



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 117693

(13) U

(51) МПК

A01N 1/02 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 12432**

(22) Дата подання заявки: **06.12.2016**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.07.2017**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.07.2017, Бюл.№ 13**

(72) Винахідник(и):

**Перепелицина Олена Михайлівна (UA),
Ястребова Олена Вікторівна (UA),
Сидоренко Михайло Васильович (UA),
Дудкін Сергій Федорович (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ВІДДІЛЕННЯ
БІОТЕХНІЧНИХ ПРОБЛЕМ ДІАГНОСТИКИ
ІНСТИТУТУ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І
КРІОМЕДИЦИНИ" НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,
пр. Науки, 42/1, м. Київ, 03028 (UA)**

(54) СПОСІБ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН

(57) Реферат:

Спосіб кріоконсервування соматичних клітин включає заморожування клітин в середовищі для кріоконсервування. Процес заморожування включає три стадії, де на першій та другій стадії охолодження в інтервалі температур від +37 °C до +4 °C та від +4 °C до -4 °C відповідно, швидкість зниження температури складає 1 °C/хвилину. На третій стадії від -4 °C до -200 °C швидкість зниження температури становить більш 150 °C/хвилину. Середовище для кріоконсервування містить ДМСО, DMEM, поліетиленгліколь, сахарозу, карбоксиметилцелюлозу, фетальну сироватку теляти (ФСТ) та сахарозу.

UA 117693 U

Корисна модель належить до галузі кріобіології та кріомедицини і може бути використана для низькотемпературного кріоконсервування соматичних клітин з метою їх подальшої трансфузії.

Проблема збереження живих і функціональних клітин поза організмом надзвичайно важлива в сучасній медицині і зачіпає багато її областей. Так розвиток медичних технологій сприяє розробці все нових підходів до лікування безпліддя за допомогою кріоконсервованих сперматозоїдів, ооцитів, ембріонів. У лікуванні онкологічних захворювань використовуються стовбурові клітини кісткового мозку. Клітинні методи регенераційної медицини базуються на використанні соматичних клітин диференційованих тканин та спрямованого диференціювання стовбурових клітин. Найбільш перспективним напрямком, що зараз інтенсивно розвивається в кріобіології, є вітрифікація, яка поступово витісняє традиційно використовуване повільне заморожування.

При вітрифікації значно спрощується не тільки процес охолодження, виключається небезпека фізичних і хімічних пошкоджень, викликаних міжклітинною та внутрішньоклітинною кристалізацією рідини. Під вітрифікацією розуміють перехід рідини в твердий стан, який викликаний не кристалізацією, а екстремальним підвищенням в'язкості рідини під час надшвидкого охолодження без проходження стадії кристалізації. Зазвичай рідина середовища для вітрифікації складається з суміші проникаючого кріопротектора (ДМСО, ацетамід, пропіленгліколь, гліцерин, етиленгліколь) і непроникаючого кріопротектора (поліетиленгліколь, фіколл, сахароза) в буферному сольовому розчині.

Вітрифікацію можна розглядати як фазовий перехід, в якому переохолоджений розчин при надшвидкому охолодженні нижче температури склування (T_g), залишаючись аморфним, набуває структуру скла і має властивості, аналогічні некристалічним твердим тілам. Живі клітини і навіть цілі ембріони можна таким чином перетворити на "скло". Склоподібний стан рідини при вітрифікації досягається за рахунок її дуже швидкого охолодження - коли ентропія рідини знижується швидше, ніж ентропія відповідного кристалічного стану. Тобто, рідина просто не встигає замерзати, коли її ентропія наближається до ентропії кристала. Однак, щоб вітрифікувати живу клітину, необхідно досягти швидкості падіння температур $\approx 10^8$ °C/хв, що на практиці є нездійсненним завданням, оскільки кріогенні рідини мають недостатню для цього температуру, і неможливе використання обсягу вітрифікованого розчину менше, ніж обсяг ооцита або ембріона.

Було показано, що додавання до середовища для заморожування кріопротекторів дозволяє різко знизити швидкість заморожування та досягти ефекту вітрифікації. Так, вже при концентрації 10 % етиленгліколю та пропіленгліколю швидкість заморожування можна знизити на порядок, при концентрації 40 % цих речовин вітрифікація стає можливою при швидкості охолодження 10^3 °C/хв, а при концентрації 60 % можливе її зниження до 50 °C/хв. Але зі збільшенням концентрації кріопротекторів, що вносяться в середовище, збільшується і їхній негативний вплив на клітини, що піддаються заморожуванню. Повільне заморожування, по суті, також призводить до накопичення переохолодженої води в біологічному об'єкті з подальшою вітрифікацією внутрішньоклітинного компонента, тільки досягається цей стан за рахунок сильної дегідратації клітин при утворенні позаклітинного льоду.

Таким чином, при досягненні такого склоподібного стану зупиняються процеси хімічної та фізичної деградації об'єкта. Незважаючи на досить складний фізичний механізм процесу вітрифікації, речовини в такому стані найчастіше зустрічаються і в нашому повсякденному житті - це власне скло, солодка вата, деякі види силікону і безліч інших. Іншим способом різкого зниження температури зразка є можливість охолодження гамет та ембріонів при температурах нижчих, ніж температура рідкого азоту. Найбільш холодний газ у рідкому стані - це гелій (його температура кипіння всього 4,2 K), і, природно, охолодження в ньому буде найбільш ефективним. Але такі гази надзвичайно важко підтримувати в зрідженому стані, а надтекучість гелію і його практично повна прозорість роблять будь-які маніпуляції в ньому практично неможливими. Тому був розроблений метод кріоконсервування в не киплячому рідкому азоті, температуру якого вдається знизити до -220 °C. Цей ефект досяжний при зниженні тиску, що призводить до зниження температури кипіння рідини. При поверненні нормального тиску безпосередньо перед вітрифікацією матеріалу азот не встигає нагрітися і закипіти, що створює можливість заморожування в переохолодженому рідкому азоті, тобто, з більшою швидкістю охолодження.

Переваги та недоліки методу надшвидкого заморожування:

- Вітрифікація полегшує і спрощує процес заморожування як простих одноклітинних об'єктів (клітини) так й багатоклітинних (ембріонів).

- При контрольованій повільній кріоконсервації об'єкти пошкоджуються кристалами льоду, що знижує подальшу виживаність біологічних об'єктів та ефективність подальшого використання. Вітрифікація дозволяє підвищити відсоток живих об'єктів після розморожування та прискорити їх відновлення.

5 - Пробопідготовка для надшвидкого заморожування на 1-му етапі не складна та наближена до стандартних процедур.

- Недолік вітрифікації - хімічна токсичність, яка прямо корелює з концентрацією кріопротекторів, часом і температурою експозиції об'єкта у цьому розчині.

10 - Проблему пропонується вирішити шляхом підбору низькомолекулярних кріопротекторів. Оскільки коефіцієнт проникності кріопротекторів до клітини знаходиться в прямому зв'язку з молекулярною вагою речовин, що входять до їх складу, і одночасно є передумовою швидкого проникнення кріопротектора в клітини або, навпаки, виходу з них, то низька молекулярна вага складових кріопротектора дозволяє зменшити час експозиції об'єкта у розчині для вітрифікації та досягти меншої хімічної інтоксикації.

15 Застосування спеціальних поживних середовищ та послідовності дегідратації перед заморожуванням присвячено досить багато робіт. Так, Michael D. Cecchi (US 2012/0064504 A1, 15.03.2012) пропонує вдосконалити наявні промислові зразки середовищ для заморожування за рахунок розширення складу та додавання глюкози (0,18 г/л), пірувату (0,03 г/л), ліпоєвої та лінолінової кислот (0,000008 г/л та 0,00005 г/л, відповідно), альфа-токоферолацетату (0,00075г/л), аскорбінової кислоти (0,01 г/л), вітаміну K2 (0,0005 г/л). Також до середовища пропонується додавати антиоксиданти для зниження пошкоджень мембран клітин та поліпшення процесу відновлення після розморожування. В результаті склад середовищ стає дуже складним та потребує адаптації під кожний зразок тканин, тип клітин та напрямки подальшого використання. Так, наприклад підвищений вміст пірувату та аскорбінової кислоти не є прийнятним для поліпотентних стовбурових клітин, оскільки викликає спонтанне диференціювання у напрямку хондроцитів. Крім цього запропонований спосіб не аналізує швидкість зниження температури та її вплив на виживаність клітин.

30 Інший підхід наведений Anita Sjorgen et al. (US 2009/0093054 A1, 09.04.2009) та Sanchez Gutierrez et al. (US 2013/0157250 A1, 20.06.2013). Для досягнення високої швидкості охолодження та стану вітрифікації рідини пропонується використовувати спеціальні "соломинки". Це тонкі трубочки з пластику або скла, діаметром 1 мм, довжиною 10-13 мм, об'ємом 20-200 мкл. Малий об'єм "соломинки" дозволяє швидко охолоджувати об'єкт, але є суттєвим фактором, який обмежує використання зазначеного способу лише в процедурах запліднення in vitro. Тобто в таких процедурах, коли кількість об'єктів налічує одиниці та десятки. Для заморожування та зберігання достатньої кількості стовбурових клітин, тканин, організмів ці об'єми не ефективні.

40 Іншими авторами John M. Baust, Robert Van Burkirk, John G. Baust (US 2001/0049140 A1, 06.12.2001) пропонується середовище на базі 2 % желатинового середовища. Для заморожування таке середовище цілком непридатне оскільки не вирішує головну проблему - заміщення води кріопротекторними розчинами для зниженні утворення кристалів та максимального збереження цілісності структур клітин.

45 В патенті України на корисну модель № 106776 було описано спосіб кріоконсервування еритроцитів тварин шляхом заморожування клітин до -196 °C з використанням кріоконсерванта, що містить 10 % ДМСО, 0,9 % NaCl, 10 мМ фосфатного буфера і воду дистильовану, де в кріоконсервант додатково вводять ПЕО-1500 в концентрації 15 %, 1,2-ПД в концентрації 5 % і сахарозу в концентрації 5 %.

До недоліків запропонованого способу кріоконсервування можна віднести його вузько специфічне використання для кріоконсервування еритроцитів і непридатність для кріоконсервування соматичних клітин, внаслідок низького відсотку живих соматичних клітин.

50 В основу корисної моделі поставлена задача підвищення відсотка живих соматичних клітин людини після заморожування-зберігання та розморожування.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб кріоконсервування соматичних клітин, що включає заморожування клітин в середовищі для кріоконсервування, згідно з корисною моделлю, процес заморожування включає три стадії, де на першій та другій стадії охолодження в інтервалі температур від +37 °C до +4 °C та від +4 °C до -4 °C, відповідно, швидкість зниження температури складає 1 °C/хвилину, а на третій стадії від -4 °C до -200 °C швидкість зниження температури становить більш 150 °C/хвилину, при цьому середовище для кріоконсервування містить ДМСО, DMEM, поліетиленгліколь, сахарозу, карбоксиметилцелюлозу, фетальну сироватку теляти (ФСТ) та сахарозу, при наступному кінцевому співвідношенні компонентів, у мас. %:

ДМСО	2-10
DMEM	30-50
поліетиленгліколь	5-15
сахароза	5-15
ФСТ	10-30
карбоксиметилцелюлоза	5-15
фізіологічний розчин	до 100.

Як непроникаючий кріопротектор використовують поліетиленгліколь з молекулярною масою 1500 г/моль.

Використання запропонованого способу і складу поживного середовища, що являють собою суміш органічних непроникаючих до клітини кріопротекторів та неорганічних, проникаючих кріопротекторів дозволить підвищити відсоток живих клітин після процедури заморожування/розморожування, зберегти здатність клітин до подальшого поділу та диференціювання, залишити незмінними рецепторні маркери клітин, їх чутливість до зовнішньо клітинних сигналів та здатність до диференціювання. Новий склад поживних середовищ для надшвидкого заморожування дозволить підвищити ефективність клітинних біотехнологічних процедур та методів в таких сферах як регенераційна медицина, лікування безпліддя різної етіології, лікування за допомогою елементів пуповинної крові. Це дозволить підвищити пов'язаних з заморожуванням, зберіганням та розморожуванням клітинного матеріалу.

Корисна модель пояснюється за допомогою графічних матеріалів, де:

- на Фіг. 1 показана загальна схема кріоконсервування;
- на Фіг. 2 показана стандартна пробірка для заморожування клітин фірми Nunc (Німеччина), пристосована для запису кріогенних температур. В центрі пробірки на центруючих розпірках знаходиться термopapap;
 - на Фіг. 3 показана кінетика зниження температури зразку в залежності від складу вітрифікаційного середовища;
 - на Фіг. 4 показана виживаність клітин MCF-7 після тристадійного заморожування з використанням різних вітрифікаційних середовищ.

Розроблений протокол тристадійного заморожування соматичних клітин з використанням нового середовища для кріоконсервування клітин реалізується наступним чином:

1. Попередньо відбирають від культури клітин 3 мл культурального середовища в центрифужну пробірку, залишають при кімнатній температурі. Потім акуратно знімають клітини з субстрату за допомогою 0,25 % розчину трипсин-Версену (близько 1 мл на 25 см² площі поверхні). Температура проведення процедури +37 °C. Час процедури - 15-20 хв. Після цього клітинну суспензію по краплях додають до 3 мл культурального середовища. Температура процедури 22-25 °C. Після підрахунку кількості живих клітин, клітинну суспензію центрифугують при 200-400 г протягом 5 хвилин та видаляють супернатант, залишаючи клітинний осад в пробірці (для 4 ампул - 2 мл).

2. На першій стадії охолодження, клітинний осад ресуспендують в повному поживному середовищі (+25 °C), переносять в охолоджені ампули для заморожування по 0,5 мл. Температура процедури +15 °C, вміст сироватки - 10 %. Ампули з клітинами витримують в холодильнику при +4 °C протягом 20 хвилин.

3. На другій стадії в кожену ампулу додають 0,5 мл холодного вітрифікаційного середовища № 1 (BC №1: 60 % о/о фетальної сироватки теляти (ФСТ) і 40 % поживного середовища, DMEM). Температура процедури близько +4 °C, вміст сироватки 50 %. Потім ампули переносять в контейнері до морозильної камери з -4 °C, на 20-30 хв.

4. На третій стадії в ампули додають по 0,5 мл крижаного (-4 °C) BC № 4 (BC № 2: 15 % ДМСО; 50 % фетальної сироватки теляти (ФСТ); 30 % поживного середовища, DMEM; 200 мМоль сахарози). Потім ампули, відразу переносять в переохолоджений азот (-220 °C), інкубують 20 хвилин, після чого переносяться в рідкий азот для зберігання (-196 °C).

Перша-друга стадії - повільне охолодження в діапазоні температур від +36 °C до -3 °C відповідає пунктам 1-3 наведеного протоколу. Третя стадія - надшвидке заморожування/вітрифікація в діапазоні температур від -3 °C до -220 °C - пункт 4 протоколу.

Для реалізації 4 пункту протоколу треба підготувати для використання вітрифікаційний прилад.

1. Підготовка вітрифікаційного приладу до використання.

1.1. Колбу вітрифікаційного приладу заливають рідким азотом, закривають кришку та вмикають прилад.

1.2. Прилад повинен працювати до зниження температури азоту до -220 °C (15-20 хв.) та утворення льоду (шуга).

1.3. Прилад вимикають, скидають тиск у колбі приладу.

2. На другій стадії в ампули додають по 0,5 мл крижаного (-4 °C) ВС № 4 (15 % ДМСО, 50 % фетальної сироватки теляти (ФСТ), 30 % поживного середовища, DMEM, 200 мМ сахарози та 10 % КМЦ). Для порівняння використовували інші склади вітрифікаційних середовищ, згідно з Таблицею 1 та Фіг. 1.

3. Після початку танення льоду у переохолоджений азот (-220 °C) занурюють ампули з клітинами.

4. Ампули інкубуються 20-30 хв. у переохолодженому азоті (-220 °C), після чого переносяться в рідкий азот для зберігання (-196 °C).

Таблиця 1

Склад вітрифікаційних середовищ:

ВС № 0 на 10 мл: 40 % ФСТ, 20 % ДМСО, 40 % DMEM
ВС № 1 на 10 мл: 60 % ФСТ, 40 % DMEM
ВС № 2 на 10 мл: 15 % ДМСО, 50 % ФСТ, 30 % DMEM, 200 мМоль сахарози
ВС № 3 на 10 мл: 15 % DMSO, 50 % ФСТ, 30 % DMEM, 200 мМоль сахарози, Поліетиленгліколь до 10 % маси/об'єм
BCN#4 на 10 мл: BCN#3+10 % карбоксиметилцелюлоза (об'єм/об'єм)

Розморожування клітин проводиться стандартно для всіх протоколів заморожування.

Спосіб відмивання від кріоконсерванта/розморожування.

Ампули з рідкого азоту по одній розморожували у воді при температурі 36 °C 3-5 хв. (до останньої крижинки). Переписували дані з ампули та занурювали ампули в 70 % спирт на 1-2 секунду. Потім вміст ампули, близько 1,6 мл, по 400 мкл переносили в стерильні центрифужні пробірки з 7 мл холодного поживного середовища без сироватки (на 1 ампулу приготувати 4 пробірки з середовищем кімнатної температури). Клітини відмивали від кріопротекторів шляхом центрифугування при 100g 5 хв. Надосадову рідину відбирали, залишивши 0,5 мл клітинного осаду. Клітинний осад ресуспендували в теплому повному поживному середовищі і переносили у культуральний посуд. Інкубували добу при стандартних умовах. Через добу середовище замінювали на свіже.

Вживаність клітин визначали за допомогою МТТ-тесту після 3 діб культивування.

Температуру охолодження клітинної суспензії визначали за допомогою термодатчика на основі термопари (Фіг. 2, Табл. 2). В Табл. 2 та на Фіг. 3 продемонстровано, яким чином склад середовища впливає на швидкість охолодження суміші у переохолодженому азоті.

Таблиця 2

Швидкість зниження температури зареєстрованої термодатчиком ззовні контейнера (скраплений азот) та в середині кріоконтейнера.

Термопара в:	МТТ аналіз, ОП540нм	Молекулярна маса кріопротектора, дальтон	швидкість охолодження °C/хв	
			в межах від 0 до -40 °C	в межах від -40 до -170 °C
рідкому азоті	-	-	14118	19500
у віалі з фізрозчином	-	-	420	228
у віалі з сахарозою	100	~342,3	150	600
у віалі з ПЕГ 15000	66,88	~15000	150	258
у віалі з ПЕГ20000	61,87	~20000	177,6	255,6
у віалі з ПЕГ40000	91,4	~40000	180	131,4

Згідно з отриманими даними (Табл. 2, Фіг. 3), можна зробити висновок, що присутність високомолекулярних сполук у вітрифікаційних середовищах призводить до згладження кривої зниження температури, порівняно з 68 мМ розчином сахарози (кінцева концентрація). Одночасно, чим вища молекулярна маса поліетиленгліколів, тим повільніше відбувається зниження температури у віалі.

На Фіг. 4 та в Табл. 3 видно, що з ряду порівняних, найбільш ефективним непроникаючим кріопротектором є ПЕГ з молекулярною масою 1500. Оскільки його додавання до стандартного (контрольного) складу середовища для кріоконсервування збільшувало відсоток живих клітин в

- 1,3 рази, а комбінація з КМЦ - у 2,1 рази. Присутність сахарози забезпечує по-перше осмотичну дегідратацію клітин та зниження утворення внутрішньоклітинного льоду, а, по-друге, швидке відновлення клітин після відтанення та, як результат, збільшення відсотка живих клітин. Присутність ПЕГ 1500 та КМЦ призводить до осмотичного збільшення концентрації всіх компонентів внутрішньоклітинного середовища, призупинення біохімічних процесів в клітині, конденсації хроматину та модифікації структурних якостей мембран клітин.

Таблиця 3

Вживаність клітин MCF-7 при різних складах вітрифікаційних середовищ

	BC0	BC1+BC2 (контроль)	BC3		BC4					
	10 % ДМСО	200 мМ сахароза	ПЕГ 1,5Т	ПЕГ 4Т	200 мМ сахароза	ПЕГ 1,5Т	ПЕГ 4Т	ПЕГ 15Т	ПЕГ 20Т	ПЕГ 40Т
Оптична густина клітинної суспензії, ОП540 нм	0,40± ±0,01	0,46± ±0,01	0,60± ±0,06	0,49± ±0,02	0,6± ±0,05	0,97± ±0,004	0,34± ±0,029	0,89± ±0,06	0,44± ±0,015	0,58± ±0,012
Відсоток живих клітин, порівняно з контролем	87,95	100	131,9	108,0	130,6	212	75,2	195,2	96,2	126,5

- Перевагами запропонованого способу кріоконсервування є його невисока собівартість та простота виконання, порівняно з підвищенням виживаності клітин. Також даний спосіб не потребує використання дороговартісних приладів програмованого охолодження та може бути використаний у лабораторіях без додаткових витрат на обладнання та реактиви. Одночасно використані у методі реактиви, а саме сахароза, ПЕГ та КМЦ, є визнаними харчовими добавками, які у зазначених концентраціях не є шкідливими, а навпаки мають доказаний позитивний вплив на клітини людини.

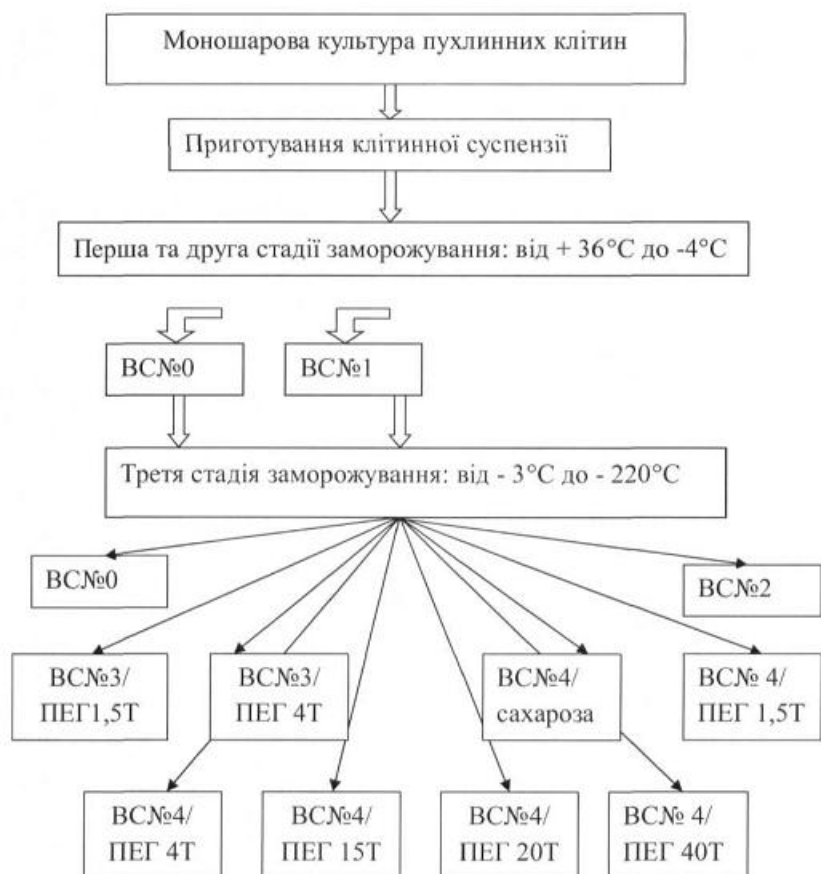
ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб кріоконсервування соматичних клітин, що включає заморожування клітин в середовищі для кріоконсервування, який **відрізняється** тим, що процес заморожування включає три стадії, де на першій та другій стадії охолодження в інтервалі температур від +37 °С до +4 °С та від +4 °С до -4 °С, відповідно, швидкість зниження температури складає 1 °С/хвилину, а на третій стадії від -4 °С до -200 °С швидкість зниження температури становить більш 150 °С/хвилину, при цьому середовище для кріоконсервування містить ДМСО, DMEM, поліетиленгліколь, сахарозу, карбоксиметилцелюлозу, фетальну сироватку теляти (ФСТ) та сахарозу, при наступному кінцевому співвідношенні компонентів, у мас. %:
- | | |
|-----------------------|---------|
| ДМСО | 2-10 |
| DMEM | 30-50 |
| поліетиленгліколь | 5-15 |
| сахароза | 5-15 |
| ФСТ | 10-30 |
| карбоксиметилцелюлоза | 5-15 |
| фізіологічний розчин | до 100. |
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як непроникаючий кріопротектор використовують поліетиленгліколь з молекулярною масою 1500 г/моль.

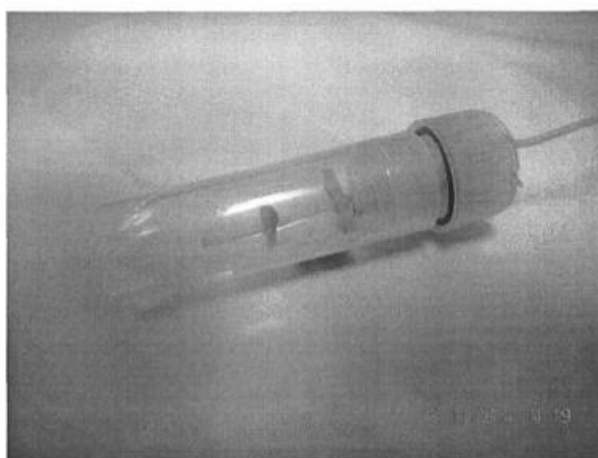
Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

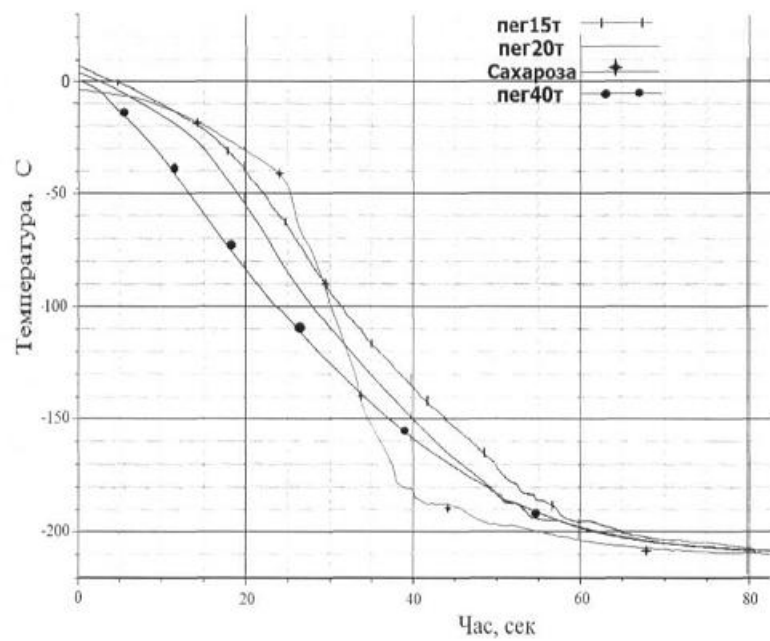
ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601



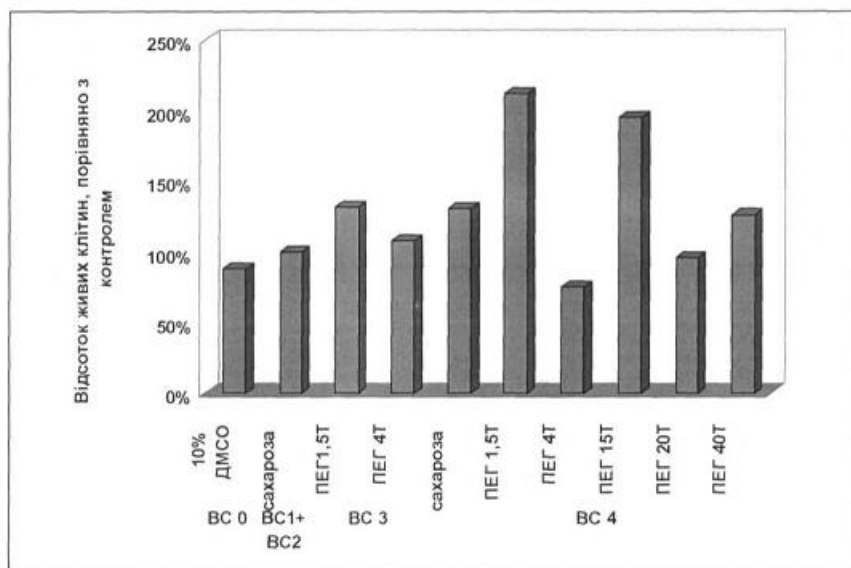
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4