



УКРАЇНА

(19) UA (11) 31175 (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 СУСПЕНЗІЇ КЛІТИН ПЛАЦЕНТИ

1

2

(21) u200714177

(22) 17.12.2007

(24) 25.03.2008

(46) 25.03.2008, Бюл.№ 6, 2008 рік

(72) ГОЛЬЦЕВ АНАТОЛІЙ МИКОЛАЙОВИЧ, UA,  
ГРИЩЕНКО ВАЛЕНТИН ІВАНОВИЧ, UA, ГУРІНА  
ТЕТЯНА МИХАЙЛІВНА, UA, РОССОХА ІРИНА  
ВІКТОРІВНА, UA(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І  
КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК  
УКРАЇНИ, UA

(56)

(57) Спосіб кріоконсервування суспензії клітин  
плаценти, що включає поєднання її з

кріоконсервувальним розчином  
"Пропандіосахароль", еквілібрацію з цим розчином  
і заморожування до температури рідкого азоту,  
який **відрізняється** тим, що поєднання суспензії  
з кріоконсервувальним розчином здійснюють  
шляхом поступового її нашаровування на  
кріоконсервувальний розчин, еквілібрацію з  
кріоконсервувальним розчином суміщають з  
програмним охолодженням до 0 °С, а  
заморожування проводять зі швидкістю 1 град./хв.  
до температури -40 °С з наступним зануренням у  
рідкий азот.

Корисна модель належить до кріобіології та  
кріомедицини і може бути використана для  
низькотемпературного консервування суспензії  
плаценти з метою подальшого використання у  
кріомедичній практиці.

Існує спосіб консервування тканин  
фетоплацентарного комплексу, згідно з яким  
фрагменти тканини витримують 30хв у  
консервуючому середовищі, що містить 10%  
ДМСО і 10% ПЕО-400, заморожують зі швидкістю  
1-2°С/хв до 0°С, далі - 5-6°С/хв до -10°С,  
витримують при -10°С 1,5-2 години і занурюють у  
рідкий азот [1].

Недоліком цього способу є те, що у  
кріоконсервуючому розчині використовується  
підвищена концентрація кріопротектору, що  
підсилює його токсичну дію на клітини і тим самим  
знижує їх схоронність (86,4±1,4%). Крім того  
процедура заморожування потребує значних  
витрат часу через довготривалу еквілібрацію.

Найбільш близьким до заявленого є спосіб  
кріоконсервування суспензії плаценти, згідно з  
яким до суспензії тканини плаценти додають  
кріоконсервуючий розчин "Пропандіосахароль" у  
співвідношенні 1:1, еквілібрують з цим розчином  
при кімнатній температурі протягом 15-20хв,  
фільтрують, розливають у плівкові контейнери або  
скляну тару по 10мл і заморожують шляхом

занурення в рідкий азот. Розморожують у водяній  
бані при температурі води 42-45°С [2].

Недоліком цього способу є недостатньо  
висока схоронність суспензії клітин плаценти після  
розморожування - 80,2±3,6%.

В основу корисної моделі поставлено задачу  
створити такий спосіб кріоконсервування суспензії  
клітин плаценти, який би забезпечив підвищення  
схоронності клітин після заморожування-відігріву.

Ця задача вирішується тим, що у способі  
кріоконсервування суспензії клітин плаценти, який  
включає поєднання її з кріоконсервуючим  
розчином "Пропандіосахароль", еквілібрацію з цим  
розчином і заморожування до температури рідкого  
азоту, згідно з корисною моделлю, поєднання  
суспензії з кріоконсервуючим розчином  
здійснюють шляхом поступового нашаровування  
клітин суспензії плаценти на кріоконсервуючий  
розчин, еквілібрацію з кріоконсервуючим розчином  
суміщають з програмним охолодженням до 0°С, а  
заморожування проводять зі швидкістю 1град/хв  
до температури -40°С з наступним зануренням у  
рідкий азот.

Заявлений спосіб дозволяє підвищити  
схоронність клітин плаценти після процедури  
заморожування-відігріву на 14-15%. Це  
обомовлено тим, що при суміщенні еквілібрації  
суспензії клітин плаценти у кріоконсервуючому

(19) UA (11) 31175 (13) U

розчині з програмним заморожуванням до 0°C скорочується тривалість токсичної дії кріопротектора на клітини, а також тим, що поступове нашаровування суспензії плаценти на кріоконсервуючий розчин, замість перемішування, скорочує час осідання клітин на дно кріоампули і сприяє більш рівномірному їх розподілу у кріоконсервуючому розчині.

Спосіб пояснюється прикладами.

#### Приклад 1

Виділену за стерильних умов плаценту тричі відмивали від слизу та крові фізіологічним розчином, після чого готували суспензію клітин плаценти методом механічної дисоціації у гомогенізаторі Понтера у співвідношенні плаценти і фізіологічного розчину 1:2 до отримання гомогенної маси. Одержану суспензію пропускали через капроновий фільтр та голки діаметру, що зменшується. Кількість клітин у суспензії підраховували у камері Горяєва. Для визначення морфологічного складу клітин плаценти робили мазки, фіксували їх метанолом та фарбували за методом Романовського [3]. Як кріоконсервуючий розчин використовували "Пропандіосахароль", що містив 370,0мл кріопротектора пропіленгліколь, 32,0мл сахарози безводної, 6,0мл хлориду натрію і води бідистильованої до 1000мл. Консервуючий розчин розливали у кріоампули (фірма "Nunk") об'ємом 1,8мл. Суспензію клітин плаценти поступово нашаровували на кріоконсервуючий розчин у співвідношенні 1:1, відразу ж поміщували у програмний заморожувач і охолоджували до 0°C. При цьому швидкість охолодження підбирали таким чином, щоб час проходження цього температурного інтервалу співпадав з рекомендованим терміном еквілібрації клітин із кріоконсервуючим розчином. Далі зразки заморожували зі швидкістю 1 град/хв. до температури -40°C, після чого занурювали у рідкий азот. Відігрівання здійснювали у водяній бані при температурі 42°C протягом 45-50с при постійному перемішуванні до повного зникнення кристалів льоду.

Схоронність клітин суспензії плаценти після кріоконсервування, яку оцінювали загальноприйнятим експрес-методом за допомогою 0,2% водного розчину трипанового синього, складала  $94 \pm 2,8\%$ .

#### Приклад 2

Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що перед зануренням у рідкий азот зразки охолоджували до різної кінцевої температури: -20°C, -40°C, -60°C. Схоронність суспензії клітин плаценти після відігріву складала  $90 \pm 2,3\%$ ,  $94 \pm 2,8\%$ ,  $94 \pm 3,0\%$ , відповідно. Із наведених даних видно, що при заморожуванні до -20°C відмічалась найнижча схоронність. Зниження кінцевої температури охолодження до -60°C не впливає на збереженість клітин суспензії плаценти, але вимагає додаткового часу на охолодження та збільшує витрати рідкого азоту, тому оптимальною кінцевою температурою охолодження перед зануренням у рідкий азот є -40°C.

#### Приклад 3

Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що умови еквілібрації з кріоконсервуючим розчином були різними: в першому випадку еквілібрацію клітин суспензії плаценти з кріоконсервуючим розчином проводили протягом 20хв при кімнатній температурі, а в другому - процедуру еквілібрації суміщали з охолодженням зразків у програмному заморожувачі до температури 0°C. Схоронність клітин суспензії плаценти була  $86,0 \pm 2,27\%$  і  $91,0 \pm 2,31\%$ , відповідно.

#### Приклад 4

Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що поєднування кріоконсервуючого розчину з суспензією клітин плаценти здійснювали різними способами. У першому випадку суспензію плаценти перемішували з розчином кріопротектора у співвідношенні 1:1, а другому - клітини суспензії плаценти замість перемішування поступово нашаровували на кріоконсервуючий розчин у співвідношенні 1:1. Схоронність суспензії клітин плаценти після заморожування та відігріву, в залежності від способу поєднування суспензії клітин плаценти з кріоконсервуючим розчином, була  $91,0 \pm 2,31\%$  і  $94,0 \pm 2,8\%$ , відповідно.

#### Джерела інформації:

1. Грищенко В.І., Юрченко Т.М., Прокопюк О.С., Строна В.І., Козлова В.П., Прокопюк В.Ю. Спосіб консервування тканин фетоплацентарного комплексу. Патент України №30808А, А01N1/02, 15.12.2000.

2. Грищенко В.І., Морозова Т.Ф., Воротилі О.М. та ін. Приготування та зберігання кріоконсервованої суспензії плаценти для клінічного використання // Метод, рекомендації. - Харків. - 1997. - С.9.

3. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая П.Н. и др. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник. - М: Медицина, 1987. - С.112.