



УКРАЇНА

(19) UA (11) 24710 (13) U  
(51) МПК (2006)  
A01N 1/02МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЕРИТРОЦИТІВ

1

(21) u200702420

(22) 05.03.2007

(24) 10.07.2007

(46) 10.07.2007, Бюл. № 10, 2007 р.

(72) Грищенко Валентин Іванович, Компанієць Антоніна Михайлівна, Ніколенко Олександра Вікторівна, Чеканова Валентина Володимирівна, Троць Юлія Петрівна

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

2

(57) Спосіб кріоконсервування еритроцитів, який включає додавання до них розчину кріопротектора оксietилованого гліцерину зі ступенем полімеризації  $n=25$  з наступним заморожуванням до  $-196^{\circ}\text{C}$ , який **відрізняється** тим, що кріопротектор вводять дозовано, при кімнатній температурі, зі швидкістю введення  $0,09-0,36$  мл/хв, витримують  $50-60$  хв і далі заморожують у шугі азоту.

Корисна модель належить до кріобіології і кріомедицини і може бути використана для низькотемпературного консервування еритроцитів з метою трансфузії.

Відомий спосіб кріоконсервування еритроцитів шляхом заморожування до  $-196^{\circ}\text{C}$  у присутності кріопротектора гліцерину [1].

Недоліком цього способу є необхідність видалення кріопротектора з розмороженого матеріалу і перенесення в ізоосмотичне середовище, що спричиняє додаткову втрату клітин, а також ускладнює технологію кріоконсервування.

Найбільш близьким до заявленого способу є спосіб кріоконсервування еритроцитів з оксietильованим гліцериним зі ступенем полімеризації  $n=25$  (ОЕГ  $n=25$ ), згідно з яким до клітин перед заморожуванням додають одноразово при кімнатній температурі 30%-ий сольовий розчин кріопротектора і після 30хв витримання заморожують до  $-196^{\circ}\text{C}$  шляхом занурення у рідкий азот [2].

Недоліком цього способу є недостатньо високі показники схоронності еритроцитів після заморожування-відтавання. Після розморожування у середньому зберігається 80-85% клітин, показники осмотичної крижкості після перенесення в ізотонічне і гіпотонічне середовище становлять 15-20%.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити такий спосіб кріоконсервування еритроцитів, у якому зміна умов кріоконсервування забезпечувала б підвищення схоронності еритроцитів.

Ця задача вирішується тим, що в способі кріоконсервування еритроцитів, який включає додавання до них розчину кріопротектора ОЕГ  $n=25$  з наступним заморожуванням до  $-196^{\circ}\text{C}$ , згідно з корисною моделлю, кріопротектор вводять дозовано, при кімнатній температурі, зі швидкістю введення  $0,09-0,36$  мл/хв, витримують  $50-60$  хв і далі заморожують у шугі азоту.

При дозованому додаванні кріопротектора до еритроцитів створюються оптимальні умови для поступової адаптації клітин до підвищення концентрації кріопротектора, а витримання при кімнатній температурі протягом  $50-60$  хв забезпечує достатній осмотичний баланс між клітинами і зовнішнім середовищем, а також більш повну структурно-осмотичну адаптацію клітин у процесі консервування.

Застосування шуги азоту (суміш рідкого і твердого азоту) забезпечує можливість досягнення високої (до  $800^{\circ}\text{C/хв}$ ) швидкості заморожування, яка є оптимальною при кріоконсервуванні з непроникаючим кріопротектором ОЕГ  $n=25$ .

Спосіб дозволяє зменшити показники осмотичної крижкості еритроцитів при розміщенні їх в ізотонічне і гіпотонічне середовище і таким чином підвищити кількість життєздатних клітин на 10-15% (Табл. 1).

Спосіб здійснюють таким чином.

До еритроцитів, отриманих з донорської крові людини, дозовано, зі швидкістю введення  $0,09-0,36$  мл/хв, при кімнатній температурі додають 30%-ний розчин кріопротектора ОЕГ  $n=25$ , пригото-

(13) U

(11) 24710

(19) UA

ваний на фізіологічному розчині NaCl, до досягнення його концентрації у суспензії клітин 15%. Одержану суспензію переносять у металевий контейнер місткістю 2мл і заморожують у шухляді азоту. Зразки відігрівають на водяній бані при температурі 40°C протягом 40сек.

#### Приклад 1.

Еритроцити отримували з донорської крові людини, заготовленої на гемоконсерванті «Глюцир», яка зберігалася після експузії не більш 2 діб при +4°C.

Кріопротектор ОЕГ n=25, приготовлений на 0,9%-ому розчині NaCl у концентрації 30%, з'єднували з еритроцитами і заморожували в металевих контейнерах місткістю 2мл у шухляді азоту. Зразки відігрівали на водяній бані при температурі 40°C протягом 40сек.

Після заморожування-відтавання визначали кількість життєздатних клітин за процентом гемолізу після перенесення еритроцитів в ізотонічне середовище, гематокрит (загальний обсяг клітин, %) визначали в капілярах на мікроцентрифузі МГЦ-8. Осмотичну крижість визначали після перенесення еритроцитів у 0,6 і 0,9% розчини NaCl. Результати наведені в Табл. 1 у порівнянні з прототипом.

З Табл. 1 видно, що після кріоконсервування заявленим способом показники осмотичної крижкості після поміщення еритроцитів в ізотонічне і гіпотонічне середовище нижчі у порівнянні з прототипом в середньому на 10-15% і, відповідно, кількість життєздатних клітин вища ніж в прототипі. Показники гематокриту теж свідчать про більш високу схоронність еритроцитів у заявленому способі.

#### Приклад 2.

Спосіб здійснювали аналогічно Прикладу 1, за винятком того, що кріопротектор додавали з різною швидкістю. Результати наведені в Табл. 2

З Таблиці 2 видно, що при дозованому додаванні ОЕГ у якості кріопротектора доцільне використання повільних швидкостей його введення (0,09-0,36мл/хв), що сприяє підвищенню показників схоронності еритроцитів після заморожування. Збільшення швидкості введення захисного середовища приводить до достовірного збільшення осмотичної крижкості, зниження кількості життєздатних клітин і показника гематокриту. Подальше зниження швидкості введення кріозахисної речовини є таким, що важко виконується.

Таблиця 1

Схоронність еритроцитів після кріоконсервування n=6

Спосіб кріоконсервування	Кількість життєздатних клітин, %	Осмотична крижість у 0,6% NaCl, %	Осмотична крижість у 0,9% NaCl, %	Гематокрит, %
Заявлений	93-95	6,9±1,17	6,5±1,31	27,6±0,9
Прототип	80-85	20,7±2,7	15,0±2,0	22,2±1,0

Таблиця 2

Показники схоронності еритроцитів  
в залежності від швидкості додавання кріопротектора n=6

Швидкість додавання, мл/хв	Кількість життєздатних клітин, %	Осмотична крижість у 0,6% NaCl, %	Осмотична крижість у 0,9% NaCl, %	Гематокрит, %
1,8	74-75	28,5±1,4	25,6±0,47	16,3±0,49
0,8	82-83	19,1±1,5	17,5±0,56	21,5±0,45
0,52	87-89	15,6±2,0	12,3±1,4	21,3±1,25
0,36	89-94	8,85±2,46	8,86±2,95	22,3±1,24
0,18	93-94	9,37±2,63	6,72±0,29	22,7±1,41
0,09	93-95	6,9±1,17	6,5±1,31	27,6±0,75

#### Джерела інформації:

1. Виноград-Финкель Ф.Р., Федорова Л.И., Семенова Н.В. и др. Усовершенствование кріоконсервирования эритроцитов при ультранизких температурах. // Проблемы гематологии и переливания крови. - 1980. - №9. - С.19-23.

2. Лубяный В.Г., Бредихина Л.П., Шраго М.И. Кріопротекторная активность олигомеров ОЭГ в низкотемпературном консервировании эритроцитов. // Кріобиология и кріомедицина. - 1981. - Вып.8, - С.34-40.