



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **71684**

(13) **U**

(51) МПК

**A01N 1/02** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2011 15152**

(22) Дата подання заявки: **21.12.2011**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **25.07.2012**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **25.07.2012, Бюл.№ 14**

(72) Винахідник(и):

**Співак Микола Якович (UA),  
Лазаренко Людмила Миколаївна (UA),  
Демченко Ольга Миколаївна (UA)**

(73) Власник(и):

**Співак Микола Якович,  
вул. Богомольця, 7/14, кв.113, м. Київ,  
01024 (UA)**

## (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН

### (57) Реферат:

Спосіб одержання гемопоетичних клітин з кордової крові або Уартанова студня шляхом їх виділення, відмивання та внесення у розчин кріопротектора, що містить диметилсульфоксид з подальшим заморожуванням, причому розчин кріоконсервування додатково включає 5-10 % сироватки крові універсального донора (A(0)Rh-), а вміст диметилсульфоксиду складає 1-3 %.

**UA 71684 U**



Корисна модель належить до біології, ветеринарії та медицини, зокрема до клітинної біології та терапії.

Відомо, що основним недоліком використання гемопоетичних клітин є обмежена можливість виділення та підтримання функціональної здатності цих клітин в умовах *in vitro* без втрати здатності мультілінійного росту або диференціації, що є необхідною умовою у клінічній практиці (див. Спивак с соавт. 2005, 2008). Відомо також, що для зберігання життєздатності виділених гемопоетичних клітин застосовуються різні методи кріоконсервування з гліцерином (див. Симонов, 1965). Проте гліцерин повільно проникає в клітину, у зв'язку з чим потрібна тривала експозиція клітин з кріопротектором. При цьому життєздатність клітин значно зменшується.

Найбільш близьким до заявленого способу є спосіб одержання гемопоетичних клітин із кріопротектором диметилсульфоксидом (ДМСО). При цьому ДМСО використовують у концентрації від 5 до 10 %, а потім зависину клітин поетапно заморожують (див. Грищенко, 2002). Недоліком способу є те, що така висока концентрація ДМСО є токсичною для гемопоетичних клітин. Крім того, після розморожування кріоконсервованих клітин їх потрібно ретельно відмити перед подальшим використанням. Отже, на сьогодні існує потреба у розробці такого способу одержання та кріоконсервування гемопоетичних клітин, який би міг забезпечити підвищення та збереження життєздатності клітин та їх функціональну активність, що дозволить реалізувати їх для застосування у медицині, ветеринарії та клітинній біології.

З огляду на зазначене задачею даної корисної моделі є створення такого способу одержання гемопоетичних клітин, незалежно від джерела їх отримання: кордової крові або Уартанова студня плода людини, в якому шляхом зміни умов способу кріоконсервування, знайдених дослідним шляхом, забезпечується спрощення способу одержання та підвищення життєздатності клітин після періоду збереження. Дана задача вирішується тим, що в способі одержання гемопоетичних клітин з різних джерел (кордова кров, Уартанов студінь) в розчин консервування їх, перед заморожуванням вносять кріопротектор ДМСО, в концентрації 1-5 % та 5-10 % сироватки донорської крові універсального донора A(0)Rh-. Введення сироватки донорської крові дає можливість знизити концентрацію ДМСО та забезпечити підвищення та збереження життєздатності клітин та функціональної активності клітин на 25-30 %.

Отже наступною задачею на вирішення якої направлено даний винахід є забезпечення способу та композиції для консервування гемопоетичних клітин незалежно від джерела їх отримання: кордової крові чи Уартанова студня плода людини, які забезпечують підвищення збереження життєздатності клітин та їх функціональної активності. Вказана задача вирішується тим, що в способі отримання гемопоетичних клітин використовується розчин кріоконсервування який додатково містить ДМСО та сироватку донорської крові універсального донора. Запропонований винахід пояснюється наступними прикладами, які наведено нижче для кращого розуміння суті корисної моделі і ніяким чином не обмежують його.

#### Приклад 1.

Гемопоетичні клітини, одержані з кордової крові після пологів, деякий час витримували при кімнатній температурі для осаду еритроцитів. Потім готували суспензію гемопоетичних клітин у сольовому розчині безбарвного Хенкса або фізіологічному розчині. Кількість клітин та їх життєздатність визначали загальноприйнятим методом у камері Горяєва після забарвлення вітальним барвником - трипановим синім. Для кріоконсервування отриману суспензію гемопоетичних клітин людини переносили до пластикових кріопробірок, в які додавали рівний об'єм кріозахисного середовища, виготовленого на основі безбарвного сольового розчину Хенкса або фізіологічного розчину. До складу кріозахисного розчину вносили ДМСО та сироватку крові універсального донора. Кінцева концентрація ДМСО складала 1 %, 2 %, 3 %, 5 % та 10 %, а сироватка крові універсального донора 5 %, 10 %.

Суспензію клітин еквілібрували з кріопротектором при 4 °С протягом 15 хвилин. А потім клітини заморожували зі швидкістю 1 °С/хв. до -80 °С за допомогою програмного заморожувача. Після цього зразки занурювали у рідкий азот і зберігали при -196 °С. Розморожування клітин здійснювали при 37 °С на водяній бані. Видалення кріопротектора здійснювали шляхом розведення вмісту кріопробірок фізіологічним розчином у співвідношенні 1:20 із наступним центрифугуванням при 200 g протягом 10 хвилин. Збереженість гемопоетичних клітин кордової крові визначали до і після кріоконсервування за допомогою загальноприйнятого вітального барвника - трипанового синього. Концентрацію клітин та їх втрати у процесі заморожування визначали шляхом обліку збережених життєздатних клітин у камері Горяєва (табл.1).

Таблиця 1

Вплив концентрації ДМСО на збереження життєздатності клітин

Концентрація ДМСО (%)	Концентрація сироватки %	Життєздатність клітин %
0	5 %	48±6
1		72±12
2		80±9
3		86±5
5		82±7
1	10 %	68±8
2		82±6
3		80±5
5		76±12

Як показник збереження життєздатності клітин та функціональної активності виділених клітин досліджували їх здатність до утворення колоній після розморожування. Колонієутворюючу активність гемопоетичних клітин визначали при культивуванні  $1 \times 10^5$  клітин у чашках Петрі (d=35) у 1 мл напіврідкого метилцелюлозного середовища, що містило загальноживані біологічні сполуки рекомбінантні цитокини та фактори росту. Підрахунок кількості колоній проводили на 14 добу культивування за допомогою світлового мікроскопа (збільшення  $\times 40 \times 100$ ). Сумарна кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) представлена у табл. 2.

Таблиця 2

Сумарна кількість КУО після заморожування (n=8)

Концентрація ДМСО (%)	Кількість КУО без сироватки крові	Кількість КУО з сироваткою крові	
		5 %	10 %
0	14±1,2	96±18	123±26
1	67±4,8	194±24	286±31
2	145±15	255±31	302±36
3	153±18	309±28	352±34
5	130±22	183±21	201±27
10	104±11	141±29	178±23

Таким чином, як свідчать отримані результати, після заморожування гемопоетичних клітин кордової крові без кріопротектора колонієутворюючих одиниць надзвичайно мало. В той же час, при додаванні ДМСО у концентрації 1-3 % у розчин клітин кількість КУО різко зростає і найбільшою стає при 3 % ДМСО. При подальшому зростанні концентрації кріопротектора збільшення кількості КУО не спостерігається, а навпаки при концентрації 10 % ДМСО вона значно зменшується, що свідчить про токсичність кріопротектора. Введення у розчин 5 % або 10 % сироватки крові універсального донора призводить до значного збільшення кількості КУО навіть у відсутності ДМСО. Проте максимальна кількість КУО спостерігалась при поєднанні у кріопротективному розчині 1-3 % ДМСО та 5-10 % сироватки крові універсального донора. Функціональна активність гемопоетичних клітин кордової крові при такому співвідношенні компонентів кріопротективного розчину була значно вищою, ніж при застосуванні одного ДМСО.

Приклад 2.

Під час пологів у жінок брали пуповинний канатик (Уартанов студень) який промивали декілька разів стерильним фізіологічним розчином, а потім подрібнювали на мілкі часточки. Такі часточки після промивання розмішували на оброблені у стерильних умовах целофанові підкладки і ставили на 6-7 діб у термостат (при 37 °C та 5 % CO<sub>2</sub>). Ці операції здійснювали згідно з описаною методикою по одержанню окремих клітин (див. Тімен з спів., 2005). Після цього загальновідомими методом збирали гемопоетичні клітини Уартанового студня, відмивали їх шляхом центрифугування і далі здійснювали спосіб як у прикладі 1. Функціональна активність та життєздатність одержаних гемопоетичних клітин з Уартанового студня при застосуванні

кріопротекторів, які містили 1-5 % ДМСО та 5-10 % сироватки крові універсального донора були значно вищі, ніж при застосуванні одного ДМСО.

Таблиця 3

Сумарна кількість колоніє утворюючих  
одиниць (КУО) після заморожування клітин Уартанового студня (n=6)

Концентрація ДМСО (%)	Кількість КУО без сироватки крові	Кількість КУО з сироваткою крові	
		5 %	10 %
0	8±2,3	28±3	32±9
1	56±6	81±7	83±5
2	83±12	105±6	97±11
3	104±14	126±4	114±8
5	86±9	108±3	107±9

5 Отже підсумовуючи результати експериментів можна зробити висновок, що запропонована корисна модель дозволяє одержувати гемопоетичні клітини з кордової крові або Уартанова студня шляхом їх виділення, відмивання та внесення у розчин кріопротектора, що містить диметилсульфоксид та сироватку крові універсального донора, що дозволяє підвищити життєздатність гемопоетичних клітин та їх функціональну активність.

10 Джерела інформації:

Тімен Г.Е., Белоусова А.О., Писанко П.В. Культивування тканин внутрішнього вуха in vitro. // Журнал вушних, носових і горлових хвороб. - 2005. - № 4. - С. 28-33.

Спивак Н.Я. Сухих Г.Т., Малайцев В.В., Богданова И.М. Стволовые клетки. Биология и потенциальное клиническое использование. Трансплантология, 2005. 8,3. - С. 6-14.

15 Спивак Н.Я. Сухих Г.Т., Богданова И.М. Генно-инженерные технологии и стволовые клетки / Физиол. Журнал. 2008. 54,3.

Спивак Н.Я. Интерферону 50 лет. // Мікробіологічний журнал, 2007.69,4 - С. 76-82.

Спивак Н.Я. Интерферон от молекулы до лекарства.// Физиол. Журнал, 2007. 53,2 - С. 99-104.

20 Симонов Л.И. Влияние гомотрансплантации кроветворной ткани на течение острой лучевой болезни крови и определение жизнеспособности консервированных клеток. Вопросы трансплантации костного мозга при лучевом поражении. Л.: 1965. - С. 22-23.

Грищенко В.І., Петренко О.Ю., Сукич О.П. Заготівля, кріоконсервування та клінічне використання клітин та цитозоль хоріона. Методичні рекомендації. Харків, 2003. - 18 с.

25

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

30 Спосіб одержання гемопоетичних клітин з кордової крові або Уартанова студня шляхом їх виділення, відмивання та внесення у розчин кріопротектора, що містить диметилсульфоксид з подальшим заморожуванням, який **відрізняється** тим, що розчин кріоконсервування додатково включає 5-10 % сироватки крові універсального донора (A(0)Rh-), а вміст диметилсульфоксиду складає 1-3 %.

---

Комп'ютерна верстка Л.Литвиненко

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601