



УКРАЇНА

(19) UA (11) 54254 (13) A

(51) 7 A61K35/50

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) СПОСІБ ПІДГОТОВКИ КУЛЬТУРИ ОВАРІАЛЬНОЇ ТКАНИНИ ДО ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ТРАНС-
ПЛАНТАЦІЇ

1

(21) 2002065205

(22) 25 06 2002

(24) 17 02 2003

(46) 17 02 2003, Бюл. № 2, 2003 р.

(72) Слюсарев Олексій Аркадійович, Друпп Юрій
Григорович, Ракша-Слюсарева Олена Анатоліївна,
Турчин Іван Семенович(73) Слюсарев Олексій Аркадійович, Друпп Юрій
Григорович(57) Спосіб підготовки культури оваріальної ткани-
ни до експериментальної трансплантації шляхом
відмивання культури оваріальної тканини, який
відрізняється тим, що здійснюють відмивання
культури оваріальної тканини розчином Хенкса
напередодні трансплантації з подальшим зали-

2

ванням її сумішшю складу середовища 199, 0,25%
розчином трипсину, розчином версену у співвід-
ношенні 1:1:1 з додаванням гентаміцину із розра-
хунку 10 мкг/мл, потім інкубуванням протягом 12-
14 годин при температурі +4 - +10°C з подальшим
прогріванням протягом 1 години при температурі
36-37°C і короткочасним диспергуванням культури
оваріальної тканини на магнітній мішалці, після
чого відмивають її від надосаду і забарвлюють
трипановим синім, потім підраховують питому вагу
життєздатних (незабарвлених) клітин, культуру
оваріальної тканини вважають придатною для
трансплантації, якщо питома вага життєздатних
клітин становить 65% і більше

Спосіб підготовки культури оваріальної ткани-
ни до експериментальної трансплантації, що заяв-
ляється, відноситься до медицини, зокрема до
акушерства і гінекології і може бути застосований
для підготовки трансплантанта і оцінки його життє-
здатності

Найбільш близьким по технічній суті до спосо-
бу, що заявляється, є спосіб підготовки культури
оваріальної тканини [1 Тронько Н.Д., Рибаків С.І.,
Комісаренко І.В. Лікування хронічного гіпокорти-
цизму методом трансплантації культури клітин
кори надниркових залоз // Методичні рекомендації,
Київ, 1990] шляхом відмиття культури оваріальної
тканини. При цьому відмиття проводилося стерил-
ьним фізіологічним розчином при температурі 36-
37°C

Недоліком відомого способу є неможливість
вірно оцінити життєздатність отриманої культури
оваріальної тканини, а також недостатнє очищен-
ня її від продуктів метаболізму клітин, низька дис-
персність культури оваріальної тканини для експе-
риментальної трансплантації тварині шляхом
ін'єкції в прямий м'яз живота

В основу винаходу поставлена задача ство-
рення способу підготовки культури оваріальної
тканини до експериментальної трансплантації
шляхом відмиття культури оваріальної тканини

розчином Хенкса за 24 години до трансплантації з
подальшим запиттям її сумішшю складу серед-
а 199, 0,25% розчин трипсину, розчин версену у
співвідношенні 1:1:1 з додаванням гентаміцину із
розрахунку 10 мкг/мл, потім інкубуванням протягом
12-14 годин при температурі +4-+10°C з подаль-
шим прогріванням протягом 1 години при темпе-
ратурі 36-37°C і диспергуванням культури оваріа-
льної тканини, після чого відмивають її від
надосаду і забарвлюють розчином трипанового
синього, потім підраховують питому вагу життє-
здатних клітин, що надає можливість отримання
очищеної, високодисперсної, достовірно життєзда-
тної культури оваріальної тканини

Суть способу полягає в тому, що для підготов-
ки культури оваріальної тканини до експеримента-
льної трансплантації здійснюють послідовно від-
миття культури оваріальної тканини розчином
Хенкса від суміші для диспергування напередодні
трансплантації з подальшим запиттям її сумішшю
складу серед-а 199, 0,25% розчин трипсину, розчин
версену у співвідношенні 1:1:1 з додаванням гента-
міцину із розрахунку 10 мкг/мл, потім інкубуванням
протягом 12-14 годин при температурі +4-+10°C із
подальшим прогріванням протягом 1 години при
температурі 36-37°C і диспергуванням культури
оваріальної тканини на магнітній мішалці, після

(13) A

(11) 54254

(19) UA

чого відмивають її від надосадку та забарвлюють 0,3% розчином трипанового синього, потім підраховують питому вагу життєздатних (незабарвлених) клітин, культуру оваріальної тканини вважають придатною для трансплантації, якщо питома вага життєздатних кліток становить 65% і більш.

Новим у способі, що заявляється, є додаткове диспергування культури оваріальної тканини у суміші складом середя 199, розчин версену та гентаміцин, проведення інкубації при температурі $+4\text{--}+10^{\circ}\text{C}$ із подальшим прогріванням при температурі $36\text{--}37^{\circ}\text{C}$, короткочасне диспергування культури оваріальної тканини, а також використання фарбування кліток розчином трипанового синього для оцінки життєздатності культури оваріальної тканини.

Оскільки експериментальна трансплантація проводиться на досить дрібних тваринних - пацюках, то виникають технічні труднощі із введенням культури оваріальної тканини. Проблема ця може бути вирішена додатковим подрібненням культури, що досягається використанням в якості компонентів суміші для диспергування середя 199, розчину версену та гентаміцину, проведенням інкубації при низькій ($+4\text{--}+10^{\circ}\text{C}$) температурі з подальшим прогріванням при температурі $36\text{--}37^{\circ}\text{C}$, короткочасним диспергуванням культури оваріальної тканини на магнітній мішалці. Фарбування культури оваріальної тканини розчином трипанового синього з подальшим підрахунком життєздатних (незабарвлених) клітин дозволяє достовірно визначити придатність культури оваріальної тканини до експериментальної трансплантації.

Спосіб реалізують таким чином. За 24 години до проведення експериментальної трансплантації культуру оваріальної тканини тричі відмивають розчином Хенкса, вміщують у флакон місткістю 50мл, що містить суміш для диспергування складу середя 199 - 10мл, 0,25% розчин трипсину - 10мл, розчин версену 10мл, гентаміцин - 300мкг, рН середя вирівнюють до значення 7,35-7,45 доданням стерильного 4% розчину бікарбонату натрію за допомогою піпетки, після чого флакон з культурою оваріальної тканини вміщують у холодильник та інкубують при температурі $+4\text{--}+10^{\circ}\text{C}$ протягом 12-14 годин, після закінчення цього часу флакон вміщують у термостат та інкубують протягом 1 години при температурі $36\text{--}37^{\circ}\text{C}$, потім флакон вміщують на магнітну мішалку і диспергують культуру при середній швидкості оборотів протягом 5хв, потім культуру оваріальної тканини відмивають 1 раз охолодженою до температури $+4\text{--}+10^{\circ}\text{C}$ середою 199, а потім ще двічі - середою 199 при температурі $36\text{--}37^{\circ}\text{C}$, після чого до культури оваріальної тканини додають піпеткою 0,3% розчин трипанового синього із розрахунку 4 частини барвника на 1 частину культури, через 5-10хв барвник зливають, а культуру оваріальної тканини мікроскопують у камері Горяєва, підраховуючи питому вагу життєздатних (незабарвлених) кліток, культуру вважають придатною для експериментальної трансплантації при питомій вазі життєздатних кліток 65% і більш.

Внаслідок використання заявленого способу підготовки культури оваріальної тканини до експериментальної трансплантації отримують ретельно очищену, подрібнену і достовірно придатну для

експериментальної трансплантації культуру оваріальної тканини.

ПРИКЛАД 1 За 24 години до проведення експериментальної трансплантації культуру оваріальної тканини тричі відмивали розчином Хенкса, вміщували у флакон місткістю 50мл, що містить суміш для диспергування складу середя 199 - 10мл, 0,25% розчин трипсину - 10мл, розчин версену - 10мл, гентаміцин - 300мкг, рН середя вирівнювали до значення 7,35-7,45 доданням стерильного 4% розчину бікарбонату натрію за допомогою піпетки, після чого флакон з культурою оваріальної тканини вміщували в холодильник та інкубували при температурі $+4\text{--}+10^{\circ}\text{C}$ протягом 14 годин, після закінчення цього часу флакон вміщували в термостат та інкубували протягом 1 години при температурі $36\text{--}37^{\circ}\text{C}$, потім флакон вміщували на магнітну мішалку і диспергували культуру при середній швидкості оборотів протягом 5хв, потім культуру оваріальної тканини відмивали охолодженою до температури $+4\text{--}+10^{\circ}\text{C}$ середою 199 один раз і ще 2 рази середою 199 при температурі $36\text{--}37^{\circ}\text{C}$, після чого до культури оваріальної тканини додавали піпеткою барвник-0,3% розчин трипанового синього з розрахунку 4 частини барвника на 1 частину культури, через 5-10хв барвник зливали, а культуру оваріальної тканини мікроскопували у камері Горяєва, підраховуючи питому вагу життєздатних (незабарвлених) кліток, отримали результат 70% життєздатних кліток і на підставі цього вважали культуру оваріальної тканини придатною для трансплантації.

ПРИКЛАД 2 За 24 години до проведення експериментальної трансплантації культуру оваріальної тканини тричі відмивали розчином Хенкса, вміщували у флакон місткістю 50мл, що містить суміш для диспергування складу середя 199 - 10мл, 0,25% розчин трипсину - 10мл, розчин версену - 10мл, гентаміцин - 300мкг, рН середя вирівнювали до значення 7,35-7,45 доданням стерильного 4% розчину бікарбонату натрію за допомогою піпетки, після чого флакон з культурою оваріальної тканини вміщували у холодильник та інкубували при температурі $+4\text{--}+10^{\circ}\text{C}$ протягом 14 годин, після закінчення цього часу флакон вміщували на водяну баню та підігрівали до температури $36\text{--}37^{\circ}\text{C}$, потім флакон вміщували на магнітну мішалку і диспергували культуру при середній швидкості оборотів протягом 10хв, потім культуру оваріальної тканини відмивали охолодженою до температури $+4\text{--}+10^{\circ}\text{C}$ середою 199 три рази, після чого до культури оваріальної тканини додавали піпеткою барвник трипановий синій із розрахунку 4 частини барвника на 1 частину культури, через 5-10хв барвник зливали, а культуру оваріальної тканини мікроскопували у камері Горяєва, підраховуючи питому вагу життєздатних (незабарвлених) клітин, отримали результат 62% життєздатних клітин і на підставі цього вважали культуру оваріальної тканини непридатною для трансплантації.

ПРИКЛАД 3 За 24 години до проведення експериментальної трансплантації культуру оваріальної тканини тричі відмивали розчином Хенкса, вміщували у флакон місткістю 50мл, що містить суміш для диспергування складу середя 199 - 10мл, 0,25% розчин трипсину - 10мл, розчин вер-

сену - 10мл, гентаміцин - 300мкг, рН середі вирівнювали до значення 7.35-7.45 доданням стерильного 4% розчину бікарбонату натрію за допомогою піпетки, після чого флакон з культурою оваріальної тканини вміщували у термостат та інкубували протягом 14 годин при температурі 36-37°C, потім флакон вміщували на магнітну мішалку і диспергували культуру оваріальної тканини при середній швидкості оборотів протягом 25хв, після чого культуру оваріальної тканини відмивали охолодженою до температури +4-+10°C середою 199 три рази, після чого до культури оваріальної тканини додавали піпеткою барвник - 0.3% розчин трипанового синього із розрахунку 4 частини барвника на 1 частину культури, через 5-10хв барвник зливали, а культуру оваріальної тканини мікроскопували у камері Горяєва, підраховуючи питому вагу життєздатних (незабарвлених) клітин, отримали резуль-

тат 58% життєздатних клітин і на підставі цього вважали культуру оваріальної тканини непридатною для трансплантації

Використання заявленого способу підготовки культури оваріальної тканини до експериментальної трансплантації дозволяє отримати очищену, високодисперсну культуру оваріальної тканини і досить точно оцінити її життєздатність, а отже і придатність для експериментальної трансплантації. Це дозволяє чекати позитивний ефект від трансплантації такої культури оваріальної тканини з метою замісної гормональної терапії при низькому ризику виникнення ускладнень

Джерела інформації

1. Тронько Н.Д., Рибаків С.І., Комісаренко І.В. Лікування хронічного гіпокортицизму методом трансплантації культури клітин кори надниркових залоз // Методичні рекомендації, Київ, 1990