



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 80497

(13) C2

(51) МПК (2006)

A01N 1/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ОРГАНОТИПОВОЇ КУЛЬТУРИ СІМ'ЯНИКІВ НОВОНАРОДЖЕНИХ ПОРОСЯТ

1

2

(21) а200604455

(22) 20.04.2006

(24) 25.09.2007

(46) 25.09.2007, Бюл. № 15, 2007 р.

(72) Божок Галина Анатоліївна, Легач Євген Іванович, Гуріна Тетяна Михайлівна, Губіна Ніна Федорівна, Бондаренко Тетяна Петрівна

(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(56) UA A 40865, 15.08.2001.

UA A 55921, 15.04.2003.

UA A 46673, 15.05.2002.

(57) Спосіб кріоконсервування органотипової культури сім'яників новонароджених поросят, що включає інкубацію у розчині кріопротектора диметилсульфоксиду і програмне заморожування з подальшим зануренням у рідкий азот, який **відрізняється** тим, що кріопротектор беруть у концентрації 10%, інкубацію проводять протягом 10 хв, а програмне заморожування здійснюють зі швидкістю 5°C/хв до температури -40°C.

Винахід належить до галузі кріобіології та кріомедицини і може бути використаний у практичній медицині.

Фрагменти тканини розміром від 0,5 до 2,0 мм³, які використовуються для подальшого культивування у живильних середовищах, називають органотиповою культурою [1].

Існує спосіб кріоконсервування органотипової культури сім'яників новонароджених хом'яків [2]. Згідно зі способом фрагменти цієї тканини розміром 0,5-1,0 мм³ інкубують протягом 20 хв у розчині 10%-го диметилсульфоксиду (ДМСО) на середовищі Лейбовица з додаванням 0,1 моль/л сахарози та 1% сироваткового альбуміну людини, потім заморожують згідно з наступним режимом: 0,3°C/хв до -40 °C, 10°C/хв до -140°C з подальшим зануренням у рідкий азот. Відігрів здійснюють на водяній бані при температурі 37°C протягом 1хв.

Недоліком цього способу кріоконсервування є те, що він не забезпечує збереженість стероїдогенної функції сім'яників на контрольному рівні: вміст тестостерону у сироватці крові цих тварин (5,1±1,5нМоль/л), що становить 61% у порівнянні з нативом (7,1±1,4нМоль/л).

Найбільш близьким до заявленого є спосіб консервування органотипової культури сім'яників плода людини [3], згідно з яким сім'яники розрізають на фрагменти 2х2х3мм, переносять у поліетиленові ампули ємністю 1мл і додають 5%-ний ДМСО, виготовлений на розчині Хенкса. Фрагменти у кріозахисному розчині витримують протягом

30хв. при температурі 22°C, після чого заморожують по триетапній програмі: від кімнатної температури до температури кристалізації кріозахисного розчину зі швидкістю 1°C/хв, витримують при цій температурі протягом 10хв., потім до температури -80°C зі швидкістю 10°C/хв., після чого занурюють у рідкий азот (-196 °C). Відігрів здійснюють на водяній бані при температурі 37-40°C до появи рідкої фази.

Головним недоліком цього способу є низький рівень секреції тестостерону. Після розморожування базальна активність виділення тестостерону складає 4,967±0,249нМоль/мг, що становить 74% у порівнянні з нативом (6,233±0,170нМоль/мг). Активність виділення тестостерона розмороженою тканиною після стимулювання ембріональними нервовими клітинами практично не відрізняється від нативної при культивуванні на фідері з додаванням нервових клітин (стимульований натив 6,000±0,1763нМоль/мг).

Це зумовлено тим, що цей спосіб вимагає загато тривалості (30 хв) експозиції фрагментів у розчині кріопротектора перед початком заморожування, що пригнічує активність аденілатциклази, яка є одним з ключових ферментів в процесі синтезу тестостерону [4].

Окрім того, складність і тривалість програми заморожування вимагає додаткового часу для реалізації даного способу.

В основу винаходу поставлено задачу створити такий спосіб кріоконсервування органотипової

(13) C2

(11) 80497

(19) UA

культури сім'яників новонароджених поросят, який би, за рахунок зміни концентрації кріопротектора, тривалості інкубації та режиму охолодження, забезпечив підвищення рівня секреції тестостерону.

Ця задача вирішується тим, що у способі кріоконсервування органотипової культури сім'яників новонароджених поросят, який включає інкубацію у розчині кріопротектора ДМСО і програмне заморожування з послідовним зануренням у рідкий азот, згідно з винаходом, ДМСО беруть у концентрації 10%, інкубацію здійснюють протягом 10хв., а програмне заморожування проводять зі швидкістю 5°C/хв до температури -40°C.

Спосіб кріоконсервування органотипової культури сім'яників новонароджених поросят, що пропонується, дає можливість зберегти стероїдогенну базальну активність органотипової культури сім'яників новонароджених поросят на контрольному рівні, а стимульовану - підвищити на 31,72% у порівнянні з нативом. Крім того, спосіб дозволяє скоротити та спростити процес кріоконсервування.

Спосіб пояснюється наступними прикладами.

Приклад 1. Органотипову культуру отримували з одного сім'яника новонародженого поросля шляхом розрізання його на фрагменти розміром від 0,5 до 2мм³, культивували протягом 2 діб у 2 мл живильного середовища 199 з додаванням 10% сироватки великої рогатої худоби, 100 Од/мл пеніциліну та 75 мкг/мл канаміцину. Після 2 доби культивування органотипову культуру відмивали від середовища культивування, переносили у пластикові контейнери для кріоконсервування об'ємом 2 мл, до неї додавали 1 мл кріоконсервуючого розчину, що містив живильне середовище 199 та 10% ДМСО, інкубували протягом 10 хв при температурі 22°C, а далі здійснювали програмне заморожування зі швидкістю 5 °C/хв до температури -40°C, після чого занурювали у рідкий азот. Відігрів здійснювали на водяній бані при 37°C до появи рідкої фази. Видаляли ДМСО шляхом триразового відмивання у 10мл живильного середовища 199. Функціональну повноцінність органотипової культури сім'яників оцінювали за здатністю виділення тестостерону в культуральне середовище. Секрецію тестостерону клітинами органотипової культури оцінювали до та після розморожування. Для цього органотипову культуру після видалення кріопротектора помішували у 2мл живильного середовища 199, що містило 100Од/мл пеніциліну та 75мкг/мл канаміцину. Після інкубації протягом 1 години відбирали пробу з живильного середовища та вимірювали рівень тестостерону радіоімунологічним методом з використанням тест-набору РІА-

тестостерон-ПР (Беларусь). Кількість гормону розраховували на білок. Рівень базальної секреції тестостерону в живильне середовище після інкубації органотипової культури сім'яників протягом 1 години при 37°C становив 23,94±3,74нМоль/мг білку, що складало 94,02% від контролю (таблиця 1).

Так як ендокринні тканини характеризуються не тільки базальним, але й стимульованим гормонопоезом, то для того, щоб оцінити схоронність та функціональну активність органотипової культури сім'яників новонароджених поросят після кріоконсервування визначали секрецію тестостерону після додавання специфічного стимулятора - хоріонічного гонадотропіну (ХГ). Для цього після розморожування органотипову культуру сім'яників помішували в 2мл живильного середовища 199, що містило 100Од/мл пеніциліну, 75мкг/мл канаміцину та стимулятор стероїдоге-незу ХГ. Інкубацію проводили протягом 1 години при 37°C. Рівень ХГ-стимульованої секреції тестостерону в живильне середовище після інкубації становив 42Д9±8,99нМоль/мг білку, що складало 131,72 % від контролю (таблиця 2).

Приклад 2. Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що охолодження до температури -40°C проводили з різними швидкостями: 1°C/хв., 5°C/хв., 10°C/хв. та 50-60°C/хв. Результати наведено у таблицях 1 і 2, з яких видно, що найбільш близькими до контролю за параметром зберігання базальної та стимульованої секреції тестостерону є режим охолодження зі швидкістю 5°C/хв.

Приклад 3. Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що після культивування органотипову культуру помішували в розчини для інкубування, які містили 0, 5, 7, 10 та 15% ДМСО на середовищі 199. Результати експерименту подані у таблиці 3, з якої видно, що ДМСО у концентрації 10% стимулює базальну секрецію тестостерону органотиповою культурою сім'яників новонароджених поросят.

Приклад 4. Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що тривалість інкубації фрагментів в консервуючому розчині становила 5, 10, 15, 30, 45 і 60 хв. Після відігрівання та видалення кріопротектора в органній культурі було проаналізовано кількість життєздатних клітин за виключенням суправітального барвника трипанового синього. Кількість клітин підраховували у камері Горяєва. Отримані результати наведені у таблиці 4, з якої видно, що інкубація протягом 10 хв дає найвищий рівень життєздатності клітин.

Таблиця 1

Рівень тестостерону в живильному середовищі в залежності від швидкості охолодження

Умови експерименту	Вміст тестостерону	
	нМоль/мг білку	% від контролю
Контроль (інтактна добова культура) 2-	25,46±11,47	-
Кріоконсервована швидкістю 1°C/хв зі	12,89±11,99	50,62
Кріоконсервована швидкістю 5°C/хв зі	23,94±3,74	94,02
Кріоконсервована швидкістю 10°C/хв зі	17,48±1,89	68,65
Кріоконсервована швидкістю 40-60°C/хв зі	17,07±12,01	67,04

Таблиця 2

Рівень тестостерону в живильному середовищі у присутності ХГ в залежності від швидкості охолодження

Умови експерименту	Вміст тестостерону	
	нМоль/мг білку	% від контролю
Контроль (інтактна добова культура) 2-	32,03±1,99	—
Кріоконсервована швидкістю 1°C/хв зі	33,43±6,47	104,37
Кріоконсервована швидкістю 5°C/хв зі	42,19±8,99	131,72
Кріоконсервована швидкістю 10°C/хв зі	23,92±3,14	74,67
Кріоконсервована швидкістю 40-60°C/хв зі	15,06±1,24	47,01

Таблиця 3

Рівень секреції тестостерону в залежності від концентрації ДМСО

Умови експерименту	Вміст тестостерону	
	нМоль/мг білку	% від контролю
0% ДМСО	20,55±5,09	-
5% ДМСО	18,98±2,80	92,36
7% ДМСО	25,01±1,34	121,70
10% ДМСО	98,45±19,20	479,07
15% ДМСО	5,32±12,31	25,88

Таблиця 4

Життєздатність клітин органотипової культури сім'яників в залежності від тривалості інкубації

Тривалість інкубації	Життєздатність, %
5 хвилин	94,412,3
10 хвилин	95,213,6
15 хвилин	76,812,4
30 хвилин	37,510,9
45 хвилин	18,311,9
60 хвилин	17,912,3

Джерела інформації.

1. Гаврилюк Б.К., Сафронов В.П. Органотипическое культивирование тканей.- М.: Наука, 1983.- С. 37-40.

2. Schatt S., Kim S.S., Gosden R. Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated hosts // Reproduction.-2002.-V. 124.-P.339-346.

3. Керос В.А. Кріоконсервування фетотестикулярної тканини людини. Автореферат дисертації.... Харків, 2001.- 19с.

4. Устиченко В.Д., Алабедалькарим Н.М., Бондаренко Т.П. Влияние сохранения архитектоники ткани на криочувствительность надпочечных желез мышей и новорожденных поросят // Проблемы криобиологии.- 2003.- № 3.- С. 39-45.