



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **87098** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
C12N 5/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2013 08162	(72) Винахідник(и):	Бєлоусова Алла Олександрівна (UA), Кривохатська Людмила Дмитрівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	27.06.2013	(73) Власник(и):	ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ОТОЛАРИНГОЛОГІЇ ІМ. ПРОФ. О.С. КОЛОМІЙЧЕНКА НАМН УКРАЇНИ", вул. Зоологічна, 3, м. Київ, 03068 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	27.01.2014		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	27.01.2014, Бюл.№ 2		

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ ЕКСПЛАНТАТІВ ТКАНИН ХВОРИХ ІЗ ЗЛОЯКІСНИМИ НОВОУТВОРЕННЯМИ

(57) Реферат:

Спосіб культивування експлантатів тканин хворих із злоякісними новоутвореннями включає вирощування пухлинної тканини на покривному склі з лункою за загальноприйнятою методикою. Одночасно із пухлинною тканиною культивують нормальну тканину слизової оболонки того ж хворого, а як субстрат використовують харчовий целофан.

UA 87098 U

Корисна модель належить до медицини, зокрема до лор-онкології і може бути використана для культивування пухлинних та нормальних тканин при дослідженні механізмів диференціювання клітин та процесу проліферації, а також для вивчення індивідуальної чутливості клітин до хіміопрепаратів.

Відомо багато методів культивування пухлин людини, які отримують при оперативних втручаннях.

Як субстрат використовують покрівні скельця зі згустком плазми - метод Гаррісона (Harrison) 1907; покрівні скельця з перфорованим целофаном - метод Шиллінга і Ерла (Shilling & Earle); целюлозні та желатинові губки - метод Лейтона (Leighton); ацетатну целюлозу - метод Шеффера (Shaffer); папіросний папір, вкритий силіконом, - метод Рихтера (Richter) (Джон Пол, Медгіз, 1963, С. 188-192).

Відомий спосіб культивування пухлинної тканини раку нирки людини на вузькому покрівному склі у плазменному згустку (Терентьева Т.Г., Фомина И.Г., Навашин СМ. Вопросы онкологии, 1971, т.XVII, №7, с.67-70), спосіб культивування шматочків пухлин на скельцях, вкритих желатином (Авт.свид. №1791452 "Способ культивирования тканей in vitro"), вирощування експлантатів пухлин у дифузійних камерах (Экспериментальная онкология, 1996, №18, С.224-250).

Недоліками аналогів є технологічні складності методик, неможливість отримати довготривалого вирощування, спостереження та фарбування неушкоджених шарів культивованих клітин у достатній кількості.

Прототипом даного способу є спосіб культивування пухлинної тканини Іщенко Р.В. (патент UA43256, бюл. № 10, 2001 р.), що містить вирощування культури на покрівному склі з лункою. Використовують плазму як субстрат, застосовують стимулятори росту, плазму та сироватку хворого, що є донором пухлини, покривають культури стерильною вазеліновою олією, після прицільної аспірації олії та рідкого поживного середовища створюють можливість фарбування зони росту.

Недоліками прототипу є трудоемність процесу, значні витрати на реактиви та неможливість отримати клітини в достатній кількості.

В основу корисної моделі поставлена задача спростити спосіб культивування експлантатів тканин за рахунок використання як субстрату харчового целофану, що забезпечує можливість довготривалого культивування пухлинної тканини.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі культивування експлантатів тканин хворих із злоякісними новоутвореннями здійснюють вирощування пухлинної тканини на покрівному склі з лункою за загальноприйнятою методикою, який, згідно з корисною моделлю, одночасно зі злоякісною культивують нормальну тканину слизової оболонки того ж хворого, а як субстрат використовують харчовий целофан.

Прозорий харчовий целофан попередньо витримують у ефірі та спирті, багато разів відмивають у проточній та дистильованій воді, нарізають на шматочки 0,5-1,5 см та за допомогою леза на кожному шматочку роблять надрізи. Целофан стерилізують 30 хв. при 1 атм. у чашках Петрі, перекладаючи його фільтрувальним папером.

Тканину для культивування отримували з пухлин гортані людей, хворих на рак, яким проводилась повна або часткова резекція гортані. Нормальні епітеліальні клітини отримували із неушкодженої слизової оболонки зовнішньої поверхні основи надгортанника у тих же хворих.

Тканини нарізали на шматочки 0,5-1 мм³, відмивали розчином Хенкса або фізрозчином з антибіотиками. Шматочки тканин фіксували у надрізах целофану і поміщали у флакони з поживним середовищем, що складалося із культурального середовища 199 та RPMT-1640 "Sigma", 15 % ембріональної сироватки телят "Sigma" та гентаміцину 40 мкг/мл.

На 3-4 день по периферії експлантатів з'являється зона виселення епітеліальних клітин. На 5-6 добу спостерігається їх активна проліферація, навкруги експлантатів утворюються різні по формі та розміру епітеліальні пласти. На 13-15 добу на целофані формуються щільні шари клітин, які з усіх сторін оточують експлантати. При тривалому культивуванні (30-40 діб) ріст клітин розповсюджується на всю плівку.

Цитологічна структура клітин досліджується в світлооптичному мікроскопі після використання необхідних методів фарбування.

Приклад застосування корисної моделі

Хворий К., 66 років, прооперований в ДУ "Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України" 14.05.2013р. з приводу плоскоклітинного ороговіваючого раку гортані. Із видаленої гортані вирізані шматочки пухлини та нормальної слизової оболонки із ділянки зовнішньої поверхні основи надгортанника розмірами 1см³, які були розрізані на експлантати розмірами 1-2 мм³.

В надрізах целофанових плівок фіксували 6-8 експлантатів, які вміщали в стерильні пеніцилінові флакони із поживним середовищем. Культивування проводили в термостаті при $t = 38^{\circ}\text{C}$. Активна проліферація ракових та нормальних епітеліальних клітин спостерігалась на 5-6 добу. На 8-9 добу навколо експлантатів формувались шари клітин, площа яких поступово збільшувалась. На 15-20 день культивування в деяких плівках шари ракових та нормальних епітеліальних клітин починали стикатись.

Під час культивування кожні 4-5 доби відбирались плівки для фарбування гематоксиліном та еозином та дослідження їх в світлооптичному мікроскопі. Характер росту шарів злоякісних та нормальних епітеліальних клітин в них мали суттєві відмінності.

Позитивним результатом даного способу є простота та економічність методики виконання за рахунок використання целофану, можливість довготривалого культивування з достатньою кількістю одночасно вирощуваних на одному і тому ж субстраті злоякісних та нормальних епітеліальних клітин, їх фарбуванні та мікроскопії.

15 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб культивування експлантатів тканин хворих із злоякісними новоутвореннями, який включає вирощування пухлинної тканини на покривному склі з лункою за загальноприйнятою методикою, який **відрізняється** тим, що одночасно із пухлинною тканиною культивують нормальну тканину слизової оболонки того ж хворого, а як субстрат використовують харчовий целофан.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601