



УКРАЇНА

(19) UA (11) 15014 (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 ВИДАЛЕННЯ КРІОПРОТЕКТОРА ІЗ СУСПЕНЗІЇ ТРОМБОЦИТІВ

1

2

(21) u200510926

(22) 18.11.2005

(24) 15.06.2006

(46) 15.06.2006, Бюл. № 6, 2006 р.

(72) Грищенко Валентин Іванович, Компанієць Антоніна Михайлівна, Книш Оксана Василівна

(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб видалення кріопротектора із суспензії тромбоцитів шляхом розведення суспензії клітин аутологічною плазмою, центрифугування, вида-

лення супернатанту та додавання до осаду клітин аутологічної плазми, який **відрізняється** тим, що розведену аутологічною плазмою суспензію тромбоцитів нашаровують на шар аутологічних еритроцитів, центрифугування проводять при 1700-1800 g протягом 12-13 хвилин, після видалення супернатанту здійснюють відбір залишку плазми і шару тромбоцитів з шаром еритроцитів, до одержаного концентрату клітин додають аутоплазму у співвідношенні 1:2, після чого центрифугують протягом 1 хвилини при 1700-1800 g і здійснюють відбір суспензії тромбоцитів.

Корисна модель належить до галузі біології, а саме до кріобіології, і може бути використана у лабораторній практиці при дослідженні впливу кріопротекторів або інших речовин на функціональні властивості тромбоцитів.

Відомий спосіб видалення кріопротектору ДМСО з концентрату тромбоцитів, який включає пропускання суспензії клітин через внутрішні компартменти порожнинно-волоконних фільтрів, під час якого кріопротектор з внутрішніх компартментів за градієнтом концентрації фільтрується через напівпроникні мембрани волокон у зовнішні компартменти фільтрів, що містять омиваючий розчин без ДМСО [1].

Недоліком цього способу є те, що він потребує наявності у розпорядженні дослідника спеціальних фільтрів, а це ускладнює виконання процедури видалення і значно підвищує вартість способу.

Відомий спосіб видалення кріопротектору із суспензії тромбоцитів, який включає центрифугування суспензії для осадження клітин, видалення супернатанту та ресуспендування осаду тромбоцитів у аутологічній плазмі [2].

Недоліком цього способу є необхідність додавання до суспензії тромбоцитів простацикліну, який значно пригнічує агрегаційну здатність тромбоцитів. Крім того, його використання ускладнює виконання способу.

Найбільш близьким до заявленого є спосіб видалення кріопротектору із суспензії тромбоцитів [3], згідно з яким до суспензії тромбоцитів, що міс-

тить кріопротектор, при температурі 20°C додають рівний об'єм аутологічної плазми з кислим цитратом декстрази у кінцевій концентрації 10%, отриману суспензію центрифугують при 4000g протягом 10 хвилин. Супернатант видаляють. Осад тромбоцитів для одержання певної концентрації клітин ресуспендують в необхідному об'ємі аутологічної плазми без кріопротектору.

Недоліками цього способу є зниження рівня збереженості функціональних властивостей тромбоцитів через додаткове введення антикоагулянта [4], травмування клітин під час осадження на дно пластикової пробірки, що не має пружних властивостей, щільного "упаковування" клітин у осаді та ресуспендування, а також збільшення втрат клітин через адгезію частини з них до стінок пробірки та утворення стійких агрегатів.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити такий спосіб видалення кріопротектору із суспензії тромбоцитів, який би забезпечив підвищення рівня збереженості функціональних властивостей цих клітин та зменшення втрат тромбоцитів під час процедури видалення кріопротектору.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі видалення кріопротектору із суспензії тромбоцитів, який включає розведення суспензії клітин аутологічною плазмою, центрифугування, видалення супернатанту та додавання до осаду клітин аутологічної плазми, згідно з корисною моделлю, розведену аутологічною плазмою суспензію тромбоцитів нашаровують на шар аутологічних

(13) U
(11) 15014
(19) UA

еритроцитів, центрифугування проводять при 1700-1800g протягом 12-13 хвилин, після видалення супернатанту здійснюють відбір залишку плазми і шару тромбоцитів з шаром еритроцитів, до одержаного концентрату клітин додають аутоплазму у співвідношенні 1:2, після чого центрифугують протягом 1 хвилини при 1700-1800g і здійснюють відбір суспензії тромбоцитів.

Щадне осадження клітин з меншою центробіжною силою на пружну "еритроцитарну подушку" у пухкий осад виключає необхідність додаткового введення антикоагулянта, а повторне центрифугування отриманої суспензії клітин (тромбоцити, еритроцити з аутоплазмою), дозволяє уникнути ресуспендування тромбоцитів, так як вони лишаються суспендованими у плазмі. Це забезпечує підвищення рівня збереженості функціональних властивостей тромбоцитів та зменшення втрат клітин під час видалення кріопротектору.

Спосіб здійснюють таким чином.

Суспензію тромбоцитів, що містить кріопротектор, повільно розводять аутологічною плазмою у співвідношенні 1:2. Швидкість додавання залежить від концентрації і проникності кріопротектору для мембрани тромбоцитів. Отриману суспензію обережно нашаровують на аутологічні еритроцити (одержані при фракціонуванні крові), центрифугують. Супернатант максимально видаляють. Здійснюють відбір залишку плазми і шару тромбоцитів з шаром еритроцитів. До одержаного концентрату клітин додають аутологічну плазму у співвідношенні 1:2, ретельно перемішують і центрифугують. Проводять обережний відбір суспензії тромбоцитів, що знаходиться над осадом еритроцитів. Введенням додаткового об'єму аутологічної плазми до суспензії доводять концентрацію клітин до необхідного для досліджень рівня.

Приклад.

Видаляли ДМСО із суспензії тромбоцитів з метою оцінки впливу 30-хвилинної еквілібрації концентрату тромбоцитів з 0,75М розчином ДМСО на агрегаційні властивості тромбоцитів.

До 4мл суспензії тромбоцитів, що містить кріопротектор, додавали протягом 1 хвилини 8мл аутологічної плазми. Одержану суспензію обережно нашаровували на аутологічну еритроцитну масу в об'ємі 2мл у пластиковій 15-мл пробірці і центрифугували при 3000 об/хв. (1760g) протягом

15хвилин. Плазму над осадом клітин видаляли. Залишок плазми і шар тромбоцитів з шаром еритроцитів відбирали за допомогою пластикової піпетки, до одержаного концентрату клітин додавали аутологічну плазму у співвідношенні 1:2, ретельно перемішували та центрифугували при 3000 об/хв. (1760g) протягом 1 хвилини. Після центрифугування обережно відбирали суспензію тромбоцитів над осадом еритроцитів. Введенням

додаткового об'єму аутологічної плазми до суспензії доводили концентрацію клітин до необхідного для досліджень рівня.

При порівняльному аналізі встановлено, що тромбоцити, які перенесли процедуру видалення кріопротектору заявленим способом, зберігають здатність агрегувати у відповідь на АДФ достовірно вищою, ніж тромбоцити, які перенесли процедуру видалення кріопротектору за способом-прототипом. Кількісні втрати клітин після видалення кріопротектору заявленим способом були достовірно нижчими (див. табл.).

Таблиця

Агрегаційна здатність та
кількісні втрати тромбоцитів після
видалення кріопротектору двома способами

	корисна модель	спосіб-прототип
Степінь агрегації на АДФ (200 мкмоль)	38±6%	10±5%
Кількісні втрати тромбоцитів	8±3 %	21±4%

Джерела інформації:

1. Arnaud F., Kapnik E., Meryman H.T. // Platelets. - 2003. - Vol. 14. - P. 131-137
2. Arnaud F.P and Pegg D.E. // Cryobiology. - 1990. - Vol. 27. - P.130-136
3. Beaujean Fr., Leforestier Ch., Mannoni P. // Cryo-Letters. - 1979. - Vol. 1. -P.98-103
4. Hester J.P., Ventura G.J.// Abstract book of 3-rd International Congress of World Apheresis Assotiation. Amsterdam, the Motherlands.-1996.- P. 103.