



УКРАЇНА

(19) UA (11) 25661 (13) U

(51) МПК (2006)

G01N 33/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПАСИВУВАННЯ КЛІТИННОЇ КУЛЬТУРИ L929

1

2

(21) u200705527

(22) 21.05.2007

(24) 10.08.2007

(46) 10.08.2007, Бюл. № 12, 2007 р.

(72) Мавров Іван Іванович, Джораєва Світлана
Кар'ягдівна, Кутова Валентина Василівна, Гон-
чаренко Валентина Василівна, Щоголева Олена
Володимирівна(73) ІНСТИТУТ ДЕРМАТОЛОГІЇ ТА ВЕНЕРОЛОГІЇ
АМН УКРАЇНИ(57) Спосіб пасивування перещеплюваної клітин-
ної культури L929, який включає застосування від-
кріплюючих агентів, який **відрізняється** тим, що
як відкріплюючий агент використовують 3% розчин
альбуциду упродовж 5 хвилин при температурі
25°C.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до мікробіології, й може бути використаною для пасивування перещеплюваної клітинної лінії L929, яка використовується для діагностичного виділення збудника хламідіозів.

Перещеплювані клітинні лінії застосовуються у мікробіологічній практиці з метою діагностичного відділення збудників різних інфекцій, як найбільш вдала модель взаємодії між клітиною та паразитом, у тому числі між клітиною та хламідіями. Клітинна лінія L929 є універсальною у тому сенсі, що дозволяє проводити діагностичне виділення хламідій не тільки з різних ділянок сечостатевого тракту, а й з екстрагенітальних вогнищ. Стан клітинної культури, яка використовується для діагностичного виділення збудника має вирішальний характер [Кутова В.В., Джораєва С.К. Досвід виділення хламідій у культурі клітин // Дерматологія та венерологія. - 2004. - №2 (24). - С.81-84].

Перещеплювані клітинні лінії культивують у виді суспензій або у вигляді одношарових культур на поверхні скла у культуральних флаконах. У останньому випадку необхідно проводити систематичні пасажі клітин, використовуючи для цього культури з попереднього пересіву або музейні клітини, які зберігаються в умовах кріоконсервування [Кутова В.В., Рудик С.К., Гончаренко В.В., Щоголева Е.В. Отличительные особенности различных линий перевиваемых клеточных культур в диагностике хламидиозов. // Иммунология та алергология. - 2002. - №3. - С.53].

Традиційно пасивування клітин здійснювалось за допомогою 0,05% розчину хімопсину, 0,02-0,04% розчину версену, 0,25% розчину трипсину, або суміші останніх у поєднанні 3:1 у якості аген-

тів, які сприяють відкріпленню клітин від поверхні культурального флакона. У культуральний флакон з формованим моношаром клітин вносять один з цих розчинів на 5-7 хвилин і залишають при температурі 35°C. Після розпушення моношару розчин відкріплюючого агенту обережно видаляють, клітини ресуспендують у свіжому середовищі та переносять до поживного середовища з розрахунку $2-2,5 \times 10^5$ клітин/мл. Цей метод дозволяє швидко відділити клітини від поверхні флакона з метою подальшого пасивування [Голубев Д.В., Сомнина А.А., Медведева М.Н. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии. Л., "Медицина", 1976, с.49-51].

Відомий спосіб є найбільш близьким до того, що заявляється по технічній суті та очікуваному результату, який може бути досягнутим до того, що заявляється, тому його обрано у якості прототипу.

Даний спосіб пасивування є єдиний та широко використовується у мікробіологічній практиці для накопичення, зберігання клітин та діагностики різних інфекцій з застосуванням даної клітинної лінії.

В основу корисної моделі покладена задача розширення арсеналу засобів, що використовуються для пасивування клітин L929.

Задачу, яку покладено в основу корисної моделі вирішують тим, що у відомому способі пасивування клітинної лінії L929, який включає застосування відкріплюючих агентів у якості такого відкріплюючого агенту, згідно корисної моделі використовують 3% розчин альбуциду упродовж 5 хвилин при кімнатній температурі.

Технічний результат корисної моделі полягає в тому, що після пасивування зразка клітин лінії

(13) U

(11) 25661

(19) UA

L929 з використанням альбучиду, його якість залишається достатньо високою, яка задовольняє спеціалістів.

Вибір альбучиду у якості відкріплюючого агенту обумовлено такими його відомими властивостями як бактерицидна та бактериостатична дія по відношенню до різних груп мікроорганізмів, низька цитотоксична дія по відношенню до клітин.

Спосіб виконують таким чином: Після створення моношару клітинною лінією L929 ростове середовище видаляють, клітини оброблюють 3% розчином альбучиду (20% розчин сульфацилу

натрію розводиться середовищем 199 безпосередньо перед застосуванням, рН 7,6-7,8). Після 5 хвилинної експозиції при кімнатній температурі, альбучид обережно, не пошкоджуючи клітинного моношару видаляють, клітини ресуспендують у ростовому середовищі і вносять у свіже поживне середовище з розрахунку $2-2,5 \times 10^5$ клітин/мл, після чого поміщують у термостат при температурі 35°C.

Кількісні характеристики цього агента були визначені дослідним шляхом. Дані представлені в таблиці №1.

Таблиця 1

Порівняльна характеристика використання версен-трипсинової суміші та альбучиду для пасивування клітинної лінії L929

Назва показнику	Використання 3% розчину альбучиду	Використання версен-трипсинової суміші	P
Час, необхідний для відшарування моношару від поверхні скла	5 хвилин при 25°C	5 хвилин при 35°C	
Час, необхідний для формування клітинного моношару	24 години	48 годин	
Мітотичний індекс культури (на 1000 клітин)	54,7±2,6	29,6±0,1	P<0,02
Зберігаємість клітин без заміни середовища	7 діб	6 діб	

Ефективність способу, що замовляється ілюструють наступні приклади його використання.

Приклад 1

Клітини лінії L929 засівають у культуральні флакони об'ємом 250мл на поживне середовище 199-50мл з додатковим внесенням 3% ембріональної телячої сироватки, розчину гентаміцину у концентрації 100мкг/мл та амфотерицину В у концентрації 2,5мкг/мл при посівній концентрації $2-2,5 \times 10^5$ клітин/мл. Культуральні флакони поміщують у термостат при температурі 35°C. Після формування моношару клітин лінії L929, поживне середовище видаляють за допомогою мірної піпетки об'ємом 10мл та вносять 5мл суміші 0,02% розчину версену і 0,25% розчину трипсину у поєднанні 3:1 на 5 хвилин при температурі 35°C для відшарування клітин. Після розпушення моношару клітин, суміш 0,02% розчину версену і 0,25% розчину трипсину не пошкоджуючи моношар видаляють за допомогою піпетки об'ємом 5мл, клітини ресуспендують у 5мл свіжого поживного середовища та засівають у нові культуральні флакони при посівній концентрації $2-2,5 \times 10^5$ клітин/мл та поміщують у термостат при температурі 35°C. Час, необхідний для формування моношару дорівнював 48 годин, мітотичний індекс культури складав 29,6.

Приклад 2

Клітини лінії L929 засівають у культуральні флакони об'ємом 250мл на поживне середовище 199-50мл з додатковим внесенням 3% ембріона-

льної телячої сироватки, розчину гентаміцину у концентрації 100мкг/мл та амфотерицину В у концентрації 2,5мкг/мл при посівній концентрації $2-2,5 \times 10^5$ клітин/мл. Культуральні флакони поміщують у термостат при температурі 35°C. Після формування моношару клітин лінії L929, поживне середовище видаляють за допомогою мірної піпетки об'ємом 10мл та вносять 5мл 3% розчину альбучиду на 5 хвилин при температурі 25°C для відшарування клітин. Після розпушення моношару клітин, розчин альбучиду не пошкоджуючи моношар видаляють за допомогою піпетки об'ємом 5мл, клітини ресуспендують у 5мл свіжого поживного середовища та засівають у нові культуральні флакони при посівній концентрації $2-2,5 \times 10^5$ клітин/мл та поміщують у термостат при температурі 35°C. Час необхідний для формування моношару дорівнював 24 години, мітотичний індекс культури клітин складав 54,7 що у 1,8 раза вище, ніж чим при обробці версен-трипсиною сумішшю. Культивування клітин лінії L 929 з застосуванням запропонованого нами способу виявилось досить ефективним прийомом: клітини раніше формували суцільний моношар після зняття їх розчином альбучиду, знизилась кількість клітин з морфологічними «дефектами», унаслідок відсутності цитотоксичної дії альбучиду у відношенні до клітин, крім того завдяки вираженій бактерицидної та бактериостатичної дії альбучид сприяє деконтамінації культуральних зразків.