



УКРАЇНА

(19) UA (11) 47452 (13) U
(51) МПК (2009)
A01K 67/00
C12N 5/00
C12N 15/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ФІДЕРНИХ КЛІТИН ЯЙЦЕПРОВІДІВ

1

(21) u200904658

(22) 12.05.2009

(24) 10.02.2010

(46) 10.02.2010, Бюл.№ 3, 2010 р.

(72) МАДІЧ АЛЛА ВСЕВОЛОДІВНА, ГЕВКАН ІВАН
ІВАНОВИЧ, ШТАПЕНКО ОКСАНА ВСЕВОЛОДІВ-
НА, СЛИВЧУК ЮРІЙ ІВАНОВИЧ, ФЕДОРОВА СВИ-
ТЛАНА ВОЛОДИМИРІВНА

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН УААН

(57) Спосіб одержання фідерних клітин яйцепро-
водів, який включає механічне подрібнення фраг-
ментів тканини, відмивання клітин у середовищі,
культивування їх у розчині трипсину, центрифугу-

2

вання гомогенату, який **відрізняється** тим, що для одержання культури високої активності та очистки проводять 3-разову трипсинізацію 0,5 % розчином трипсину етилендіамінтетраоцтова кислота (1:1) та культивування впродовж 25 хвилин при 37 °С, відмиванням суспензії клітин від трипсину шляхом центрифугування у середовищі DMEM впродовж 10 хвилин при 1000 об/хв, відмивання і нейтралізацію трипсину здійснюють додаванням середовища DMEM з бичачим сироватковим альбуміном та центрифугуванням впродовж 2 хвилин при 1000 об/хв.

Корисна модель належить до галузі репродуктивної біотехнології, зокрема, до ембріобіотехнологічних досліджень *in vitro* при стимуляції процесів оогенезу, одержанні ембріонів трансферабельних стадій.

Відома методика отримання культури фідерних клітин (Voelkel S.A., Amborski G.F., Hill K.G., Godke R.A. Use of a uterine-cell monolayer culture system for micromanipulated bovine embryos // Theriogenology. - 1985. - Vol. 24., №3. - P.271-281), яка полягає в культивуванні шматочків тканини (до 2мм) впродовж 2 тижнів, обробці клітин 0,05% трипсину у збалансованому солевому розчині Хенкса.

Недоліком цього способу є те, що для отримання культури клітин використовують культивування шматочків тканин, а це в свою чергу приводить до тривалого процесу отримання готової культури.

Найбільш близьким по суті до засобу, що заявляється є метод отримання культури фідерних клітин яйцепроводів (S.Woldesenbet, G.R.Newton Comparison of proteins synthesized by polarized caprine oviductal epithelial cells and oviductal explants *in vitro* // Theriogenology. - 2003. - Vol.60 (3). - P. 533-543), який полягає в механічному подрібненні фрагментів яйцепроводу, відмиванні клітин у HBSS та короткотривалому (10хв) культивуванні епітеліальних клітин у розчині трипсину.

Недоліком цього способу є те, що для отримання ізольованої культури клітин яйцепроводів проводять одноразову трипсинізацію та центрифугування культури, що є недостатнім для одержання культури високої активності та очистки.

Заявлений нами спосіб усуває недоліки прототипу і дозволяє отримати культуру високої життєздатності та проліферативної активності за рахунок модифікації деяких методичних елементів; послідовній трьохразовій обробці зразків гомогенізованих тканин розчином трипсину з наступним центрифугуванням.

В основу корисної моделі поставлено завдання розробити спосіб одержання моношару з ізольованих епітеліальних клітин яйцепроводів, який характеризуються стійким проліферативним ростом, спрямований на стимуляцію процесів оогенезу, відновлення мітотичного дроблення ембріонів.

Технічний результат досягається проведенням 3-х разової обробки тканини яйцепроводів 0,5% розчином трипсину з наступним центрифугуванням, що дозволяє отримати культуру фідерних клітин з високою життєздатністю та проліферативною активністю.

Отже, використання зазначеного способу отримання первинної культури фідерних клітин за рахунок удосконалення методичних прийомів було отримано моношар з ізольованих епітеліальних

UA (11) 47452 (13) U

клітин яйцепроводів, що забезпечує дозрівання ооцитів корів до 93%, відновлює мітотичне дроблення ембріонів та підвищує їх якість на 10-15%.

При проведенні патентно-інформаційного пошуку заявником і авторами винаходу знайдено технічне рішення, яке містить найбільшу кількість ознак, спільних із заявленим способом (культивуванні культури клітин яйцепроводів, обробці клітин трипсином, центрифугуванні гомогенату культури клітин) (S.Woldesenbet, G.R.Newton Comparison of proteins synthesized by polarized caprine oviductal epithelial cells and oviductal explants in vitro // Theriogenology. - 2003. - Vol.60 (3). - P. 533-543).

Однак, наявність зазначених, спільних з прототипом суттєвих ознак недостатньо для одержання технічного результату, який забезпечує заявлений спосіб. Технічні рішення, які б за сукупністю ознак повністю співпадали з заявленим технічним рішенням - не виявлено. Це дозволяє зробити висновок про відповідність заявленого технічного рішення критерію корисної моделі - "новизна".

В патентній і науково-технічній інформації не знайдено технічних рішень, в яких були б описані відомості про ознаки, що відрізняють заявлений спосіб від прототипа і забезпечують досягнення технічного результату: шляхом збільшення кількості обробки зразків гомогенізованих тканин 0,5% розчином трипсину та ресуспендуванням клітинної маси.

Отже, заявлене технічне рішення не впливає явним чином з рівня техніки, що дозволяє зробити висновок про його відповідність критерію корисної моделі - "винахідницький рівень".

Корисна модель може бути застосована в біотехнологічних і трансплантаційних центрах, у дослідницьких центрах репродуктивної біотехнології тварин для регенерації та відновлення мітотичного дроблення ембріонів при їх багаторазовій бісекції, одержанні клонів тварин при економічно вигідних витратах.

Таким чином, заявлене технічне рішення є новим, промислово придатним і має винахідницький рівень, тобто відповідає усім умовам патентоспроможності корисної моделі відповідно до ст.7 розділу II закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі" №1771-III, 2000р.

Для підвищення життєздатності та потенціалу розвитку ооцитів та ембріонів ранніх доімплантаційних стадій нами досліджено різні способи одержання фідерних клітин яйцепроводу з визначенням їх проліферативного росту.

Як контроль був вибраний спосіб одержання фідерних клітин яйцепроводу за Voelkel S.A., et al 1985, який полягає у наступних послідовних процедурах:

1. Культивування шматочків тканини (до 2мм) впродовж 2 тижнів.

2. Обробка клітин трипсином (0,05% трипсина у збалансованому солевому розчині Хенкса).

У 1-шій дослідній групі фідерні клітини яйцепроводу одержували згідно наступної схеми за S.Woldesenbet, 2003:

1. Епітеліальні клітини яйцепроводів отримували від кожного з сегментів яйцепроводу - ампулярної, істмусної ділянок шляхом зішкрібання,

механічно подрібнювали та поміщали в культуральні флакони.

2. Відокремлені клітини культивували в середовищі DMEM:F12 з вмістом 5% (1:1) бичачий сироватковий альбумін (BCA).

3. Клітини відмивали HBSS, видаляли з культуральних флаконів та піддавали короткотривалому впродовж 10 хвилин культивуванню у розчині трипсину/етиленадіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) (1:1).

4. Життєздатність отриманих клітин яйцепроводу визначали шляхом фарбування клітин трипановим синім.

5. Клітини культивували в 12-лункових культуральних планшетах. Середовище змінювали кожні 48 годин до формування стійкого моношару клітин яйцепроводів.

6. Визначення концентрації клітин проводили в камері Горяєва.

У 2-й дослідній групі одержували культуру клітин яйцепроводів згідно модифікованого нами способу, що полягає в послідовній трьохразовій обробці зразків гомогенізованих тканин розчином трипсину з наступним центрифугуванням та дозволяє отримати культуру фідерних клітин з високою життєздатністю та проліферативною активністю:

1. Для одержання культури фідерних клітин використовують яйцепроводи від евтанованих тварин відразу після їх забою на м'ясокомбінаті.

2. Тканина яйцепроводів механічно подрібнюється ножицями та після додавання середовища ТМ-199 у співвідношенні 1:1 гомогенізується у скляному гомогенізаторі.

3. Отриману суспензію клітин фільтрують через 4 шари марлі.

4. Відокремлення пошкоджених нежиттєздатних клітин проводять шляхом дворазового ресуспендування клітинної маси у 2мл культурального середовища DMEM з наступним центрифугуванням впродовж 10хв при 1000об/хв.

5. Після останнього центрифугування осад дезагрегується 0,5% розчином трипсину/ЕДТА (1:1) та культивується 25 хвилин при 37°C.

6. Для відмивання від трипсину до суспензії додають середовище DMEM та центрифугують 10 хвилин при 1000об/хв.

7. Супернатант відбирають і для нейтралізації трипсину ще раз додають середовище DMEM з BCA та центрифугують 2хв при 1000об/хв.

8. Для проведення повторної трипсинізації до центрифугату додають 0,5% розчин трипсину/ЕДТА (1:1) та культивують знову 25 хвилин при 37°C.

9. Відмивання від трипсину та нейтралізацію його DMEM проводять аналогічно пункту 5 і 6.

10. Третю трипсинізацію, відмивання і нейтралізацію трипсину здійснюють згідно пункту 4.5 та 6.

11. Одержані три групи клітин змішують, ресуспендують і проводять визначення концентрації клітин в камері Горяєва в 5-ти великих квадратах по формулі:

$C = n \cdot 12,5 \cdot 1000$, де

n - число клітин в 5-ти квадратах

12. У стерильні чашки з культуральним середовищем ($V=200\text{мкл}$) додавали отримані ізольовані клітини яйцепроводів і культивували впродовж 24-х годин при $t=38,5$, в атмосфері з 5% CO_2 . Використовують первинну культуру клітин яйцепроводів в концентрації 1×10^6 клітин/мл середовища.

В результаті проведених досліджень встановлено, що завдяки застосуванню трьохкратної трипсинізації тканини яйцепроводів при одержанні первинної культури збільшується в 2,5 рази вихід ізольованих клітин яйцепроводів (1-ша дослідна група) за рахунок поетапного відщеплення клітин

від конгломератів тканини. Одержані клітини 1-шої дослідної групи по життєздатності та проліферативній активності не відрізняються від клітин одержаних шляхом однократної трипсинізації (табл.) через те, що відділені клітини не піддаються дії трипсину.

Приклади конкретного використання способу

Для перевірки технології та підтвердження переваги заявленого способу перед відомими нами досліджено ефективність різних способів отримання культури фідерних клітин яйцепроводу.

Таблица

Результати одержання фідерних клітин яйцепроводів трьома способами, $M \pm m$, $n=3$

Групи	Кількість клітин в 1мл ($\times 10^6$), через 24, 48 та 72 години культивування			
	початкова	24	48	72
Контрольна	1,2	$3,85 \pm 0,03$	$4,89 \pm 0,03$	$6,62 \pm 0,05$
Прототип	1,2	$4,44 \pm 0,38$	$5,05 \pm 0,03$	$8,46 \pm 0,05$
Модифікований спосіб	1,2	$3,55 \pm 0,10$	$4,97 \pm 0,04$	$15,93 \pm 0,04$

Порівняння результатів досліджень способів одержання фідерних клітин яйцепроводу заявленого модифікованого способу з традиційними способами свідчить про те, що найбільш ефективним виявився заявлений спосіб одержання фідерних клітин яйцепроводів.

Послідовна трьохразова обробка зразків гомогенізованих тканин розчином трипсину з наступним центрифугуванням (Модифікований спосіб)

дозволяє отримати культуру фідерних клітин з високою життєздатністю та проліферативною активністю з $1,21 \times 10^6$ до $15,93 \pm 0,04 \times 10^6$ після 72 годин культивування, тоді як в прототипі концентрація клітин після тривалого культивування становила $8,46 \pm 0,05 \times 10^6$, а в контрольній групі відповідно - $6,62 \pm 0,05 \times 10^6$.