



УКРАЇНА

(19) UA (11) 4567 (13) U

(51) 7 A01N1/02

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

(54) СПОСІБ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ОРГАННОЇ КУЛЬТУРИ НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ НОВОНАРОДЖЕНИХ ПОРОСЯТ

1

(21) 20040604398

(22) 07.06.2004

(24) 17.01.2005

(46) 17.01.2005, Бюл. № 1, 2005 р.

(72) Гуріна Тетяна Михайлівна, Алабедацька
Наталія Михайлівна, Устиченко Вікторія Дмитрівна,
Бондаренко Тетяна Петрівна(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІО-
МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ

(57) Спосіб кріоконсервування органної культури

2

надниркових залоз новонароджених поросят, який включає вміщення зразка в контейнер, що містить середовище 199 з кріопротектором димексидом, інкубацію і заморожування до температури рідкого азоту, який відрізняється тим, що димексид беруть в концентрації 10%, інкубацію проводять при 21-22°C протягом 5хв., після інкубації дно контейнера витримують у рідкому азоті протягом 40-50сек, після чого повністю занурюють у рідкий азот.

Корисна модель належить до кріобіології та кріомедицини і може бути використана в медицині при трансплантаціях.

Відомий спосіб кріоконсервування цільних фетальних надниркових залоз [1], який включає інкубацію їх в середовищі RPMI 1640, що містить 20% ембріональної телячої сироватки, і заморожування від кімнатної температури до -40°C зі швидкістю 1град/хв., далі до -80°C зі швидкістю 5град/хв., від -80°C до -120°C зі швидкістю 5град/хв. з послідовним зануренням у рідкий азот.

Недоліком способу є те, що в клітинах кріоконсервованих надниркових залоз пошкоджується ендоплазматичний ретикулум і зникають ліпідні включення, які грають важливу роль в забезпеченні процесів стероїдогенезу. Це свідчить про порушення гормонпродукції клітин.

Відомий спосіб кріоконсервування зрізів наднирників новонароджених поросят [2]. Спосіб передбачає інкубацію зрізів в розчині Хенкса з 10% димексидом (ДМСО) і заморожування до температури рідкого азоту.

Недоліком способу є зниження гормональної активності розморожених залоз. Вміст глюкокортикоїдів в клітинах становить 7,39 і 12,49нМоль/л мг (контроль 31,06нМоль/л мг) на 2 і 7 добу культивування, відповідно. Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб кріоконсервування культури клітин адренокортикальної тканини [3]. Згідно зі способом зразок поміщують у контейнер, що містить середовище 199 з 5% ДМСО, і інкубують

при 0°-4°C протягом 15хв., далі відігривають до 25°C і заморожують від 25°C до -70 - -72°C зі швидкістю 0,5-1,0град/хв., після чого занурюють у рідкий азот.

Недоліком способу є те, що він не забезпечує високої життєздатності та гормональної активності клітин. Після розморожування зберігається 85% життєздатних клітин, а вміст в них глюкокортикоїдів становить 26,4нМоль/л мг (85,2%) (контроль 31,0нМоль/л мг) [4].

Крім цього, спосіб є тривалим, що пов'язано з проведенням додаткової процедури нагріву зразка після інкубації (15хв) і тривалістю процесу заморожування (2 години при швидкості заморожування 1град/хв і 3,5 години при швидкості 0,5град/хв.).

В основу корисної моделі поставлено задачу створити такий спосіб кріоконсервування органної культури надниркових залоз новонароджених поросят, який би дозволив підвищити кількість життєздатних клітин та їх гормональну активність при одночасному скороченні часу його здійснення.

Ця задача вирішується тим, що в способі, який включає поміщення зразка в контейнер, що містить середовище 199 з кріопротектором ДМСО, інкубацію і заморожування до температури рідкого азоту, відповідно до корисної моделі, ДМСО беруть в концентрації 10%, інкубацію проводять при 21-22°C протягом 5хв, після інкубації дно контейнера витримують у рідкому азоті протягом 40-50сек, після чого повністю занурюють у рідкий азот.

(13) U

(11) 4567

(19) UA

Зміна умов інкубації та заморожування дозволяє підвищити життєздатність та гормональну активність клітин органної культури надниркових залоз новонароджених поросят на 10-13% і 21-28%, відповідно, а також скоротити час його виконання (процес інкубації з криопротектором і заморожування займає не більш ніж 10хв)

Спосіб здійснюють таким чином

Органну культуру надниркових залоз новонароджених поросят відмивають від середовища культивування, поміщують в контейнер, що містить середовище 199 з 10% ДМСО, і інкубують протягом 5хв при температурі 21-22°C, яка в цьому випадку є оптимальною для насичення клітин криопротектором. Після інкубації дно контейнера занурюють у рідкий азот і витримують протягом 40-50сек. Далі контейнер повністю занурюють у рідкий азот і зберігають в ньому до моменту застосування. Такий режим заморожування забезпечує спрямоване кристалоутворення, що знижує ризик пошкодження клітин.

Приклад 1. Органну культуру надниркових залоз новонароджених поросят відмивали від середовища культивування, додавали до неї 0,8мл середовища 199 і переносили в пластикові контейнери об'ємом 2мл, що містили 0,8мл середовища 199 і 20% ДМСО (кінцева концентрація ДМСО 10%), та інкубували протягом 5хв при 21-22°C. Після закінчення інкубації дно контейнерів витримували у рідкому азоті протягом 40-50сек. Далі контейнери повністю занурювали у рідкий азот і зберігали протягом 72 годин. Відігрів здійснювали на водяній бані при 42°C до появи рідкої фази ДМСО видалляли шляхом 3-разового відмивання 10мл живильного середовища. Гормональну активність клітин оцінювали за їх здатністю до секреції глюкокортикоїдів при культивуванні при 37°C в 2мл живильного середовища, що містить 10% теплоінактивованої ембріональної телячої сироватки.

100Од/мл пеніциліну та 75мкг/мл канаміцину. Рівень гормону визначали радіоімунологічним методом за допомогою тест-набору СТРОН-К-125-1-М (Біларусь) та нормували на 1мг тканини. Він становив $33,16 \pm 2,12$ нМоль/л мг ($n=10$). Життєздатність клітин оцінювали за виключенням суправитального забарвлення трипанового синього. Для цього зі зразків отримували суспензію клітин методом ферментативної дезагрегації [5]. Життєздатність клітин становила $95,3 \pm 2,5\%$.

Приклад 2. Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що застосовували різні кінцеві концентрації ДМСО в середовищі інкубації: 7%, 10% і 15%. Результати наведені в табл 1.

З табл 1 видно, що найвища життєздатність та гормональна активність забезпечуються при застосуванні 10% ДМСО.

Приклад 3. Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що інкубацію з ДМСО у кінцевій концентрації 10% проводили протягом 1, 5 та 10хв. Результати наведені в табл 2.

З табл 2 видно, що при інкубації менше 5хв життєздатність клітин знижується, а при інкубації протягом 5 і 10хв зберігається однаково високий рівень життєздатності. Оскільки згідно даним досліджень [6] тривала інкубація (протягом 10-30хв) надниркових залоз у розчині 10% ДМСО приводить до пригнічення базальної активності аденілатциклази і зниження функціональної активності клітин, то якнайкоротший строк інкубації клітин у криопротекторі є переважливим.

Таким чином, отримані дані свідчать про те, що заявлений спосіб криоконсервування органної культури надниркових залоз новонароджених поросят забезпечує одержання криоконсервованого матеріалу з високою життєздатністю і гормональною активністю, що дозволяє використовувати його для трансплантації.

Таблиця 1

Життєздатність та гормональна активність органної культури надниркових залоз після криоконсервування в присутності різних концентрацій ДМСО ($n=10$)

Умови експерименту	Вміст глюкокортикоїдів		Життєздатність, % від контролю
	нМоль/лмг	% від контролю	
Контроль	$31,1 \pm 3,25$	100	100
Криоконсервування з 7% ДМСО	$20,98 \pm 1,10$	$67,3 \pm 3,5$	$29,42 \pm 3,1$
Криоконсервування з 10% ДМСО	$33,16 \pm 4,24$	$106,3 \pm 6,8$	$95,3 \pm 2,5$
Криоконсервування з 15% ДМСО	$27,68 \pm 1,53$	$88,7 \pm 4,9$	$54,6 \pm 3,8$

Таблиця 2

Життєздатність клітин органної культури надниркових залоз при інкубації різної тривалості з 10% ДМСО ($n=10$)

Час інкубації	Життєздатність, % від контролю
1хв	$53,4 \pm 4,5$
5хв	$95,3 \pm 2,5$
10хв	$93,6 \pm 3,8$

Джерела інформації

1. Till H. Cryopreservation and transplantation of fetal adrenal glands in adrenalectomized rats //Eur J

Ped Surg - 1998 - №8 - P 240-243

2. Чуйко В.А., Карпенко Л.Г., Иванова Е.Г., Губина Н.Ф., Лерач Е.И. Криоконсервация коры над-

почечников // Проблемы криобиологии. - 1995 - №1. - С.47-51

3. Патент України №34848А, С12N 5/02. 2001 Спосіб кріоконсервування культури клітин адренокортикальної тканини.

4. Бондаренко Т.П., Легач Е.И. Секретирующая способность адренокортикальной ткани новорожденных половозрелых свиней при действии низких температур // Проблемы криобиологии. - 1998, - №2. - С.50-54.

5. Ogawa T., Dobrinski I, Avarbook M.R., Brinster

R.L. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes // Biology of Reproduction. - 1999. - N60. - P. 515-521.

6. Karpenko L.G., Gubina N.F., Schirova V.A., Kapelyants A.S. The effects of freezing and cryoprotectant exposure on adenylate cyclase activity in cell membranes of bovine thyroid gland and adrenal cortex // CryoLetters. - 2001 - Vol.22, N4. - P.229-334.

