель ООО НПП «ПанЭко», Россия), 10% ЭТС (производитель Biosera, Франция), 1% раствор пенициллина-стрептомицина (производитель ООО НПП «ПанЭко», Россия). После 3 дней культивирования в питательную среду добавили эндотелиоиндуктивную добавку 10 ng/mL фактора роста фибробластов – FGF2 и 50 g/mL фактора роста эндотелия сосудов – VEGF-A165 (производитель ООО «СайСторЛаб», Россия). Все МСК культивировали при 37°C и 5% CO_2 в течение 21 дня, с заменой питательной среды на свежую каждый 3 день культивирования.

На втором этапе процесса культивирования МСК снимали с флаконов при помощи раствора трипсина-ЭДТА 0,05% с солями Хенкса (производитель ООО НПП «ПанЭко», Россия) и наносили клетки в количестве $0,04 \times 10^6$ на один каркас с двух сторон. Перед нанесением МСК каркасы, выполненные в виде пластин 4×4 мм и толщиной не более 1 мм, изготовленные из высокоочищенного ксеноколлагена I типа, который представлял собой частично декальцинированные губчатые фрагменты костной ткани (пластина губчатая деминерализованная «Биопласт-Дент», производитель ЗАО «ОЭЗ «ВЛАДМИВА», Россия), помещали в лунки 96-луночных планшетов и смачивали питательной средой DMEM-F12 с глутамином, 10% ЭТС, 1% раствор пенициллина-стрептомицина. Объем питательной среды в лунке 96 луночного планшета (производитель SPL LIFE SCIENCE CO., LTD. Южная Корея) составлял 250 мкл. Каркасы выдерживали в питательной среде в течение 24 часов в инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 .

Сначала на каждый каркас с двух сторон наносили МСК в количестве $0,04 \times 10^6$ клеток, культивированных в питательной среде, содержащей остеоиндуктивную добавку, при этом после нанесения клеток на одну сторону выдерживали 60 минут и затем наносили МСК, культивированные в питательной среде, содержащей остеоиндуктивную добавку, на поверхность второй стороны каркаса. После того выдерживали 60 минут и на первую сторону каркаса наносили МСК, культивированные в питательной среде, содержащей эндотелиоиндуктивную добавку, выдержали клетки на поверхности первой стороны 60 минут и нанесли МСК, культивированные в питательной среде, содержащей эндотелиоиндуктивную добавку, на поверхность второй стороны каркаса. Затем МСК культивировали в течение 27 дней в питательной среде DMEM-F12 с глутамином, 10% ЭТС, 1% раствор пенициллина-стрептомицина, заменяя на свежую питательную среду каждый 3 день культивирования при помощи пипеточного дозатора. На 9 день

культивирования добавили нативные МСК в количестве $0,04 \times 10^6$ клеток на один каркас с заменой среды в лунках 96-луночного планшета на питательную среду DMEM-F12 с глутамином, 10% ЭТС, 1% антибиотиков и остеоиндуктивной добавкой 10 мМ β -

5 глицерофосфат натрия, 100 нМ дексаметазона и 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты. Далее продолжали заменять питательную среду на свежую без добавок каждый 3 день культивирования. Затем на 18 день добавляли нативные МСК в количестве $0,04 \times 10^6$ клеток с заменой среды в лунках 96-луночного планшета на питательную среду DMEM-F12, 10% ЭТС, 1% антибиотиков с эндотелиоиндуктивной добавкой 10 ng/mL фактора роста фибробластов - FGF и 50 g/mL фактора роста эндотелия сосудов – VEGF. И

10 продолжали заменять питательную среду на свежую без добавок каждый 3 день культивирования до окончания процесса культивирования.

Для подтверждения дифференцировки МСК в остеобласты и эндотелиоциты были использованы микроскопические методы исследования с оценкой морфологии и наличия

15 маркеров: для остеобластов фактор транскрипции RUNX2, для эндотелиоцитов CD 31 (PECAM-1). Используются первичные антитела к фактору транскрипции RUNX2 (Product code ab76956, производитель Abcam, Великобритания), со вторичными антителами (Product code ab150113, Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488), производитель Abcam, Великобритания) и Alexa Fluor® 594 антитело против человеческого CD31

20 (Product code 303126, производитель Biolegend США). Все работы с антителами проводили согласно инструкции производителей, затем проводили регистрацию изображений при помощи инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа DIGITAL ECLIPSE C1 plus (производитель NIKON, Япония), примеры изображений представлены на фиг.1-4.

25 Таким образом, результаты микроскопического исследования позволили установить, что предлагаемый способ создания трабекулярного костного органоида позволяет сформировать соединительно-тканые остеогенные островки, состоящие из остеобластов, эндотелиоцитов и МСК, которые образуют фиброваскулярную соединительно-тканую прослойку, располагающуюся как на поверхности, так и в

30 полостях каркаса с формированием трабекулярных пластин характерных для интрамембранозной кости. Следовательно поставленная задача решена и технический результат достигнут.

(57) Формула изобретения

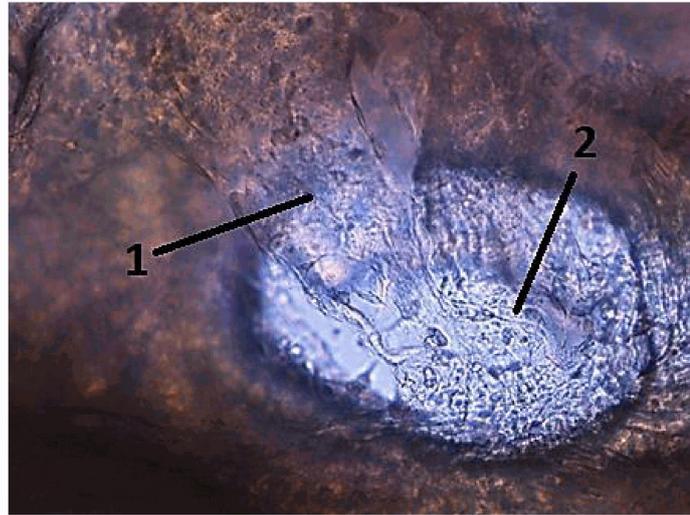
35 Способ формирования трабекулярного костного органоида, включающий двухэтапный процесс культивирования мезенхимных стволовых клеток, выделенных из жировой ткани, при этом на первом этапе суспензию, содержащую $1,0 \times 10^6$ мезенхимных стволовых клеток, добавляют в культуральный флакон площадью 25 см^2 и культивируют в питательной среде DMEM-F12 с глутамином, содержащей 10% ЭТС,

40 1% антибиотиков, с добавленной на третий день остеоиндуктивной добавкой 10 мМ β -глицерофосфат натрия, 100 нМ дексаметазона и 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, в другой культуральный флакон площадью 25 см^2 помещают суспензию, содержащую $1,0 \times 10^6$ мезенхимных стволовых клеток, и культивируют в питательной среде DMEM-F12 с глутамином, содержащей 10% ЭТС, 1% антибиотиков, а также добавленную на

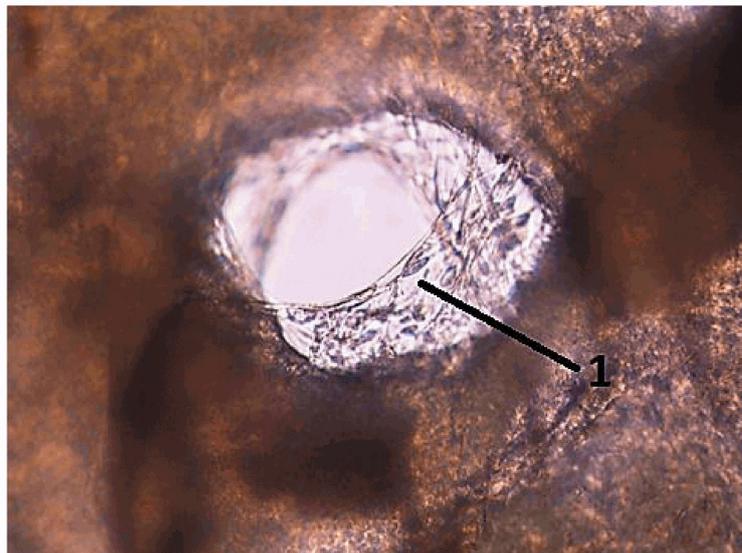
45 третий день эндотелиоиндуктивную добавку 10 нг/мл фактора роста фибробластов - FGF и 50 г/мл фактора роста эндотелия сосудов – VEGF, причем процесс культивирования осуществляют в инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 в течение 21 дня,

заменяя питательную среду на свежую каждый 3 день культивирования; на втором этапе процесса мезенхимные стволовые клетки снимают с флаконов при помощи трипсина-ЭДТА 0,05% с солями Хенкса и наносят с двух сторон в количестве $0,04 \times 10^6$ клеток на один каркас, причем каркасы выполнены в виде пластин размером 4×4 мм и толщиной 1 мм и изготовлены из высокоочищенного ксеноколлагена I типа, который представляет собой частично декальцинированные губчатые фрагменты костной ткани, упомянутые каркасы предварительно смачивают питательной средой DMEM-F12 с глутамином, 10% ЭТС, 1% антибиотиков и выдерживают в течение 24 часов в инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 в лунках 96-луночных планшетов, затем на поверхность одной стороны каркаса сначала наносят мезенхимные стволовые клетки, культивированные в питательной среде, содержащей остеоиндуктивную добавку, выдерживают клетки 60 минут, и наносят мезенхимные стволовые клетки, культивированные в питательной среде, содержащей остеоиндуктивную добавку, на поверхность второй стороны каркаса, выдерживают 60 минут и на первую сторону каркаса наносят мезенхимные стволовые клетки, культивированные в питательной среде, содержащей эндотелиоиндуктивную добавку, выдерживают клетки на поверхности 60 минут и наносят мезенхимные стволовые клетки, культивированные в питательной среде, содержащей эндотелиоиндуктивную добавку, на поверхность второй стороны каркаса; далее мезенхимные стволовые клетки культивируют в течение 27 дней в питательной среде DMEM-F12 с глутамином, содержащей 10% ЭТС и 1% антибиотиков, заменяя питательную среду на свежую каждый 3 день культивирования при помощи пипеточного дозатора, на 9 день культивирования к мезенхимным стволовым клеткам на каркасах добавляют нативные мезенхимные стволовые клетки в количестве $0,04 \times 10^6$ клеток на каркас с заменой среды в лунках 96-луночного планшета на питательную среду DMEM-F12 с глутамином, содержащую 10% ЭТС, 1% антибиотиков с остеоиндуктивной добавкой 10 мМ β -глицерофосфат натрия, 100 нМ дексаметазона и 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, и продолжают заменять питательную среду каждый 3 день культивирования на свежую среду без добавок, на 18 день добавляют нативные МСК в количестве $0,04 \times 10^6$ клеток на каркас с заменой среды в лунках 96-луночного планшета на питательную среду DMEM-F12 с глутамином, 10% ЭТС, 1% антибиотиков с эндотелиоиндуктивной добавкой 10 нг/мл фактора роста фибробластов - FGF и 50 г/мл фактора роста эндотелия сосудов – VEGF и продолжают обновление питательной среды на свежую без добавок каждый третий день культивирования.

1

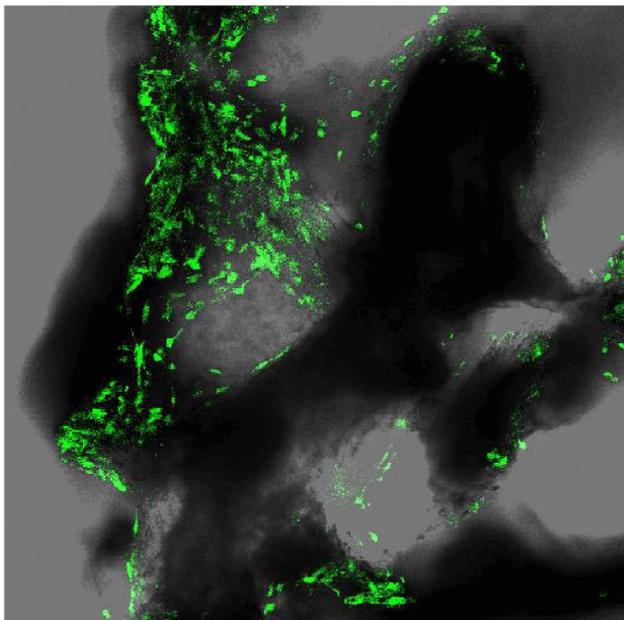


Фиг.1

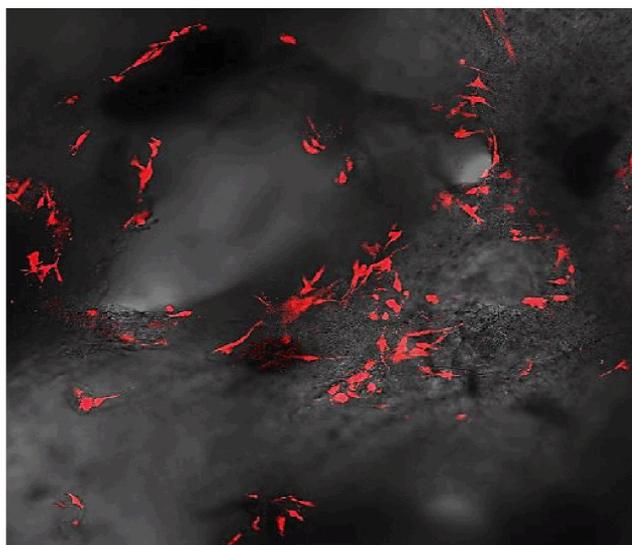


Фиг. 2

2



ФИГ. 3



ФИГ. 4