



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **46440** (13) **U**
(51) МПК (2009)
C12N 5/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ ГОРМОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ОРГАНОТИПОВИХ КУЛЬТУР ЩИТОВИДНИХ ЗАЛОЗ НОВОНАРОДЖЕНИХ ПОРОСЯТ**

1

2

(21) u200905844

(22) 09.06.2009

(24) 25.12.2009

(46) 25.12.2009, Бюл.№ 24, 2009 р.

(72) БІЛЯВСЬКА СВІТЛАНА БОРИСІВНА, БОЖОК
ГАЛИНА АНАТОЛІЇВНА, ЛЕГАЧ ЄВГЕН ІВАНОВИЧ,
БОНДАРЕНКО ТЕТЯНА ПЕТРІВНА(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІО-
МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ

(57) Спосіб підвищення гормональної активності органотипових культур щитовидних залоз новонароджених поросят, що включає культивування фрагментів щитовидних залоз в середовищі 199, збагаченому 10% сироватки великої рогатої худоби та йодидом калію, який **відрізняється** тим, що додатково на 3 добу культивування в середовище культивування вводять фрагменти надниркових залоз або гіпофізу.

Корисна модель належить до галузі медицини, зокрема трансплантології, і може бути використана на етапі обробки трансплантаційного матеріалу з метою покращення його якості, а саме - морфофункціональних характеристик тканини щитовидної залози, а також зниження імуногенності та подовження термінів функціонування трансплантату в організмі реципієнта.

Відомий спосіб підвищення гормональної активності культури тироцитів новонароджених поросят з метою подальшого їх застосування для компенсації гіпофункції щитовидної залози [1]. Спосіб полягає в тому, що видалені щитовидні залози новонароджених поросят відокремлюють від жирової і з'єднувальної тканин, подрібнюють на шматочки розміром 1-2мм³, ферментують на водяній бані при 37°C і висівають у пробірки по 10⁶ клітин в 1мл живильного середовища 199, яке містить 15% сироватки великої рогатої худоби і антибіотики.

Недоліком даного способу є те, що він не дозволяє підтримувати високий рівень гормональної активності тироцитів. Так, падіння вмісту тироксину в середовищі культивування з 2 по 5 добу складає 86,1%.

Найбільш близьким за своєю суттю та ефектом до способу, що заявляється, є спосіб підвищення гормональної активності органотипової культури щитовидної залози новонароджених поросят [2]. Спосіб включає експлантацію щитови-

дних залоз новонароджених поросят в асептичних умовах, подрібнювання залоз на фрагменти, 3-кратне відмивання та культивування від 1 до 10 діб на живильному середовищі №2 (середовище 199, 10% сироватки великої рогатої худоби, 75мкг/л йодиду калію та 100ОД/мл пеніциліну і 100мкг/мл стрептоміцину) при температурі 37°C з заміною середовища культивування 1 раз на добу.

Гормональну активність тироцитів у культурі оцінювали шляхом визначення базального та стимульованого рівнів тироксину в середовищі культивування. Вміст тиреоїдних гормонів в середовищі культивування визначали радіоімунологічним методом за допомогою тест-наборів PIA-T4-CT та PIA-T3-CT на кожну добу культивування/рекультивування, концентрацію гормонів розраховували на білок. Життєздатність культур визначали методом суправітального забарвлення трипановим синім клітинної суспензії, отриманої методом ферментативної дезагрегації.

Недоліком цього способу підвищення гормональної активності органотипової культури щитовидної залози новонароджених поросят є те, що на 4 добу спостерігається виражене падіння гормональної активності культури. Так, вміст тироксину в середовищі культивування на 2 добу складає 14,28±0,6нмоль/мг білку, а на 4 добу - 8,31±0,1нмоль/мг білку. Відсоток падіння вмісту гормону дорівнює 41,8%. Також спостерігається зниження стимульованої секреції тироксину з

(13) **U**(11) **46440**(19) **UA**

31,24±0,9нмоль/мг білку на 2 добу до 28,81±2,1нмоль/мг білку на 4 добу культивування, що складає 7,7%.

Крім того, на 4 добу спостерігається зниження життєздатності клітин в культурі до 52,68±0,7%.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити такий спосіб підвищення гормональної активності щитовидних залоз новонароджених поросят, в якому би, шляхом введення в середовище культивування додаткового модифікуючого агенту, забезпечувалась можливість підвищення показників гормональної активності.

Ця задача вирішується тим, що в способі підвищення гормональної активності щитовидних залоз новонароджених поросят, який включає культивування фрагментів щитовидних залоз в середовищі 199, збагаченому 10% сироватки великої рогатої худоби та йодидом калію, згідно з корисною моделлю, додатково на 3 добу культивування в середовище культивування вводять фрагменти надниркових залоз або гіпофізу.

Комбіноване культивування щитовидних залоз з наднирковими залозами або гіпофізом має позитивний вплив на морфофункціональні характеристики тканини щитовидної залози. Шляхи реалізації даного ефекту обумовлені локальною модифікуючою дією біологічно активних речовин на сигнально-регуляторні і трофічні процеси в тиреоїдній тканині.

Комбіноване культивування фрагментів щитовидних і надниркових залоз забезпечує підвищення гормональної активності на 89,5% порівняно з прототипом та життєздатності клітин на 19,5%. Комбіноване культивування фрагментів щитовидних залоз і гіпофізу забезпечує підвищення гормональної активності на 87,9% порівняно з прототипом та життєздатності клітин на 18,1%.

Культивування фрагментів щитовидних залоз з фрагментами надниркових залоз або гіпофізу за заявленим способом може використовуватися на етапі обробки трансплантаційного матеріалу, а отримані таким чином гормонально активні культури щитовидних залоз призначені для трансплантації у випадку первинного гіпотиреозу лабільного перебігу, в стадії декомпенсації, при неефективності терапії синтетичними гормональними монопрепаратами.

Спосіб здійснюють таким чином.

Щитовидні, надниркові залози і гіпофізи експлантують від новонароджених поросят в асептичних умовах, подрібнюють на фрагменти 0,5-1мм³ і переносять до культуральних флаконів із розрахунку 1 залоза на флакон. Фрагменти щитовидних залоз культивують протягом 3 діб на живильному середовищі 199, збагаченому 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби і йодидом калію (75мкг/л) з додаванням пеніциліну (100ОД/мл) і стрептоміцину (100мкг/мл) при температурі 37°С, з заміною середовища культивування 1 раз на добу. Потім на 3 добу культивування, до фрагментів щитовидних залоз вводять фрагменти надниркових залоз або гіпофізу, відокремлюють напівпроникливою мембраною та інкубують 24 години з заміною середовища на кожну добу культивування.

Приклад 1. Щитовидні, надниркові залози і гіпофізи новонароджених поросят отримували в стерильних умовах і подрібнювали на фрагменти 0,5-1мм. Фрагменти щитовидних залоз культивували протягом 3 діб на живильному середовищі 199, збагаченому 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби і йодидом калію (75мкг/л) з додаванням пеніциліну (100ОД/мл) і стрептоміцину (100мкг/мл) при температурі 37°С. Заміну середовища культивування здійснювали 1 раз на добу. На 3 добу культивування фрагменти щитовидних залоз відокремлювали напівпроникливою мембраною від фрагментів надниркових залоз або гіпофізу і інкубували 24 години. Монокультури щитовидних залоз отримували шляхом культивування протягом 4 діб у вищеописаних умовах без внесення модифікуючих агентів. Для визначення здатності органотипових культур щитовидних залоз відповідати на дію модифікаторів гормонопоезу, на 3 добу в середовище культивування монокультур щитовидних залоз або комбінованих культур щитовидних і надниркових залоз додавали дибутирил-циклічний аденозинмонофосфат (1ммоль/мл) на 12 годин, а комбіновані культури щитовидних залоз і гіпофізу інкубували в присутності тиротропін-релізінг гормону (200мкг/мл) протягом 2 годин.

Гормональну активність органотипових культур щитовидних залоз визначали за вмістом тироксину в середовищі культивування. Концентрацію тироксину в середовищі культивування дослідних зразків визначали методом радіоімунологічного аналізу з використанням стандартних тест-наборів РІА-Т4-СТ (Білорусь) згідно з інструкцією. Показники вмісту Т4 нормували на білок, який вимірювали за методом Бредфорда.

Життєздатність культур визначали на 4 добу культивування методом суправітального забарвлення трипановим синім клітинної суспензії, отриманої методом ферментативної дезагрегації. Кількість життєздатних клітин (ЖК, %) визначали шляхом підрахунку в гемоцитометрі і знаходили за формулою: $ЖК = \left(\frac{\sum_{\text{незабарвл}}}{\sum_{\text{заг}}} \right) \times 100$, де $\sum_{\text{незабарвл}}$ - кількість живих (незабарвлених) клітин, $\sum_{\text{заг}}$ - загальна кількість клітин в полі зору.

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

Дані, наведені в Табл. 1, свідчать, що вміст тироксину в середовищі культивування фрагментів щитовидних залоз новонароджених поросят на 4 добу дорівнював 36,29±1,7нмоль/мг білка, що на 74,6% вище за представлений в прототипі (9,23±0,7нмоль/мг білка). Рівень Т4 в інкубаційному середовищі після комбінованого культивування фрагментів щитовидних і надниркових залоз вірогідно збільшувався на 58,8% порівняно з монокультурою щитовидних залоз і складав 88,05±3,0нмоль/мг білка. Комбіноване культивування фрагментів щитовидних залоз і гіпофізу також супроводжувалось вірогідним збільшенням концентрації тироксину в середовищі інкубації на 52,5%, яка дорівнювала 76,35±2,7нмоль/мг білка.

Показник життєздатності клітин монокультур

щитовидних залоз (Табл. 2) на 4 добу культивування складав $52,68 \pm 0,7\%$. Показник життєздатності клітин комбінованих культур щитовидних і надниркових залоз становив $68,25 \pm 0,02\%$, що на $19,5\%$ вище ніж у клітин монокультур щитовидних залоз. Зафіксовано збільшення життєздатності клітин ($64,36 \pm 0,01\%$) в органотипових культурах щитовидних залоз після комбінованого культивування з експлантатами гіпофізу на $18,1\%$.

Приклад 2. Ефективність заявленого способу підвищення гормональної активності органотипових культур щитовидних залоз новонароджених поросят також оцінювали *in vivo* шляхом ксенотрансплантації тваринам з експериментальним гіпотиреозом. В якості тварин-реципієнтів використовували самок щурів вагою 165-215г. Післяопераційний гіпотиреоз моделювали за допомогою ретроградної тиреоїдектомії під комбінованим внутрішньочеревним наркозом (кетамін - 2,5мг, ксилазин - 0,5мг/100г маси тіла). З метою запобігання порушення кальцієвого обміну тваринам давали 0,2% розчин кальцію хлориду. Контролем були інтактні щури.

Органотипові культури щитовидних і надниркових залоз отримували за методом, описаним в

Прикладі 1. Трансплантаційний матеріал у дозі 30-35мг вносили під капсулу нирки, перед цим тваринам здійснювали лівосторонню адреналектомію методом електрокоагуляції.

Тварин виводили із експерименту на 30 добу після трансплантації. Вміст загального тироксину в плазмі крові тварин-реципієнтів визначали за допомогою радіоімунологічного аналізу з використанням тест-наборів PIA-T4-CT (Білорусь) згідно з інструкцією.

Після трансплантації органотипових культур щитовидних залоз гіпотиреоїдним щурам (Табл. 3) рівень загального Т4 складав $24,03 \pm 5,4$ нмоль/л, що на $61,1\%$ менше в порівнянні з інтактним контролем ($61,71 \pm 6,1$ нмоль/л) та на $24,0\%$ більше порівняно з тиреоїдектомованими тваринами ($18,26 \pm 0,8$ нмоль/л).

Комбіноване культивування фрагментів щитовидних залоз з фрагментами надниркових залоз зумовило підвищення рівня тироксину в плазмі крові тварин-реципієнтів після ксенотрансплантації ($29,48 \pm 0,6$ нмоль/л) в порівнянні з ксенотрансплантацією монокультур щитовидних залоз ($24,03 \pm 5,4$ нмоль/л).

Таблиця 1

Рівні базальної та стимульованої секреції тироксину (нмоль/мг білка) органотиповою культурою щитовидної залози новонароджених поросят в інкубаційному середовищі на 4 добу культивування ($M \pm m$, $n=28$)

Органотипова культура щитовидної залози			Комбінована органотипова культура щитовидної і надниркової залози		Комбінована органотипова культура щитовидної залози і гіпофізу	
	базальна секреція	стимульована секреція	базальна секреція	стимульована секреція	базальна секреція	стимульована секреція
Запропонований спосіб	$36,29 \pm 1,7$	$92,44 \pm 4,5^*$	$88,05 \pm 3,0^*$	$50,09 \pm 6,2$	$76,35 \pm 2,7^*$	$46,22 \pm 3,6$
Спосіб за прототипом	$9,23 \pm 0,7$	$28,81 \pm 2,1$	-	-	-	-

* - $p < 0,05$ по відношенню до базального рівня тироксину в інкубаційному середовищі монокультур щитовидних залоз.

Таблиця 2

Вплив комбінованого культивування двох видів ендокринних тканин на життєздатність клітин щитовидних залоз новонароджених поросят на 4 добу культивування ($M \pm m$, $n=28$)

Органотипова культура щитовидної залози (за прототипом)	Комбінована органотипова культура щитовидної і надниркової залози	Комбінована органотипова культура щитовидної залози і гіпофізу
Життєздатність, % ¹	Життєздатність, % ¹	Життєздатність, % ¹
$52,68 \pm 0,7$	$68,25 \pm 0,02$	$64,36 \pm 0,01$

¹ за 100 %-в прийнято кількість життєздатних клітин інтактних щитовидних залоз.

Таблиця 3

Рівень тироксину (нмоль/л) в плазмі крові щурів після ксенотрансплантації моно- та комбінованої органотипової культури щитовидної та надниркової залози ($M \pm m$, $n=42$)

Інтактні тварини (контроль)	Тиреоїдектомовані тварини без трансплантації	Ксенотрансплантація органотипової культури щитовидної залози	Комбінована ксенотрансплантація культури щитовидної і надниркової залози
61,71±6,1	18,26±0,8	24,03±5,4	29,48±0,6

Джерела інформації:

1. Изучение морфофункциональных свойств культивируемых тироцитов новорожденных поросят с целью определения возможности их применения для компенсации гипопункций щитовидной

железы / Шостак И.Н. и др. // Пробл. эндокринологии. - 1992. - Т.38. - №5. - С.33-37.

2. Луговой С.В. Вплив кріоконсервування на культуру клітин щитовидної залози новонароджених поросят / Автореф. дис...Харків, 2003. - 18с.