

Винахід належить до галузі кріобіології і може бути використаний для приготування клітинних препаратів.

Відомий спосіб кріоконсервування гемопоетичних клітин кісткового мозку, що включає заморожування в розчині Хенкса з 20% ембріональної телячої сироватки і 10% диметилсульфоксиду (ДМСО), відігрів на водяній бані при 37°C і відмивання клітин розчином Хенкса [1].

Недоліком такого способу є присутність сироватки в розчині для заморожування, що є імуногеною і неприпустимою для клітинних препаратів.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб кріоконсервування гемопоетичних клітин ембріональної печінки людини (ГКЕПЛ), відповідно до якого клітинну суспензію заморожують у розчині Хенкса з кріопротектором ДМСО, розморожують на водяній бані при 37°C і відмивають клітини від кріопротектора розчином Хенкса [2].

Недоліком цього методу є втрата значної частини (40-45%) життєздатних клітин.

Задачею винаходу є створення способу кріоконсервування гемопоетичних клітин ембріональної печінки людини, який би дозволив підвищити вихід життєздатних клітин.

Ця задача вирішується тим, що в способі кріоконсервування гемопоетичних клітин ембріональної печінки людини, який включає заморожування клітинної суспензії в розчині кріоконсервування з кріопротектором ДМСО, відігрів і відмивання клітин від кріопротектора, відповідно до винаходу, для заморожування і відмивання клітин використовують збалансований ізотонічний сахарозо-сольовий розчин.

Збалансований ізотонічний сахарозо-сольовий розчин відрізняється від розчину Хенкса тим, що основним компонентом, що забезпечує фізіологічні показники осмотичного тиску, є сахароза, а не натрію хлорид. Використання збалансованого ізотонічного сахарозо-сольового розчину для заморожування і відмивання від кріопротектора ГКЕПЛ дозволяє знизити втрату життєздатних клітин на 17%. Сахароза є речовиною, розчини якої дозволено для внутрішньовенного введення, тому її внесення в організм людини в складі клітинної суспензії, кріоконсервованої на основі збалансованого ізотонічного сахарозо-сольового розчину, не може викликати негативних наслідків.

Спосіб пояснюється наступним прикладом.

Приклад. Гемопоетичні клітини одержували з ембріональної печінки людини 6-12-тижнів гестації. Печінку дисоціювали на одиночні клітини, фільтрували через систему для переливання крові. Отримані клітини розводили стерильним сахарозо-сольовим розчином, що містить 280 мМ сахарози і мікродобавки солей (5мМ KCl, 1мМ CaCl₂, 0,8мМ Mg SO₄*7H₂O, 5мМ Na₂HPO₄*H₂O і 1,5мМ KH₂PO₄, pH=7,2) і додавали кріопротектор ДМСО до кінцевої концентрації 5%. Через 15-20хв клітини заморожували на програмному заморожувачі. Заморожування здійснювали до температури кристалізації зі швидкістю 1°/хв до -40°C, витримуючи 10хв на плато кристалізації, потім - зі швидкістю 10°/хв до -80°C з наступним зануренням у рідкий азот. Розморожування виконували на водяній бані при 37°C протягом 1-1,5хв. Кріопротектор видаляли шляхом повільного розведення клітинної суспензії новою порцією стерильного ізотонічного сахарозо-сольового розчину (pH=7,2), що містить 280 мМ сахарози і мікродобавки солей (5мМ KCl, 1мМ CaCl₂, 0,8мМ Mg SO₄*7H₂O, 5мМ Na₂HPO₄*H₂O і 1,5мМ KH₂PO₄) з кінцевим розведенням суспензії клітин у 10 разів. Після центрифугування (200g), протягом 10 хвилин супернатант видаляли, а осад переводили в 1 мл розчину відмивання. Стійкість клітин ембріональної печінки людини до і після кріоконсервування оцінювали за вітальним фарбуванням трипановим синім і бромістим етидієм. Кількість клітин підраховували в камері Горяєва. Життєздатність визначали як відношення кількості життєздатних клітин до загальної кількості клітин і виражали у відсотках. Утрату клітин у ході процесу кріоконсервування оцінювали за виходом життєздатних клітин (ВЖК). ВЖК визначали як відношення кількості життєздатних клітин після відігрівання і відмивання від кріопротектора до загальної кількості клітин до кріоконсервування, виражали у відсотках. Результати наведені в табл. 1 і 2 у порівнянні з прототипом.

Як видно з наведених даних, життєздатність ГКЕПЛ не відрізняється в зразках після кріоконсервування заявлюваним способом і відповідно до прототипу. Але при цьому вихід життєздатних клітин вище в середньому на 17% у випадку кріоконсервування ГКЕПЛ способом, що заявляється.

Таблиця 1

Вміст життєздатних ГКЕПЛ до кріоконсервування
(n=6)

Розчин кріоконсервування	Життєздатність, %
Розчин Хенкса	90,2±3,1
Сахарозо-сольовий розчин	89,5±2,4

Таблиця 2

Вміст життєздатних ГКЕПЛ після кріоконсервування (n=6)

Спосіб кріоконсервування	Життєздатність, %	Вихід життєздатних клітин, %
За прототипом	62,5±8,0	42,5±7,7
Заявлюваний	63,7±8,5	59,7±7,2*
*- різниця достовірна відносно до прототипу, p<0,05		

Джерела інформації:

1. Grander M., Berthier R., Hollard D. Frozen human bone marrow from normal individuals: a possible control for the culture of human bone marrow in agar //Exp. Hemat - 1977. - 5, №6. - P.437.
2. Грищенко В.И., Лобынцева Г.С., Вотякова И.А., Шерешков С.И. Гемопозитические клетки эмбриональной печени человека (эмбриогенез, трансплантация и криоконсервирование). - Киев: Наук. думка, 1988. - С.152-156.