



УКРАЇНА

(19) UA (11) 18444 (13) U
(51) МПК (2006)
A61B 19/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ТА КУЛЬТИВУВАННЯ ФІБРОПЛАСТІВ ТА МІОГЕННИХ КЛІТИН НОВОНАРОДЖЕНИХ ЩУРІВ

1

2

(21) u200604379

(22) 19.04.2006

(24) 15.11.2006

(46) 15.11.2006, Бюл. № 11, 2006 р.

(72) Чоботько Григорій Михайлович, Лавренчук Галина Йосипівна, Серкіз Ярослав Іванович, Бурдюк Людмила Сергіївна

(73) НАУКОВИЙ ЦЕНТР РАДІАЦІЙНОЇ МЕДИЦИНИ АМН УКРАЇНИ

(57) 1. Спосіб отримання та культивування фібробластів та міогенних клітин новонароджених щурів, що включає отримання в асептичних умовах субстрату із скелетно-м'язової тканини, відмивання від крові розчином Хенкса з додаванням гентаміцину із розрахунку 10мкг/мл, механічного подрібнення та розміщення в суміші для диспергування з подальшим відмиванням від суміші для диспергування, розміщенням у культуральній суміші і культивуванням 5-7 діб, який **відрізняється** тим, що як компоненти суміші для диспергування вико-

ристані 0,25% розчин трипсину, розчин версену та гентаміцин.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що розчини трипсину і версену беруть в співвідношенні 1:1, а гентаміцину із розрахунку 10мкг/мл.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що фрагменти тканини інкубують протягом 40 хвилин на магнітному змішувачі з подальшим видаленням першої порції, далі знову додають суміш для диспергування, інкубують 20 хвилин.

4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що суспензію клітин відмивають від суміші для диспергування центрифугуванням протягом 5 хв при 1000об/хв та вміщують в культуральну суміш складу: середовище RPMI - 1640 та теляча ембріональна сироватка в співвідношенні 9:1 з додаванням гентаміцину із розрахунку 10мкг/мл.

5. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що подальше культивування проводять 5-7 діб при температурі 36,8°C.

Спосіб отримання та культивування фібробластів та міогенних клітин 1-2 - денних новонароджених щурів, відноситься до області біології, зокрема до досліджень в експериментальній біології і може бути використаний як в цитології, ембріології, так і в експериментальній фармакології. Найбільш близьким по технічній суті до даного способу, є спосіб культивування міогенних клітин ембріонів щурів [К.И.Пыльдове «О росте и превращении так называемой «кожно-мышечной ткани» в однослойной трипсинизированой культуре/ Архив анатомии, гистологии, эмбриологии, 1963, XLY, вып.,10»] шляхом видалення в асептичних умовах ембріонів, отримання скелетно-м'язової тушки, відмивання від крові розчином Хенкса з додаванням пеніциліну та стрептоміцину по 500од. в 1мл розчину, механічного подрібнення з подальшим розміщенням в суміші для диспергування, потім відмиванням від суміші для диспергування, розміщенням у культуральну суміш і культивуванням 5-7 діб при температурі 37°C. При цьому використовували суміш для диспергування наступного складу: се-

редовище 199, 0,25% розчин трипсину у співвідношенні 1:1,5, а культуральне середовище складалось із середовища 199, гідролізату лактальбуміну та сироватки великої рогатої худоби у співвідношенні 4,5:4,5:1 та антибіотиків (пеніцилін та стрептоміцин по 500од. в 1мл розчину).

Недоліками цього способу є втрата тварини (самки) при видаленні ембріонів, використання розчину трипсину для диспергування викликає недостатнє роз'єднання клітин та швидку їх агрегацію в конгломерати при перенесенні в культуральне середовище а використання пеніциліну та стрептоміцину, до яких більшість мікроорганізмів резистентна, зменшує міру захисту від інфекційних агентів, що призводить до втрати експерименту.

В основу корисної моделі поставлено завдання створення та удосконалення способу отримання фібробластів та міогенних клітин 1-2-х денних новонароджених щурів шляхом отримання в асептичних умовах скелетно-м'язової тушки новонароджених щурів, відмивання від крові розчином Хенкса з додаванням гентаміцину із розрахунку

(13) U

(11) 18444

(19) UA

10мкг/мл, механічного подрібнення з подальшим розміщенням в суміші для диспергування, потім відмиванням від суміші для диспергування, розміщенням у культуральну суміш і культивуванням 5-7 діб.

Суть способу отримання та культивування первинних культур полягає в тому, що для отримання міогенних клітин новонароджених щурят дезінфікували в 70° етиловому спирті, декапітували та проводили девісцерацію з видаленням шкіри. Тушки після трьохкратного відмивання від формених елементів крові в розчині Хенкса з антибіотиками (гентаміцин із розрахунку 10мкг/мл), подрібнювали ножицями. Подрібнену таким чином тканину для дезагрегації переносили в колбу з розчином для диспергування. Співвідношення тканини і розчину складало 1:3. В якості розчину для диспергування використовували суміш 0,25% розчин трипсину та розчин версену в співвідношенні 1:1 з додаванням гентаміцину із розрахунку 10мкг/мл. Диспергування проводили на магнітному змішувачі при температурі 37°C протягом 40 хвилин з двократною зміною розчину для диспергування для видалення крові. Далі клітинну завесь піддавали повторному диспергуванню: кожні 10 хвилин суміш зливали в центрифужні пробірки та центрифугували при 1000об/хв протягом 5хв. Далі осад ресуспендували поживним середовищем складу: середовище RPMI - 1640, ембріональна теляча сироватка у співвідношенні 9:1 та гентаміцин із розрахунку 10мкг/мл та поміщали в стерильний посуд. Таку маніпуляцію проводили стільки разів поки не отримували необхідну кількість клітин. Підрахунок клітин проводили в камері Горяєва. Клітини після диспергування збирали в окремий

стерильний посуд для того, щоб при посадці в культуральних флаконах була однакова початкова кількість клітин. На другу добу культивування проводили заміну поживного середовища і в подальшому культивували без змін.

Новим у способі, що заявляється, є те, що використовували 1-2-х денних новонароджених щурят, що зберігало життя самці, в якості компонентів суміші для диспергування використовували 0,25% розчин трипсину та розчин версену в співвідношенні 1:1 і гентаміцин із розрахунку 10мкг/мл, фрагменти тканини інкубують протягом 40 хвилин на магнітному змішувачі при температурі 37°C, першу порцію суміші, яка містить багато формених елементів крові, зливають, осад заливають свіжим розчином для диспергування, знову інкубують 20 хвилин і тільки тоді вже відбирають клітинну завесь в центрифужні пробірки, центрифугують при 1000об/хв протягом 5хв, надосадкову рідину зливають, а осад ресуспендують в поживному середовищі складу: середовище RPMI - 1640, ембріональна теляча сироватка у співвідношенні 9:1 та гентаміцин із розрахунку 10мкг/мл та поміщають в стерильний посуд.

Використання розчину версену як одного з компонентів суміші для диспергування дозволяє добитися ретельного розділення тканин на фрагменти і видалення продуктів життєдіяльності клітин, оскільки розчин версену потенціює дію розчину трипсину та знижує здатність клітин до агрегації. Використання гентаміцину надає можливість знищення більш широкого спектра інфекційних агентів, і в той же час концентрація антибіотика, що використовується, є порівняно малотоксичною для клітин культури.