



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **78706**

(13) **U**

(51) МПК

**C12N 1/02** (2006.01)

**C12N 5/07** (2010.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

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

(21) Номер заявки: **u 2012 11936**

(22) Дата подання заявки: **16.10.2012**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **25.03.2013**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **25.03.2013, Бюл.№ 6**

(72) Винахідник(и):

**Нікольська Валентина Василівна (UA),  
Нікольська Катерина Ігорівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ  
ГЕНЕТИЧНОЇ ТА РЕГЕНЕРАТИВНОЇ  
МЕДИЦИНИ НАМН УКРАЇНИ",  
вул. Вишгородська, 67, м. Київ, 04114 (UA)**

**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЖИВИЛЬНОГО АГАРОВОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ  
ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОЇ КОЛОНІЄУТВОРЮЮЧОЇ АКТИВНОСТІ ГЕМОПОЕТИЧНИХ  
СТОВБУРОВИХ КЛІТИН**

**(57) Реферат:**

Спосіб одержання живильного агарового середовища для дослідження гранулоцитарно-макрофагальної колонієутворюючої активності гемопоетичних стовбурових клітин включає отримання живильного середовища шляхом змішування поживного середовища з ембріональною телячою сироваткою, вітамінами, замінними і незамінними амінокислотами, піруватом натрію, L-глутаміном та додаванням розтопленого агару і змішуванням. Як поживне середовище використовують 10-кратний концентрат середовища Ігла MEM та додатково вводять NEPS-буфер, з подальшим змішуванням однієї частини 2-кратного концентрату живильного середовища, підігрітого до 39 °С, з однією частиною 0,6 % розчину агару тієї ж температури.

**UA 78706 U**



Корисна модель належить до біотехнології та медицини, а саме до способів одержання живильного агарового середовища для дослідження активності гемопоетичних стовбурових клітин, і може бути використана в гематології, трансплантології та експериментальній біології.

Відомий спосіб приготування поживного ростового середовища для культивування стромальних стовбурових клітин (Пат. № 15680U, МПК C12N 5/08, опубл. 17.07.2006, Бюл. № 7). Проте даний спосіб не відповідає потребам даного дослідження - не дозволяє виявляти активність гемопоетичних стовбурових клітин.

Відомий і спосіб одержання живильного агарового середовища для визначення кількості гранулоцитарно-макрофагальних колонієутворюючих одиниць гемопоетичних стовбурових клітин шляхом змішування наступних компонентів: середовище McCoy's 5A - 800 мл, ембріональна теляча сироватка - 150 мл,  $\text{NaHCO}_3$ , 7,5 % - 6 мл, піруват Na, 110 mM - 10 мл, MEM-вітаміни, 100× - 4 мл, MEM-амінокислоти, 50× - 8 мл, MEM-амінокислоти незамінні, 100× - 4 мл, MEM-глутамін, 200 mM - 4 мл. На другому етапі для одержання агарового середовища змішують 9 частин підігрітого до 37 °C рідкого живильного середовища з 1 частиною розтопленого на водяній бані при 100 °C 3 % розчину агару. Отримане таким чином середовище охолоджують до температури 39-40 °C і використовують в дослідженнях колонієутворюючої активності гемопоетичних стовбурових клітин (Pike B.L., Robinson W.A. Human Bone Marrow Colony Growth in Agar-gel // J.Cell.Physiol. - 1970. - V.76. - P. 77-84).

Недоліком такого способу є те, що на другому етапі необхідно підігріти рідку частину живильного середовища до 37 °C, а 3 % агаровий розчин - до 100 °C, і змішати. Отриману суміш охолоджують до температури 39-40 °C, яка є придатною для збереження життєздатності та функціональної активності досліджуваних клітин, але не нижче температури 38-37 °C, при якій відбувається желювання 0,3 % розчину агару. Такий процес досить трудомісткий, вимагає використання додаткового обладнання (термостата), а при охолодженні суміші до 39-40 °C неможливо точно проконтролювати необхідну температуру в умовах стерильності середовища.

В основу корисної моделі поставлена задача вдосконалення способу одержання живильного агарового середовища для дослідження гранулоцитарно-макрофагальної колонієутворюючої активності гемопоетичних стовбурових клітин шляхом підбору необхідної концентрації живильних компонентів, яка є оптимальною для збереження життєздатності і функціональної активності досліджуваних клітин, а розведення приготованого концентрату середовища розчином 0,6 % агару забезпечує збереження ізотонічності розчину солей у кінцевому середовищі та є більш зручним у використанні.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі, що включає отримання живильного середовища шляхом змішування поживного середовища з ембріональною телячою сироваткою, вітамінами, замінними і незамінними амінокислотами, піруватом натрію, L-глутаміном та подальшим додаванням розтопленого агару та змішуванням, згідно з корисною моделлю, як поживне середовище використовують 10-кратний концентрат середовища Ігла MEM (Minimum Essential Medium) та додатково вводять HEPES-буфер, з подальшим змішуванням однієї частини 2-кратного концентрату живильного середовища, підігрітого до 39 °C, з однією частинною 0,6 % розчину агару тієї ж температури.

До даного рішення автори прийшли, досліджуючи як концентрацію компонентів живильного середовища, так і умови його розведення агаром. Так додаткове введення в середовище HEPES-буферу підтримує фізіологічне значення pH. Розведення в 2 рази підігрітого до 39 °C 2-кратного концентрату живильного середовища з 0,6 % розчином агару, підігрітим до тієї ж температури, відновлює ізотонічність середовища, зберігаються оптимальні температура та концентрація компонентів, чим в подальшому забезпечуються оптимальні умови для підтримки життєздатності та функціонування клітин.

Спосіб здійснюється наступним чином.

Для отримання 2-кратного концентрату середовища, яке відповідає поставленим вимогам - ізотонічності розчину та оптимальній концентрації складових, змішують наступні компоненти середовища: середовище Ігла MEM, 10× - 85 мл, ембріональну телячу сироватку - 150 мл,  $\text{NaHCO}_3$ , 7,5 % - 6 мл, піруват Na, 110 mM - 10 мл, MEM-вітаміни, 100× - 4 мл, MEM-амінокислоти, 50× - 8 мл, MEM-амінокислоти незамінні, 100× - 4 мл, L-глутамін, 200 mM - 4 мл, HEPES Na - сіль, 1M - 10 мл,  $\text{H}_2\text{O}$  - 219 мл.

Безпосередньо перед застосуванням до однієї частини 2-кратного концентрату середовища, підігрітого до 39 °C, додають рівний об'єм розтопленого на водяній бані та охолодженого до 39 °C 0,6 % розчину агару, ретельно перемішують та використовують, додавши певну кількість (звичайно  $0,5 \times 10^5$ /мл) клітин, що тестуються.

Перевагою способу є технологія, що передбачає збереження ізотонічності розчину солей у кінцевому середовищі, забезпечення наявності всіх необхідних компонентів в оптимальній

концентрації, використання більш зручного в роботі 0,6 % розчину агару, одержання кінцевого середовища при оптимальній температурі для підтримки життєздатності та функціональної активності досліджуваних клітин.

Запропонований спосіб одержання живильного агарового середовища для дослідження гранулоцитарно-макрофагальної колонієутворюючої активності гемопоетичних стовбурових клітин може бути впроваджений у науково-дослідних лабораторіях в гематології, трансплантології та експериментальній біології при вивченні колонієутворюючої активності гемопоетичних клітин-попередників.

10

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання живильного агарового середовища для дослідження гранулоцитарно-макрофагальної колонієутворюючої активності гемопоетичних стовбурових клітин, що включає отримання живильного середовища шляхом змішування поживного середовища з ембріональною телячою сироваткою, вітамінами, замінними і незамінними амінокислотами, піруватом натрію, L-глутаміном та додаванням розтопленого агару і змішуванням, який відрізняється тим, що як поживне середовище використовують 10-кратний концентрат середовища Ігла MEM та додатково вводять HEPES-буфер, з подальшим змішуванням однієї частини 2-кратного концентрату живильного середовища, підігрітого до 39 °С, з однією частиною 0,6 % розчину агару тієї ж температури.

---

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

---

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

---

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