



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1192762** **A**

(5D) 4 A 01 N 1/00

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 3732756/28-14

(22) 18.04.84

(46) 23.11.85. Вкл. № 43

(71) Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР и Украинский
ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии

(72) М.И.Шраго, Л.А.Ханина,
Ю.В.Калугин, Е.Н.Черныш,
С.В.Кощий, Б.Т.Стегний,
В.С.Белоконь, Г.А.Красников
и П.Т.Берус

(53) 615.475(088.8)

(56) Методические рекомендации по
криоконсервированию и цитологичес-
кому контролю качества культур кле-
ток и фрагментов ткани. Харьков,
1981, с. 74.

(54)(57) СРЕДА ДЛЯ КОНСЕРВИРОВАНИЯ
КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР, содержащая пита-
тельную среду и криопротектор,
отличающаяся тем, что,
с целью повышения жизнеспособности
клеток, в качестве криопротектора
используют оксигетилированный
глицерин со степенью полимеризации
 $n=3$ при следующем соотношении ком-
понентов, мас. %:

Оксигетилированный глицерин	3-15
Питательная среда	Остальное

(19) **SU** (11) **1192762** **A**



Изобретение относится к криобиологии и может быть использовано при низкотемпературном консервировании культур клеток.

Цель изобретения - повышение жизнеспособности клеток.

Способ осуществляют в консервирующей среде, содержащей питательную среду, среду 199 или 0,5%-ный гидролизат лактальбумина на растворе Хэнкса и криопротектор, в качестве криопротектора используют оксиэтилированный глицерин со степенью полимеризации $n=3$ (ОЭГ $n=3$) в конечной концентрации 3-15%, причем компоненты среды взяты в следующем соотношении, мас. %:

ОЭГ $n=3$	3-15
Питательная среда	До 100
pH	7,2-7,4

Пример 1. Образовавшийся монослой клеток 2-суточной перевиваемой линии почки овцы (ПО-2) хорошего исходного качества (клетки имели полигональную форму, присущую эпителиеподобным клеткам, границы между клетками четко выражены, в клетках отсутствуют видимые признаки цитопатологии роста) снимают с поверхности стекла культуральных сосудов с помощью диспергирующей смеси, состоящей из 0,02%-ного раствора Версена и 0,25%-ного раствора трипсина Дифко в соотношении 9:1, предварительно ополоснув слой раствором Хэнкса (pH 7,2). Процедуру снятия клеток со стекла осуществляют при 37°C. При появлении первых признаков отделения клеток диспергирующую смесь осторожно сливают, после чего легким потряхиванием снимают оставшиеся на поверхности стекла клетки. Жизнеспособность клеток, оцененная методом суправитального окрашивания, 95%.

Клеточную взвесь разбавляют питательной средой 199, доводя плотность клеток до 10×10^6 в 1 мл. К суспензии клеток в соотношении 1:1 при постоянном перемешивании добавляют 6%-ный раствор оксиэтилированного глицерина (ОЭГ) $n=3$ и доводят pH до 7,2 путем добавления 5%-ного раствора биокarbonата натрия.

Таким образом, среда, в которой находятся клетки, содержит, мас. %:

ОЭГ $n=3$	3
Среда 199	До 100

Затем производят расфасовку клеточной взвеси по 2 мл в стеклянные ампулы, которые запаивают после 20-минутной эквilibрации при 22°C.

Замораживание клеточной суспензии осуществляют в аппарате программного замораживания, сначала со скоростью 2 град./мин до -5°C, затем, со скоростью 20 град./мин до -100°C. Замороженные образцы культуры переносят на длительное хранение в стационарное хранилище с жидким азотом.

После месячного хранения в жидком азоте ампулы с клетками оттаивают в водяной бане при +40°C. Размороженную культуру клеток ПО-2 разбавляют питательной средой 199, содержащей 10% сыворотки крупного рогатого скота, инактивированной при +56°C в течение 30 мин, и канамицина сульфата из расчета 100 ед/мл с pH 7,2, до посевной концентрации $0,4 \times 10^6$ клеток в 1 мл. Культивирование осуществляют в культуральных сосудах емкостью 0,25 л при +37°C, замену питательной среды осуществляют по истечении 10 ч культивирования.

Жизнеспособность клеток оценивают методом суправитального окрашивания 0,2%-ным раствором трипанового синего по колониеобразующей активности и по характеру формирования монослоя.

Уровень восстанавливаемых из замороженного состояния клеток 85%. По истечении 3 сут. культивирования монослой выполнен клетками на 85% поверхности культурального сосуда.

Клетки имеют свойственную им полигональную форму, границы между клетками отчетливо выражены, в цитоплазме отсутствуют видимые признаки цитопатологии их роста.

Пример 2. Все этапы подготовки клеток к низкотемпературному консервированию и отогреву осуществляют аналогично примеру 1, а консервирование осуществляют в среде следующего состава, мас. %:

ОЭГ $n=3$	5
Среда 199	До 100

При этом на первом этапе замораживание ведут со скоростью 2 град./мин до -10°C.

После размораживания уровень восстановления клеток 92%, после 3 сут. культивирования монослой выполнен клетками на 100%.

Пример 3. Все этапы подготовки клеток к низкотемпературному консервированию и отогреву осуществляют аналогично примеру 1, а консервирование осуществляют в среде, содержащей, мас. %:

ОЭГ n=3 10
Среда 199 До 100

На первом этапе замораживание ведут со скоростью 2 град./мин до -15°C.

После размораживания уровень восстановления клеток 85%, а после 3 сут. культивирования монослой выполнен клетками на 90% поверхности культурального сосуда.

Пример 4. Подготовку клеток к консервированию и отогреву осуществляют аналогично примеру 1, а консервирование осуществляют в среде, содержащей, мас. %:

ОЭГ n=3 15

Среда 199 До 100

На первом этапе замораживание ведут со скоростью 2 град./мин до -20°C.

5 После размораживания уровень восстановления клеток 85%, монослой после 2 сут. хранения выполнен клетками на 94%.

10 Во всех четырех примерах клетки имеют свойственную им полигональную форму, границы между клетками отчетливо выражены, в цитоплазме отсутствуют видимые признаки цитопатологии их роста.

Результаты экспериментов приведены в таблице.

Как видно из таблицы, наилучший эффект криозащиты отмечается при содержании в среде ОЭГ n=3 в 5%-ной концентрации.

Состав криозащитной среды, мас. %		Уровень восстановленных клеток, %	Формирование монослоя клеток на третьи сутки культивирования, %
ОЭГ n=3	Среда 199		
3	До 100	85	85
5	До 100	92	100
10	До 100	85	90
15	До 100	85	94

Составитель М. Позняк

Редактор О. Юрковецкая Техред О. Неце Корректор В. Синицкая

Заказ 7194/6

Тираж 742

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ИПИ "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4

