



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 58403

(13) A

(51) 7 A61B10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ АМНІОЦИТІВ

1

2

(21) 2003032588

(22) 25 03 2003

(24) 15 07 2003

(46) 15 07 2003, Бюл. № 7, 2003 р.

(72) Заставна Данута Володимирівна, Гулеюк Наталя Любомирівна, Гнатейко Олег Зиновійович, Безкоровайна Галина Михайлівна, Савицький Василь Ярославович

(73) ІНСТИТУТ СПАДКОВОЇ ПАТОЛОГІЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб культивування амніоцитів, який включає вирощування клітин амніотичної рідини в середовищі AmnioMax-C100 Basal Medium в CO₂-інкубаторі до формування 4-6 колоній амніоцитів, який відрізняється тим, що після формування колоній амніоцитів культуральне середовище з культур зливають у новий флакон, в якому знову вирощують культуру амніоцитів, повторюючи цей цикл 2-3 рази

Винахід відноситься до галузі медицини, зокрема - медичної генетики і може бути застосований для вирощування культури амніоцитів, яка використовується при діагностиці хромосомної патології плоду

Відомі способи культивування амніоцитів ґрунтуються на центрифугуванні амніотичної рідини, посадці осаджених амніоцитів на покривні скла у чашки Петрі з комплексним середовищем Ігла+RPMI-1640+Ham's F10+пуповинна та ембріональна теляча сироватка, культивуванні амніоцитів напротязі 10-15 діб у CO₂-інкубаторі [1]

Недоліками цього способу є трудомісткість, методична складність, тривалість виконання та низький вихід культур

Найближчим аналогом є спосіб культивування амніоцитів, який включає посадку нативної (невідцентрифугованої) амніотичної рідини у комплексному середовищі росту Ham's F-10 + Ham's F-12 + RPMI-1640+20% ембріональної телячої сироватки на слайд-флакони, культивування 7-9 діб при 37°C [2]

Недоліком аналогу є низький вихід культур, методична складність та трудомісткість

Задачею винаходу є розробка такого способу культивування амніоцитів, який би за рахунок повторного використання середовища росту забезпечував би підвищення кількості кінцевого клітинного продукту при зменшенні вихідного біологічного матеріалу

Поставлена задача вирішується тим, що в спосіб культивування амніоцитів, який включає вирощування нативної амніотичної рідини в сере-

довищі AmnioMax-C100 Basal Medium в CO₂-інкубаторі до формування 4-6 колоній клітин, згідно з винаходом, після формування колоній клітин культуральне середовище з культур зливають у новий флакон, в якому знову вирощують культуру амніоцитів, повторюючи цей цикл 2-3 рази

Зливання середовища і повторне вирощування культур амніоцитів забезпечує підвищення виходу готового продукту, оскільки в злитому середовищі є живі клітини, здатні до росту в культурі. При цьому, відпадає необхідність у повторних зборах вихідного біологічного матеріалу

Вказані у формулі винаходу кількості циклів обґрунтовані на 17 дослідженнях. При цьому встановлено, що після 3-го циклу, як правило, культура себе не відтворює

Спосіб виконують наступним чином: у пластиковий разовий флакон для культури клітин вносять амніотичну рідину, додають середовище AmnioMax-C100 Basal Medium у співвідношенні 2:1, культивують у CO₂-інкубаторі 5-9 діб до утворення 4-6 колоній амніоцитів на дні флакона. Після цього середовище росту з культур зливають у новий пластиковий разовий флакон, в якому знову вирощують культуру амніоцитів. Цей цикл при необхідності повторюють 2-3 рази

Приклад 1

Тетяна О., 22 роки. Вагітна, 23-24 тижні вагітності. Скерована на дородову діагностику з приводу підозри на хромосомну патологію плоду на підставі підвищеного у 2,5 рази рівня альфа-фетопroteinу у крові, відносного багатовіддія та двобічних пієлоектазій плоду

(19) UA (11) 58403 (13) A

Під час амніоцентезу отримано 20мл амніотичної рідини

Амніотичну рідину в стерильних умовах розлили у три пластикові разові флакони для культивування клітин по 8 мл в один флакон, додали 4мл середовища AmnioMax-C100 Basal Medium фірми "Gibco BRL". Клітини культивували в термостаті при 37°C та вмістом 5% CO₂. Для більш зрозумілого пояснення подальших маніпуляцій ці перші (вихідні) культури умовно позначаємо культурами серії №1

Мікроскопування культур серії №1 на 6-ту добу культивування засвідчило наявність по 4-6 колоній амніоцитів діаметром 4-6 мм в усіх трьох флаконах

"Старе" середовище, у якому, як показали дослідження в інвертованому мікроскопі, плавали живі неприкріплені клітини, злили у нові флакони для культивування клітин, ставили в термостат на 37°C з CO₂-продувкою. Ці культури умовно назвали культурами серії №2

Мікроскопування культур серії №2 засвідчило наявність 4-6 колоній клітин через 5 діб після початку культивування. На 6-у добу середовище росту з культур серії №2 злили в нові культивувальні флакони (культури серії №3) і поміщали у термостат для подальшого культивування

Те ж проробляли з культурами серії №3 з метою приготувати культур серії №4. Оцінка культур серії №4 засвідчила присутність клітинного росту у флаконах з дещо нижчою проліферативною активністю, а спроба ще раз повторити цикл не увінчалася успіхом

Отже, з 3-х вихідних культур амніоцитів отримано додатково 9 нових культур амніоцитів без внесення нових порцій біологічного матеріалу

Приклад 2

Валентина Б., 36 років, вагітність 17-18 тиж. Скерована на інвазивну пренатальну діагностику з приводу вікового цензу, зниженого рівня альфа-фетопroteinу, підвищеного рівня хоріогонічного гонадотропіну в крові та обтяженого родинного анамнезу (у сина рідного брата вагітної - синдром Дауна)

Під час амніоцентезу отримано 15мл амніотичної рідини

Амніотичну рідину в стерильних умовах розлили у два пластикові разові флакони для культивування клітин по 8мл в один флакон, додали 4мл середовища AmnioMax-C100 Basal Medium фірми "Gibco BRL". Клітини культивували в термостаті при 37°C з вмістом 5% CO₂. Позначаємо ці культури умовно культурами серії №1

Мікроскопування культур серії №1 засвідчило наявність по 4-6 колоній амніоцитів діаметром біля 5мм в усіх флаконах на 9-у добу культивування. На 9-у добу "старе" середовище з цих культур зливали в нові флакони під умовною назвою флакони з культурами серії №2

Через 5 діб у флаконах серії №2 констатована наявність 4-5 колоній амніоцитів. На 6-ту добу середовище росту з цих культур зливали у нові флакони (культури серії №3)

Мікроскопування культур серії №3 засвідчило достатній колоніальний ріст на 6-у добу, середовище росту з цих культур на 6-ту добу злили у нові флакони (культури серії №4). Мікроскопування культур серії №4 засвідчило поодинокі прикріплені амніоцити через 6-ть діб культивування, а ще через 3-й доби констатовано загибель клітин

Таким чином, з 2-х вихідних культур амніоцитів отримано додатково 4-ри культури амніоцитів без внесення нових порцій біологічного матеріалу

Запропонований спосіб застосований при 17 дослідженнях. При цьому, в 11 випадках вдалося провести відтворення культур у 3-х циклах, а у 6-й випадках - у 2-х циклах. В той час як при використанні способу найближчого аналога в усіх 17 випадках був тільки 1-ин цикл

Таким чином, використання запропонованого способу дозволяє збільшити вихід готового продукту при зниженні кількості вихідного біологічного матеріалу

Джерела інформації

1 Гринберг К.Н., Кухаренко В.И., Золотухина Т.В. // Методические рекомендации по культивированию клеток для диагностики наследственных болезней человека - М - 1990 - С 19-22

2 Арбузова С.Б., Хлевная Л.А., Малова С.А. Усовершенствованная методика культивирования и фиксации амниоцитов человека // Биополимеры и клетка, - 1998 - Т. 14, №6 - С 559-560 - найближчий аналог