



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 86877

(13) U

(51) МПК

C12N 5/02 (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 09669**

(22) Дата подання заявки: **02.08.2013**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **10.01.2014**

(46) Публікація відомостей **10.01.2014, Бюл.№ 1**  
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Лукаш Любов Леонідівна (UA),  
Лебедєва Єлизавета Олегівна (UA),  
Рубан Тетяна Афанасіївна (UA),  
Сухорада Олена Михайлівна (UA),  
Коломієць Юрій Миколайович (UA)**

(73) Власник(и):

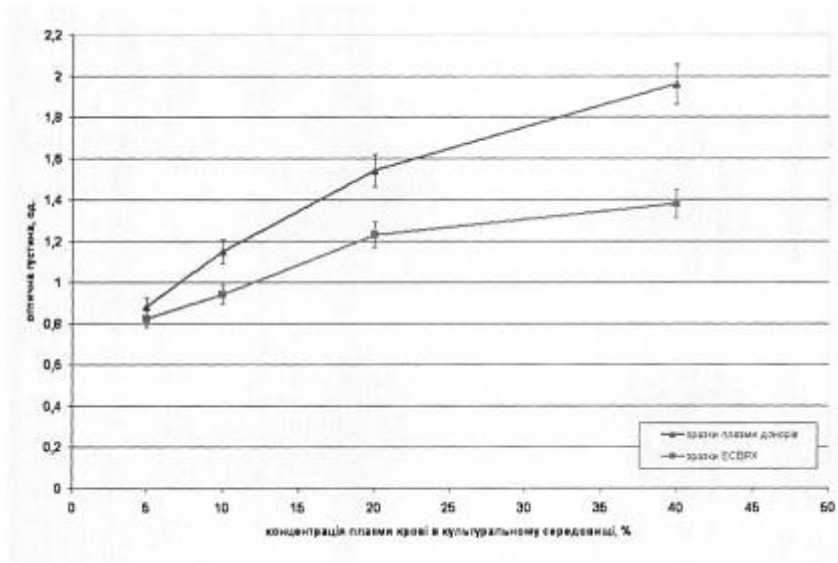
**ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ ТА  
ГЕНЕТИКИ НАН УКРАЇНИ,  
вул. Академіка Заболотного, 150, м. Київ,  
03680 (UA),  
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "НАЦІОНАЛЬНИЙ  
ІНСТИТУТ СЕРЦЕВО-СУДИННОЇ ХІРУРГІЇ  
ІМ. М.М. АМОСОВА НАЦІОНАЛЬНОЇ  
АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ",  
вул. М. Амосова, 6, м. Київ-110, 03680 (UA)**

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ РОСТОВИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПЛАЗМИ КРОВІ ЛЮДИНИ

(57) Реферат:

Спосіб визначення ростових властивостей плазми крові людини включає пасивування стандартизованої лінії клітин, із зразком досліджуваної крові з подальшою інкубацією і визначенням ростових властивостей. Як середовище застосовують плазму крові людей, взятую натщесерце, у концентрації в межах 2,5-20 %, в плазму вносять тестерну клітинну лінію 4BL у 96-ямкові планшети, клітини 4BL знімають з поверхні скла планшетів за допомогою Трипсину і Версену у співвідношенні 1:1. Потім клітини забарвлюють 0,2 % трипановим синім, підраховують в камері Горяєва і розводять у культуральному середовищі до концентрації 100 тис./мл. Клітини із зразками плазми культивували 72 години в CO<sub>2</sub>-інкубаторі, далі в кожен ямку додають по 15 мкл розчину барвника тіазолілу блакитного тетразоліуму броміду, клітини з барвником інкубують протягом 4 годин при 37 °С, клітини під час тестування не відмивають і розчин з ямок не видаляють. Потім додають у ямки по 200 мкл диметилсульфоксиду (ДМСО) і безперервно перемішують культуральне середовище мікропіпеткою до повного екстрагування барвника з клітин, визначають ростові властивості плазми крові людини шляхом вимірювання оптичної густини за допомогою спектрофотометра для мікропланшетів при 570 нм.

UA 86877 U



Фіг. 1

Корисна модель належить до медицини, зокрема до лабораторної діагностики та розробки нових діагностичних тестів з використанням малих об'ємів (мінімум 1 мл) крові пацієнтів та може бути використана у кардіології в діагностичних цілях.

Плазма є молекулярним дзеркалом стану всіх органів і тканин організму, містить маркери різних захворювань та інфекційних процесів. Тому діагностика з використанням плазми крові є напрямком, що розвивається найшвидше у всьому світі. Існує понад тисячу найменувань різних аналізів з використанням плазми: біохімічних, імунохімічних, мікробіологічних, вірусологічних, молекулярно-біологічних.

Відомий спосіб визначення ростових властивостей сироватки великої рогатої худоби (RU1632037, МПК C12N 5/02, дата публікації: 15.11.1994), що включає пасивування стандартизованої лінії клітин тварин, що перевиваються, в середовищі із зразком неінактивованої і досліджуваної сироватки великої рогатої худоби з подальшою інкубацією і визначенням індексу проліферації (ростових властивостей) на рівні останнього пасажу, що характеризується тим, що як стандартизовану лінію клітин застосовують лінію клітин нирок теляти Таурус-1, що перевиваються, після попередньої 3-4-денної інкубації, використовуючи на перший посів  $2 \pm 1 \times 10^6$  клітин на 1 мл середовища, і проводять 5 послідовних пасажів.

Даний відомий спосіб не адаптований для людини та не підходить для діагностики кардіологічних захворювань людини.

Технічною задачею є одержання простого способу оцінки ростових властивостей зразків плазми крові людини, за допомогою якого у короткі терміни можна визначити кількість життєздатних клітин при вирощуванні їх в культуральному середовищі, в якому один із основних компонентів, стандартна ембріональна сироватка великої рогатої худоби (ЕСВРХ), замінений на досліджувані зразки плазми крові людини. Основна ідея способу оцінки ростових властивостей плазми крові полягає у заміні одного із найважливіших компонентів стандартного культурального середовища, ЕСВРХ на зразки плазми крові людини, що тестуються, наступному вирощуванні клітин людини у цьому середовищі і визначенні кількості життєздатних клітин.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб визначення ростових властивостей плазми крові людини включає пасивування стандартизованої лінії клітин, із зразком досліджуваної крові з подальшою інкубацією і визначенням ростових властивостей. Новим у способі є те, що як середовище застосовують плазму крові людей, взятую натщесерце, у концентрації в межах 2,5-20 %, в плазму вносять тестерну клітинну лінію 4BL у 96-лункові планшети, клітини 4BL знімають з поверхні скла планшетів за допомогою Трипсину і Версену у співвідношенні 1:1, потім клітини забарвлюють 0,2 % трипановим синім, підраховують в камері Горяєва і розводять у культуральному середовищі до концентрації 100 тис./мл, клітини із зразками плазми культивували 72 години в CO<sub>2</sub>-інкубаторі, далі в кожен лунку додають по 15 мкл розчину барвника тіазолілу блакитного тетразоліуму броміду, клітини з барвником інкубують протягом 4 годин при 37° С, клітини під час тестування не відмивають і розчин з лунок не видаляють, потім додають у лунки по 200 мкл диметилсульфоксиду (ДМСО) і безперервно перемішують культуральне середовище мікропіпеткою до повного екстрагування барвника з клітин, визначають ростові властивості плазми крові людини шляхом вимірювання оптичної густини за допомогою спектрофотометра для мікропланшетів при 570 нм.

Інактивацію плазми здійснюють прогріванням її в термостаті протягом 30 хв. при t 60 °С.

Перелік графічних зображень:

На Фіг. 1 зображено порівняння ростових властивостей зразків плазми крові донорів та стандартної ембріональної сироватки великої рогатої худоби (ЕСВРХ) з використанням шестерної лінії клітин людини 4BL.

На Фіг. 2 зображено порівняння ростових властивостей зразків плазми крові донорів, взятих натщесерце та після їжі.

На Фіг. 3 зображено порівняння ростових властивостей зразків нативної та інактивованої нагріванням плазми крові донорів.

На Фіг. 4 зображено порівняння ростових властивостей зразків плазми крові пацієнтів двох вікових груп з серцево-судинною патологією.

На Фіг. 5 зображено моношар клітин людини 4BL при культивуванні в середовищі з 10 % плазми.

На Фіг. 6 зображено утворення агрегатів при культивуванні з 40 % плазми.

Приклад застосування способу:

Оцінку ростових властивостей плазми крові людини проводили з використанням клітин лінії 4BL, яку одержали із периферійної крові здорового донора у відділі генетики людини ІМБГ НАНУ [1]. Клітини цієї лінії є чутливими до ростових факторів сироватки і плазми крові, здатні

росту в умовах стандартної моношарової культури. Визначено, що клітини на стадії стабілізації проявляють більшу чутливість до ростових факторів сироватки і плазми крові, ніж на стадії становлення або структурної нестабільності. Тому для тестування використовували культури після 180 пасажу на 24-й годині росту. Клітини вирощували в середовищі DMEM (dulbecco's modified eagle's medium, Sigma, США) з додаванням 10 % ембріональної сироватки великої рогатої худоби (фірма "PAA", Австрія), 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, в CO<sub>2</sub>-інкубаторі при t 37 °C, 4 % CO<sub>2</sub> та 80 % вологості.

Кров для проведення тестування одержували від здорових донорів зі станції переливання крові, а кров від пацієнтів кардіологічного профілю - з Національного інституту серцево-судинної хірургії ім. М.М. Амосова. Кров знаходилась у спеціальних лабораторних пробірках в антикоагуляційному стані завдяки додаванню гепарину. Для одержання плазми кров інкубували 30 хв. при t 37 °C, а потім центрифугували 15 хв. при 1,5 тис. об/хв. Плазму (надосад) використовували одразу після одержання або після її криоконсервації. Заморожування плазми проводили при t -20 °C, розморожували при кімнатній температурі. Інактивацію плазми здійснювали прогріванням її в термостаті протягом 30 хв. при t 60 °C.

Пропонований спосіб визначення ростових властивостей плазми проводили з використанням 96-лункових планшетів згідно з протоколом фірми Промега [2]. Тестування проводили наступним чином. Клітини 4BL знімали з поверхні скла за допомогою Трипсину і Версену у співвідношенні 1:1. Для визначення життєздатних клітин їх забарвлювали 0,2 % трипановим синім, підраховували в камері Горяєва і розводили в культуральному середовищі до концентрації 100 тис/мл. Потім в кожен лунку 96-ти лункового планшета вносили по 50 мкл середовища з різною концентрацією 2,5-20 % плазми крові здорових донорів або пацієнтів.

В контрольні лунки (за відомою методикою) додавали культуральне середовище із стандартною ЕСВРХ в таких же концентраціях. В кожен лунку вносили по 5 тис. клітин в 50 мкл середовища без плазми та сироватки. Сумарний об'єм вмісту лунки складав 100 мкл.

Після 72 годин культивування клітин із зразками плазми в CO<sub>2</sub>-інкубаторі в кожен лунку додавали по 15 мкл розчину барвника тіазолілу блакитного тетразоліуму броміду (розчин МТТ). МТТ розчиняли в фосфатно-сольовому буферному розчині (PBS) у концентрації 5 мг/мл, розчин фільтрували через фільтри з порами 0,2 мкм та зберігали в замороженому стані при -20 °C. Клітини з барвником інкубували протягом 4 годин при 37 °C. Клітини під час тестування не відмивали і розчин з лунок не видаляли. Потім додавали у лунки по 200 мкл диметилсульфоксиду (ДМСО, Sigma, США) і безперервно перемішували культуральне середовище мікропіпеткою до повного екстрагування барвника з клітин. Кожну точку досліджували в трьох повторях. Вимірювання оптичної густини проводили на спектрофотометрі для мікропланшетів (MR 700 Microplate Reader, "Dynatech" Великобританія) при 570 нм. Статистичну обробку даних проводили в програмах Excel, Statistica.

Результати досліджень ростових властивостей зразків плазми крові людини представлені у вигляді графіків (Фіг. 1-4).

У даному випадку порівнювали ростові властивості зразків плазми крові донорів і стандартної ЕСВРХ, яку використовують при культивуванні клітин (Фіг.1). За результатами серії дослідів показано, що плазма крові донорів при концентрації від 10 до 40 % статистично достовірно перевищувала ростові властивості ЕСВРХ. Це пояснюється тим, що для клітин людини гомологічна плазма крові є більш адекватним джерелом ростових факторів, ніж ЕСВРХ.

Порівнюючи ростові властивості зразків плазми крові донорів, які взято натщесерце і після прийняття їжі виявлено статистично достовірну різницю при всіх досліджуваних концентраціях (Фіг. 2). Показано перевищення показників при всіх концентраціях плазми донорів за умов прийняття їжі. Ймовірно, цей ефект пов'язаний з впливом ростових факторів і біологічно активних речовин, які надходять у крові після приймання їжі. Проаналізувавши криві росту, ми дійшли висновку, що кров пацієнтів і донорів потрібно брати в дослід лише натщесерце для отримання адекватних даних.

Проводили порівняння ростових властивостей зразків нативної та інактивованої нагріванням при 60 °C плазми крові здорових донорів (Фіг. 3). Виявлена стимуляція проліферації клітин із збільшенням вмісту плазми крові від 2,5 до 20 % у культуральному середовищі при тестуванні як нативної, так і інактивованої плазми. Проте при використанні нативної плазми крові при всіх досліджених концентраціях було отримано достовірно вищі показники кількості клітин порівняно з інактивованою.

Проводили порівняння ростових властивостей зразків плазми крові пацієнтів двох вікових груп, до яких входили по 10 індивідумів з однаковою серцево-судинною патологією (Фіг. 4). Перша група складалася з пацієнтів 40-50-літнього, а друга - з пацієнтів 60-70-літнього віку. Виявилось, що при всіх досліджених концентраціях плазми показники кількості клітин були

вищими для зразків плазми крові пацієнтів молодшого віку. Аналогічні спостереження зроблено і при дослідженні зразків крові донорів 30-ти та 40-50-літнього віку (дані не представлені на Фіг). Слід відзначити, що у всіх наших дослідженнях чітко простежується пряма залежність кількості вирощених клітин від концентрації плазми крові в культуральному середовищі.

5       Аналіз сукупності експериментальних результатів свідчить про те, що при досягненні 40 % концентрації плазми у культуральному середовищі часто спостерігається формування агрегатів клітин, що здатні відкріплюватись від поверхні культурального флакона (Фіг. 5).

10       Це може пояснюватись недостатністю вільної поверхні при досягненні клітинами конфлюентного моношару та/або перевищенням необхідних концентрацій біологічно активних речовин, оптимальних для росту і життєдіяльності клітин тестерної лінії 4BL. Тому оптимальним діапазоном концентрацій плазми в культуральному середовищі при тестуванні вважаємо 2,5-20 %.

На основі одержаних даних зроблено наступні висновки.

15       1. Ростові властивості плазми крові здорових донорів статистично достовірно вищі, ніж ростові властивості ембріональної сироватки великої рогатої худоби, яку використовують при стандартному культивуванні клітин *in vitro*.

2. Показано підвищені ростові властивості зразків плазми крові здорових донорів після прийому їжі порівняно з умовами натщесерце. Це вказує на необхідність проведення тестування зразків плазми натщесерце для одержання адекватних даних.

20       3. Інактивація зразків плазми крові протягом 30 хв. при 60 °C призводить до статистично достовірного зниження ростових властивостей плазми.

4. Порівняння ростових властивостей зразків плазми крові пацієнтів різного віку показало, що показники ростових властивостей у 40-50-річних пацієнтів значно вищі, ніж у літніх пацієнтів (60-70 років).

25       5. Оптимальним діапазоном концентрацій зразків плазми крові здорових донорів і пацієнтів, що тестуються з використанням тестерної клітинної лінії 4BL, прийнято 2,5-20 %.

30       Таким чином, запропонований спосіб тестування дозволяє у відносно короткі терміни одержати дані по ростових властивостях зразків плазми крові людини, які можна використовувати при діагностуванні пацієнтів. Спосіб, що пропонується, є економічним та доступним і може бути використаний як експрес-діагностика при скринінгу захворювань, пов'язаних із підвищеним вмістом ростових факторів або зменшеним вмістом інгібіторів в плазмі крові людини. Одержані дані можуть вказати на необхідність розширення межі діагностичного пошуку.

Джерела інформації:

35       1. Лукаш Л.Л., Яцишина А.П., Кушнирук В.О., Пидпала О.В. Репрограммирование соматических клеток взрослого человека *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів, т. II - К.: Логос.-2011. – С. 493-498.

40       2. Promega Corp. 2800 Woods Hollow Rd., Madison, WI 53711. USA. t 16082744330, 8003569526, 8003561970; +1608277 2601. custserv(5),promega.com www.promega.com Набор для изучения клеточной пролиферации; изучение цитотоксичности; перенос ДНК; эндотелиальные клетки; трансфекция гена; факторы роста; иммортализация; реактивы для молекулярной биологии.

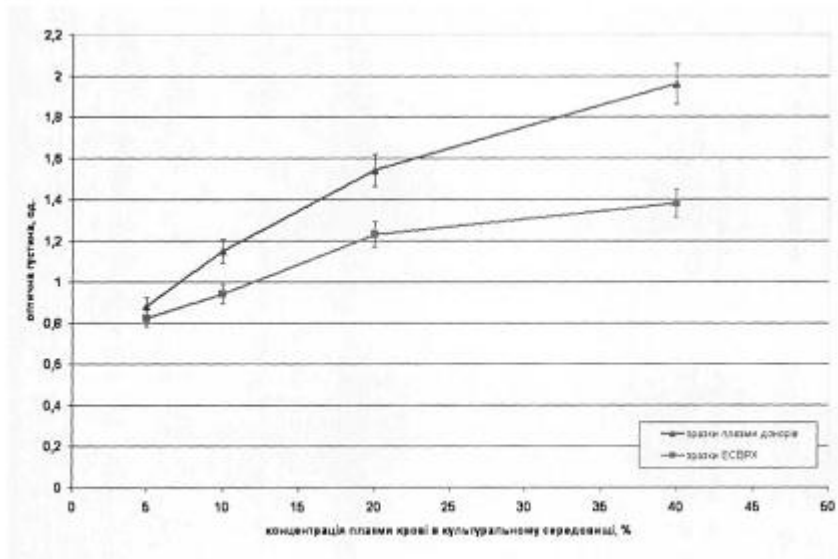
#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

45

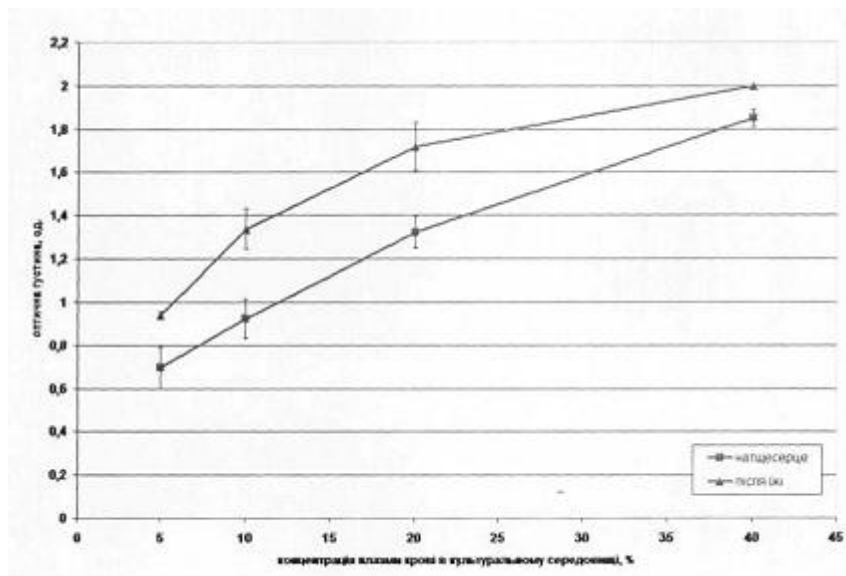
1. Спосіб визначення ростових властивостей плазми крові людини, що включає пасивування стандартизованої лінії клітин, із зразком досліджуваної крові з подальшою інкубацією і визначенням ростових властивостей, який **відрізняється** тим, що як середовище застосовують плазму крові людей, взяту натщесерце, у концентрації в межах 2,5-20 %, в плазму вносять тестерну клітинну лінію 4BL у 96-ямкові планшети, клітини 4BL знімають з поверхні скла планшетів за допомогою Трипсину і Версену у співвідношенні 1:1, потім клітини забарвлюють 0,2 % трипановим синім, підраховують в камері Горяєва і розводять у культуральному середовищі до концентрації 100 тис./мл, клітини із зразками плазми культивували 72 години в СО<sub>2</sub>-інкубаторі, далі в кожен ямок додають по 15 мкл розчину барвника тіазолілу блакитного тетразоліуму броміду, клітини з барвником інкубують протягом 4 годин при 37 °C, клітини під час тестування не відмивають і розчин з ямок не видаляють, потім додають у ямки по 200 мкл диметилсульфоксиду (ДМСО) і безперервно перемішують культуральне середовище мікропіпеткою до повного екстрагування барвника з клітин, визначають ростові властивості

плазми крові людини шляхом вимірювання оптичної густини за допомогою спектрофотометра для мікропланшетів при 570 нм.

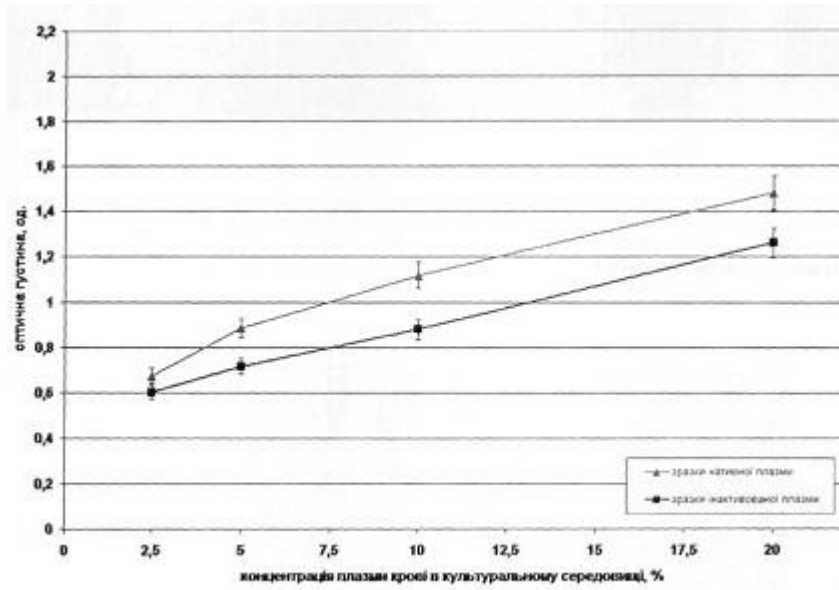
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що інактивацію плазми здійснюють прогріванням її в термостаті протягом 30 хв. при  $t$  60 °С.



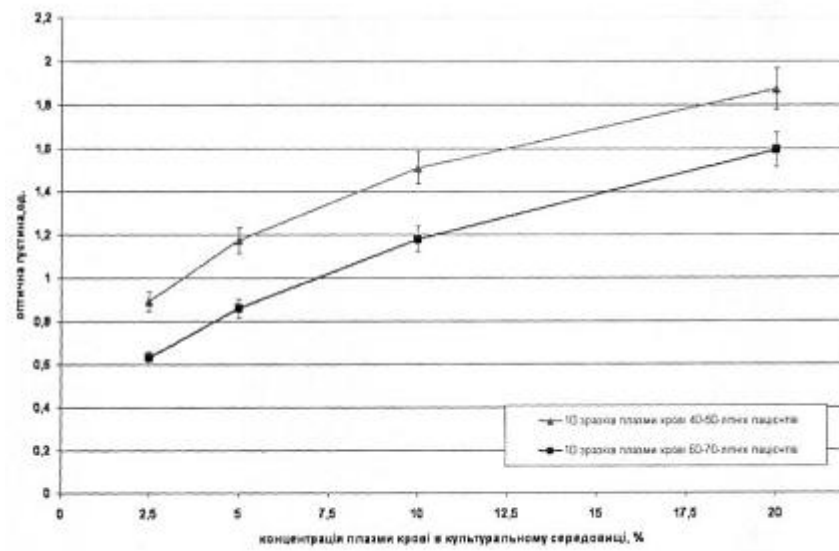
Фіг. 1



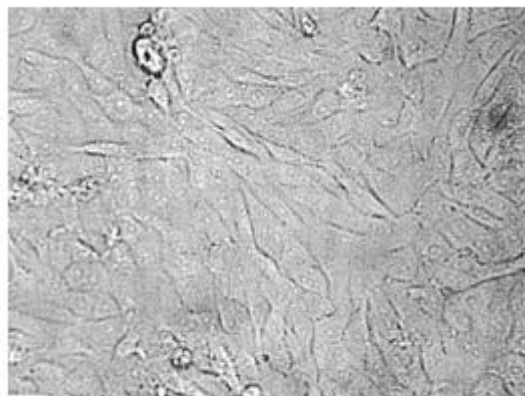
Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5

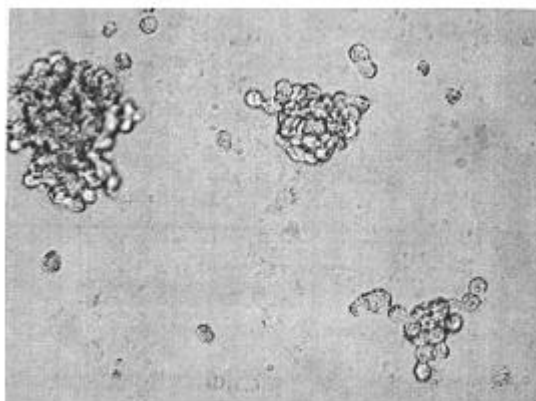


Fig. 6

---

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