



УКРАЇНА

(19) UA (11) 18571 (13) U  
(51) МПК (2006)  
A01N 1/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЕРИТРОЦИТІВ

1

(21) u200605129

(22) 10.05.2006

(24) 15.11.2006

(46) 15.11.2006, Бюл. № 11, 2006 р.

(72) Воловельська Єлизавета Леонідівна, Мусіна Ірина Алімівна, Зінченко Василь Демидович, Рамазанов Віктор Володимирович, Бондаренко Валерій Антонович

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

2

(57) Спосіб кріоконсервування еритроцитів, що включає заморожування в рідкому азоті з кріозахисним середовищем, що містить 20% декстрану та 7% диметилсульфоксиду, відігрівання на водяній бані та відмивання від кріопротектора у фізіологічному розчині, який **відрізняється** тим, що фізіологічний розчин містить озон в концентрації 0,2-0,3мг/л.

Корисна модель належить до галузі кріобіології і може бути використана для трансфузії еритроцитів після зберігання їх у замороженому стані.

Відомий спосіб кріоконсервування еритроцитів, в якому до еритромаси додають кріозахисне середовище, що містить 1,2-пропандіол (1,2-ПД), полівінілпіролідон (ПВП), сахарозу та хлористий натрій, заморожують до -70°C, відігрівають на водяній бані і відмивають двома розчинами, які містять сорбітол та хлористий натрій [1].

Недоліком цього способу є використання високих (23-42%) концентрацій проникаючого кріопротектора 1,2-ПД, який треба видаляти шляхом відмивання. Для цього використовується складна комбінація двох гіпертонічних розчинів. Це потребує великих витрат праці та часу.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб консервування еритроцитів, в якому еритроцити заморожують у рідкому азоті з кріозахисним середовищем, до складу якого входять 20% декстрану та 7% диметилсульфоксиду. Заморожені клітини відігрівають на водяній бані і відмивають від кріопротектора у фізіологічному розчині [2].

Недоліком цього способу є недостатньо висока збереженість клітин -92,7±0,7%.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити такий спосіб кріоконсервування еритроцитів, який би забезпечив можливість підвищити збереженість еритроцитів.

Ця задача вирішується тим, що в способі кріоконсервування еритроцитів, який включає заморо-

жування в рідкому азоті з кріозахисним середовищем, що містить 20% декстрану та 7% диметилсульфоксиду, відігрівання на водяній бані та відмивання від кріопротектора у фізіологічному розчині, згідно з корисною моделлю, фізіологічний розчин містить озон в концентрації 0,2-0,3мг/л.

Застосування озонованого фізіологічного розчину для відмивання еритроцитів від кріопротектора дозволяє підвищити стійкість еритроцитів до дії гіперконцентрованих розчинів в умовах кріоконсервування. Це дозволяє підвищити збереженість клітин на 1-2%, що є суттєвим для трансфузіології. Спосіб здійснюють таким чином.

Кров центрифугують при 800g протягом 10 хвилин. Надосад зливають. До осаду приливають фізіологічний розчин. Цю процедуру повторюють 3 рази. До відмитих еритроцитів у співвідношенні 1:1 приливають кріозахисне середовище, яке містить 20% декстрану та 7% диметилсульфоксиду.

Клітини з кріозахисним середовищем ретельно перемішують та інкубують протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Отриману суспензію розливають у контейнери, які занурюють в рідкий азот. Відігрівання здійснюють на водяній бані (+40°C). Після відігрівання до клітин додають озонований фізіологічний розчин при +37°C і проводять центрифугування отриманої суспензії. Цю процедуру повторюють 3 рази, таким чином повністю відмиваючи клітини від кріопротектора.

Приклад 1

Кров центрифугували при 800g протягом 10 хвилин. Надосад зливали. До осаду приливали

(13) U  
(11) 18571  
(19) UA

фізіологічний розчин. Цю процедуру повторювали 3 рази. До відмитих еритроцитів у співвідношенні 1:1 приливали кріоконсервант, який мав наступний склад: декстран - 20%, ДМСО - 7%, глюкоза - 2%, сахароза - 7%, NaCl - 0,3%, вода дистильована - решта.

Клітини з кріоконсервантом ретельно перемішували та інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Отриману суспензію розливали в контейнери, які занурювали в рідкий азот. Відігрівання здійснювали на водяній бані. Після відігрівання до клітин додавали озонований фізіологічний розчин при +37°C і проводили відмивання еритроцитів від кріопротектора шляхом центрифугування отриманої суспензії. Цю процедуру повторювали 3 рази, таким чином повністю відмиваючи клітини від кріопротектора.

Озонований фізіологічний розчин для відмивання отримували, барбуючи фізіологічний розчин озono-кисневою сумішшю з концентрацією озону 20мг/л. Озон для барботування фізіологічного розчину отримували з чистого кисню шляхом електросинтезу. Концентрацію озону в газовій озono-кисневій суміші та розчиненого у фізіологічному розчині озону визначали спектрофотометричним методом за допомогою Specord UV VIS (Німеччина) по поглинанню світла в смузі Хартлі (255нм). Далі фізіологічний розчин з розчиненим в ньому озоном додавали у фізіологічний розчин, що не містив озон, з таким розрахунком, щоб кінцева концентрація розчиненого озону складала 0,2мг/л.

Збереженість еритроцитів оцінювали спектрофотометричним методом, вимірюючи вихід ге-

моглобін у клітин за допомогою приладу СФ - 4А. Вона складала  $95,04 \pm 0,43\%$ .

#### Приклад 2

Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що у середовище відмивання вводили озон у різних концентраціях. Одержані результати наведені в таблиці.

З таблиці видно, що найбільшу збереженість еритроцитів забезпечує відмивання клітин озонованим фізіологічним розчином з кінцевою концентрацією озону 0,2-0,3мг/л.

При застосуванні концентрацій озону, нижчих, або вищих 0,2-0,3мг/л, спостерігається зменшення збереженості еритроцитів.

Таблиця

Збереженість еритроцитів в залежності від концентрації озону в середовищі відмивання

Концентрація озону, мг/л	Збереженість еритроцитів, %
0	$89,32 \pm 0,58$
0,05	$88,22 \pm 0,76$
0,10	$91,38 \pm 0,92$
0,20	$95,04 \pm 0,43$
0,30	$93,15 \pm 0,32$
0,40	$81,98 \pm 0,61$

#### Джерела інформації:

1. Пат. України №12355 А, МПК А01N1/02. Публ. 28.02.1997. Бюл. №1.
2. Пат. України №13845, МПК А01N1/02. Публ. 17.04.2006. Бюл. №4.