

Винахід належить до кріобіології і може бути використаний для довгострокового зберігання біологічного матеріалу з метою подальшого застосування в наукових експериментах та практичній медицині.

Відомий спосіб роботи банку кріоконсервованої крові, згідно до якого суспензію крові вміщують в полімерний контейнер, додають кріоконсервант, заморожують до -80°C і поміщують у сховище. При необхідності контейнер вилучають зі сховища і розморожують [1].

Однак цей спосіб є вузькоспецифічним для зберігання крові і тому не забезпечує збереження необхідних якісних характеристик інших біологічних об'єктів.

Найбільш близьким до заявленого за ознаками є спосіб роботи низькотемпературного банку біологічних об'єктів [2]. Згідно зі способом до зразка біологічного матеріалу додають кріоконсервант, що містить $0,4 \div 1,45$ моль/л кріопротектора диметилсульфоксиду (ДМСО), і здійснюють заморожування у три етапи: на першому етапі - зі швидкістю $0,5 \div 1,5^{\circ}\text{C/хв}$ до $-3,5 \div -4^{\circ}\text{C}$ з застосуванням сидінгу при $-3,5 \div -4^{\circ}\text{C}$, на другому етапі - зі швидкістю $0,3-0,5^{\circ}\text{C/хв}$ до $-7 \div -8^{\circ}\text{C}$, після чого здійснюють температурну зупинку при $-30 \div -40^{\circ}\text{C}$ протягом 3-5хв, а на третьому етапі - зі швидкістю $10-12^{\circ}\text{C/хв}$ до $-80 \div -86^{\circ}\text{C}$. Після заморожування контейнери із замороженим біологічним матеріалом переносять у сховище, занурюють у рідкий азот і зберігають. Перед застосуванням контейнери з біологічним матеріалом вилучають із сховища і розморожують.

Недоліками способу є:

Програма заморожування, яку передбачає спосіб, не є універсальною для всіх біологічних об'єктів і тому не забезпечує високого рівня їх збереженості. Наприклад, для еритроцитів - без'ядерних клітин крові з високою проникністю мембран для води, режим заморожування з повільними (нижчими, ніж 10°C/хв) швидкостями заморожування в діапазоні температур $0 \div -30^{\circ}\text{C}$ не є придатним. В зазначеному діапазоні температур позаклітинна кристалізація льоду призводить до надмірної дегідратації клітин і пошкоджуючої дії "ефектів розчину" (підвищенню концентрації електролітів та поза- і внутрішньоклітинної в'язкості, зміні рН та інше), що є руйнівним для клітин. Тривале перебування клітин у таких розчинах під час повільного заморожування спричиняє їхню загибель. Для заморожування біологічних об'єктів з великим об'ємом (фрагменти тканини, ооцити) швидкості охолодження на першому, другому і третьому етапах є також повільними і тому призводять до надмірної дегідратації та пошкодженню клітин біологічного об'єкту. Для безклітинної біологічної рідини (плазма, сироватка крові) зазначені режими придатні, однак вони є складними та громіздкими, оскільки ці об'єкти можливо заморожувати шляхом безпосереднього занурення у рідкий азот або розміщення у морозильну камеру без застосування кріопротекторів.

Застосований в способі кріопротектор ДМСО ($0,4 \div 1,45$ моль/л) також не є універсальним.

Біологічний матеріал, призначений для клінічного використання, перевіряють на відсутність інфікування (ВІЛ-інфекція, гепатит В і С, сифіліс, мікоплазма, токсоплазма та інші) під час зберігання у рідкому азоті, тому можливе попадання збудників захворювань від інфікованого матеріалу до неінфікованого через рідкий азот. Це може статися внаслідок недостатньої герметичності ємності, в якій зберігається матеріал (дефекти тарного матеріалу, розтріскування тари в процесі заморожування).

В основу винаходу поставлено задачу удосконалити спосіб роботи банку за рахунок диференційного підходу до кріоконсервування різних біологічних об'єктів та виключення можливості інфікування матеріалу в процесі зберігання у рідкому азоті.

Ця задача вирішується тим, що в способі роботи низькотемпературного банку, який передбачає змішування біологічного матеріалу з кріоконсервантом, розфасування в контейнери, програмне заморожування біологічного матеріалу в контейнерах, перенесення контейнерів з замороженим біологічним матеріалом у сховище, занурення у рідкий азот, зберігання, вилучення контейнерів із сховища і розморожування для подальшого використання, згідно з винаходом, заморожування проводять за програмою, розробленою для конкретного біологічного об'єкту, а перед зануренням у рідкий азот контейнери з замороженим біологічним матеріалом зберігають у парах азоту протягом часу, необхідного для дослідження матеріалу на відсутність інфікування, з послідовним вилученням інфікованого матеріалу.

Заморожування за відповідними для кожного виду біологічного об'єкта програмами забезпечує їхню високу збереженість після завершення процесу зберігання в банку.

Зберігання контейнерів з біологічним матеріалом в парах азоту дозволяє мати досить часу для дбайливого обстеження біологічного матеріалу на відсутність вірусного, бактеріального, грибового та протозойного забруднення.

Спосіб, що заявляється, дозволяє поліпшити роботу банку, забезпечуючи високу якість кріоконсервованого матеріалу при довгостроковому зберіганні, можливість проведення необхідного мікробіологічного контролю, виявлення інфікованого матеріалу, видалення його із сховища до занурення у рідкий азот.

Приклади здійснення способу.

Приклад 1

Плаценту людини перфузували через пупкову вену фізіологічним розчином протягом 10хв. Після цього її відмивали від елементів крові, готували фрагменти розміром 3×2 см, уміщували на 30хв. в середовище 199, що містить 10% ДМСО і 10% ПЕО-400, потім переносили до контейнеру об'ємом 15см^3 , наповненого тим же середовищем.

Заморожували за програмою: $1-2^{\circ}\text{C/хв.}$ від кімнатної температури до 0°C ; до -10°C зі швидкістю 5°C/хв. і після двогодинної витримки занурювали у пари азоту з температурою $180-185^{\circ}\text{C}$. Після обстеження на відсутність інфікованості та бактеріальне забруднення через 3 тижні неінфікований стерильний матеріал занурювали у рідкий азот.

Життєздатність визначали шляхом фарбування зразків трипановим синім. Кількість життєздатних клітин у зразку нативної плаценти становила 88, а у кріоконсервованій за зазначеним способом - 86.

Приклад 2

Гемопоетичні клітини, одержані з ембріональної печінки людини 10-12 тижнів гестації, дисоціювали на окремі

клітини і фільтрували через систему переливання крові. Одержані клітини розводили розчином Хенкса і додавали розчин, що містить 3% ДМСО і 10% ПЕО-400. Через 15хв. клітини заморожували зі швидкістю 1°C/хв., витримували 10хв. на плато кристалізації, потім охолоджували зі швидкістю 10°C/хв. до -80°C та розміщували в парах рідкого азоту при температурі $-180 \div -185^\circ\text{C}$. Через три тижні після обстеження інфікований матеріал вилучали, а неінфікований стерильний занурювали у рідкий азот для довгострокового зберігання. Відігрів контейнерів здійснювали на водяній бані з температурою 37-40°C. Кількість життєздатних клітин на 100 підрахованих становила 96.

Приклад 3

Свіжеотриману сперму людини змішували 1:1 з кріоконсервантом, до складу якого входить кріопротектор гліцерин у концентрації 1 М, яєчний жовток у концентрації 20%об. та середовище Дюльбека. Після цього суспензію сперматозоїдів з кріоконсервантом розфасовували у пайети ємністю 0,3мл та заморожували на програмному заморожуванні за режимом: швидкість охолодження 1°C/хв до -8°C, далі 10C/хв. - до -30°C з наступним зануренням в пари рідкого азоту (температура $-180 \div -185^\circ\text{C}$). Через 2 тижні неінфікований біологічний матеріал занурювали у рідкий азот, а непридатний - видаляли. Відігрів пайет з замороженою суспензією сперматозоїдів здійснювали на водяній бані при температурі 40°C.

Після кріоконсервування кількість життєздатних сперматозоїдів була 65%, що є достатньо високою для даного біооб'єкту.

Приклад 4

Сироватку кордової крові людини, отриману в стерильних умовах, змішували з фізіологічним розчином 1:1, розливали в стерильні кріопробірки ємністю 1мл і розміщували в парах рідкого азоту (температура $-180 \div -185^\circ\text{C}$). Після обстеження (через чотири тижні) інфікований чи нестерильний матеріал вилучали, а контейнери з придатною неінфікованою сироваткою кордової крові занурювали у рідкий азот. Відігрів контейнерів з сироваткою здійснювали на водяній бані з температурою 40÷42°C. При цьому вміст білкових фракцій зберігався на початковому рівні (загальний білок 68,1г/л, $\alpha 1$ – глобулін 4,4%, $\alpha 2$ – глобуліни 8,1% β – глобуліни 15,6%, γ – глобуліни 16,8%).

З наведених прикладів видно, що запропонований спосіб роботи банку забезпечує високу збереженість різних біологічних об'єктів і при цьому дозволяє уникнути їх інфікування в процесі зберігання.

Джерела інформації:

1. Заявка Росії №99126524/14, МПК А01N1/02, публ.27.08.2001.
2. Патент України №49759А, МПК А61J1/05, публ. 16.09.2002.