



УКРАЇНА

(19) UA (11) 81883 (13) C2
(51) МПК (2006)
C12N 5/02МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ СТОVBУРОВИХ КЛІТИН

1	2
(21) a200703097	L-триптофан 10,0 мг/л
(22) 23.03.2007	L-фенілаланін 32,0 мг/л
(24) 11.02.2008	L-цистин 31,3 мг/л
(72) СКОЛОЖАБСЬКИЙ АНДРІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ, UA, ЛІСОВИЙ ВОЛОДИМИР МИКОЛАЙОВИЧ, UA	біотин (вітамін Н) 0,5-1,0 мг/л
(73) ХАРКІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, UA	холінхлорид (вітамін В4) 1,0 мг/л
(56) RU 2164240 C2, 20.03.01. PAA The Cell Culture Company, Laboratories GmbH: Classical Media [Електронний ресурс]. - 2007. - Режим доступу: http://www.paa.com/classical_media.html.	фолієва кислота (вітамін В9) 1,0 мг/л
Стволовые клетки и опухолевый рост / Под ред. В.Г. Пинчука, З.А. Бутенко. - К.: Наук. думка, 1985. - С. 255.	I-інозитол (вітамін В8) 2,0 мг/л
Адаме Р. Методы культуры клеток для биохимиков: Пер. с англ. / Пер. М.А. Панова: Под ред. В.Ю. Полякова. - М.: Мир, 1983. - С. 26.	нікотинамід (вітамін РР) 1,0 мг/л
(57) Поживне середовище для культивування стовбурових клітин, яке включає амінокислоти, вітаміни, знезаражуючі сполуки та збалансовані буферні сольові розчини, яке відрізняється тим, що додатково містить регулятор поділу клітин дексаметазон, індуктори росту інсулін свинячий, хоріонічний гонадотропін, інтерлейкін IL-1, інтерлейкін IL-2, інтерлейкін IL-3, інтерлейкін IL-4, інтерлейкін IL-5, інтерлейкін IL-6, інтерлейкін IL-11 та знезаражуючі речовини амфотерицин В і флуконазол при наступному складі інгредієнтів:	рибофлавін (вітамін В2) 0,1 мг/л
L-аланін 25,0 мг/л	тіамін хлорид (вітамін В1) 1,0 мг/л
L-аргінін HCl 127,0 мг/л	аскорбінова кислота (вітамін С) 0,5-1,0 мг/л
L-аспаргін·H ₂ O 20,0 мг/л	пантотенат кальцію (вітамін В5) 1,0 мг/л
L-валін 46,0 мг/л	піридоксину гідрохлорид (вітамін В6) 1,0 мг/л
L-гістидин HCl·H ₂ O 42,0 мг/л	ціанокобаламін (вітамін В12) 1,0 мг/л
гліцин 15,0 мг/л	D-глюкоза безводна 1000 мг/л
L-глутамін 302,0 мг/л	дексаметазон 2,5-10,0 нг/мл
L-глутамінова кислота 75,0 мг/л	інсулін свинячий високоочищений МК 40,0-200,0 ОД/л (монокомпонентний)
L-ізолейцин 52,0 мг/л	хоріонічний гонадотропін 250,0-500,0 ОД/л
L-лейцин 52,0 мг/л	інтерлейкін IL-1 3-5 нг/мл
L-лізин HCl 72,5 мг/л	інтерлейкін IL-2 3-5 нг/мл
L-метіонін 15,0 мг/л	інтерлейкін IL-3 3-5 нг/мл
L-пролін 39,8 мг/л	інтерлейкін IL-4 3-5 нг/мл
L-серин 25,0 мг/л	інтерлейкін IL-5 3-5 нг/мл
L-тирозин 51,9 мг/л	інтерлейкін IL-6 3-5 нг/мл
L-треонін 48,0 мг/л	інтерлейкін IL-11 5-10 нг/мл
	пеніцилін 100,0 ОД/мл
	стрептомицину сульфат 100,0 мкг/мл
	амфотерицин В 2,5 мкг/мл
	флуконазол 20,0-70,0 мкг/мл
	сольовий розчин Хенкса з феноловим червоним 3 500 мл.

(13) C2

(11) 81883

(19) UA

Винахід відноситься до біології, біохімії та медицини, що може бути використаним для відтворення в умовах науково-дослідних, лікувально-діагностичних та реабілітаційних закладів методики культивування однорідних за фенотиповими ознаками й без мутаційних перетворень різного генезу стовбурових клітин плюрипотентного класу.

На теперішній час для культивування, збагачення та спрямованого диференціювання, призначеного до трансплантації клітинного матеріалу будь-якого походження, існує велика кількість біотехнологій, що використовують різні рецептури живильних середовищ. Традиційне живильне середовище становить сольовий розчин певного складу, до якого додаються амінокислоти, вітаміни, ростові фактори, та компоненти біогенного походження (добавки плазми, сироватки крові, тканинні екстракти й тощо). Мінеральні компоненти в цих розчинах підібрані так, що розчин виконує буферні функції, підтримуючи постійний кислотно-лужний баланс або сталість рН середовища в процесі вирощування клітин, що є одним з головних вимог умов культивування. Для готування живильних середовищ звичайно використовуються сольові розчини Ерла, Хенкса та NEPES з рН в діапазоні 7,2-7,6 [Ex vivo expansion of CD34+ umbilical cord blood cells in a defined serum-free medium (QBSF-60) with early effect cytokines / L. Qiu, R. Meagher, S. Welhausen et al. // Journal of hematotherapy & stem cell research. - 1999. - Vol. 8, № 6. - P. 609-618; Стволовые клетки и опухолевый рост / Под ред. В.Г. Пинчука, З.А. Бутенко. - Киев: Наук, думка, 1985. - С. 255; In vitro efficacy of the successive or staggered use of eardrops / M.T. Kalcicoglu, O. Ozturan, R. Durmaz et al. // Eur Arch Otorhinolaryngol. - 2006. - Vol. 263, № 5. - P. 395-398; Glucocorticoids increase in vitro and in vivo activities of antibiotics against Chlamydomonas pneumoniae / D. Caronzolo, V. Lucini, M. Pannacci et al. //Antimicrobial agents and chemotherapy. - 2004. - Vol. 48, №12. - P. 4878-4881].

Відомі на даний час культуральні середовища поділяють на дві категорії: сироваткові та безсироваткові.

До поширених живильних розчинів з додаванням сироватки для вирощування клітинного матеріалу відносяться MEM Minimum Essential Medium (Eagle), BME (basal medium. Eagle), середовище Дульбекко DME або DMEM (подвійна модифікація середовища Ігла), Ham's F-12, середовище 199, середовище Мак-Коя 5A або RPMI 1629, RPMI 1640 [Адаме Р. Методы культуры клеток для биохимиков: Пер. с англ. / Пер. М.А. Панова: Под ред. В.Ю. Полякова. - Москва: Мир, 1983. - С. 263; PAA The Cell Culture Company, Laboratories GmbH: Classical Media [Електронний ресурс]. - 2007. - Режим доступу: <http://www.paa.com/classicaljmedia.html>. Назва зі сторінки Інтернету].

Середовище Дульбекко DME або DMEM (подвійна модифікація середовища Ігла) найчастіше використовується для культивування

клітинного матеріалу з сироваткою, але може також бути основою для безсироваткових середовищ. Містить подвійну концентрацію амінокислот, гліцин, серин, піруват, залізо. При використанні цього середовища необхідний інкубатор з 10% концентрацією CO₂ [Адаме Р. Методы культуры клеток для биохимиков: Пер. с англ. / Пер. М.А. Панова: Под ред. В.Ю. Полякова. - Москва: Мир, 1983. - С. 263; PAA The Cell Culture Company, Laboratories GmbH: Classical Media [Електронний ресурс]. - 2007. - Режим доступу: http://www.paa.com/classical_media.html. Назва зі сторінки Інтернету].

Середовище МакКоя 5A (1958 р.) та серія середовищ RPMI розроблені для підтримки клонального росту первинних культур різних клітинних ліній у присутності сироватки. Звичайно виробляються в модифікації Івката та Грейса (RPMI). Потребують обов'язкового забезпечення при культивуванні в атмосфері 5% концентрації CO₂ [Адаме Р. Методы культуры клеток для биохимиков: Пер. с англ. / Пер. М.А. Панова: Под ред. В.Ю. Полякова. - Москва: Мир, 1983. - С. 263; PAA The Cell Culture Company, Laboratories GmbH: Classical Media [Електронний ресурс]. - 2007. - Режим доступу: <http://www.paa.com/classicaljmedia.html>. Назва зі сторінки Інтернету].

Середовище 199 розроблене в 1950 році для культивування фрагментів серця з ембріона курчати. Для середовища характерний широкий спектр живильних речовин і невисока їхня концентрація. Це живильне середовище використовується без добавок, якщо підтримує первинні клітинні культури, а також із сироваткою як ростове середовище для клітин, що швидко розмножуються. Для оптимального росту клітин звичайно додають 5%-20% фетальної (ембріональної) сироватки [Адаме Р. Методы культуры клеток для биохимиков: Пер. с англ. / Пер. М.А. Панова: Под ред. В.Ю. Полякова. - Москва: Мир, 1983. - С. 263; PAA The Cell Culture Company, Laboratories GmbH: Classical Media [Електронний ресурс]. - 2007. - Режим доступу: http://www.paa.com/classical_media.html. Назва зі сторінки Інтернету].

Серед стандартних середовищ для ведення культур тваринних клітин виділяють середовище Ігла MEM (minimal essential medium) і BME (basal medium. Eagle), серед яких найчастіше використовується MEM. Воно містить мінеральні речовини, амінокислоти (13 незамінних), 6 водорозчинних вітамінів, холін і інозит, що виконують роль вуглеводного субстрату. MEM використовується тільки із сироваткою, тому що в ній відсутні біотин, вітамін В 12, іони заліза й мікроелементи. Основа розчину збалансований буферний сольовий розчин Ерла або Хенкса.

Середовище MEM включає:		
L-Аргінін-HCl	126,0 мг/л	Фолієва кислота
L-Валін	46,0 мг/л	I-Інозитол
L-Глутамін	292,0 мг/л	Нікотинамід
L-Гістидин-HCl·H ₂ O	42,0 мг/л	Пірідоксаль-H
L-Ізолейцин	52,0 мг/л	Рибофлавін

L-Лейцин	52,0 мг/л
L-Лізин-HCl	72,5 мг/л
L-Метіонін	15,0 мг/л
L-Фенілаланін	32,0 мг/л
L-Треонін	48,0 мг/л
L-Триптофан	10,0 мг/л
L-Тірозин	36,0 мг/л
L-Цистин	24,0 мг/л
D-Са-пантотенат	1,0 мг/л
Холінхлорид	1,0 мг/л

Живильне середовище MEM, як найбільш близьке по складу до того, що заявляється, обрано в якості прототипу.

Невід'ємним компонентом більшості ростових середовищ є сироватка тварин (теляча, бичача, кінська), без наявності 5%-10% якої розмноження клітин і формування моношару не відбувається. Сироватка, як компонент більшості живильних середовищ, являє собою надзвичайно складну суміш дрібних і великих молекул, здатних як викликати, так і гальмувати ріст клітин. До головних функцій сироватки належать такі: забезпечення гормональними факторами, що стимулюють ріст клітин і їх функції; забезпечення факторами прикріплення, розпластування та проліферації клітин; забезпечення транспортними білками, що переносять гормони, мінеральні речовини, ліпіди й тощо.

Одним із невід'ємних компонентів живильних середовищ становлять ростові фактори і серед них найважливішим практично для всіх типів клітин є гормон інсулін. З інших гормонів найчастіше застосовуються глюкокортикоїди (гідрокортизон, дексаметазон), стероїди (естрадіол, тестостерон, прогестерон) і гормони щитовидної залози (трийодтіронін). Гормони стимулюють або пригнічують процес розмноження залежно від типу клітин і їхньої густини. Так, глюкокортикоїди, наприклад, впливають на проліферацію клітин, змінюючи їхню чутливість до факторів росту.

Ще одним вкрай необхідним компонентом сироваткових живильних розчинів є необхідність включення в їхній склад різних антибіотиків для забезпечення протимікробного та протимікозного знезаражування протягом терміну культивування. Частіше всього застосовують пеніцилін, стрептоміцин, гентаміцин сульфат, канаміцин, тощо. Більшість поширених антибіотиків для забезпечення знезаражуючих властивостей живильних середовищ мають властивість цитотоксичної дії до вирощуваних клітин.

Живильні середовища для вирощування стовбурових клітин мають ряд недоліків, головними із яких є фенотипова різноманітність кінцевої культури клітин, серед яких переважну кількість становлять комітовані клітини-попередники й, насамперед, фібробластоподібні клітини, клітини-попередники лімфопоезу, клітини-попередники еритропоезу та інші бластні клітини, відсутність контрольованої селекції в напрямку отримання стовбурових клітин плюрипотентного класу та складність дотримання стабільного знезаражуючого ефекту протягом довготермінового культивування без перепосівів.

Тіамін-НСл зв'язку з вищевикладеним, 10 мг/л, D-глюкоза безводна 1000 мг/л, Пеніцилінного середовища шляхом 5000 ОД/л, Стрептоміцину сульфату ростових факторів, Гентаміцину сульфату оксичної дії до 5000 ОД/л Ерлатин.

Задачу, яку покладено в основу винаходу, не вирішують тим, що у відоме живильне середовище, яке включає амінокислоти, вітаміни, знезаражуючі сполуки та збалансовані буферні сольові розчини, згідно з винаходом, додатково включають регулятор поділу клітин дексаметазон, індуктори росту інсулін свинячий, хоріонічний гонадотропін, інтерлейкін IL-1, інтерлейкін IL-2, інтерлейкін IL-3, інтерлейкін IL-4, інтерлейкін IL-5, інтерлейкін IL-6, інтерлейкін IL-11 та знезаражуючі речовини амфотерицин В і флуконазол при наступному складі інгредієнтів:

L-Аланін	25,0 мг/л
L-Аргінін HCl	127,0 мг/л
L-Аспаргін-H ₂ O	20,0 мг/л
L-Валін	46,0 мг/л
L-Гістидин HCl-H ₂ O	42,0 мг/л
Гліцин	15,0 мг/л
L-Глутамін	302,0 мг/л
L-Глютамінова кислота	75,0 мг/л
L-Ізолейцин	52,0 мг/л
L-Лейцин	52,0 мг/л
L-Лізин HCl	72,5 мг/л
L-Метіонін	15,0 мг/л
L-Пролін	39,8 мг/л
L-Серин	25,0 мг/л
L-Тірозин	51,9 мг/л
L-Треонін	48,0 мг/л
L-Триптофан	10,0 мг/л
L-Фенілаланін	32,0 мг/л
L-Цистин	31,3 мг/л
Біотин (вітамін Н)	0,5-1,0 мг/л
Холінхлорид (вітамін В4)	1,0 мг/л
Фолієва кислота (вітамін В9)	1,0 мг/л
I-Інозитол (вітамін В8)	2,0 мг/л
Нікотинамід (вітамін РР)	1,0 мг/л
Рибофлавін (вітамін В2)	0,1 мг/л
Тіамін хлорид (вітамін В1)	1,0 мг/л
Аскорбінова кислота (вітамін С)	0,5-1,0 мг/л
Пантотенат кальцію (вітамін В5)	1,0 мг/л
Пірідоксина гідрохлорид (вітамін В6)	1,0 мг/л
Ціанокобаламін (вітамін В12)	1,0 мг/л
D-глюкоза безводна	1000 мг/л
Дексаметазон	2,5-10,0 нг/мл
Інсулін свинячий високоочищений МК (монокомпонентний)	40,0-200,0 ОД/л
Хоріонічний гонадотропін	250,0-500,0 ОД/л
Інтерлейкін IL-1	3-5 нг/мл
Інтерлейкін IL-2	3-5 нг/мл
Інтерлейкін IL-3	3-5 нг/мл

Інтерлейкін IL-4	3-5 нг/мл
Інтерлейкін IL-5	3-5 нг/мл
Інтерлейкін IL-6	3-5 нг/мл
Інтерлейкін IL-11	5-10 нг/мл
Пеніцилін	100,0 ОД/мл
Стрептоміцину сульфат	100,0 мкг/мл
Амфотерицин В	2,5 мкг/мл
Флуконазол	20,0-70,0 мкг/мл
Хенкса з феноловим червоним	+

Технічний ефект винаходу, а саме підвищення його якості, обумовлений тим, що живильне середовище для культивування стовбурових клітин конструюється на основі збалансованого фосфатно-сольового буферного розчину Хенкса з рН 7,4 із індикаторним барвником феноловим червоним, що змінює забарвлення з яскраво-червоного (у свіжому середовищі) до жовто-жовтогарячого (у середовищі з культивованими протягом деякого часу клітинами). Крім того, вдосконалена рецептура не потребує підвищеної концентрації CO_2 в атмосфері при культивуванні та забезпечує, завдяки оптимізації концентрації й співвідношення сумісно використовуваних сучасних протимікробних та протимікозних препаратів нового покоління з препаратами аміноглікозидів природного походження, ефективне знезаражування культури протягом довготермінового вирощування клітин без перепосівів.

Отже, згідно з винаходом, живильне середовище включає зміни у концентрації антибіотиків, вітамінів, індукторів росту (ростових факторів) та їхнього співвідношення, одночасно додатково введені тiazолmістні сполуки, які сумісно з антибіотиками із групи аміноглікозидів та антифунгальних препаратів забезпечили достатнє знезаражування при довготерміновому культивуванні без необхідності до періодичних перепосівів.

Якість складових живильного середовища, що заявляється, регламентує наступна науково-технічна документація, наведена у табл. 1.

Компонент	Джерело нормативної документації
Амінокислоти	Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - Вид. 1-е - Харків: РІРЕГ, 2001. - 556 с.
L-Аланін	ДФУ 1-го вид., с. 313
L-Аргініну гідрохлорид	ДФУ 1-го вид., с. 320
L-Аспаргін моногідрат	ДФУ 1-го вид., с. 327
L-Гістидину гідрохлорид моногідрат	ДФУ 1-го вид., с. 351
Гліцин	ДФУ 1-го вид., с. 355
L-Глутамін	ДФУ 1-го вид., с. 359
L-Глутамінова кислота	ДФУ 1-го вид., с. 363
L-Ізолейцин	ДФУ 1-го вид., с. 369
L-Лейцин	ДФУ 1-го вид., с. 403
L-Лізіну гідрохлорид	ДФУ 1-го вид., с. 413
L-Метіонін	ДФУ 1-го вид., с. 419
L-Пролін	ДФУ 1-го вид., с. 439
L-Серин	ДФУ 1-го вид., с. 449
L-Тирозин	ДФУ 1-го вид., с. 458
L-Треонін	ДФУ 1-го вид., с. 459

L-Триптофан	ДФУ 1-го вид.
L-Фенілаланін	ДФУ 1-го вид.
L-Цистин	Fluca, 2003/
Вітаміни та цукри	
Біотин (вітамін Н)	USP 24, p. 2
Холінхлорид (вітамін В4)	ТУ 6-02-569
Фолієва кислота (вітамін В9)	ДФУ 1.1, с.31
і-інозитол (вітамін В8)	Fluca, 2003/
Нікотинамід (вітамін РР)	ДФУ 1-го вид.
Рибофлавін (вітамін В2)	ДФУ 1-го вид.
Тіамін хлорид (вітамін В1)	ДФУ 1-го вид.
Аскорбінова кислота (вітамін С)	ДФУ 1-го вид.
Пантотенат кальцію (вітамін В 5)	ЕР 5.0, p. 1
Пірідоксина гідрохлорид (вітамін В6)	ДФУ 1-го вид.

Продовження таблиці 1

Компонент	Джерело нормативної документації
Цианокобаламін (вітамін В 12)	ЕР 5.0, p. 13
D-глюкоза безводна	ФС 42У-52/3
Індуктори росту	
Дексаметазон	ЕР 5.0, p. 14
Інсулін свинячий високоочищений МК (монокомпонентний)	ЕР 5.0, p. 18
Хоріонічний гонадотропін	ЕР 5.0, p. 16
Інтерлейкін IL-1	Fluca, 2003/
Інтерлейкін IL-2	Fluca, 2003/
Інтерлейкін IL-3	SIGMA, 200
Інтерлейкін IL-4	SIGMA, 200
Інтерлейкін IL-5	SIGMA, 200
Інтерлейкін IL-6	SIGMA, 200
Інтерлейкін IL-11	SIGMA, 200
Знезаражуючі сполуки	
Бензилпеніциліну натрієва сіль	ДФУ 1.1, с.23
Стрептоміцину сульфат	ДФУ 1.1, с.4
Амфотерицин В	ЕР 5.0, p.99
Флуконазол	ЕР 5.6, p. 45
Збалансовані буферні сольові розчини	
Хенкса з феноловим червоним	ФСБ 42-007

Примітки:

1. ДФУ 1-го вид. - Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. - Харків: РІРЕГ, 2001. - 556 с.

2. ДФУ 1-1 - Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - Вид. 1-е - Харків: РІРЕГ, 2001. - 556 с.

3. ДФУ 1-го вид., с. 313

4. ДФУ 1-го вид., с. 320

5. ДФУ 1-го вид., с. 327

6. ДФУ 1-го вид., с. 339

7. ДФУ 1-го вид., с. 351

8. ДФУ 1-го вид., с. 355

9. ДФУ 1-го вид., с. 359

10. ДФУ 1-го вид., с. 363

11. ДФУ 1-го вид., с. 369

12. ДФУ 1-го вид., с. 403

13. ДФУ 1-го вид., с. 413

14. ДФУ 1-го вид., с. 419

15. ДФУ 1-го вид., с. 439

16. ДФУ 1-го вид., с. 449

17. ДФУ 1-го вид., с. 458

18. ДФУ 1-го вид., с. 459

клітин дозволяють забезпечити мінімальні біохімічні, фізико-хімічні, знезаражуючі та інші сприятливі властивості та умови для життєдіяльності клітин, які необхідні для відтворення селективного росту та забезпечення отримання однорідної за фенотиповими ознаками популяції стовбурових клітин плюрипотентного класу.

Якість живильного середовища ілюструють наступний приклад:

Приклад 1. У якості первинного клітинного матеріалу використовувався кістковий мозок стегнових кісток статевозрілих щурів-самців лінії Wistar-Kyoto у кількості 5 особин масою 400-450 г, що втримувалися на брикетованих кормах за умов віварію.

Видалення кісткового мозку ссавців здійснювали відповідно до національних «Загальних етичних принципів дослідів на тваринах» (Україна, 2001), що відповідає положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 18.03.1986 р.).

Суспензію клітин кісткового мозку виділяли відразу після декапітації під пентобарбіталовим наркозом із використанням внутрішньочеревного введення 40 мг/кг пентобарбіталу натрію. У стерильних умовах видаляли епіфізи стегнових кісток, а діяфізи промивали 0,5 мл живильного середовища MEM із додаванням 20% сироватки крові ембріонів корів за допомогою голки 16 G, насадженої на шприц. Отриманий таким чином із зазначеного джерела клітинний аспірат ссавців для порівняння ефективності збільшення клітинної маси вирощували на стандартних стерильних 6-лункових планшетах (корисна площа поверхні субстрату 9,6 см²/лунка; 16,5 мл/лунка) та стерильних чашках Петрі (розмір - 20х100 мм; корисна площа поверхні субстрату 78,54 см²/чашка) за умов використання трьох варіантів живильного розчину (мінімальний, оптимальний й максимальний), що заявляється як винахід, та з використанням стандартного живильного розчину MEM з сироваткою для культивування за Adams R.L.P. [Адаме Р. Методи культури кліток для біохіміків: Пер. с англ. / Пер. М.А. Панова: Под ред. В.Ю. Полякова. - Москва: Мир, 1983. - С. 263]. Оцінка зростання культури клітин проводилася за визначенням густини насиченості клітинами культурального моношару (Кл/см²), що протягом тестового періоду вирощування (35 діб) заповнював вільну поверхню ага-агарового субстрату.

На 35 добу проводили дисоціацію клітин культури, що досягалася шляхом механічної (шкребки) та ферментної її обробки з використанням 1 мМ розчину ЕДТА й наступної інкубації з холодним 0,01% розчином трипсину протягом 30 секунд. В обох моделях культивування (розроблене та традиційне) отриману клітинну суспензію тричі відмивали центрифугуванням і ресуспендували у свіжому живильному розчині MEM без сироватки та потім оцінювали стан клітинної культури, тобто

підраховували загальну кількість клітин, а також виявляли в їхньому числі мертві й живі клітини (0,1% розчин барвника трипанового синього забарвлював тільки мертві клітини). Підрахунок клітин виконували за допомогою лічильної камери Горяєва за стандартною методикою.

Підрахунок клітин вирощеної культури аспірату кісткового мозку ссавців з використанням живильного середовища продемонструвало отримання з площі 57,6см² агар-агарового субстрату (один 6-лунковий планшет) наступну кількість стовбурових клітин за різних показників мас складових: при мінімальних 96,11х10⁶, при оптимальних - 99,26х10⁶ та при максимальних - 101,04х10⁶. Останнє свідчить, що в порівнянні живильні середовища з оптимальними й максимальними показниками мас складових дають майже однакові показники, що може свідчити про доцільність використання рецептури живильного середовища з оптимальними величинами мас для одержання однорідної за фенотиповими ознаками популяції стовбурових клітин плюрипотентного класу.

Навпаки, використання стандартного живильного середовища MEM за однакових умов культивування клітинного аспірату кісткового мозку щурів продемонструвало отримання з площі 57,6 см² агар-агарового субстрату (один 6-лунковий планшет) тільки 10,72х10⁶ різних за фенотиповими ознаками клітин, що більш чим в 9 раз поступається використанню в якості живильного розчину середовища з оптимальними величинами мас, що заявляється як винахід.

Таким чином, живильне середовище з оптимальними величинами мас, що містить новий якісний і кількісний склад амінокислот, вітамінів, мінеральних сполук й їхнього співвідношення з одночасним додаванням гормонів, факторів росту і тіазолвмісних сполук для забезпечення довготермінового культивування без перепосівів, спрощує й прискорює вирощування однорідної за фенотиповими ознаками популяції стовбурових клітин, а також дозволяє отримати, у порівнянні з класичними живильними розчинами, більшу масу та більш якісний клітинний матеріал активних стовбурових клітин з одиниці площі поверхні підложки.