



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

ДЛЯ СЛУЖЕБНОГО ПОЛЬЗОВАНИЯ ЭКЗ №

(19) **SU** (11) **1543583** **A1**

(51)5 A 01 N 1/02

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 4308801/28-14

(22) 28.07.87

(71) Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР

(72) А.А. Цуцаева, Н.Н. Попов, Г.С. Тупчиенко, В.И. Гарбуз, В.П. Архиреев и И.А. Морозов

(53) 615.475 (088,8)

(56) Авторское свидетельство СССР № 1481926, кл. А 01 N 1/02, 1988.

(54) СРЕДА ДЛЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ
ТКАНЕВЫХ ЛИМФОЦИТОВ

(57) Изобретение относится к биологии и медицине. Цель изобретения - повышение качества продукта за счет увеличения числа жизнеспособных клеток и упрощения подготовки к трансфузии. Среда содержит в качестве основного компонента полиглюкин; 5-7,5% полиэтиленоксида; 5-7,5% антиоксиданта 378.

Изобретение относится к биологии и медицине и может быть использовано для криоконсервирования тканевых лимфоцитов с целью последующей трансфузии, а также для создания запасов этих клеток для лечения иммунодефицитных состояний различного генеза.

Целью изобретения является повышение качества продукта за счет увеличения числа жизнеспособных клеток и упрощение процесса подготовки к трансфузии.

Среда для криоконсервирования тканевых лимфоцитов содержит 5-7,5% ПЭО-400, 5,0-7,5% антиоксиданта 378, остальное - раствор кровезаменителя полиглюкина.

Пример 1. Клетки тканевых лимфоцитов замораживают в предлагаемой среде (полиглюкин 87,5%; антиоксидант 7,5%, ПЭО-400 5%) и в известной среде (среда Игла 90%, ПЭО-400 10%).

Суспензию тканевых лимфоцитов получают мягким гомогенизированием тимус

сыворотки в среде Игла и фильтруют через капроновый фильтр, центрифугируют. Осадок клеток ресуспендируют, доводя до концентрации клеток, равной $2 \cdot 10^7$ кл/мл. Отливают по 2,5 мл в три пробирки. Суспензию первой пробирки не замораживают - одна служит контролем. К суспензии второй пробирки добавляют 2,5 мл 20% раствор ПЭО-400 на среде Игла. Таким образом, конечная концентрация ПЭО-400 составляет 10%. После 15-минутной экспозиции замораживают, отогревают и тестируют. После размораживания клетки отмывают центрифугированием и ресуспендируют для подготовки к трансфузии в полиглюкине. Вновь проводят оценку сохранности клеток.

Содержимое 3-й пробирки центрифугируют. К осадку добавляют до 2,5 мл полиглюкин с антиоксидантом в концентрации 7,5%. К этой суспензии добавляют 2,5 мл полиглюкина с антиоксидантом в концентрации 7,5% и ПЭО-400 в концентрации 10%. Таким образом, по-

(19) **SU** (11) **1543583** **A1**

лучают суспензию клеток в концентрации $1 \cdot 10^7$ кл/мл в среде из 7,5% АО, 5% ПЭО-400 и 87,5% полиглюкина. После 15-минутной экспозиции замораживают, отогревают и тестируют как в примере 1. Для трансфузии данная среда готова к применению, поэтому операция отмывки в этом случае исключается.

Результаты представлены в таблице. 10

Таким образом, процесс отмывания клеток от среды прототипа приводит к уменьшению сохранности клеток по сравнению с предлагаемой средой на 38%. Эта среда, не предполагающая отмывания клеток, обеспечивает более высокую сохранность их, что обуславливает значительное увеличение терапевтического эффекта.

Состав среды замораживания	Сохранность лимфоцитов после размораживания относительно контроля, %	Сохранность лимфоцитов перед трансфузией от носителя контроля, %
1. Полиглюкин 87,5% АО-7,5% ПЭО-400 5,0%	93±5	35
2. Среда Игла 90% ПЭО-400 10%	77±8	40
3. Контроль	100	100

Пример 2. Для оценки функциональной активности тканевых лимфоцитов используют способность лимфоцитов к антителообразованию.

Криоконсервирование проводят для лимфоцитов селезенки мышей в одном из предлагаемых вариантов среды кон-

сервирования (7,5% антиоксиданта 378, 5% ПЭО-400 и 87,5% полиглюкина). После размораживания при 40°C $1 \cdot 10^7$ клеток в 0,2 мл среды вводят летально облученным мышам. Затем проводят иммунизацию их 0,5 мл 10% суспензией эритроцитов и определяют титр антител в сыворотке крови мышей на 7, 9 и 14 сутки после иммунизации.

Контролем служат трансфузии летально облученным мышам в тех же концентрациях и объемах нативных спленоцитов и криоконсервированных на среде прототипа.

Полученные данные позволяют заключить, что после переноса летально облученным мышам спленоцитов, криоконсервированных на среде прототипа титр антител на 14 сутки после иммунизации составляет лишь 25% от контрольного переноса нативных спленоцитов, тогда как при переносе спленоцитов на предлагаемой среде титр антител был в 2 раза больше. Это свидетельствует о том, что криоконсервирование клеток в предлагаемой среде обеспечивает в 2 раза большую сохранность функциональной активности клеток, чем при консервировании клеток на среде прототипа.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Среда для криоконсервирования тканевых лимфоцитов, содержащая полиэтиленоксид-400 и физиологический разбавитель, отличающаяся тем, что, с целью повышения качества продукта за счет увеличения числа жизнеспособных клеток и упрощения подготовки к трансфузии, в качестве физиологического разбавителя она содержит полиглюкин, дополнительно содержит антиоксидант 378 при следующем соотношении компонентов, %:

Полиэтиленоксид-400	5-7,5
Антиоксидант 378	5-7,5
Полиглюкин	Остальное

Составитель А. Лычкова
Редактор В. Трубоченко Техред А. Кравчук Корректор М. Максимихинец

Заказ 193/ДСП Тираж 283 Подписное
ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101