



(19) **KG** (11) **1740** (13) **C1**
(51) **C12N 5/071** (2015.01)

ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЛУЖБА ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ И
ИННОВАЦИЙ ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя (владельца)

(21) 20140039.1

(22) 04.04.2014

(46) 29.05.2015, Бюл. № 5

(71) Кыргызско - Российский Славянский университет (KG)

(72) Самаева Е. В., Тухватшин Р. Р. (KG)

(73) Кыргызско - Российский Славянский университет (KG)

(56) Патент RU № 2382077, кл. C12N 5/071, 2010

(54) Способ культивирования аутофибробластов

(57) Изобретение относится к клеточной биологии, в частности к технологии получения культур клеток, и может быть использовано в медицине для лечения ран различной этиологии, в том числе ожоговых.

Задача изобретения - повышение качества и количества культуры аутофибробластов, используемых при лечении ран различной этиологии, в том числе ожоговых.

Поставленная задача достигается тем, что в способе культивирования аутофибробластов включающем получение клеток из биоптата кожи и их культивирование в питательной среде DMEM с раствором антибиотика-антимикотика, содержащей 10 %-ную фосфатно-буферную смесь, где в культуральную среду добавляют 20 % обогащенную тромбоцитами плазму и препарат корня солодки «Глицирам».

1 н. п. ф., 1 пр., 3 фиг.

Изобретение относится к клеточной биологии, в частности к технологии получения культур клеток, и может быть использовано в медицине для лечения ран различной этиологии, в том числе ожоговых.

Известен способ культивирования фибробластов для заместительной терапии, который заключается в том, что биоптат кожи инкубируют в растворе ферментов диспазы и коллагеназы I типа на основе среды культивирования DMEM с добавлением 5 % эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС) в течение 1,5 часов при постоянном помешивании и пипетировании. Культивирование проводят в среде, содержащей собственную сыворотку крови пациента и специальный набор реактивов, включающих антибиотик (патент RU № 2320720, кл. C12N 5/08, F61L 27/38, 2008).

Недостатком известного способа является то, что во взвеси содержащей фибробласты количество жизнеспособных клеток не велико, их адгезивные свойства снижены, а рецепторная система частично повреждена, так как инкубация проводится при постоянном перемешивании и пипетировании. Кроме этого, на культивирование уходит 4-5 недель, что, как известно, также приводит к увеличению доли апоптотических клеток, появлению клеток с измененным генотипом и с морфологическими и функциональными нарушениями.

Наиболее близким к предлагаемому способу по технической сущности и достигаемому результату является способ культивирования фибробластов для заместительной терапии, описанный в патенте RU № 2382077, кл. C12N 5/071, 2010. Этот способ заключается в том, что клетки получают из биоптатов кожи без ферментативной и механической обработки исходного материала, где биоптат помещается под покровное стекло и инкубируется на чашке Петри, покрытой синтетическим аналогом внеклеточного матрикса поли-D-лизином, в среде DMEM с 2

%-ной фосфатно-буферной смесью (ФБС) до образования фибробластами, мигрировавшими из экспланта, монослоя. Дальнейшее культивирование клеток производят на чашке Петри с поли-D-лизином в питательной среде, в котором традиционно используемые сыворотки животного происхождения заменяют 10 %-ной собственной сывороткой крови пациента (ССКП).

Недостатком этого способа является то, что во многих случаях качество клеточной культуры не высокое, по причине применения к клеткам излишне «жестких» условий, а также длительности процедуры выделения и культивирования.

Задача изобретения - повышение качества и количества культуры аутофибробластов, используемых при лечении ран различной этиологии, в том числе ожоговых.

Поставленная задача достигается тем, что в способе культивирования аутофибробластов включающем получение клеток из биоптата кожи и их культивирование в питательной среде DMEM с раствором антибиотика-антимикотика, содержащей 10 %-ную фосфатно-буферную смесь, где в культуральную среду добавляют 20 % обогащенную тромбоцитами плазму и препарат корня солодки «Глицирам».

Патогенетическая суть этой методики определяется стимулирующим влиянием трансплантированных на рану аутофибробластов на пролиферацию эпидермоцитов, сохранившихся в ране, и эпидермоцитов сетчатых лоскутов аутокожи. Именно при использовании аутоклеток: наблюдается длительный клинический эффект, исключен риск заражения пациента инфекционными агентами, а также риск развития аллергических реакций. Кроме этого не возникает трудностей с поиском подходящих доноров. Пересадку лучше производить в первые трое суток после ожоговой травмы, когда раневая поверхность хорошо защищена иммунными клетками от микробной инвазии. Но для осуществления этого необходимо добиться получения из биоптата кожи пациента наибольшее количество жизнеспособных клеток за первые трое суток от момента получения травмы, при этом используя недорогие и доступные стимуляторы роста клеток.

В предложенном нами способе выращивание культуры аутофибробластов происходит с применением обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) - биологического продукта, получаемого из аутологичной крови пациента содержание ростовых факторов в ней в 3-5 раз больше, чем в цельной крови и препарата корня солодки - «Глицирам», который выделяется из корней солодки голой. Он является аммониевой солью глицирризиновой кислоты и обладает действием, напоминающим действие дезоксикортикостерона и кортизона, следовательно, также способствует росту и дифференцировке аутофибробластов. Готовили культуральную смесь из раствора таблетки глицерама и ОТП, в которой из биоптата кожи выращивали фибробласты.

Пример.

Способ культивирования аутофибробластов опробовали на лабораторных беспородных крысах. Под кетаминным наркозом у крысы с наружной поверхности бедра, после удаления шерсти, брали биопсию кожи 2х3х4 мм толщиной 0,2-0,3 мм (эпидермис и сосочковый слой дермы). Отсеченный кусочек погружали в заранее приготовленный флакон со средой. Биоптат дважды промывали в растворе питательной среды с антибиотиками и антимикотиками (пенициллин - 100 Ед/мл, стрептомицин - 100 мкг/мл, амфотерицин В - 2,5 мкг/мл). Затем донорский материал в стерильных условиях измельчали с помощью офтальмологических ножниц до минимально возможных фрагментов (0,01-0,1 мм).

Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) получали из левого желудочка сердца, после предварительного вскрытия грудной клетки под кетаминным наркозом. Кровь гепаринизируют (100 Ед на 1 мл), затем центрифугируют. На первом этапе после центрифугирования при 1300 об/мин в течение 10 минут, плазму, содержащую тромбоциты, отделяют от эритроцитов и лейкоцитов. Вторичное центрифугирование при 4000 об/мин 10 минут приводит к агрегации тромбоцитов на дне пробирки. Супернатант - бедную тромбоцитами плазму удаляют.

В стерильных условиях в чашке Петри пестиком измельчают таблетку «Глицирама» (50 мг). Добавляют 10 мл 0,9 % физиологического раствора, полученный раствор фильтруют через керамический фильтр. Используют 0,2 мл полученного раствора - 1 мг «Глицирама».

В стерильный культуральный флакон TC Flask, Canted Neck, Anti - Tip, Vent, Sterile (Corning Costar), площадью 25 см² помещают биоптат кожи, измельченный механически ножницами, питательная среда DMEM с антибиотиками/антимикотиками (пенициллин - 100 Ед/мл, стрептомицин - 100 мкг/мл, амфотерицин В - 2,5 мкг/мл), 10 % FBS и 20 % ОТП и 1 мг «Глицирама». Флакон с содержимым помещают в термостат при температуре 37 °С. Контроль роста культуры проводят на третьи сутки в камере Горяева путем подсчета клеток, окрашенных

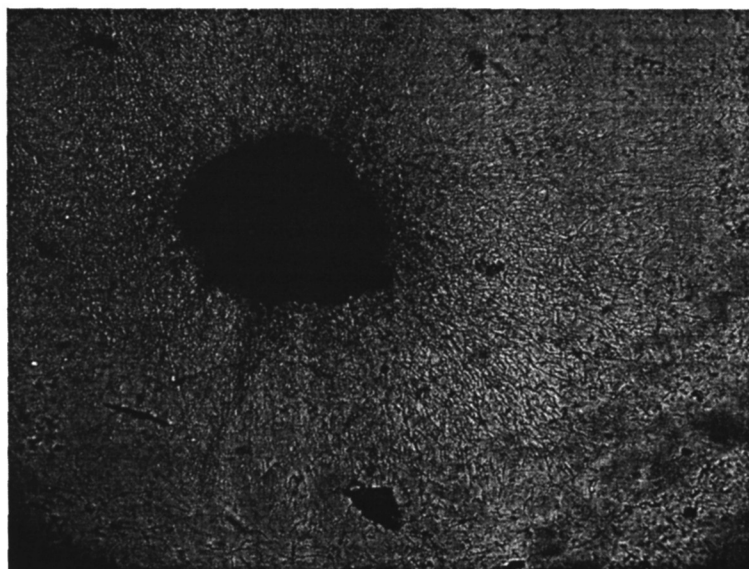
0,4 % раствором трипанового синего (фиг. 1). Интенсивность окрашивания свидетельствует о высокой жизнеспособности и пролиферативной активности клеток (фиг. 2). Фибробласты типичной веретеновидной и звездчатой (с отростками) формы хорошо видны при окраске препарата гематоксилин-эозином, где ядра клеток синие, цитоплазма и межклеточное вещество - розовые (фиг. 3).

Использование предлагаемого способа культивирования аутофибробластов способствует повышению эффективности и качества получаемой для последующей трансплантации культуры клеток за счет использования технологии получения культуры клеток из кожного эксплантата, не требующей применения протеаз для обработки первичного материала, а также за счет сокращения общих сроков культивирования.

Формула изобретения

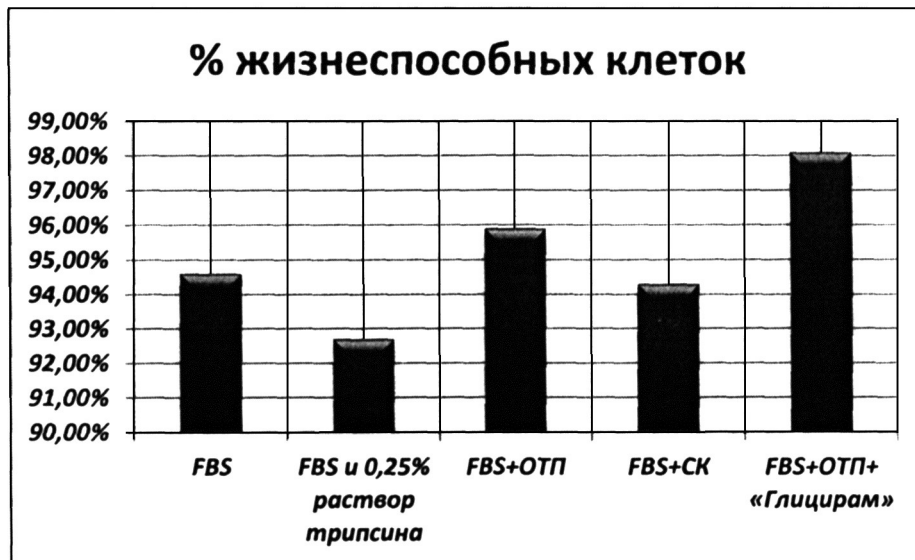
Способ культивирования аутофибро-бластов, включающий получение клеток из биоптата кожи и их культивирование в питательной среде DMEM с раствором антибиотика-антимикотика, содержащей 10 %-ную фосфатно-буферную смесь, отличающийся тем, что в культуральную среду добавляют 20 % обогащенную тромбоцитами плазму и препарат корня солодки "Глицирам".

Способ культивирования аутофибробластов

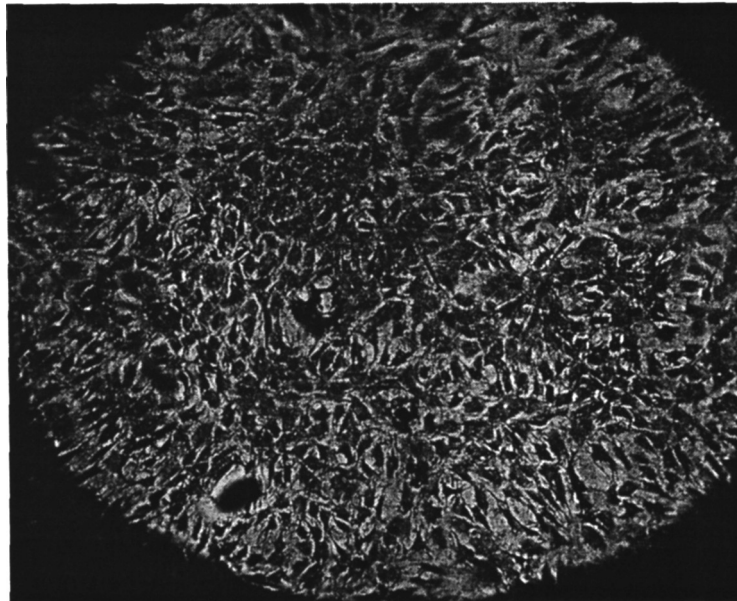


Фиг. 1

Способ культивирования аутофибробластов



Фиг. 2



Фиг. 3

Выпущено отделом подготовки материалов

Государственная служба интеллектуальной собственности и инноваций при Правительстве Кыргызской Республики,
720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41; факс: (312) 68 17 03