

СПОСІБ ПІДБОРУ ОПТИМАЛЬНОГО СТРОКУ КУЛЬТИВУВАННЯ, ЖИТТЄЗДАТНИХ І ГОРМОНАЛЬНО-АКТИВНИХ ОРГАННИХ КУЛЬТУР ЩИТОВИДНОЇ ЗАЛОЗИ, ПРИЗНАЧЕНИХ ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ

Винахід стосується медицини, а саме трансплантологи' і може знайти застосування в клініці при пересадці органних культур щитовидної залози. Значного прогресу в сучасній ендокринології було досягнуто завдяки запровадженню в практику лікування гіпофункціональних станів ендокринних залоз методів ауто-, ало- і ксенотрансплантації. Зокрема, за допомогою методу трансплантації клітинних і органних культур щитовидної залози вдається досягти як покращення клінічного стану хворого, так і гормональної компенсації різних форм стійкого гіпотиреозу.

Однак до теперішнього часу не розроблено та не запропоновано для клінічного застосування спосіб підбору оптимального строку культивування та відбору органних культур щитовидної залози, призначених для трансплантації, який би дозволив гарантувати максимально ефективне клінічне застосування цього методу лікування тиреоїдної патології.

Проведений патентно-інформаційний пошук по вітчизняним та зарубіжним науковим виданням виявив декілька способів підбору оптимального строку культивування ендокринних органів з використанням морфологічних та імунологічних методів дослідження, які включають культивування тканин або клітин ендокринних органів з наступним відбором частини матеріалу і аналізом біологічної активності в динаміці [1,4].

Так, спосіб підбору оптимального строку культивування клітин ендокринних органів, призначених для трансплантації, заключається у виділенні із проб клітин антигенів, імунізації ними тварин і визначенні з допомогою реакції пасивної гемаглютинації титру антитіл в отриманих імунних сироватках [4]. Однак цей спосіб є вельми трудомістким, потребує кваліфікованого персоналу (спеціаліста-імунолога) та тривалого часу для постановки (більше трьох тиж-

нів), а отримані при цьому дані свідчать тільки про імуногені властивості клітин ендокринних органів і не дають уявлення про їхню життєздатність та основну функцію тканини щитовидної залози - здатність до секреції тиреоїдних гормонів.

Крім того, відомий спосіб підбору оптимального строку культивування органної культури щитовидної залози новонароджених поросят, який заключається у проведенні динамічного світлооптичного та електронномікроскопічного дослідження, а також морфометричного аналізу [1]. Однак цей спосіб є трудомістким і потребує кваліфікованого персоналу (спеціаліста-морфолога). Отримані при цьому дані не дають уявлення про гормонсекреторну активність органної культури щитовидної залози, оскільки гістологічні ознаки активності клітин щитовидної залози є чисто морфологічним феноменом і відображають, швидше за все, ступінь стимуляції клітин щитовидної залози тиреотропним гормоном гіпофіза, чим дійсну продукцію гормонів. До того ж відомо, що деякі хімічні речовини (зокрема, природні або штучні струминогени) здатні блокувати синтез тиреоїдних гормонів, що в цілісному організмі призводить (за принципом зворотнього зв'язку) до надмірного виробітку тиреотропного гормону гіпофізу і, як наслідок, до гістологічних ознак гіпертрофії внутрішньоклітинних структур щитовидної залози, що може бути помилково прийнято за гіперфункцію. Дійсна ж продукція гормонів щитовидної залози при цьому знижена.

Також проведений патентно-інформаційний пошук показав, що до теперішнього часу не розроблено та не запропоновано для безпосереднього застосування в клінічній практиці способу відбору найбільш придатного трансплантаційного матеріалу. На експериментальних та доклінічних етапах досліджень були вивчені лише деякі показники життєдіяльності та функціональної активності тиреоїдної тканини, а також дана її морфологічна характеристика.

Так, спосіб вивчення органної культури щитовидної залози новонароджених поросят у динаміці культивування заключається у проведенні світлооптичного дослідження [3]. Однак цей спосіб є трудомістким і потребує кваліфікованого персоналу (спеціаліста-морфолога). Отримані при цьому дані не дають

уявлення про гормонсекреторну активність органної культури щитовидної залози, що про вже згадувалось раніше.

Також відомий спосіб визначення життєздатності кріоконсервованої тканини щитовидної залози людини, призначеної для трансплантації, який заключається у дослідженні йодакумуляуючої активності та органіфікації йодидів, а також визначені активності аденилатциклази [2]. Однак отримані при використанні цих методів дані свідчать про активність тільки перших двох етапів утворення тиреоїдних гормонів - захвату йоду щитовидною залозою та його зв'язування з білками - і зовсім не дають уявлення про гормонсекреторну активність тканини щитовидної залози, яка і є основною функцією будь-якої ендокринної залози. До того ж, процес синтезу тироксину і трийодтироніну тиреоїдною тканиною складається з п'яти етапів (захват йоду щитовидною залозою з крові та його органіфікація є першими), кожний з яких становить лімітуючий фактор в гормоногенезі. В деякій мірі аналогічні твердження справедливі також і для методу визначення активності аденилатциклази, яка відіграє певну роль у здатності клітин сприймати гормональні сигнали (в першу чергу, тиреотропного гормону гіпофізу) та трансформувати їх в клітинний метаболізм. Однак за останні роки отримані незаперечні дані про можливість тиреотропної регуляції функціональної активності щитовидної залози і через інші внутрішньоклітинні системи, зокрема гуанілатциклази.

Враховуючи вищенаведені аргументи, більш доцільним є розробка способу підбору оптимального строку культивування, життєздатних і гормонально-активних органних культур щитовидної залози, призначених для трансплантації, шляхом безпосереднього визначення тиреоїдних гормонів, що синтезуються тканиною щитовидної залози та є основним терапевтичним фактором при трансплантації. Для підтвердження життєздатності тиреоїдної тканини також необхідно досліджувати її спроможність поглинати йод, який до того ж є обов'язковим елементом синтезу тиреоїдних гормонів.

В основу цього винаходу поставлене завдання створити *спосіб* підбору оптимального строку культивування органних культур щитовидної залози та

відбору найбільш придатних для клінічного застосування органних культур за результатами попереднього визначення їх життєздатності та гормонсекреторної активності. Це дозволить значно спростити методику підбору органних культур та уникнути проведення низько- або, навіть, неефективної трансплантації тиреоїдної тканини.

Спосіб полягає в тому, що автори пропонують підбирати оптимальний строк культивування та відбирати найбільш придатні для трансплантації органні культури тиреоїдної тканини за показниками максимальної йодакумулюючої та гормонпродукуючої активностей, що досягається шляхом визначення рівнів тиреоїдних гормонів (тироксину і трийодгироніну) в живильному середовищі радіоімунологічним методом, а також визначення рівня поглинання радіойоду тиреоїдною тканиною радіоізотопним методом.

Відмінні ознаки заявленого винаходу в своїй сукупності раніше не використовувались у відомих технічних рішеннях і для фахівця явно не впливають з рівня техніки, тому можна зробити висновок *про* те, що винахід відповідає критеріям "охороноздатності", "новизни" та "винахідницького рівня".

Спосіб виконується наступним чином:

З кожного культурального посуду, що містить органні культури щитовидної залози, відбирають аліквоти живильного середовища, які відповідають різним строкам культивування та різним пробам тканин, після чого заморожують при -20°C до кількісного визначення в них тироксину та трийодтироніну радіоімунологічним методом. Потім переносять по декілька частинок кожної органної культури щитовидної залози в іншу культуральну посуду із свіжим живильним середовищем та інкубують з радіойодом протягом 90 хвилин, після чого тиреоїдну тканину ретельно промивають 0,9% розчином NaCl, зважують і визначають ступінь поглинання ізотопу радіометричним методом. За максимальними показниками вмісту тироксину і трийодгироніну в живильному середовищі та за максимальними показниками накопичення радіойоду в тиреоїдній тканині підбирають оптимальні строки культивування та відбирають *найбільш* придатні для трансплантації органні культури.

Радіометричним критерієм життєздатності органної культури щитовидної залози вважається сам факт накопичення радіоізотопу в тиреоїдній тканині, оскільки поглинання йоду фібробластами щитовидної залози (60 ± 2 імп/хв/ 10^6 клітин при середнього виході приблизно 10^7 клітин з одного граму тканини) не чинить впливу на результати досліджень.

Враховуючи, що концентрація внутрішньоклітинного тироксину становить, за даними досліджень, від $1,890 \cdot 10^{-8}$ мкг/клітину до 170 мкг/г тканини, а секреція тироксину та трийодтироніну щитовидною залозою відбувається у пропорції 10:1, показниками високої гормональної активності органної культури щитовидної залози є рівні тироксину та трийодтироніну в живильному середовищі, що перевищують значення 5,0 і 0,5 пмоль/мг тканини, відповідно.

При оцінці отриманих результатів необхідно також враховувати, що ступінь гормональної компенсації гіпотиреозу та фактична кількість поглинутого трансплантатом щитовидної залози радіойоду залежать від його функціональної цілості в момент дослідження, кількості трансплантованої тканини та рівня циркулюючого в крові реципієнта тиреотропного гормону.

Запропонований спосіб оцінки органних культур щитовидної залози, призначених для трансплантації, дозволяє визначати їх життєздатність та функціональну активність (зокрема, здатність секретувати тироксин і трийодтиронін).

Приклад I. З метою підбору оптимального строку культивування органних культурах щитовидної залози новонароджених поросят, що призначені для трансплантації, на 3-, 5-, 8-, 11-, 14-₅ 17- і 20-у добу культивування відбирали аліквоти живильного середовища для кількісного визначення в них тироксину та трийодтироніну радіоімунологічним методом з використанням наборів реактивів ріо-Т4-ИПР та ріо-Т3-ИПР (Дослідне підприємство Інституту біоорганічної хімії АН Беларусі). Потім переносили по декілька частинок кожної органної культури щитовидної залози в іншу культуральну посуду із свіжим живильним середовищем, що містило йод-131 (Дослідне підприємство "Радиопрепарат" Інституту ядерної фізики АН Узбекистану) із розрахунку 37 кБк на 1 мл

середовища. Через 90 хвилин частинки щитовидних залоз промивали декілька разів холодним 0,9% розчином NaCl, просушували на фільтрувальному папері та зважували, після чого визначали поглинання радіоїоду тиреоїдною тканиною радіометричним методом на гама-лічильнику "Gammacord II" ("Miles Laboratories Inc.", США).

За результатами досліджень, де рівні тиреоїдних гормонів - тироксину (Т₄) і трийодтироніну (Т₃) - та ступінь поглинання радіоїоду виявились найбільшими, в даному випадку 3-8-а доба культивування, визначали оптимальний строк культивування тиреоїдної тканини (таблиця 1).

Таблиця 1. Функціональна активність органної культури щитовидної залози новонароджених поросят залежно від строків культивування

Строки культивування, доба	Поглинання йоду, імПХВ- ¹ -мг тканини ⁻¹	Секреція Т ₄ , пмоль-мг тканини* ¹	Секреція Т ₃ , пмоль-мг тканини ⁻¹
3	1067 ± 88 (5)	57,0919,68(8)	10,31 ± 1,10(2)
5	732 ± 10(10)	16,03 ± 2,24 (9)	3,30 ± 0,92 (4)
8	1191 ± 95(5)	12,96 ± 2,20 (10)	3,14 ± 0,83 (9)
11	692 ± 23 (5)	4,09 ± 0,63 (10)	0,61 ± 0,12(10)
14	525 ± 24 (5)	3,70 ± 0,46 (10)	0,57 ± 0,23(10)
17	770 ± 32 (5)	3,58 ± 0,56 (8)	0,23 ± 0,06 (8)
20	634 ± 18(5)	2,35 ± 0,48 (3)	0,08 ± 0,02 (3)

Примітка: в дужках вказана кількість органних культур, кожна з яких отримана від окремої тварини.

Приклад 2. Вищеописаним способом відбирали найбільш життєздатні та гормонально активні органні культури щитовидної залози новонароджених поросят для проведення трансплантації. Аліквоти живильного середовища та частинки тканини кожної органної культури щитовидної залози використовували для кількісного визначення тироксину та трийодтироніну радіоімунологічним методом та поглинання радіоїоду тиреоїдною тканиною радіометричним методом.

За результатами визначень, де рівні тиреоїдних гормонів - тироксину і трийодтироніну - та ступінь поглинання радію вивчили найбільшими, в даному випадку проби за номерами 1-8, 10-12 і 14, відбирали життєздатні та функціонально активні органні культури щитовидної залози з максимальними гормонпродукуючими показниками (таблиця 2).

Таблиця 2. Життєздатність та гормонсекреторна активність органних культур щитовидної залози новонароджених поросят

Номери проб	Поглинання йоду, імП-хв ⁻¹ -мг тканини* ¹	Секреція Т ₄ , пмоль-мг тканини ⁻¹	Секреція Т ₃ , пмоль-мг тканини ¹
1	1399	36,03	11,41
2	714	16,45	1,16
3	699	18,97	5,16
4	749	15,55	2,45
5	799	31,71	4,45
6	1160	25,12	3,43
7	1186	19,01	2,36
8	1273	16,38	4,64
9	872	2,01	0,22
10	1462	16,59	1,38
11	772	7,25	1,12
12	716	7,34	0,83
13	834	1,23	0,09
14	682	6,64	0,59
15	852	2,13	0,08

Перевагою даного способу порівняно з прототипом є те, що за рахунок підбору оптимального строку культивування та відбору органних культур щитовидної залози з високою життєздатністю та максимальною гормонпродукуючою активністю досягається подовження строку функціонування трансплантату та підвищення рівня компенсації гормональної недостатності у реципієнта.

Запропонований спосіб з успіхом застосовується у відділі патофізіології ендокринної системи Інституту ендокринології та обміну речовин ім.В.П.Комісаренка АМН України і може бути запропонований в практику ендокринологічних та хірургічних відділень інших клінік, а також дослідних підрозділів наукових установ.

Література:

1. Дроздовим І.І., Турчин І.С., Балла Л.А. Гістологічна характеристика органної культури щитовидної залози новонароджених поросят у динаміці культивування //Доповіді НАН України. - 1996. - N11. - С.158-163.
2. Македонская В.А. Клиническая и функциональная оценка трансплантации ткани щитовидной железы, подвергнутой низкотемпературной консервации и хранению при -196 °С // Автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата медицинских наук. - Харьков, 1986. - 16 с. (прототип).
3. Турчин І.С., Комісаренко І.В., Тронько М.Д. та ін. Трансплантація культур клітин і тканин щитовидної залози при гіпотиреозі (Методичні рекомендації) // Установи-розробники: Інститут ендокринології та обміну речовин ім.В.П.Комісаренка АМН України, Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України, Український науково-практичний центр ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України. Київ "Чорнобильінтерінформ", 1997. 15 с
4. Чеботарьов В.Ф., Степура Н.М. Спосіб підбору оптимального строку культивування клітин ендокринних органів, призначених для трансплантації. Опис до патенту на винахід України. 1996, N 11267, кл. С 12 N 5/00.