



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 34848

(13) A

(51) 6 C12N5/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ КУЛЬТУРИ КЛІТИН АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОЇ ТКАНИНИ

(21) 99073996

(22) 13.07.1999

(24) 15.03.2001

(46) 15.03.2001, Бюл. № 2, 2001 р.

(72) Бондаренко Тетяна Петрівна, Легач Євген
Іванович(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІО-
МЕДИЦИНИ НАН УКРАЇНИ

(57) Спосіб кріоконсервування культури клітин аденокортикальної тканини, що включає інкубування з кріопротектором і послідовне заморожування, який відрізняється тим, що як кріопротектор використовують 5%-ний димексид, інкубування здійснюють при 0–4°C, а заморожування проводять від 25°C до -70...-72°C зі швидкістю 0,5–1°/хв, з послідовним зануренням у рідкий азот.

Винахід відноситься до кріобіології і кріомедицини і може бути використаний в трансплантології.

Відомий спосіб кріоконсервування аденокортикальної тканини, який включає її інкубування з 20%-ним гліцерином при 37°C, заморожування до -79°C і зберігання на протязі 1 доби [1].

Недоліком способу є те, що він не забезпечує тривале збереження аденокортикальної тканини.

Це обумовлено тим, що кріопротектор гліцерин не має протипіщмічних властивостей, що призводить до ушкодження клітин аденокортикальної тканини та втрати ними функціональних властивостей (стероїдогенез, секреція). Крім того, висока концентрація кріопротектору пригнічує секретуючу здібність клітин. Температура збереження -79°C не забезпечує тривале зберігання тому, що при такій температурі в клітинах залишається міцно зв'язана вода, що призводить до ушкодження клітин за умов більш тривалого зберігання.

Завдання винаходу є створення такого способу кріоконсервування культури клітин аденокортикальної тканини, який за рахунок використання двоетапного заморожування і заміни кріопротектору забезпечував би тривале зберігання клітин зі збереженням їх функціональних властивостей.

Це завдання вирішується тим, що в спосіб кріоконсервування, який включає інкубування з кріопротектором і послідовне заморожування, як кріопротектор беруть 5%-ний димексид, інкубування здійснюють при 0–4°C, а заморожування проводять від 25°C до -70...-72°C зі швидкістю 0,5–1°/хв, після чого занурюють у рідкий азот.

Запропонований спосіб заморожування з 5%-ним димексидом забезпечує зберігання культури клітин аденокортикальної тканини більш 1 року зі збереженням їх функціональної активності. Це дає змогу накопичувати культуру клітин і використовувати її при необхідності для трансплантації.

Спосіб здійснюють таким чином.

Відміту від середовища культивування при 37°C культуру клітин примішують в охолоджений до 0–4°C фізіологічний розчин, додають охолоджений розчин димексиду, який приготовлений на середовищі 199 (кінцева концентрація кріопротектору 5%, клітин 50%) і інкубують 15 хвилин. Потім нагрівають до 25°C і охолоджують до -70...-72°C зі швидкістю 0,5–1°/хв, примішують у рідкий азот, де зразки зберігають при -196°C. Відігрів здійснюють на водяній бані при 42°C до появи рідкої фази.

Приклад 1. Культуру клітин відмивали від середовища культивування при 37°C і примішували в фізіологічний розчин, який охолоджено до 0–4°C. Розчин димексиду, що зроблений на середовищі 199 і охолоджений до 0–4°C, додавали до суспензії клітин, інкубували 15 хвилин, примішували в поліетіленові ампули, що мали об'єм 10 мл, герметично запаювали і нагрівали до 25°C. Заморожування здійснювали на програмному заморожувачі зі швидкістю 0,5–1°/хв до -70...-72°C, після чого занурювали в рідкий азот та зберігали на протязі 1 року. Відігрів здійснювали на водяній бані при 42°C. Функціональну активність клітин оцінювали за їх здібністю до секреції глюкокортикоїдів і стероїдогенезу при дії стимуляторів синактена і екстракту гіпофіза. Рівень гормонів визначали


