



УКРАЇНА

(19) UA (11) 30014 (13) A

(51) 6 A01N1/02, A61K35/14

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ТА ПІДГОТОВКИ ДО ТРАНСФУЗІЇ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ

(21) 97125874

(22) 08.12.1997

(24) 15.11.2000

(33) UA

(46) 15.11.2000, Бюл. № 6, 2000 р.

(72) Пережрестенко Петро Михайлович, Глухенька Галина Тимофіївна, Алгазінова Маргарита Костянтинівна, Гольцев Анатолій Миколайович, Калиниченко Тетяна Олексіївна, Кейсевич Людвіг Владиславович, Скачкова Надія Костянтинівна

(73) КИЇВСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГІЇ ТА ПЕРЕЛИВАННЯ КРОВІ

(57) 1. Спосіб кріоконсервування та підготовки до трансфузії гемопоетичних клітин кордової крові шляхом введення у нефракційовану кров рівного об'єму кріоконсерванту, подальшого програмного заморожування клітинної зависі, її розморожування для трансфузії з вилученням гемолізату еритроцитів, який відрізняється тим, що перед введенням кріоконсерванту цільну кров центрифугують для вилучення плазми, як кріоконсервант використовують водний розчин низькомолекулярного полівінілпіролідону, глюкози та лактози, після розморожування у клітинну завись додатково вводять рівний об'єм сольового розчину низькомолекулярного полівінілпіролідону, а вилучення гемолізату еритроцитів проводять шляхом центрифугування розведеної сольовим розчином низькомолекуляр-

ного полівінілпіролідону розмороженої клітинної зависі з подальшим вилученням надстою, а клітини, що залишилися ресуспендують у раніш вилученій аутологічній кордовій плазмі.

2. Спосіб по п. 1, який відрізняється тим, що використовують кріоконсервант, який вміщує водний розчин низькомолекулярного полівінілпіролідону, глюкози та лактози у співвідношенні компонентів розчину об. %:

низькомолекулярний полівінілпіролідон	17-20
глюкоза	10-11
лактоза	4-5
вода	до 100.

3. Спосіб по п. 1, який відрізняється тим, що як сольовий розчин полівінілпіролідону використовують водний розчин низькомолекулярного полівінілпіролідону, натрія хлориду, калія хлориду, кальція хлориду, магнія хлориду, натрія гідрокарбонату у співвідношенні об. %:

низькомолекулярний полівінілпіролідон	6-6,5
натрія хлорид	0,50-0,55
калія хлорид	0,04-0,045
кальція хлорид	0,05-0,001
магнія хлорид	0,0005-0,001
натрія гідрокарбонату	0,023-0,025
вода	до 100.

Винахід відноситься до області консервування живих тканин, зокрема, гемопоетичних клітин, що можуть бути застосовані в клінічній практиці для лікування різних захворювань.

Відомі способи кріоконсервування гемопоетичних клітин кордової крові шляхом попереднього фракціонування цільної крові та подальшого програмного заморожування одержаних мононуклеарних клітин в суміші із кріопротектором. Гемопоетичні стовбурові клітини відносяться до мононуклеарів, присутність яких забезпечує позитивний ефект підчас трансфузії кордової крові.

Наприклад, відомий спосіб кріоконсервування, в якому фракціонування цільної крові проводять осадженням еритроцитів кордової крові людини 3 % розчином желатину (Harris D.T. et al. Collection, separation and cryopreservation of umbilical

cord blood for use in transplantation // Bone Marrow Transplant. - 1994. - 13. - P. 135-143; Bertolini F. et al. A comparison study of different procedures for collection and banking of umbilical cord blood // J. Hematother. - 1995. - 4. - P. 29-36.)

Відомий спосіб кріоконсервування, в якому фракціонування проводять шляхом диференційного центрифугування у градієнті щільності гіпак-фіколлу (Юрасов С.В. и др. Анализ распределения гемопоэтических стволовых клеток в мононуклеарной фракции пуповинной крови человека // Гематология и трансфузиология. - 1996. - п. 2. - С. 13-16; пат. США № 5004581 МКИ А01 № 1/02, А61К35/14, 1991; Hows J.M. et al. Growth of human umbilical cord blood in long-term haematopoietic cultures // Lancet. - 1992. - 340, № 11. - P. 73-75; Berthon C., Legros-Maida S. et al. Cord blood T

(19) UA (11) 30014 (13) A

lymphocytes lack constitutive perforine expression in contrast to adult peripheral blood T lymphocytes // - 1995. - 85, № 6. - P. 1540-1546.)

Недоліком вищезгаданих способів кріоконсервування шляхом попереднього фракціонування цільної кордової крові є: низький вихід мононуклеарних клітин в порівнянні з початковими даними; ряд додаткових маніпуляцій, що тягнуть за собою ризик бактеріального забруднення та негативно впливають на збереження гемопоетичних клітин кордової крові.

Найбільш близьким до способу, що ми пропонуємо, є спосіб, що полягає у введенні у цільну кордову кров кріоконсерванту - 20% розчину діметилсульфоксиду (ДМСО) у співвідношенні 1:1, подальшого програмного заморожування та підготовки до трансфузії шляхом багаторазового відмивання клітин від ДМСО з одночасним вилученням гемолізату еритроцитів (Vilmer et al. HLA-mismatched cord blood transplantation in a patient with advanced leukemia // Transplantation. - 1992. - 53, № 5. - P. 1155-1157).

Використовування у цьому способі у якості кріоконсерванту ендоцелюлярної дії ДМСО, що має значну токсичність, чинить негативну дію як на розморожені гемопоетичні клітини - строк їх збереження без структурно-функційних змін не перевищує 20-30 хв., так і на організм людини, якому роблять трансфузію. Крім цього, необхідність багаторазового відмивання гіпертонічними розчинами глюкози до ізотонічного вмісту ДМСО також негативно впливає на збереження гемопоетичних клітин кордової крові, що підготовлені до трансфузії, яка вміщує 75-78%.

В основу винаходу поставлено задачу розробки способу кріоконсервування та підготовки до трансфузії гемопоетичних клітин кордової крові, що забезпечує підвищення збереження клітин, що підготовлені до трансфузії, завдяки введенню операції вилучення плазми та введення її після розморожування, використання іншого кріоконсерванту, а також іншого режиму підготовки клітин до трансфузії.

Задача вирішується способом кріоконсервування та підготовки до трансфузії гемопоетичних клітин кордової крові шляхом введення у нефракціоновану кров рівного об'єму кріоконсерванту, подальшого програмного заморожування клітинної зависі, її розморожування для трансфузії з вилученням гемолізату еритроцитів, в якому згідно винаходу, перед введенням кріоконсерванту цільну кров центрифугують для вилучення плазми, як кріоконсервант використовують водний розчин низькомолекулярного полівінілпіролідону (ПВП), глюкози та лактози, після розморожування у клітинну завись додатково вводять рівний об'єм сольового розчину низькомолекулярного ПВП, а вилучення гемолізату еритроцитів проводять шляхом центрифугування розведеної сольовим розчином низькомолекулярного ПВП розмороженої клітинної зависі з подальшим вилученням надстою, а клітини, що залишилися ресуспендують у раніш вилученій аутологічній кордовій плазмі.

Як кріоконсервант використовують середовище для консервування клітин кісткового мозку (Гематология и трансфузиология. - 1984. - 4 - С. 62-64) кількісного складу об. %:

ПВП	17-20
глюкоза	10-11
лактоза	4-5
вода	до 100.

Для розведення розмороженої клітинної зависі як сольовий розчин використовували водний розчин низькомолекулярного ПВП, натрію хлориду, калію хлориду, кальцію хлориду, магнію хлориду, натрію гідрокарбонату при співвідношенні компонентів у розчині об. %:

ПВП	6-6,5
натрію хлориду	0,50-0,55
калію хлориду	0,04-0,045
кальцію хлориду	0,05-0,001
магнію хлориду	0,0005-0,001
натрію гідрокарбонату	0,023-0,025
вода	до 100.

Цей склад передбачає собою відомий препарат "Гемодез". У практиці гемодез застосовується як дезінтоксикаційний засіб. У даному способі застосовується по іншому призначенню - для вилучення гемолізату еритроцитів. Це сприяє збільшенню виходу мононуклеарних клітин.

Суть винаходу ілюструється декількома прикладами.

Приклад 1. Кріоконсервування та підготовка гемопоетичних клітин кордової крові до трансфузії.

Заготівлю крові проводять з пуповинної вени материнського кінця пуповини, з використанням системи для взяття крові, з'єднаної з пляшками об'ємом 250 мл із стерильним розчином "Глюгіцир". Кордову кров змішували у співвідношенні 4:1 (на 4 частини крові 1 частину розчину). Клітинну завись вилучену від плазми шляхом центрифугування при 1200 об/хв. - 20 хв. Зняту плазму заморожували та зберігали у холодильнику при мінус 20 - мінус 30°C, потім використовували для ресуспендування розморожених гемопоетичних клітин кордової крові. У флакон із клітинною зависсю крові, при постійному перемішуванні, додавали кріоконсервант у співвідношенні 1: 1.

Клітинну завись розливали у металеві контейнери ємністю 160 мл. Металеві контейнери з клітинною зависсю заморожували згідно загальноприйнятому програмному заморожуванню. Розморожування проводили у водяній бані при температурі (40±0,5)°C протягом (35±5) с (Кріоконсервірування клеточных суспензий. Под общ. ред. Цуцаевой А.А. - К.: Наук. думка, 1983 - 240 с.).

За допомогою системи для переливання крові клітинну завись з контейнеру переливають у стерильну пляшку ємністю 250 мл. У пляшку з клітинною зависсю вводили рівний об'єм сольового розчину 6% низькомолекулярного полівінілпіролідону, центрифугували при 1200 об/хв. - 15 хв., вилучали надстій, що вміщує гемолізат еритроцитів, а клітини, що залишилися, ресуспендували у раніш аутологічній плазмі.

Приклад 2. Кріоконсервування та підготовка гемопоетичних клітин кордової крові до трансфузії. Заготівлю крові проводили з пупочної вени материнського кінця пуповини методом, що описаний у прикладі 1, змішуючи у рівних співвідношеннях з 20% розчином ДМСО, заморожували та розморожували згідно загальноприйнятій програмі, потім 4-х кратно відмивали гіперосмотичними розчинами 20% глюкози до ізоосмотичного вмісту ДМСО.

Оцінку життєздатності клітин проводили методом суправітального забарвлення 1% водним розчином еозину та підрахунком абсолютного вмісту мононуклеарних клітин у камері Горяєва.

Аналізу піддавали заготовлену для консервації кров (30 мл) та клітинну зависль після заморожування - розморожування, що була проведена відомим способом. Одержані результати зведені у табл. 1.

Дані, що приведені у табл. 1, засвідчують про вірогідне збільшення виходу мононуклеарних клітин та морфологічне збереження їх у випадку кріоконсервування - по пропонованому способу.

Основним критерієм життєздатності розморожених гемопоетичних клітин кордової крові є клінічний ефект під час лейкопінічних станів у хворих із злоякісними новоутвореннями при лікуванні цитостатичними препаратами, що супроводжуються септичним процесом та сенсибілізаціями, що попереджали багаторазовими гемотрансфузіями.

До теперішнього часу згідно пропонованому способу у банку довгострокового збереження крові та кісткового мозку заморожено 25 зразків кордової крові, з яких 10 примірників підготовлено до трансфузії.

Результати наведені у табл. 2.

Надані дані (табл. 2) засвідчують про те, що пропонований спосіб забезпечує після розморожування вихід морфологічно збережених клітин у середньому 95%.

Включення трансфузії кріоконсервованих гемопоетичних клітин кордової крові у комплексне лікування онкологічних хворих із стійкою лейкопенією (кількість лейкоцитів було $2,0-1,5 \cdot 10^9/\text{л}$ та нижче) сприяло підвищенню кількості лейкоцитів у периферичній крові до 14-16 добам після трансфузії. Це дало можливість продовжити перерваний курс початої цитостатичної терапії.

Таблиця 1

Морфологічне збереження розморожених клітин кордової крові, що підготовлені до трансфузії

Критерії оцінки життєздатності клітин	Кордова Кров	Після розморожування	
		Пропонований спосіб (приклад 1)	Прототип (приклад 2)
Число мононуклеарних клітин, 10^8	$2,59 \pm 0,06$	$2,48 \pm 0,06^{**}$	$1,53 \pm 0,07^*$
Суправітальне забарвлення 1% водним розчином еозину	$94,0 \pm 1,02$	$89,0 \pm 0,41^{**}$	$73,0 \pm 0,82^*$

* - $p < 0,05$ (вірогідні розбіжності в порівнянні з початковими даними)

** - $p < 0,05$ (вірогідні розбіжності між прототипом та пропонованим способом).

Таблиця 2

Збереження кріоконсервованих гемопоетичних клітин кордової крові, що підготовлені до трансфузії онкологічним хворим із стійкою лейкопенією

№/№	Шифр зразків	До заморожування		Після розморожування	
		кількість мононуклеарних клітин, 10^9	життєздатність клітин, %	Кількість мононуклеарних клітин, 10^9	життєздатність клітин, %
1	П-4	0,95	98	0,90	91
2	К-3	0,70	96	0,66	89
3	О-7	0,79	94	0,75	89
4	Д-6	0,81	94	0,76	89
5	К-8	0,73	90	0,69	85
6	Ш-15	0,71	94	0,67	90
7	Р-14	0,70	95	0,66	90
8	М-5	0,70	95	0,66	90
9	Г-18	0,70	93	0,66	89
10	С-13	0,83	94	0,78	89
	М±м	$0,76 \pm 0,05$	$94,20 \pm 0,82$	$0,72 \pm 0,02$	$89,00 \pm 0,61$

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2002 р. Формат 60х84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 35 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22
