



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **117257** (13) **U**  
(51) МПК  
**G01N 33/15** (2006.01)  
**G01N 33/48** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

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

|  |  |
|--|--|
| <p>(21) Номер заявки: <b>u 2016 12864</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>19.12.2016</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>26.06.2017</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>26.06.2017, Бюл.№ 12</b></p> | <p>(72) Винахідник(и):<br/><b>Нікольська Валентина Василівна (UA),</b><br/><b>Остапченко Людмила Іванівна (UA),</b><br/><b>Хілько Тетяна Дмитрівна (UA),</b><br/><b>Якубцова Ірина Володимирівна (UA),</b><br/><b>Преображенська Тамара Дмитрівна (UA)</b></p> <p>(73) Власник(и):<br/><b>КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ</b><br/><b>УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА</b><br/><b>ШЕВЧЕНКА,</b><br/>вул. Володимирська, 60, м. Київ, 01601 (UA),<br/><b>Нікольська Валентина Василівна,</b><br/>бульвар Ігоря Шамо, 2/7, кв. 117, м. Київ, 02154 (UA),<br/><b>Остапченко Людмила Іванівна,</b><br/>вул. Костьольна, 3, кв. 7, м. Київ, 01001 (UA),<br/><b>Хілько Тетяна Дмитрівна,</b><br/>вул. Вифлеємська, 8, кв. 7, м. Київ, 02105 (UA),<br/><b>Якубцова Ірина Володимирівна,</b><br/>вул. Академіка Заболотного, 76, кв. 35, м. Київ, 03187 (UA),<br/><b>Преображенська Тамара Дмитрівна,</b><br/>просп. Комарова, 17-а, кв. 51, м. Київ, 03065 (UA)</p> |
|--|--|

**(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ПРЕПАРАТІВ TRIGONELLA FOENUM GRAECUM L. ЗА ВПЛИВОМ НА КУЛЬТУРИ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН**

**(57) Реферат:**

Спосіб визначення активності препаратів *Trigonella foenum graecum* L. полягає в визначенні впливу препаратів *Trigonella foenum graecum* L. на культури клітин і оцінюванні результатів по життєздатності клітин, причому як об'єкт впливу препаратів використовують культуру мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин, а результат впливу визначають по кількості живих клітин після культивування, яку оцінюють, вимірюючи оптичну густину розчину, екстрагованого із клітин барвника кристалічного фіолетового.

UA 117257 U



Корисна модель належить до медицини, а саме до галузі біотехнології, і може бути застосована для дослідження біологічно активних речовин та препаратів з метою визначення їх цитотоксичного або стимулюючого впливу на проліферуючі клітини *in vitro* в установах та лабораторіях, які займаються створенням нових сполук, що можуть бути перспективними при розробленні нових препаратів.

Використані терміни та скорочення:

МСК - мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини;

DMEM - Дульбекко модифіковане середовище Ігла (Dulbecco's Modified Eagle's Medium);

ЕТС - ембріональна теляча сироватка;

MTT - 3-(4,5-диметилтіазол-2-ил)-2,5-дифенілтетразоліумбромід.

Відомий спосіб визначення активності препаратів *Trigonella foenum graecum* L., що вибрано за найближчий аналог, полягає в тому, що клітини різних пухлинних культур висівають в 96-лунковий планшет при щільності 5000 клітин/лунку. Зразки інкубують при 37 °C протягом 72 і 96 годин в титрованому середовищі, що містить різні концентрації екстракту *Trigonella foenum graecum* L. Кількість життєздатних клітин оцінюють з MTT-методом [Alsemari A. The selective cytotoxic anti-cancer properties and proteomic analysis of *Trigonella foenum graecum*. BMC Complement Altern Med. 2014 Mar 29; 14:114].

Недоліками найближчого аналогу є дослідження активності препаратів лише на пухлинних клітинах, довготривалий термін проведення випробування, а саме висновки про результати дослідження отримують лише через 5-6 діб, мінімально через 3 доби. Крім того, для оцінювання використовується MTT-аналіз, який вимагає залучення дорогого реактиву. Для здійснення дослідження потрібно мати чи створювати банк перевивних культур, що потребує постійного підтримання культур в життєздатному стані або зберігання їх в кріосховищі.

В основу корисної моделі поставлено задачу, яка полягає в розробленні способу визначення активності препаратів *Trigonella foenum graecum* L. за впливом на культури мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (МСК) шляхом культивування МСК в поживному середовищі, в склад якого входять препарати, виготовлені із *Trigonella foenum graecum* L., в певній концентрації, що дозволить зафіксувати зміни у стані культивованих клітин і визначити цитотоксичну або стимулюючу активність досліджуваних препаратів. Вивчення впливу різних концентрацій препаратів, виготовлених із *Trigonella foenum graecum* L., на МСК дає можливість вивчати дію препаратів не тільки на пухлинні клітини, а і на нормальні стовбурові клітини, що застосовуються в сучасній тканинній інженерії.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі, який полягає в визначенні впливу препаратів *Trigonella foenum graecum* L. на культури різних пухлинних клітин (Т-клітинної лімфоми, В-клітинної лімфоми, папілярного раку щитовидної залози і раку, раку молочної залози), згідно з даною корисною моделлю, використовується культура мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (МСК). Мезенхімальні (стромальні) стовбурові клітини (МСК) дорослого організму поступово займають значне місце в клітинній терапії та регенеративній медицині завдяки їх плюрипотентності, тобто здатності диференціюватися в різні клітинні типи як *in vitro* під дією специфічних індукторів, так і після трансплантації в організм під дією мікрооточення.

Спосіб виконується наступним чином.

МСК отримують з тимусу мишей лінії C57BL/6 методом експлантатів. Для нарощування клітини культивують в середовищі DMEM/F12 (1:1) з додаванням 10 % ЕТС, 10 мМ L-глутаміну майже всі реактиви тут і далі - Sigma, США) і по 100 ОД/мл пеніциліну і стрептоміцину при 37 °C в 5 % атмосфері CO<sub>2</sub>. В лунки 96-лункового планшета вносять по 5000 МСК в 100 мкл поживного середовища.

Через 24 години додають по 100 мкл середовища, що містить 10-кратні розведення досліджуваних препаратів *Trigonella foenum graecum* L. Як контроль використовують культури з поживним середовищем. Через 24 години стан культур оцінюють морфологічно. Для кількісної оцінки інтенсивності впливу різних розведень досліджуваних препаратів на культури МСК тимусу до прикріплених до поверхні клітин додають по 50 мкл 0,1 % розчину кристалічного фіолетового, промивають водою, висушують та екстрагують барвник 100 мкл 3 % розчину оцтової кислоти. Потім вимірюють оптичну густину розчину в кожній лунці при 630 нм. Приймаючи оптичну густину контрольних лунок за 1, підраховують індекс цитотоксичної або стимулюючої дії різних розведень досліджуваних препаратів. Дані наведено в таблиці.

Таблиця

Індекс цитотоксичної і стимулюючої активності препаратів по їх впливу на МСК тимусу мишей

|      | Контроль | Розведення Trigonella Foenum-Graecum (водно-сольовий екстракт, III) |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                    |                   |                   |
|------|----------|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
|      |          | 10 <sup>-1</sup>  | 10 <sup>-2</sup> | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-4</sup> | 10 <sup>-5</sup> | 10 <sup>-6</sup> | 10 <sup>-7</sup> | 10 <sup>-8</sup> | 10 <sup>-9</sup>   | 10 <sup>-10</sup> | 10 <sup>-11</sup> |
| M    | 1,000    | 0,698   | 0,070            | 0,092            | 0,279            | 1,408            | 1,553            | 1,119            | 1,208            | 1,166              | 1,061             | 1,239             |
| ±m   | 0,042    | 0,052   | 0,005            | 0,005            | 0,023            | 0,039            | 0,089            | 0,057            | 0,118            | 0,124 <sub>1</sub> | 0,142             | 0,176             |
| n    | 21       | 8   | 8                | 8                | 11               | 11               | 12               | 4                | 4                | 4                  | 4                 | 4                 |
| min  | 0,618    | 0,481   | 0,052            | 0,075            | 0,147            | 1,184            | 1,184            | 1,006            | 0,880            | 0,870              | 0,744             | 0,859             |
| p(t) | -        | <0,001  | <0,001           | <0,001           | <0,001           | <0,001           | <0,001           | >0,05            | >0,05            | >0,05              | >0,05             | >0,05             |
| p(U) | -        | <0,001  | <0,001           | <0,001           | <0,001           | <0,001           | <0,001           | >0,05            | <0,05            | >0,05              | >0,05             | >0,05             |

Як видно з таблиці, препарат Trigonella foenum graecum L. (водно-сольовий екстракт, III) в перших 4-х розведеннях проявляє цитотоксичну дію, що змінюється активацією з 5-го по 7-е розведення.

Переваги способу:

Доступність тварин (мишей), необхідних для отримання первинних культур МСК тимусу. В потрібний час у тварин можна видалити тимуси, отримати культуру МСК і провести необхідні визначення.

Комплекс досліджень за нашим способом вкладається в 2 доби.

Для обліку результатів використовується не дорогий МТТ-аналіз, а спектрофотометричний метод, коли результат впливу досліджуваних препаратів визначають по кількості живих клітин після культивування, яку оцінюють, вимірюючи оптичну густину розчину екстрагованого із клітин барвника (кристалічного фіолетового).

Даний спосіб може бути впровадженим в установах та лабораторіях, які займаються створенням нових сполук, що можуть бути перспективними при розробленні нових препаратів; в експериментальних дослідженнях в галузі імунології та клітинної біології, а також у фармакології при створенні і тестуванні активності нових лікарських препаратів.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення активності препаратів Trigonella foenum graecum L., який полягає в визначенні впливу препаратів Trigonella foenum graecum L. на культури клітин і оцінюванні результатів по життєздатності клітин, який **відрізняється** тим, що як об'єкт впливу препаратів використовують культуру мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин, а результат впливу визначають по кількості живих клітин після культивування, яку оцінюють, вимірюючи оптичну густину розчину, екстрагованого із клітин барвника кристалічного фіолетового.

Комп'ютерна верстка О. Рябо

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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