



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **61440** (13) **U**
(51) МПК
C12N 5/02 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ПІДГОТОВКИ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ФРАГМЕНТІВ НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ НОВОНАРОДЖЕНИХ ПОРОСЯТ ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ

1

2

(21) u201013487

(22) 15.11.2010

(24) 25.07.2011

(46) 25.07.2011, Бюл.№ 14, 2011 р.

(72) УСТИЧЕНКО ВІКТОРІЯ ДМИТРІВНА, АЛАБЕ-
ДАЛЬКАРІМ НАТАЛІЯ МИХАЙЛІВНА, БОНДАРЕН-
КО ТЕТЯНА ПЕТРІВНА

(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІО-
МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК

УКРАЇНИ

(57) Спосіб підготовки кріоконсервованих фрагментів надниркових залоз новонароджених поросят для трансплантації, що включає розморожування фрагментів, видалення кріопротектора та рекультивування протягом 2 діб в середовищі 199, збагаченому 10 % ембріональної телячої сироватки, який **відрізняється** тим, що рекультивування проводять при температурі 24 °С.

Корисна модель належить до галузі кріобіології і кріомедицини і може бути використана в трансплантології.

Відомий спосіб підготовки кріоконсервованої адренортикальної тканини для трансплантації шляхом розморожування зразків при 42 °С та видалення кріопротектора стерильним фізіологічним розчином [1].

Недоліком цього способу є те, що він не забезпечує досить високого рівня гормональної активності клітин адренортикальної тканини, оскільки призводить до вірогідного зниження базальної секреції кортизолу в порівнянні з нативною тканиною та до втрати здатності зразків до стимульованої секреції.

Найбільш близьким до заявленого способу є спосіб підготовки кріоконсервованих фрагментів надниркових залоз для трансплантації [2]. Даний спосіб полягає у тому, що кріоконсервовані фрагменти надниркових залоз новонароджених поросят відігрівають на водяній бані при 42 °С та видаляють кріопротектор шляхом 4-разової заміни живильного середовища. Далі зразки рекультивують при 37 °С в атмосфері з 5 % CO₂ протягом 2 діб в 2 мл живильного середовища 199, що містить 10 % ембріональної телячої сироватки, 100 Од/мл пеніциліну та 75 мкг/мл канаміцину.

Недоліком цього способу є те, що він не дозволяє підтримувати високий рівень гормональної активності кріоконсервованих клітин надниркових залоз. In vitro базальна секреція кортизолу дорівнює 64 % в порівнянні з нативним контролем, а стимульована секреція вище лише в 1,77 рази в порівнянні з базальною секрецією. При трансплантації рівень кортизолу в плазмі крові тварин-

реципієнтів складає 160 % в порівнянні з даним показником для адреналектомованих тварин, прийнятим за 100 %.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалити відомий спосіб підготовки кріоконсервованих фрагментів надниркових залоз новонароджених поросят для трансплантації шляхом зміни умов рекультивування, і таким чином забезпечити підвищення їх гормональної активності.

Ця задача вирішується тим, що в способі підготовки кріоконсервованих фрагментів надниркових залоз новонароджених поросят, який включає розморожування фрагментів, видалення кріопротектора та рекультивування протягом 2 діб в середовищі 199, збагаченому 10 % ембріональної телячої сироватки, згідно з корисною моделлю рекультивування проводять при температурі 24 °С.

Температура, нижча за фізіологічну, є тим фактором, що позитивно впливає на функціональну активність клітин при культивуванні. Зниження температури рекультивування фрагментів надниркових залоз до 24 °С дозволяє підвищити гормональну активність фрагментів надниркових залоз. Так, базальна секреція кортизолу підвищується в порівнянні з даними за прототипом у 2,92 рази, а стимульована секреція - у 2,25 рази в порівнянні з базальною секрецією. При цьому гормональна активність фрагментів, рекультивованих при 24 °С, на 30 добу після трансплантації дорівнює 316,43% в порівнянні з рівнем даного показника для адреналектомованих тварин, прийнятим за 100%, що у 2,8 рази вище в порівнянні з даними, отриманими за умов прототипу.

Спосіб здійснюють таким чином.

(19) **UA** (11) **61440** (13) **U**

Кріоконсервовані фрагменти надниркових залоз новонароджених поросят відігрівають при 42 °С та видаляють кріопротектор шляхом 4-разової заміни живильного середовища. Далі рекультивують при 24 °С в атмосфері з 5 % CO₂ протягом 2 діб в 2 мл середовища 199, що містить 10 % ембріональної телячої сироватки, 100 Од/мл пеніциліну та 75 мкг/мл канаміцину.

Приклад 1

Новонароджених поросят забивали з використанням ефірного наркозу, надниркові залози негайно вилучали в стерильних умовах, відмивали середовищем 199, що містило 100 Од/мл пеніциліну і 75 мкг/мл канаміцину, подрібнювали на фрагменти розміром 1-3 мм³ та кріоконсервували в присутності 5 % ДМСО зі швидкістю охолодження 1°С/хв. [3]. Кріоконсервовані фрагменти надниркових залоз відігрівали при 42 °С, видаляли кріопротектор шляхом 4-разової заміни живильного середовища та рекультивували при 24 °С в атмосфері з 5 % CO₂ протягом 2 діб в 2 мл середовища 199, що містить 10 % ембріональної телячої сироватки, 100 Од/мл пеніциліну та 75 мкг/мл канаміцину. Після рекультивування визначали базальну та стимульовану секрецію кортизолу. Вивчення стимульованої секреції проводили при додаванні до середовища інкубації дбцАМФ до кінцевої концентрації 2 ммоль/л.

Рівень кортизолу в середовищі інкубації фрагментів визначали методом радіоімуннологічного аналізу з використанням стандартних тест-наборів СТЕРОН-К-¹²⁵I-М (Білорусія) і нормували на білок, концентрацію якого визначали за методом Бредфорд [3].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента і однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) - для непараметричних даних.

Виходячи з даних, представлених в Табл. 1, рекультивування при 24 °С дозволяє зберегти високий рівень базальної секреції кортизолу клітинами кріоконсервованих фрагментів надниркових залоз новонароджених поросят (137,67±7,53

нмоль/г білку), що у 2,92 рази вище, ніж у випадку рекультивування за умов прототипу (37 °С). Зразки, підготовані згідно з заявленим способом, здатні також до стимульованої секреції в присутності стимулятора стероїдогенезу дбцАМФ. Так, рівень стимульованої секреції дорівнює 310,42±10,12 нмоль/г білку, що у 2,25 рази вище в порівнянні з базальною секрецією, та складає 121,49 % по відношенню до відповідного показника за прототипом, прийнятого за 100 %.

Приклад 2

Ефективність заявленого способу оцінювали при ксенотрансплантації фрагментів надниркових залоз новонароджених поросят тваринам з наднирковою недостатністю.

Трансплантацію кріоконсервованих і рекультивованих фрагментів надниркових залоз, підготованих згідно з Прикладом 1, в дозі 35 мг здійснювали під капсулу нирки адреналектомованих мишей під комбінованим наркозом (кетамін - 2,5 мг, ксилазін - 0,5 мг/100 г маси тіла тварин). Через 30 діб після трансплантації тварин виводили з експерименту та оцінювали рівень кортизолу в плазмі крові за допомогою радіоімуннологічного аналізу з використанням стандартних тест-наборів СТЕРОН-К-¹²⁵I-М (Білорусія).

В надниркових залозах мишей основним глюкокортикоїдом є кортикостерон у зв'язку з неактивністю ферменту СYP21в, що відповідає за синтез кортизолу. Однак незначна кількість кортизолу (10 нмоль/л) присутня в плазмі крові мишей, тому про ефективну продукцію кортизолу клітинами трансплантату свідчило підвищення рівня даного показника вище 10 нмоль/л. На 30 добу після трансплантації спостерігалось підвищення рівня кортизолу в плазмі крові тварин-реципієнтів (316,43 % в порівнянні з рівнем даного показника для адреналектомованих тварин, прийнятого за 100 %), який складав 32,94±2,31 нмоль/л, що у 2,8 рази вище в порівнянні з даними, отриманими за умов прототипу.

Таблиця 1

Вміст кортизолу (нмоль/г білку) у середовищі інкубації кріоконсервованих фрагментів надниркових залоз новонароджених поросят після рекультивування за різних температурних режимів

Температура рекультивування	Нативні фрагменти	Кріоконсервовані та рекультивовані фрагменти	
		Базальна секреція	Стимульована секреція
24°С	242,8±2,29	137,67±7,53 *	310,42±10,12#
37°С (за прототипом)	186,95±12,51	47,07±2,31 *	255,5±12,03#

* - відмінності вірогідні в порівнянні з відповідними нативними фрагментами (p<0,05);

- відмінності вірогідні в порівнянні з відповідною базальною секрецією (p<0,05).

Таблиця 2

Вміст кортизолу (нмоль/л) в плазмі крові експериментальних тварин на 30 добу після трансплантації фрагментів надниркових залоз новонароджених поросят

Адреналектомовані тварини	Тип трансплантату		
	Нативні фрагменти	Кріоконсервовані та рекультивовані фрагменти	
		24 °C	37 °C (за прототипом)
10,41±1,87	37,92 ± 5,23*	32,94±2,31*	11,74±3,42

* - відмінності вірогідні по відношенню до адреналектомованих тварин ($p < 0,05$).

Джерела інформації:

1. Легач Є.І. Вплив кріоконсервування на адренокортикальну тканину // Автореф. дис.... канд. мед. наук: 03.00.19. - Харків, 1998. - 18 с.

2. Легач Е.И. Влияние аденогипофиза на морфо-функциональные свойства адренокортицитов в органотипической культуре и при трансплантации // Проблемы эндокринной патологии. -

2007. - № 2. - С. 52-60.

3. Патент України 34848 А, МПК⁵ C12N 5/02, Публ. 1999 р. Спосіб кріоконсервування культури клітин адренокортикальної тканини.

4. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. - 1976. - V. 72. - P. 248-254.