



УКРАЇНА

(19) UA (11) 42022 (13) U
(51) МПК (2009)
C12N 5/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ ФІБРОБЛАСТІВ ЛЮДИНИ

1

2

(21) u200814006

(22) 05.12.2008

(24) 25.06.2009

(46) 25.06.2009, Бюл.№ 12, 2009 р.

(72) ГУЛЕВСЬКИЙ ОЛЕКСАНДР КИРИЛОВИЧ,
ТРИФОНОВА ГАННА ВАЛЕРІЇВНА, ПЕТРЕНКО
ТЕТЯНА ПИЛИПІВНА(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІО-
МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ(57) Спосіб культивування фібробластів людини, який включає застосування живильного середовища, що містить 90% середовища 199 та 10% ембріональної сироватки теляти, який **відрізняється** тим, що в живильне середовище додатково вносять препарат актовегін у кількості 5,5-5,6мкл/мл.

Корисна модель належить до галузі біотехнології і може бути використана при вирощуванні фібробластів людини (ФЛ), в тому числі ембріонального походження.

Відомий спосіб культивування ФЛ із застосуванням середовища, яке містить 90% середовища DMEM, 5% сироватки великої рогатої худоби та 5% пуповинної сироватки людини [1].

Недоліком нього способу є недостатньо висока швидкість росту культури ФЛ.

Найбільш близьким до способу культивування, що заявляється, є спосіб культивування ФЛ ембріонального походження на середовищі, що містить 90% середовища 199 та 10% ембріональної сироватки теляти (ЕС) [2].

Недоліком цього способу є повільний ріст ФЛ.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити такий спосіб культивування ФЛ, в якому би, шляхом введення в живильне середовище додаткової речовини, забезпечувалась можливість підвищення швидкості росту культури клітин.

Ця задача вирішується тим, що в способі культивування ФЛ, який передбачає застосування живильного середовища, що містить 90% середовища 199 та 10% ЕС, згідно з корисною моделлю, у живильне середовище додатково вводять препарат актовегін у кількості 5,5-5,6мкл/мл.

Актовегін - відомий фармацевтичний препарат (виробник Nyscomed, Австрія). За складом він є депротеїнізованим дериватом крові молочних телят з молекулярною масою до 5кДа. Мас інсуліноподібну дію та здатен підвищувати енергетичний метаболізм клітин [3]. Для культивування ФЛ акто-

вегін беруть у вигляді розчину для ін'єкцій із концентрацією діючої речовини 40мг/мл.

Додавання актовегіну у кількості 5,5-5,6мкл/мл до живильного середовища, що містить 90% середовища 199 та 10% ЕС, дозволяє прискорити ріст культури ФЛ: на 4 добу росту приріст клітин у порівнянні з прототипом підвищується на 71%.

Приклад 1

До живильного середовища, що містить у співвідношенні 9:1 середовище 199 і ембріональну сироватку теляти, додавали актовегін у кількості 5,5-5,6мкл/мл живильного середовища. У готове середовище вносили суспензію клітин із розрахунку 10^5 кл/мл середовища. Приготовлену таким чином суспензію клітин вносили в культуральні ємкості. Посівна концентрація клітин складала приблизно $15,5 \times 10^3$ кл/см² культуральної поверхні. Культуральні ємкості поміщали в CO₂ - інкубатор при температурі 37°C. На 4 добу росту живильне середовище зливали, фібробласти знімали з культуральної поверхні розчином версена з трипсином (4:1). Кількість клітин в отриманій таким чином суспензії підраховували в камері Горяєва у світовому мікроскопі. Кількість ФЛ складала у перерахунку на площу культуральної поверхні $30,54 \pm 1,06 \times 10^3$ кл/см².

Приклад 2

Досліджували вплив актовегіну на ріст культури ФЛ. Кількість актовегіну. 1,4-1,5мкл/мл та 5,5-5,6мкл/мл, брали виходячи з рекомендацій щодо застосування препарату актовегін при лікуванні таких захворювань як церебральна ішемія, пролежні, трофічні язви та ряду інших [3]. Кількість акто-

(19) UA (11) 42022 (13) U

вегіну - 10 мкл/мл брали із розрахунку перевищення максимально рекомендованої кількості приблизно у 2 рази.

Для порівняння культивували ФЛ згідно з прототипом в середовищі, що не містило актовегіну.

Культивування ФЛ в живильних середовищах з актовегіном та без нього проводили аналогічно Прикладу 1. Результати наведені в Таблиці.

З Таблиці видно, що додавання в живильне середовище актовегіну забезпечує підвищення росту культур, але найбільш високий приріст від-

мічається при внесенні його в кількості 5,5-5,6мкл/мл середовища.

При культивуванні ФЛ в живильних середовищах, що містили актовегін у кількостях 1,4-1,5мкл/мл та 10мкл/мл, кількість клітин на 4 добу росту склала $21,4 \pm 0,98 \times 10^3$ кл/см² та $24,1 \pm 1,0 \times 10^3$ кл/см², відповідно.

При культивуванні ФЛ на живильному середовищі згідно прототипу кількість клітин на 4 добу росту склала $17,9 \pm 1,0 \times 10^3$ кл/см² культуральної поверхні.

Таблиця

Ріст ФЛ в живильному середовищі без додавання актовегіну (прототип), та при додаванні різних кількостей актовегіну.

Склад середовища		Кількість клітин на 4 добу росту, $\times 10^3$ кл/см	Перевищення прототипу, %
1.	90% середовища 199 10% ЕС (прототип) (n=9)	17,9 \pm 1	-
2.	90% середовища 199 10% ЕС та актовегіну 1,4-1,5мкл/мл (n= 4)	21,4 \pm 0,98	20
3.	90% середовища 199 10% ЕС та актовегіну 5,5-5,6мкл/мл (n=5)	30,54 \pm 1,06	71
4.	90% середовища 199 10% ЕС та актовегіну 10мкл/мл (n= 4)	24,1 \pm 1	35

Джерела інформації.

1. Черников В.Г., Шипшин С.С. и др. // Бюл. экспериментальн. биологии и медицины - 2000, - №5, - С.587-590.

2. Пат. №6521 UA, МІЖ⁷ А61К35/54, опубл. 16.05.2005.

3. Нордвик Б. Актовегин. Новые аспекты клинического применения. М., 2002. - С.18-24.