

Корисна модель відноситься до клітинної біології і може бути використана у медичній та ветеринарній практиці.

Відомі способи культивування хрящових тканин [пат. США №5206023, ИСМ, 1994, 22-24, С.105. А61F2/02, А61L37/22, С07L15/6, С09Н3/02, опубл. 27.04.93. Т1149 №4] з застосуванням ксеногенного матеріалу, недостатком якого є відторгнення організмом тварин.

Також відомий спосіб культивування експлантантів [Silbermann M. et al. In vitro transformation of chondrogenitor cells into osteoblasts and the formation of new membrane bone. - J. Anatomie Rekord.1983.206 №4 p.373-383].

При культивуванні експлантів мишечків нижньої щелепи 19-20 добових зародків мишей, які містять чистий хрящ, на міліпорових фільтрах у модифіційованому середовищі Ігла, протягом 10 днів ефективність культивування по відомому способу досить низька. Так на протязі перших 2-х днів тканина хряща зберігає свою первинну структуру. Через 5 днів культивування хондробластичні клітини зникають, а увесь хрящ заповнюють гіпертрофовані хондроцити, а мезенхімальні клітини диференціюються в остеобласти, котрі утворюють остеоїд.

Недостатком вказаного способу є те, що при культивуванні експлантів хряща на міліпорових фільтрах хондробластичні клітини через 5 днів зникають, а увесь хрящ заповнюється гіпертрофованими хондроцитами.

Задача корисної моделі - підвищення проліферативної активності та покращання диференціації клітин.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі культивування хрящових фрагментів, який включає вирощування їх на підложках у живильному середовищі, згідно корисної моделі, в якості підложки використовують демінералізовану кісткову тканину тварин.

Використання демінералізованої кісткової тканини в якості підложки для культивування хрящових фрагментів дає змогу підвищити їх проліферативну активність та покращати диференціювання клітин.

Приклад конкретного виконання. Приклад 1. Підложку з кісткової тканини тварин готують наступним чином. Відбирають стегнові кістки у 10-ти добових курчат і у 4-6 місячних щурів, поміщають їх у декальцинатор, який складається із 20%-ного нітрату натрію та мурав'їної кислоти в рівних частинах.

Після демінералізації стегнових кісток у них відрізають епіфізи, вимивають кістковий мозок, очищують від м'язових волокон, після чого тричі промивають дистильованою водою (по 20хв.) і переносять у 96-градусний спирт на 5 годин для знежирення. Після цього тричі промивають у дистильованій воді (по 30хв.), двічі у розчині Хенкса з антибіотиками (по 20хв.), після чого переносять у живильне середовище 199, яке містить 10% глюкози. В цьому живильному середовищі і зберігаються кісткові підложки при -4°C.

Приклад 2. Хрящову тканину, одержану у 10-ти добових щурів з головок стегнових кісток, колінних суглобів, міжхребцевих дисків ретельно відмивають у двох порціях середовища 199 з антибіотиками. Обережно відтинають лезом бритви близькі м'язові волокна, зв'язки. Хрящ, взятий з головок стегнової кістки, розрізають лезом на чотири частини. Міжхребцеві хрящові диски та хрящова тканина колінного суглоба не розрізається і висаджується у кісткове ложе підложок, (одержаних від 4-х місячних щурів), таким чином, що б хрящова тканина щільно прилягала до кісткової основи, тобто підложки. Підложки з хрящовими фрагментами укладають у чашки Петрі, де знаходиться живильне середовище 199 з додаванням 20%-ної нормальної інактивованої сироватки великої рогатої худоби. Культивування відбувається за умов 36°C у атмосфері повітря з додаванням 5 % CO<sub>2</sub> на протязі 15 днів зі зміною живильного середовища кожні 2 доби. Протягом перших двох днів хрящова тканина зберігала свою первинну структуру. Але через 5 днів культивування спостерігається збільшення чисельності хондробластичних клітин.

Через десять днів культивування спостерігається апоіційний ріст хряща, недиференційовані клітини на поверхні хряща проліферують та диференціюються у молоді хрящові клітини.

Через 15 днів культивування спостерігається інтерстиційний ріст хряща, молоді хрящові клітини діляться, утворюючи клітинне гніздо, яке складається з двох або чотирьох клітин, тобто хрящові клітини клітинних гнізд утворюють клони, котрі і є нащадками однієї первинної хрящової клітини.

Приклад 3. Стегнові кістки з хрящовими епіфізами виділяють у 18 добових курячих ембріонів, відрізають лезом бритви м'язові волокна, прилеглі до кістки, зв'язки, відмивають у 2-х порціях живильного середовища 199, яке містить антибіотики, потім укладають у декальциновані кісточки-підложки 10-добових курчат. Культивування проводили як описано у прикладі 1 протягом 15 днів. Морфологічні особливості культивованої кісткової тканини визначали на зрізах, пофарбованих гематоксилиноєозином. Кісткова тканина після культивування зберігає свою цитоморфологічну характеристику. Остеобласти розташовані на поверхні кістки і являють собою великі клітини з одним ядром, цитоплазма різко базофільна. На кінці епіфізарних пластинок спостерігається інтерстиціальний ріст хряща.

Додатковий вплив на індукцію хондрогенезу в культурі клітин може відігравати морфогенетичний білок, а також остеоіндуктивний фактор, який міститься у демінералізованій кістці, яка відіграє роль в остеоутворенні In vitro.

По запропонованому способу, починаючи з 5 доби культивування, спостерігається збільшення чисельності хондробластичних клітин і до 10-ї доби спостерігається інтерстиціальний ріст хряща з проліферацією та диференціюванням недиференційованих клітин, а на 15 день культивування спостерігається інтерстиціальний ріст хряща.

Застосування способу дозволяє з більшою ефективністю одержати ріст клітин у хрящових експлантатах, котрі можуть бути використані в гуманній та ветеринарній медицинах для регенерації суглобових хрящів.