



УКРАЇНА

(19) UA (11) 13845 (13) U
(51) МПК (2006)
A01N 1/02МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЕРИТРОЦИТІВ

(21) u200510392

(22) 03.11.2005

(24) 17.04.2006

(46) 17.04.2006, Бюл. № 4, 2006 р.

(72) Рамазанов Віктор Володимирович, Олійник
Ольга Олександрівна, Меліхова Світлана Володи-
мирівна, Бондаренко Ігор Валерійович, Бондарен-
ко Валерій Антонович(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІО-
МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ(57) Спосіб кріоконсервування еритроцитів, який
включає додавання до еритромаси кріоконсерван-

та, що містить кріопротектори, цукрозу, натрію
хлорид і воду дистильовану, заморожування, відіг-
рівання і відмивання, який **відрізняється** тим, що
кріоконсервант додатково містить глюкозу, а як
кріопротектори містить декстран 35000 і диметил-
сульфоксид при такому співвідношенні компонен-
тів, мас. %:

| | |
|-------------------|--------|
| декстран 35000 | 15-25 |
| диметилсульфоксид | 7 |
| глюкоза | 1-3 |
| цукроза | 7 |
| NaCl | 0,3 |
| вода дистильована | решта. |

Корисна модель належить до кріобіології і мо-
же бути використана для низькотемпературного
зберігання еритроцитів з метою трансфузії.

Найбільш близьким до способу, який заявля-
ється, є спосіб кріоконсервування еритроцитів з
використанням кріоконсерванта, що містить 1,2
пропандіол (1,2 ПД), полівінілпіролідон (ПВП), цук-
розу і натрію хлорид (NaCl). Кріоконсервант дода-
ють до еритромаси у співвідношенні (0,3-1):1 до
кінцевої концентрації 1,2 ПД у надосаді 23-42%,
заморожують до -70°C, відігрівають на водяній
бані і відмивають двома розчинами, що містять
сорбітол і NaCl [1].

Недоліком цього способу є те, що в ньому ви-
користовуються високі концентрації проникаючого
кріопротектора 1,2 ПД, у зв'язку із чим для відми-
вання розморожених еритроцитів застосовують
складну комбінацію двох гіпертонічних розчинів.
Це потребує великих витрат труда і коштів.

В основу корисної моделі поставлено задачу
створити такий спосіб кріоконсервування еритро-
цитів, у якому б, шляхом зміни складу кріоконсер-
ванта, забезпечувалася можливість знизити тру-
домісткість способу і затратуваних на його
здійснення коштів.

Ця задача вирішується тим, що в способі кріо-
консервування еритроцитів, який включає дода-
вання до еритромаси кріоконсерванта, що містить
кріопротектори, цукрозу, NaCl і воду дистильова-
ну, заморожування, відігрівання і відмивання, від-
повідно до корисної моделі, Кріоконсервант додат-
ково містить глюкозу, а в якості кріопротекторів

містить декстран 35000 і диметилсульфоксид
(ДМСО) при такому співвідношенні компонентів,
мас. %:

| | |
|-------------------|-------|
| Декстран 35000 | 15-25 |
| ДМСО | 7 |
| Глюкоза | 1-3 |
| Цукроза | 7 |
| NaCl | 0,3 |
| Вода дистильована | решта |

Застосування кріоконсерванта нового складу
дозволяє здійснювати відмивання клітин за допо-
могою однокомпонентного розчину, що містить
ізотонічну концентрацію NaCl (0,9%). Це дає мож-
ливість знизити трудомісткість способу і затрату-
ваних коштів.

Спосіб здійснюють таким чином.

Кров центрифугують при 1500об/хв протягом
15хв, видаляють надосад, а еритромасу відмива-
ють розчином, що містить 0,9% NaCl. До відмитої
еритромаси у співвідношенні 1:1 додають кріокон-
сервант, що містить, мас. %:

| | |
|-------------------|-------|
| Декстран 35000 | 15-25 |
| ДМСО | 7 |
| Глюкоза | 1-3 |
| Цукроза | 7 |
| NaCl | 0,3 |
| Вода дистильована | решта |

Кріоконсервант із еритромасою перемішують,
витримують 30хв при 22-25°C. Отриману суспен-
зію розливають у контейнери і занурюють у рідкий
азот. Відігрівання здійснюють на водяній бані. Піс-
ля відігрівання еритроцити відмивають при 37°C

(13) U
(11) 13845
(19) UA

0,9% розчином NaCl. Відмиті еритроцити переводять у розчин 8^В, що містить 0,3% NaCl, 7% цукрози, 0,2% Na₂HPO₄+12H₂O і 0,1% Na₂PO₄+2H₂O, для гіпотермічного зберігання (4°C) [2].

Приклад 1. До відмитих еритроцитів у співвідношенні 1:1 додавали кріоконсервант, що містить, мас. %:

| | |
|-------------------|-------|
| Декстран 35000 | 20 |
| ДМСО | 7 |
| Глюкоза | 2 |
| Цукроза | 7 |
| NaCl | 0,3 |
| Вода дистильована | решта |

Суспензію перемішували і витримували протягом 30хв. при 22-25°C, розливали в металеві контейнери, виготовлені з нержавіючої сталі об'ємом 10,0мл. Контейнери закручували фторопластовими пробками і занурювали в рідкий азот (швидкість заморожування 300-400°C/хв). Відігрівали на водяній бані при 40°C протягом 5хв. Відмивання еритроцитів проводили 0,9% розчином NaCl при 37°C. Для цього до одного об'єму розмороженої суспензії повільно при перемішуванні доливали 9 об'ємів теплої (37°C) фізіологічного розчину. Після центрифугування при 1500об/хв надосад видаляли, а еритроцити відмивали до повного видалення гемоглобіну в надосадовій рідині (3 рази). Відмиті еритроцити переводили в розчин 8^В і зберігали при 4°C. Результати наведені у порівнянні з найближчим аналогом у таблиці 1.

Таблиця 1

Схоронність еритроцитів після кріоконсервування.

| Показники | Спосіб кріоконсервування | |
|---|--------------------------|-----------|
| | Найближчий аналог | Заявлений |
| Загальні втрати, % | 7,2±0,4 | 7,3±0,7 |
| Гемоліз у розчині 8 ^В через 24 години, % | 1,1±0,1 | 1,2±0,3 |

З таблиці 1 видно, що схоронність еритроцитів після кріоконсервування способом, який заявляється, не нижче, ніж у найближчому аналізі.

Приклад 2. Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що кріоконсервант не містив глюкозу.

Після кріоконсервування і відмивання загальні втрати становили 11,5±1,5%, гемоліз у розчині 8^В через 24 години зберігання при 4°C становив 1,9±0,3%. Таким чином без глюкози в кріоконсерванті збільшуються загальні втрати і гемоліз.

Приклад 3. Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що кріоконсервант не містив декстран 35000.

Після кріоконсервування і відмивання загальні втрати становили 36±4%, гемоліз у розчині 8^В че-

рез 24 години зберігання при 4°C становив 4,2±0,7%. Таким чином без декстрану в кріоконсерванті збільшуються загальні втрати і гемоліз.

Приклад 4. Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що кріоконсервант містив меншу кількість декстрану і глюкози, мас. %:

| | |
|-------------------|-------|
| Декстран 35000 | 15 |
| ДМСО | 7 |
| Глюкоза | 1 |
| Цукроза | 7 |
| NaCl | 0,3 |
| Вода дистильована | решта |

Після кріоконсервування і відмивання загальні втрати становили 22±3%, гемоліз у розчині 8^В через 24 години зберігання при 4°C становив 3,1±0,6%. Отже, при зниженні кількості декстрану і глюкози в кріоконсерванті збільшуються загальні втрати і гемоліз.

Приклад 5. Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що кріоконсервант містив підвищену кількість декстрану і глюкози, мас. %:

| | |
|-------------------|-------|
| Декстран 35000 | 25 |
| ДМСО | 7 |
| Глюкоза | 3 |
| Цукроза | 7 |
| Nad | 0,3 |
| Вода дистильована | решта |

Після кріоконсервування і відмивання загальні втрати становили 18±3%, гемоліз у розчині 8^В через 24 години зберігання при 4°C становив 2,8±0,4%, тобто при підвищенні кількості декстрану і глюкози в кріоконсерванті збільшуються загальні втрати і гемоліз.

Приклад 6. Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що еритроцити зберігали в рідкому азоті протягом 6 місяців, табл. 2.

Таблиця 2

Схоронність еритроцитів після кріоконсервування.

| Показники | Спосіб кріоконсервування | |
|---|--------------------------|-----------|
| | Найближчий аналог | Заявлений |
| Загальні втрати, % | 10,9±1,6 | 11,0±1,4 |
| Гемоліз у розчині 8 ^В через 24 години, % | 0,8±0,2 | 1,3±0,3 |

З таблиці 2 видно, що схоронність еритроцитів після кріоконсервування заявленим способом, не нижче, ніж у найближчому аналізі.

Джерела інформації:

1. Патент України №12355, А01N1/02, 1995 р.

2. Аграненко В.А., Федорова Л.И. Замороженная кровь и ее клиническое применение. М. : Медицина, 1983.-с.55.