



УКРАЇНА

(19) UA (11) 41736 (13) A

(51) 7 C12N5/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ОРГАННОЇ КУЛЬТУРИ ПРИЩИТОПОДІБНИХ ЗАЛОЗ

1

2

(21) 2001031433

(22) 01.03.2001

(24) 17.09.2001

(46) 17.09.2001, Бюл. № 8, 2001 р.

(72) Турчин Іван Семенович, Дроздович Ірина Інокентіївна, Бугаєв Володимир Миколайович, Сидоренко Лариса Миколаївна

(73) КООРДИНАЦІЙНИЙ ЦЕНТР ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ОРГАНІВ ТКАНИН І КЛІТИН МОЗ УКРАЇНИ

(57) Спосіб одержання органної культури прищитоподібних залоз шляхом їх виділення, механічно-

го подрібнення та культивування з подальшою заміною живильного середовища, який відрізняється тим, що тканину подрібнюють до мікрофрагментів розміром $0,1-0,3\text{мкм}^3$, поміщають у флакони при співвідношенні об'єму тканини і живильного середовища 1:8, а культивування проводять в ротаційному апараті з швидкістю обертання ролера $2,5-3,0\text{об/хв}$ при температурі $27-28^\circ\text{C}$ та заміною живильного середовища кожні 12 годин протягом 2-х діб, а в подальшому через кожні 24 години.

Винахід відноситься до медицини, зокрема ендокринології, трансплантології, цитології, і стосується одержання органної культури прищитоподібних залоз для лікування гіпопаратиреозу.

З літературних та патентних джерел інформації відомі способи одержання культур ендокринних залоз як тварин, так і людини [1, 2, 3]. Однак всі ці способи не придатні для культивування прищитоподібних залоз, тому що останні вимагають інших умов культивування.

За прототип авторами взято спосіб одержання культури ендокринної тканини, який полягає у виділенні ендокринної залози, подрібненні її до мікрофрагментів діаметром $0,5-0,8\text{мм}$, внесенні у флакони з ростовим середовищем при співвідношенні його до об'єму флакона 1:3, а культивування проводять при $20-26^\circ\text{C}$ та швидкості обертання ролера $60-70\text{об/хв}$ із заміною $1/2$ культурального середовища [4].

Недоліком цього способу є те, що така величина мікрофрагментів не дозволяє їх повному просочуванню живильним середовищем, температурний режим не сприяє адаптації клітин та їх проліферації, а висока швидкість обертання ролера не забезпечує оптимального режиму агрегації мікрофрагментів.

Таким чином, вказані недоліки знижують життєздатність культури та впливають на її функціональну активність.

В основу даного винаходу поставлено задачу розробити такий спосіб одержання органної культури прищитоподібних залоз, в якому за рахунок

підбору оптимальних умов культивування досягається підвищення життєздатності та гормональної активності паратироцитів.

Суть винаходу полягає в тому, що виділені парашитоподібні залози згідно винаходу подрібнюють до мікрофрагментів діаметром до $0,1-0,3\text{мкм}^3$, поміщають у флакони при співвідношенні об'єму тканини до об'єму живильного середовища 1:8, а культивування проводять в ротаційному апараті з швидкістю обертання ролера $2,5-3,0\text{об/хв}$ при температурі $27-28^\circ\text{C}$ із заміною живильного середовища кожні 12 годин протягом 2-х діб, а в подальшому через кожні 24 години.

Спосіб здійснюється наступним чином. Парашитоподібні залози виділяють при дотримуванні правил асептики та антисептики. Безпосередньо після видалення кожні 5 залоз (цілі) вміщують у флакони з охолодженням (4°C) розчином Хенкса ($6-7\text{мл}$) з антибіотиками (гентаміцин) на 3-5 хвилин. Потім матеріал тричі відмивають охолодженням розчином Хенкса з антибіотиками. Після цього розчин максимально зливають і очисними зігнутими ножицями матеріал подрібнюють на фрагменти розміром $0,1-0,3\text{мкм}^3$. Подрібнений матеріал 3-4 рази відмивають охолодженням розчином Хенкса (кожна порція складає $6-7\text{мл}$). Після чого у кожний флакон наливають повноцінне живильне середовище (склад середовища 199-40%, середовище RPMI 1640 - 30%, середовище Ігпа - 20%, сироватка великої рогатої худоби - 10%, антибіотики (гентаміцин, пеніцилін) у співвідношенні 1:8).

Флакони вміщують в холодильник (4°C) на 30-

(13) A

(11) 41736

(19) UA

40хв, після чого їх переносять в ротаційний апарат для культивування при температурі 27-28°C та швидкості обертання ролера 2,5-3,0об/хв. Через кожні 12 годин на протязі наступних 2-х діб проводять повну заміну живильного середовища, потім його також повністю замінюють кожні 24 години на протязі наступних 3-х діб культивування. Життєздатність культури визначають за допомогою морфологічних (світло- та електронномікроскопічних) та гормональних досліджень.

До даного рішення автори прийшли досліджуючи гістоструктуру та гормональну активність органної культури прищитовидних залоз. На відміну від прототипу, запропоновані авторами умови одержання органної культури прищитовидних залоз, а саме подрібнення до мікрофрагментів розміром 0,1-0,3мм³ сприяє нормальному обміну речовин в культурі, збагачує тканину киснем, (менші розміри фрагментів руйнують клітини, а більші - 0,3мм втрачають ефективність просочування), вибране співвідношення об'єму тканини до культурального середовища 1:8 ставить за мету перешкоджанню виникненню плексії культивованих тканин і є оптимальним. Підібрана температура культивування 27-28°C є оптимальною для фізіологічного функціонування, а швидкість обертання ролера сприяє нормальній оксигенації тканини і не зашкоджує агрегації фрагментів. Оптимально ефективною є і заміна живильного середовища перші 2 доби культивування через 12 годин, а потім через 24 години, так як сприяє активному видаленню зруйнованих клітин та продуктів їх метаболізму, які мають токсичний вплив на подальший ріст культури.

Таким чином запропоновані умови одержання органної культури прищитоподібних залоз дозволяють підвищити життєздатність та гормональну активність паратироцитів, а отримана культура придатна для ксенотрансплантації при лікуванні хворих на гіпопаратиреоз.

Приклад 1 Культивування тканини прищитоподібних залоз новонароджених поросят

Тварин умертвляють шляхом гільйотування. Видалені за стерильних умов прищитоподібні залози вміщують по 5 в один флакон, витримують декілька хвилин в охолоджену розчині Хенкса з антибіотиками, потім відмивають декілька разів, заливають залози подрібнюють до мікрофрагментів 0,1-0,3мм³. Подрібнений матеріал відмивають розчином Хенкса, заливають живильним середовищем 1:8, вміщують у ротаційний апарат для культивування із швидкістю обертання ролера 2,5-3,0об/хв при температурі 27-28°C із заміною живильного середовища згідно винаходу.

Проведене гістологічне дослідження 2-х, 3-х, 5-ти, та 7-ми добової органної культури прищитоподібних залоз та адекватне визначення рівня паратиреоїдного гормону у культуральному сере-

довищі. Виявлено, що на 2-у добу культивування у культивованій тканині виразні некротичні зміни відсутні. У 3-х та 5-ти добовій органній культурі найбільш життєздатними є фрагменти, які звільнені від сполучнотканинної капсули. Функціонально найбільш активними є клітини в невеликих фрагментах. У 5-ти добовій культурі спостерігаються ознаки мітотичного поділу клітин. За ультраструктурними ознаками паратироцити в значній мірі зберігають свої морфологічні та функціональні якості. На 7-му добу культивування в окремих мікрофрагментах виявляються зони деструкції як в центральній частині так і по периферії.

Максимальний вміст паратгормону у культуральному середовищі визначається на 5-ту добу культивування і складає 10нг/л з 7-ї доби культивування він починає знижуватися (6,8нг/л). Найбільш оптимальним строком забору матеріалу для трансплантації є 5-та доба культивування.

Приклад 2 Культивування тканини прищитоподібних залоз ембріональних плодів людини

Джерелом отримання органної культури є прищитоподібні залози ембріональних плодів людини 12-14 недільного внутрішньоутробного розвитку. Стерильно виділені залози вміщують по 3 в один флакон, відмивають охолодженням розчином Хенкса з антибіотиками. Залози змільчують на фрагменти розміром 0,1-0,3мм³. Отриманий матеріал знову промивають охолодженням розчином Хенкса. Потім у кожний флакон наливають живильне середовище у співвідношенні 1:8. Флакони видержують у холодильнику (4°C) 30-40хв, після чого переносять у ротаційний апарат для подальшого культивування при швидкості обертання ролера 2,5-3,0об/хв, при температурі 27-28°C протягом 7-ми діб. В процесі культивування здійснювався гістологічний та гормональний контроль (3, 5, 7 діб). На протязі всього строку культивування клітини зберігають життєздатність і певний рівень гормональної активності. Концентрація паратиреоїдного гормону на 5-ту добу культивування вища, ніж на 3-тю добу і дорівнює 12 нг/л, на 7-му добу знижується (8,2 нг/л).

Таким чином використання даного способу дозволяє отримати високоефективну культуру прищитоподібних залоз, яка може використовуватися для трансплантації при лікуванні хворих на гіпопаратиреоз.

Література

- 1 Бюллетень експериментальної медицини - 1985 - №5 - С 632
- 2 А С СССР №889704, МКИ С12N5/00 - Оpubл 1998
- 3 Пат №2135193 РФ, МКИ А61K35/39 - Оpubл 1999
- 4 Прототип Пат №2095410 РФ, МКИ С12N5/00 - Оpubл 1997