



УКРАЇНА

(19) UA (11) 81368 (13) C2  
(51) МПК (2006)  
A01N 1/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

### (54) СПОСІБ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЯДРОВІСНИХ КЛІТИН У СКЛАДІ ЦІЛЬНОЇ КОРДОВОЇ КРОВІ

1

(21) а200607817

(22) 12.07.2006

(24) 25.12.2007

(72) ЦУЦАЄВА АЛЛА ОЛЕКСАНДРІВНА, UA,  
ГРИЩЕНКО ВАЛЕНТИН ІВАНОВИЧ, UA,  
ЖЕЛТЯКОВА ІРИНА ОЛЕКСАНДРІВНА, UA,  
БРОВКО ОЛЕНА ВАЛЕРІЙВНА, UA, ЧЕРНОУСОВА  
СВІТЛАНА СЕРГІЙВНА, UA, ПЕЩАНСЬКИЙ  
МИКОЛА ІВАНОВИЧ, UA

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

(56) UA A 31847, 15.12.2000.

UA A 30014, 15.11.2000.

UA A 60238, 15.09.03.

Rubinstein P., Dobrila L., Rosenfield R.E., et. al.  
Processing and cryopreservation of  
placental/umbilical cord blood for unrelated bone  
marrow reconstitution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. -  
1995. - Vol. 92(22). - P. 10119-10122.

Meryman H.T., Howard G. Cryopreservation of  
granulocytes. - In: The granulocyte: Function and

2

clinical utilization. New York, 1977, p. 193-201.  
Кріоконсервирование клеточных суспензий / Под  
ред. А.А. Цуцаевой. - Киев: Наук. думка, 1983. - С.  
36-38.

UA A 69041, 16.08.04.

UA A 46673, 15.05.02.

Donaldson C., Armitage W.J., Denning-Kendall P.A.  
et al. Optimal cryopreservation of human umbilical  
cord blood // Bone Marrow Transplantation. - 1996. -  
18. - P. 725-731.

Цуцаева А.А., Грищенко В.И., Кудокочева О.В. и  
др. // Проблемы криобиологии. - 2000, №1. - С. 59-  
63.

(57) Спосіб кріоконсервування ядровісних клітин  
у складі цільної кордової крові, що включає  
повільне охолодження в присутності  
кріопротектора і подальше занурення в рідкий  
азот, який **відрізняється** тим, що як кріопротектор  
використовують аутологічну плазму, а  
охолодження проводять до  $-20^{\circ}\text{C}$  з наступною 20-  
хвилинною стабілізацією при даній температурі.

Винахід належить до галузі кріобіології і може  
бути використаний в медицині з метою  
проведення імуномоніторингу хворих на різних  
етапах розвитку захворювання.

Відомий спосіб кріоконсервування  
ядровісних клітин кордової крові людини,  
згідно з яким спочатку в градієнті щільності  
видаляють еритроцити, а потім до суспензії клітин  
додають 20 % діметилсульфоксид (ДМСО) до  
кінцевої концентрації 10 %. Заморожування  
проводять шляхом програмного охолодження зі  
швидкістю  $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ . до  $-40^{\circ}\text{C}$ , потім зі швидкістю  
 $10^{\circ}\text{C}/\text{хв}$  до  $-100^{\circ}\text{C}$ , з подальшим переносом  
контейнера з клітинною суспензією у рідкий азот  
[1].

Основним недоліком способу є його  
складність, пов'язана з необхідністю попереднього  
виділення ядровісних клітин із цільної  
кордової крові і проведення багаторазового  
відмивання клітинної суспензії від кріопротектора  
ДМСО.

Найбільш близьким до заявленого є спосіб  
кріоконсервування ядровісних клітин кордової  
крові людини у складі цільної кордової крові, який  
включає повільне ( $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ ) охолодження в  
присутності 10 % ДМСО до  $-80^{\circ}\text{C}$  з послідовним  
зануренням в рідкий азот, відігрів і багаторазове  
відмивання [2].

Недоліки способу:

1. Зниження фагоцитарної активності зрілих  
гранулоцитів [3].

2. Повна втрата окислювально-  
відновлювального потенціалу фагоцитів [3].

3. Необхідність багаторазового відмивання  
клітин від кріопротектора, яке ускладнює процес  
кріоконсервування і справляє негативну дію на  
морфологічні властивості клітин.

В основу винаходу поставлено задачу  
створити такий спосіб кріоконсервування  
ядровісних клітин у складі цільної кордової  
крові, у якому б, за рахунок заміни кріопротектора і  
зміни програми заморожування, забезпечилась

(13) C2

(11) 81368

(19) UA

можливість підвищити фагоцитарну активність зрілих гранулоцитів і зберегти їх окислювально-відновлювальний потенціал, при одночасному спрощенні процесу кріоконсервування.

Ця задача вирішується тим, що в спосіб кріоконсервування ядровміщуючих клітин у складі цільної кордової крові, який включає повільне охолодження в присутності кріопротектора і подальше занурення в рідкий азот, згідно з винаходом, в якості кріопротектора використовують аутологічну плазму, а охолодження проводять до  $-20^{\circ}\text{C}$ , з наступною 20-хвилинною стабілізацією при даній температурі.

Заявлений спосіб, в порівнянні з прототипом, дозволяє вірогідно збільшити число фагоцитуючих клітин (табл. 2) і повністю зберегти їх окислювально-відновлювальний потенціал (табл. 3), при цьому збереженість ядровміщуючих клітин залишається на рівні прототипу (табл. 1). Крім того спосіб спрощується за рахунок виключення процедури відмивання клітин від кріопротектора.

Позитивний вплив аутологічної плазми на ядровміщуючі клітини кордової крові зв'язаний з високим вмістом у ній високомолекулярних білків, які знижують інтенсивність дії на клітини концентраційних градієнтів - ведучого ушкоджуючого фактора, який реалізується на етапах заморожування [4].

Повільне охолодження клітин до  $-20^{\circ}\text{C}$  з зупинкою при  $-20^{\circ}\text{C}$  протягом 20 хвилин сприяє створенню дрібнокристалічних структур льоду, щадному обезводненню клітин, зниженню ступеню вираженості сольових градієнтів та дозволяє стабілізувати системи в зоні низьких температур [5].

Спосіб пояснюється наступними прикладами.

Приклад 1. Зразки кордової крові людини вміщували в пластикові одноразові контейнери, які герметично запаювали і кріоконсервували за 2 етапною програмою, згідно якій на першому етапі проводили охолодження в програмному заморожувачу зі швидкістю  $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$  до  $-20^{\circ}\text{C}$  з наступною стабілізацією при даній температурі, а на другому - швидке занурення в рідкий азот. Зберігання зразків здійснювали в рідкому азоті при температурі  $-196^{\circ}\text{C}$ . Відігрів матеріалу проводили у водяній бані при температурі  $40-41^{\circ}\text{C}$ .

Після відігріву досліджували вплив кріоконсервування на морфофункціональні властивості ядровміщуючих клітин кордової крові. Результати показали, що кількість збережених клітин у суспензії, які визначали методом суправітального забарвлення, вірогідно не відрізнялась від показника прототипу (табл. 1). Кількість фагоцитуючих клітин в зразках кордової крові була вірогідно вища (табл. 2). Окислювально-відновлювальний потенціал фагоцитів, який визначали за їх здібністю відновлювати нітросиній тетразолій (НСТ-тест), вірогідно не відрізнявся від нативу (табл. 3). Кількість життєздатних клітин, які утворюють колонії в агарі (КУОк), вірогідно не відрізнялась від вмісту таких клітин в нативних зразках (табл.4).

Приклад 2. Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за виключенням того, що охолодження

зразків проводили як в прототипі: до  $-80^{\circ}\text{C}$  з наступним зануренням в рідкий азот. Результати подані в таблиці 5. З таблиці видно, що кількість збережених і НСТ-позитивних клітин вірогідно не відрізнялась від показників нативних зразків, тоді як кількість фагоцитуючих клітин і КУОк була вірогідно нижча.

Приклад 3. Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за виключенням того, що в якості кріопротектора використовували ДМСО. Досліди відігрітих зразків показали, що кількість збережених ядровміщуючих клітин вірогідно не відрізнялась від показників нативних, тоді як кількість фагоцитуючих, НСТ-позитивних клітин і КУОк була вірогідно нижча (табл. 5).

Показники збереженості ядровміщуючих клітин кордової крові

Спосіб	Кількість збережених
Прототип	
Заявлений	

Фагоцитарна активність ядровміщуючих клітин кордової крові

Спосіб	Кількість фагоцитів
Нативний зразок	
Прототип	
Заявлений	

Примітка: \* - ( $p < 0,05$ ) вірогідні різниці в порівнянні з нативними зразками  
" - ( $p < 0,05$ ) вірогідні різниці в порівнянні з прототипом

Показники окислювально-відновлювальної активності фагоцитів кордової крові людини після кріоконсервування

Спосіб	Кількість позитивних
Нативний зразок	
Прототип	
Заявлений	

Примітка: \* - ( $p < 0,05$ ) вірогідні різниці в порівнянні з нативними зразками  
" - ( $p < 0,05$ ) вірогідні різниці в порівнянні з прототипом

Вплив кріоконсервування на кількість КУОк в кордовій крові людини

Строки спостереження	Кількість колоній
7 доба	
14 доба	

Вплив різних умов кріоконсервування на морфофункціональні властивості ядровміщуючих клітин кордової крові

Умови кріоконсервування	Кількість збережених	Кількість фагоцитуючих	Кількість позитивних
-------------------------	----------------------	------------------------	----------------------

ння	ядровміщуючих клітин	клітин		7 доба
Нативний зразок	92±1,05	76±2,6	68±2,9	100
1	90±2,1	30±2,3*	68±3,2	16±2*
2	89,4±1,3	28±2*	13±1,7*	63±5*

Примітка: 1 - програма охолодження за прототипом, кріопротектор-плазма;

2 - програма охолодження заявленого способу, кріопротектор-ДМСО

\* - ( $p < 0,05$ ) вірогідні різниці в порівнянні з нативними зразками

Джерела інформації:

1. Rubinstein P., Dobrila L., Rosenfield R.E., et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1995. - Vol. 92(22). - P. 10119-10122.

2. Donaldson C., Armitage W.J., Denning-Kendall P.A. et al. Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood // Bone Marrow Transplantation. - 1996. - 18. - P. 725-731.

3. Meryman H.T., Howard G. Cryopreservation of granulocytes. - In: The granulocyte: Function and clinical utilization. New York, 1977, p. 193-201.

4. Цуцаева А.А., Грищенко В.И., Кудкоцева О.В. и др. // Проблемы криобиологии. - 2000, №1. - С. 59-63.

5. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под ред. А.А. Цуцаевой. - Киев: Наук. думка, 1983. - С. 36-38.