



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58997 (13) A

(51) 7 A01N1/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН

1

2

(21) 2002129661

(22) 03 12 2002

(24) 15 08 2003

(46) 15 08 2003, Бюл. № 8, 2003 р.

(72) Грищенко Валентин Іванович, Семиноженко Володимир Петрович, Петренко Олександр Юрійович, Тарасов Андрій Ігорович, Петренко Юрій Олександрович, Грищук Віктор Петрович, Дьомін Юрій Альбертович

(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб кріоконсервування гемопоетичних клітин шляхом поетапного заморожування до -196°C в розчині консервування, що містить диметилсульфоксид, який відрізняється тим, що розчин консервування додатково включає 10 % поліетиленоксиду молекулярної маси 400, а вміст диметилсульфоксиду складає 2-3 %

Вінахід відноситься до медицини, зокрема кріобіології, і може бути використаний у трансплантології.

Відомий спосіб кріоконсервування гемопоетичних клітин у розчині консервування, який містить гліцерин [1].

Однак гліцерин повільно проникає всередину клітин, у зв'язку з чим необхідна тривала експозиція клітин із кріопротектором, що призводить до їхнього ушкодження.

Найбільш близьким до заявлюваного є спосіб кріоконсервування гемопоетичних клітин із кріопротектором диметилсульфоксидом (ДМСО) [2]. Клітини занурюють у розчин, який містить 5-10 % ДМСО, інкубують у ньому протягом 15-20 хв і поетапно заморожують до -196°C спочатку зі швидкістю $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -40°C , витримують 10 хвилин, потім зі швидкістю $10^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -80°C із наступним зануренням у рідкий азот.

Недоліком способу є те, що використовувана концентрація ДМСО є токсичною. Це призводить до зниження функціональної активності клітин вже на етапі еквілібрації і, окрім того, потребує відмивання від кріопротектора перед трансфузією.

В основу винаходу поставлено задачу створити такий спосіб консервування гемопоетичних клітин, в якому шляхом зниження концентрації ДМСО забезпечувалася би можливість підвищити функціональну активність клітин. Ця задача вирішується тим, що в спосіб кріоконсервування гемопоетичних клітин шляхом поетапного заморожування до -196°C у розчині консервування, який містить

ДМСО, розчин консервування додатково включає 10 % поліетиленоксиду м.м. 400 (ПЕО-400), а вміст ДМСО складає 2-3 %.

ПЕО-400 є малотоксичною речовиною, дозволеною для внутрішньовенного введення, тому він не виявляє негативного впливу на організм людини.

Уведення 10 % ПЕО-400 у розчин консервування дає можливість знизити концентрацію ДМСО до 2-3 %, що забезпечує підвищення функціональної активності клітин на 20-25 %.

Спосіб здійснюють таким чином:

Гемопоетичні клітини, одержані з ембріональної печінки людини 6-12 тижнів гестації, дисоціюють на поодинокі клітини і фільтрують через систему для переливання крові. Одержані клітини розводять розчином Хенкса і додають розчин кріоконсервування, який містить 2-3 % ДМСО і 10 % ПЕО-400. Через 15-20 хв клітини заморожують зі швидкістю $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, витримують 10 хвилин на плато кристалізації, а потім заморожують зі швидкістю $10^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -80°C з наступним зануренням у рідкий азот (-196°C). Відігрівання здійснюють на водяній бані при $37-40^{\circ}\text{C}$.

Гемопоетичні клітини кріоконсервували в середовищах, які містять різні концентрації (0-10 %) ДМСО в поєднанні з 10 % ПЕО-400 і без нього.

Після розморожування здійснювали підрахунок клітин у камері Горяєва, а також експлантацію в метилцелюлозне середовище, яке містило рекомбінантні ростові фактори, 10 нг/мл колонієстимулюючого фактора гранулоцитів і макрофагів, 10

(13) A
(11) 58997
(19) UA

нг/мл ІЛ-3, 50 нг/мл фактора стовбурових клітин і 3 од/мл еритропоєтину) Результати клонування підраховували на 14-у добу культивування. Сумарна кількість колонієформуючих одиниць (КФО) представлена в таблиці

Таблиця

Кількість КФО після криоконсервування (n=6)

Концентрація ДМСО, %	Кількість КФО	
	Без ПЕО-400	з ПЕО-400
0	2±1	184±26
2	35±5	325±32
3	48±5	333±30
5	264±30	307±22
10	212±24	256±25

Із наведених у таблиці даних видно, що після криоконсервування клітин без кріопротекторів колонії практично не формуються. Після криоконсервування в розчині, який містить тільки ДМСО, максимальна кількість КФО відзначена при концентрації 5 %. Подальше збільшення концентрації ДМСО призводило до зниження числа КФО. Уведення 10 % ПЕО-400 до складу криозахисного розчину призводило до істотного збільшення

кількості КФО навіть у відсутності ДМСО. Однак максимальна колонієформуюча активність у присутності 10 % ПЕО-400 відзначалась при концентраціях ДМСО 2-3 %. Функціональна активність клітин у цьому випадку була на 23 % вищою, ніж у прототипі (5 % ДМСО). При наступному збільшенні концентрації ДМСО у присутності ПЕО-400 кількість КФО знижувалась унаслідок токсичності ДМСО.

Таким чином, введення 2-3 % ПЕО-400 до складу розчину консервування дає можливість знизити концентрацію ДМСО і за рахунок цього підвищити функціональну активність гемопоетичних клітин. Окрім цього, після криоконсервування не потрібне відмивання клітин від кріопротектора.

Джерела інформації

1. Симонов Л.И. Влияние гемотрансплантаций эмбриональной кроветворной ткани на течение острой лучевой болезни крыс и определение жизнеспособности консервированных клеток // Вопросы трансплантации костного мозга при лучевом поражении - Ленинград, 1965 - С. 22-23.

2. E. M. Andersen et al. Gestational age and cell viability determine the effect of frozen storage on human fetal HPC preparations // Fetal Diagn & Ther - 1996 -11 - P. 427-432.