



УКРАЇНА

(19) UA (11) 60238 (13) A

(51) 7 A01N1/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту(54) СКЛАД КРІОКОНСЕРВАНТУ ДЛЯ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН ДОНОРСЬКОЇ КОРДОВОЇ КРОВІ  
(ВАРІАНТИ)

1	2
(21) 2003054944	поліп'юкін 6%, рН 4,5-6,0 40-45
(22) 29 05 2003	хлорид натрію 8-9
(24) 15 09 2003	лізоцим 0,04-0,05
(46) 15 09 2003, Бюл. № 9, 2003 р.	димексид 4-6
(72) Лобинцева Галина Степанівна, Гладких Юрий Васильович, Лобинцев Дмитро Валерійович, Гладких Володимир Юрійович	вода бідистильована решта
(73) Лобинцева Галина Степанівна, Гладких Юрий Васильович, Лобинцев Дмитро Валерійович, Гладких Володимир Юрійович	2. Склад кріоконсерванту для гемопоетичних клітин донорської кордової крові, що передбачає застосування водного розчину хлориду натрію, цукрів та кріопротектора, який відрізняється тим, що як цукри він містить поліп'юкін, як кріопротектор - поліетиленоксид м м 400 та додатково лізоцим у співвідношенні компонентів розчину, об %
(57) 1 Склад кріоконсерванту для гемопоетичних клітин донорської кордової крові, що передбачає застосування водного розчину хлориду натрію, цукрів та кріопротектора, який відрізняється тим, що як цукри він містить поліп'юкін, як кріопротектор - димексид та додатково лізоцим у співвідношенні компонентів розчину, об %	поліп'юкін 6%, рН 4,5-6,0 40-45 хлорид натрію 8-9 лізоцим 0,04-0,05 поліетиленоксид м м 400 10-20 вода бідистильована решта

Склад кріоконсерванту для гемопоетичних клітин донорської кордової крові, його варіанти

Винахід відноситься до біології та медицини і може бути використаний для кріоконсервування гемопоетичних клітин донорської кордової крові людини

Відомий склад кріоконсерванту (дивись спосіб консервації еритроцитів, патент Росії №2051580, МПК А01 N1/02, А61 K35/18, дата публікації 1996 01 10) який передбачає використання для кріоконсервування водного розчину пропиленгліколю, сахарози та хлористого натрію у бідистильованій воді

Кріоконсервант такого складу має обмежену сферу застосування і може використовуватися лише для заморожування клітин, які не мають ядра (як еритроцити). Такий кріоконсервант передбачає застосування великої швидкості заморожування і не може застосовуватися для клітин, що мають ядра і консервуються з низькою швидкістю охолодження бо обезвожує клітину

Відомий склад кріоконсерванту (дивись Спосіб кріоконсервування кровотворних клітин кордової крові, патент України №31847 МПК 6 А01 N1/02 А, дата публікації 15 12 2000, номер бюлетеня 7)

який передбачає використання для кріоконсервування гемопоетичних клітин кордової крові людини водного розчину Декстрану-60 (декстрану молекулярної маси 60000) в концентрації 1,2%

Кріоконсервант такого спрощеного складу не може забезпечити збереження життєздатності клітин при кріоконсервуванні тому, що він не зв'язує необхідну кількість води і не забезпечує необхідну структуру льоду, великі кристали якого пошкоджують мембрани клітин

Відомий склад кріоконсерванту (дивись Спосіб кріоконсервування та підготовки до трансфузії гемопоетичних клітин кордової крові, патент України №30014 МПК А01 N1/02, А61 K35/14, дата публікації 15 11 2000, номер бюлетеня 6) який передбачає використання для кріоконсервування гемопоетичних клітин кордової крові людини водного розчину низькомолекулярного полівінілпіролідону, глюкози та лактози у співвідношенні компонентів розчину об %

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

(13) A  
(11) 60238  
(19) UA

При цьому як сольовий розчин полівінілпіролідону використовують водний розчин низькомолекулярного полівінілпіролідону, натрію хлориду, калію хлориду, кальцію хлориду, магнію хлориду, натрію гідрокарбонату у співвідношенні об %

низькомолекулярний полівінілпіролідон	6-6,5
натрію хлорид	0,50-0,55
калію хлорид	0,04-0,045
кальцію хлорид	0,05-0,001
	0,0005-
магнію хлорид	0,001
натрію гідрокарбонату	0,023-0,025
вода	до 100

(Точно такий склад криоконсерванту передбачено також у патенті України №42599 МПК А01 N1/00, А01 N1/02 В, А61 К35/14, дата публікації 15 10 2001, номер бюлетеня 9)

Використання низькомолекулярних сахарів у складі криоконсерванту призводить до певних проблем. Низькомолекулярні сахари мають можливість проникати через кліткову мембрану у клітини і при розморожуванні, внаслідок вирівнювання градієнту концентрації позакліткова вода буде проникати у клітку. Внаслідок перевищення кількості води усередині клітини її мембрана може пошкоджуватися.

Такий криоконсервант передбачає застосування в своєму складі великої різноманітності та кількості сілі. Перевищення різноманітності та кількості сілі в розчині один з механізмів пошкодження клітин при замороженні. Внаслідок заморожування, в просторі між кристалами льоду (тобто в міжклітинному просторі) їх концентрація підвищується. Це призводить до кризи клітин, які зводяться у цьому просторі.

Полівінілпіролідон, внаслідок його низької проникності у клітину менш ефективний криопротектор і відповідно не забезпечує достатнього захисту внутрікліткових компонентів.

Завданням винаходу є створення складу криоконсерванту для гемопоетичних клітин донорської кордової крові у якому шляхом зміни знайдених емпіричним шляхом інгредієнтів, та їх вмісту в складі криоконсерванту, забезпечується покращання умов збереження клітин донорської кордової крові, збільшення періоду збереження та підвищення кількості життєздатних клітин кордової крові після періоду збереження.

Для вирішення цього завдання криоконсервант для гемопоетичних клітин донорської кордової крові передбачає застосування в своєму складі водного розчину Хлориду натрію, сахарів та криопротектора.

Новим у складі криоконсерванту є те, що у якості сахарів він містить поліглюкозин, у якості криопротектора димексид та додатково лізоцим у співвідношенні компонентів розчину об %

поліглюкозин 6% рН4,5-6,0	40-45
хлорид натрію	8-9
лізоцим	0,04-0,05
димексид	4-6
вода бідистильована	решта

В іншому варіанті виконання криоконсерванта для гемопоетичних клітин донорської кордової крові, новим у складі криоконсерванту є те, що

у якості сахарів він містить поліглюкозин, у якості криопротектора поліетиленоксид м м 400 та додатково лізоцим у співвідношенні компонентів розчину об %

поліглюкозин 6% рН4,5-6,0	40-45
хлорид натрію	8-9
лізоцим	0,04-0,05
поліетиленоксид м м 400	10-20
вода бідистильована	решта

Проведені дослідження показують, що успіх криоконсервування визначається не тільки оптимальною технологією заморожування, а також складом речовин оточення в якому охолоджується об'єкт.

Склад запропонованого криоконсерванту забезпечує оптимальну проникність криопротектору у клітину в зв'язку з чим забезпечується достатній захист внутрікліткових компонентів.

Хлорид натрію, у запропонованій кількості забезпечує підтримання допустимих границь коливання осмотичного тиску у нутрі та поза клітинами. Для хлористого натрію складається в зниженні градієнту осмотичного тиску при переході криопротектора з середі в клітину и в зворотному напрямку, що запобігає розриву плазматичної мембрани в процесі заморожування - відігріву.

Наявність поліглюкозину забезпечує нормалізацію осмотичного градієнту в системі.

Лізоцим в складі криоконсерванту володіє бактеріолітичною дією, здатністю стимулювати неспецифічну реактивність організму, оказувати противозапальну і муколітичну дію. Крім того, його присутність в розчині стимулює проліферацію стовбових клітин кордової крові.

Для забезпечення корекції концентрації водневих и гідроксильних іонів та для підтримання стабільності рН середі в складі криопротектору додатково може бути застосований фосфатний буфер.

Сутність винаходів що заявляються пояснюється прикладами. Компоненти, використовувани при виготовленні криоконсерванту для гемопоетичних клітин донорської кордової крові що заявляються, фармакопейної якості і випускаються промисловим шляхом.

Лізоцим (Lysocim) – фермент білкової природи, молекулярна маса 15000, форма випуску в герметично закоркованих флаконах по 15, 100 і 150мг.

Розчин поліетиленоксиду – 400 30% (Solutio Polyethyleneoxydi – 400, 30%) Форма випуску в скляних пляшках для препаратів крові та кровозамінників по 100, 250, 500мл).

Димексид (Dimexidum) Концентрат містить 99,0% диметилсульфоксиду концентрат випускають в скляних пляшках оранжевого кольору по 100мл.

Поліглюкозин (Реополіглюкозин) 6% розчин, форма випуску в скляних пляшках 250 і 500мл.

У Таблиці 1 дані приклади конкретного виконання варіантів здійснення складу криоконсерванту для гемопоетичних клітин донорської кордової крові з зазначенням застосовуваних речовин, а в таблиці 2 якісні характеристики, що досягаються при застосуванні криоконсервантів одержуваних у цих прикладах.

Спосіб готування криоконсерванту для гемопоетичних клітин донорської кордової крові в зазначених прикладах здійснювали таким шляхом. Склад криоконсерванту готували за добу до проведення досліджень.

При приготуванні зазначеного в таблиці 1 складу спочатку готували розчин хлориду натрію, перемішували шляхом похитування або на магнітній мішалці колби протягом 5 хвилин. Потім додавали наступний компонент і також перемішували протягом 5 хвилин. Компоненти додавали в такий послідовності. Після розчинення хлориду натрію розчиняли решту солей, потім відповідний до прикладу криопротектор, цукру та лізоцим.

Підготовка клітин до низькотемпературного консервування

В отриману завісь клітин, що призначені для криоконсервування, через ін'єкційну голку по краплині додавали такий же об'єм криоконсерванта відповідно прикладу, при легкому перемішуванні завісі шляхом похитування пробірки. В камері Горяєва підраховували кількість ядерних клітин в препараті.

За допомогою шприцу через ін'єкційну голку клітини розливали по 1мл в поліетиленові криоампули об'ємом 1-1,8мл фірми Nunc (CryoStore Boxes). Криоампули герметично зачиняли кришками і маркували.

Заморожування гемопоетичних клітин виконували за допомогою програмного заморозувача, який дозволяє варіювати швидкість зниження температури на різних етапах криоконсервування і автоматично здійснювати ініціювання процесу кристалізації (сідінг) за певної температури. Заморожування здійснювали в три етапи, при цьому на першому етапі з швидкістю 0,7-1,2°C за 1хв. от +20°C до до -8,5-10,5°C, на другому етапі зі швидкістю 1,0-4,5°C/хв. до -30 - -40°C, температурною зупинкою при - 25-30°C 3-5 хв., а на третьому етапі зі швидкістю 10-12°C/хв. до -130-196°C.

Розморожування сателіта стерильних і чистих від вірусної і мікоплазмової флори зразків для культивування

Стерильні та чисті від вірусної і мікоплазмової флори зразки досліджували на біологічну активність методом культивування в напівтвердих се-

редовищах, для підрахунку кількості клітин-попередників та їх проліферативної активності.

Розморожування сателіта, призначеного для культивування,

виконували таким чином. Сателіт вилучали із низькотемпературного банку і розміщували у водяну баню (плюс 40±0,5°C) на 50-60 сек. до появи рідкої фази (в контейнері плаває крижінка), переносили в лабораторію для культивування. Контейнер обробляли стерилізуючим розчином і вносили в камеру ламінарного боксу для подальшої роботи.

Підрахунок кількості розморожених гемопоетичних клітин

Стерильним одноразовим 10мл шприцом через ін'єкційну голку клітини переміщували в контейнері і 2 краплі наносили на предметне скло, з яких набирали меланжер до першої позначки, а з клітин, що залишились, робили мазки. В меланжер добирали до кінцевої позначки розчин метиленового синього на 2%-му розчині оцтової кислоти (розведення в 10 разів). Кількість клітин підраховували в камері Горяєва під мікроскопом.

Визначення кількості клітин-попередників (КОЕ-ГМ) в розморожених зразках гемопоетичних клітин

Визначення КОЕ-ГМ в зразках розморожених гемопоетичних клітин виконують шляхом культивування в напівтвердому агарі протягом 7-9 днів за методикою Пайк і Робінсон, 1970 р. з модифікацією, що описана в монографії «Гемопоетичні клітини ембріональної печінки людини (ембріогенез, трансплантація, криоконсервування)», В.І. Грищенко, Г.С. Лобинцева, І.А. Вотякова, С.І. Шерешков. Київ, 1988.

Підрахунок кількості колоній і кластерів здійснювався на постійних препаратах під мікроскопом. Життєздатність розморожених клітин, оцінених за методом клонування, у порівнянні з нативними клітинами не повинна бути менше, ніж 60%.

Як видно з результатів дослідів, запропонований склад криоконсерванту для гемопоетичних клітин донорської кордової крові забезпечує високе збереження клітин-попередниць гемопоєза кордової крові в порівнянні з аналогічними складами криоконсерванту.

Таблиця 1

Склад криоконсерванту													
Приклади	Вода бідитилбована	Натрію хлоридхлорид	Димексин	Поліетиленоксид	Лізоцим	Поліглюкін	Низькомолекулярний олівінілпіролідон	Глюкоза	Лактоза	Калію хлорид	Кальцію хлорид	Магнію хлорид	Натрію гідрокарбонат
прот	66,9	0,5											
1	46,9	8,3	4,8	0	0,05	40							
2	41,1	8,9	5	0	0,05	45							
3	44,8	8,2	6	0	0,04	41							
4	42	9	4	0	0,04	45							

Продовження таблиці

5	42,8	8,8	4,4	0	0,05	44							
6	43	8,6	5,4	0	0,04	43							
7	41,3	8,1	5,6	0	0,04	45							
8	45	8,4	4,6	0	0,05	42							
9	41,5	8,5	6	0	0,05	44							
10	45,5	8,7	5,8	0	0,04	40							
11	41	9	6	0	0,04	44							
12	43,8	8	5,2	0	0,05	43							
13	32,1	8,9	0	14	0,05	45							
14	36,4	8,6	0	12	0,04	43							
15	37	8	0	10	0,05	45							
16	38,2	8,8	0	11	0,04	42							
17	32,8	8,2	0	15	0,05	44							
18	34	9	0	17	0,04	40							
19	33,3	8,7	0	18	0,05	40							
20	31	8	0	20	0,05	41							
21	26,7	8,3	0	20	0,04	45							
22	34,6	8,4	0	13	0,04	44							
23	32,5	8,5	0	16	0,05	43							
24	32	9	0	15	0,04	44							

Таблиця 2

Приклади	Показники	
	% живих клітин	кількість колоній та кластерів на $10^5$ клітин в агарі
1	82,2±3,2	86,4±5,8
2	95,2±2,4	121,3±2,1
3	96,1±3,1	124,2±4,1
4	94,5±2,7	123,2±3,0
5	96,2±2,7	120,4±4,3
6	93,7±1,8	125,7±2,8
7	90,0±3,4	121,5±4,2
8	95,4±1,6	123,0±3,1
9	96,4±2,9	128,0±1,8
10	93,3,1±2,3	121,4±3,3
11	94,2±3,4	120,3±3,7
12	95,2±2,3	126,5±4,0
13	88,7±4,8	110,4±5,2
14	90,3±2,1	107,6±3,2
15	85,3±2,0	104,7±2,5
16	84,1±3,4	102,7±5,3
17	87,2±3,4	115,3±2,7
18	88,6±1,2	110,6±3,0
19	91,2±5,1	121,4±2,1
20	90,8±3,7	120,5±1,1
21	89,0±3,5	118,8±3,2
22	88,4±3,0	116,2±1,1
23	87,2±4,2	117,0±3,5
24	85,2±3,1	114,5±1,2