



УКРАЇНА

(19) UA (11) 84775 (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 КОНЦЕНТРАТУ ТРОМБОЦИТІВ ЛЮДИНИ

1

(21) а200700161

(22) 05.01.2007

(24) 25.11.2008

(46) 25.11.2008, Бюл.№ 22, 2008 р.

(72) ГРИЩЕНКО ВАЛЕНТИН ІВАНОВИЧ, UA, ГУ-
РІНА ТЕТЯНА МИХАЙЛІВНА, UA, КНИШ ОКСАНА
ВАСИЛІВНА, UA, КОМПАНІЄЦЬ АНТОНІНА МИ-
ХАЙЛІВНА, UA

(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІО-
МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ, UA

(56) Аграненко В.А., Файнштейн Ф.Э., Голубева
В.Л., Абакумов Е.М., Воробьева Г.С. Крיוконсер-
вированные тромбоциты и их клиническая эффек-
тивность // Гематология и трансфузиология.-1987.-
№5.-С.8-12

2

Крיוконсервирование клеточных суспензий / Цу-
цаева А.А., Аграненко В.А., Федорова Л.И. и др. -
К., 1983.- С.112-113.

(57) Спосіб крיוконсервування концентрату тром-
боцитів людини, який включає змішування його з
кріозахисним розчином, що містить крיוпротектор
1,2-пропандіол на аутологічній плазмі, і програмне
заморожування з наступним зануренням у рідкий
азот, який **відрізняється** тим, що крיוзахисний
розчин додатково містить крיוпротектор димети-
лацетамід, при цьому кожний з крיוпротекторів
беруть в концентрації 0,3М, а заморожування здій-
снюють спочатку до температури кристалізації
суспензії зі швидкістю 1 град./хв., потім для зняття
переохолодження проводять температурне ініцію-
вання кристалоутворення і далі заморожують зі
швидкістю 1град./хв. до -35...-40°C з наступним
зануренням у рідкий азот.

Винахід належить до галузі крיוбіології та крיו-
медицини і може бути використаний у практичній
медицині для трансфузій при лікуванні тромбоци-
топеній різного походження.

Існує спосіб крיוконсервування тромбоцитів
людини у крיוзахисному середовищі, що містить
6%-ний розчин ДМСО на аутологічній плазмі [1].
Згідно з способом клітинну суспензію спочатку
охолоджують від кімнатної температури до 0°C зі
швидкістю 5 град./хв., при 0°C застосовують 5-хви-
линну еквілібрацію і далі охолоджують до -5°C зі
швидкістю 1град./хв, від -5°C до -15°C - 2град./хв,
від -15°C до -45°C - 1град./хв, від -45°C до -70°C -
5град./хв. з подальшим зберіганням при
температурі -95°C. Відігрів здійснюють на водяній
бані при температурі 37°C.

Недоліком цього способу є те, що він потребує
додаткового відмивання відігрітих клітин від
кріопротектору для зменшення токсичного впливу
на хворих продуктів розпаду ДМСО. Саме з цієї
причини концентрат тромбоцитів, який був
крюконсервований з додаванням розчинів ДМСО,
не знайшов широкого клінічного використання. До
того ж відмивання тромбоцитів від ДМСО
призводить до додаткових втрат та пошкоджень
клітин [2].

Відомий спосіб крיוконсервування концентрату
тромбоцитів з додаванням розчину крיוпротектору
диметилацетаміду (ДМАЦ) на воді для ін'єкцій у
концентрації 0.29М (2,5%) з додаванням 2,5% глю-
кози [3]. Згідно з цим способом суспензію клітин
після змішування з крיוзахисним розчином повіль-
но охолоджують з послідовним занурюванням у
рідкий азот.

Недоліком способу є низькі показники біологі-
чної повноцінності клітин тромбоцитів після
крюконсервування - кількісна збереженість клітин
складає не більш 80%, при цьому лише 50% з них
зберігають життєздатність та функціональну акти-
вність.

Найбільш близьким до заявленого є спосіб
крюконсервування тромбоцитів людини [4], згідно
з яким концентрат тромбоцитів змішують з розчи-
ном крיוпротектору 1,2-пропандіолу на аутологіч-
ній плазмі до кінцевої концентрації 0,5М (3,9%),
помішують у поліпропіленові ампули об'ємом 5 мл
та заморожують до -5°C шляхом розташування їх
на 5хв. у сидінговій бані, далі охолоджують зі шви-
дкістю 14 град./хв. до -70°C, після чого занурюють
у рідкий азот. Відігрів здійснюють на водяній бані
при температурі 37°C.

(13) C2

(11) 84775

(19) UA

Недоліком цього способу є те, що він не дає можливості отримувати концентрат тромбоцитів з достатньо високими показниками біологічної повноцінності. Кількісна збереженість клітин після розморожування становить $86,3 \pm 7,3\%$, РГШ $12,4 \pm 2,7\%$, агрегація на АДФ $3,8 \pm 0,9\%$.

Крім того концентрат тромбоцитів має високу кінцеву концентрацію кріопротектору. Відомо, що при клінічному застосуванні кріоконсервованих компонентів крові, які заморожують з використанням кріозахисного розчину на основі 1,2-пропандіолу, дозволена одноразова залишкова доза кріопротектору для внутрішньовенного введення становить не більш 15г [5]. Одна лікувальна доза при трансфузіях концентрату тромбоцитів в середньому дорівнює 250-300 мл. За умови використання вищезазначеного способу сумарна кількість кріопротектору у лікувальній дозі становить 11,7г, що наближається до критичного показника залишкової дози і не дає змоги у разі необхідності збільшити кількість концентрату тромбоцитів, що викликає необхідність вирішення задачі створити такий спосіб кріоконсервування концентрату тромбоцитів людини, який би, за рахунок зміни складу кріозахисного розчину та режиму охолодження, дозволив підвищити показники біологічної повноцінності клітин, а також знизити кількість кріопротектору в концентраті тромбоцитів.

Ця задача вирішується тим, що у способі кріоконсервування концентрату тромбоцитів, який включає змішування його з кріозахисним розчином, що містить кріопротектор 1,2-пропандіол на аутологічній плазмі, програмне заморожування з послідовним зануренням у рідкий азот, згідно з винаходом, кріозахисний розчин додатково містить кріопротектор ДМАЦ, при цьому кожний з кріопротекторів беруть в концентрації 0,3М, а заморожування здійснюють спочатку до температури кристалізації суспензії зі швидкістю 1град./хв, потім для зняття переохолодження проводять температурне ініціювання кристалоутворення і далі заморожують зі швидкістю 1град./хв до $-35...-40^{\circ}\text{C}$ з послідовним зануренням у рідкий азот.

Заявлений спосіб забезпечує одержання високих показників біологічної повноцінності клітин тромбоцитів після кріоконсервування: кількісна збереженість клітин $90,0 \pm 8,0\%$, РГШ $40,0 \pm 13,0\%$, агрегація на АДФ $66,7 \pm 12,0\%$.

Повільні швидкості охолодження (1 гр/хв.) є найменш травматичними для тромбоцитів у температурному інтервалі до початку процесу кристалізації суспензії клітин. Температурне ініціювання кристалоутворення дає змогу зняти переохолодження клітинної суспензії і за рахунок цього знизити імовірність внутрішньоклітинної кристалізації, чим зменшити пошкодження клітин на етапі утворення твердофазної матриці. Додавання до кріозахисного розчину кріопротектору ДМАЦ знижує концентрацію 1,2-пропандіолу, а зменшена сумарна концентрація обох кріопротекторів нівелює їх токсичну дію на організм людини. Це дозволяє виключити процедури відмивання залишків кріопротектору і тим самим уникнути додаткової втрати і пошкодження клітин. Таким чином, спосіб, що

пропонується, дозволяє одержувати кріоконсервований концентрат тромбоцитів з високими показниками біологічної повноцінності та низькою кількістю кріопротектору, що дає змогу використовувати його у клінічній практиці.

При використанні запропонованого способу сумарна кількість кріопротектору у лікувальній дозі складає: 1,2-пропандіолу - 6,48г, а ДМАЦ - 7,8г.

Спосіб пояснюється наступними прикладами.

Приклад 1. Концентрат тромбоцитів отримували шляхом фракціонування цільної донорської крові, заготовленої на консерванті "Глюгіцир" в потроєні полімерні контейнери "Гемакон". Виділення концентрату тромбоцитів здійснювали за допомогою рефрижераторної центрифуги УРЛ 05-01 в перші 4 години після забору крові при температурі $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ [6]. Перед проведенням заморожування концентрат тромбоцитів зберігали при постійному перемішуванні на автоматичній мішалці при $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ протягом 18-20 годин. Кріозахисний розчин, який містив 0,3М (2,28%) 1,2-ПД та 0,3М (2,26%) ДМАЦ, вводили у концентрат тромбоцитів при 22°C у співвідношенні 1:1 протягом 1хв. Кінцевий об'єм зразка становив 1,6мл. Одразу ж після введення кріозахисного розчину в концентрат тромбоцитів проводили заморожування за допомогою програмного заморожувача "Cryoson" (Німеччина) у кріоампулах "Nunc". Заморожування проводили згідно з наступним режимом: від кімнатної температури до температури кристалізації кріозахисного розчину з концентратом тромбоцитів, яку визначали заздалегідь ($-1,67^{\circ}\text{C}$), швидкість охолодження становила 1 град./хв. Для зняття переохолодження при температурі кристалізації проводили температурну ініціацію. Далі охолоджували до температури -40°C зі швидкістю 1 град./хв., після чого зразок занурювали у рідкий азот.

Відігрівання зразків здійснювали на водяній бані при температурі 37°C , після чого одразу проводили оцінку кількісної збереженості тромбоцитів. Оцінку морфо-функціональної збереженості тромбоцитів (РГШ та агрегації на АДФ) проводили після видалення кріопротектору [7]. Одержані після кріоконсервування показники біологічної повноцінності концентрату тромбоцитів виражали у відсотках по відношенню до відповідних показників до заморожування: кількісна збереженість клітин $90,0 \pm 8,0\%$, реакція на гіпотонічний шок $40,0 \pm 13,0\%$, агрегація на АДФ $66,7 \pm 12,0\%$.

Приклад 2. Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що для заморожування концентрату тромбоцитів використовували програму як зі зняттям переохолодження, так і без зняття переохолодження. Результати наведені у Таблиці 1. З Таблиці 1 видно, що найкращі показники біологічної повноцінності були отримані при застосуванні програми заморожування зі зняттям переохолодження.

Приклад 3. Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що брали різні концентрації кріопротекторів. Результати наведені у Таблиці 2, з якої видно, що найкращі показники біологічної повноцінності кріоконсервованого кон-

центрату тромбоцитів одержували при використанні обох кріопротекторів у концентрації 0,3М.

Приклад 4. Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, але заморожування перед занурюванням у рідкий азот проводили до різних температур. Результати наведені у Таблиці 3, з якої видно, що зниження кінцевої температури охолодження до -

50°C не впливає на показники якості життєздатності концентрату тромбоцитів, але вимагає додаткового часу на охолодження та збільшує витрати рідкого азоту, тому оптимальною кінцевою температурою охолодження перед занурюванням у рідкий азот є -35...-40°C.

Таблиця 1

Показники біологічної повноцінності кріоконсервованих тромбоцитів при застосуванні програм заморожування зі зняттям та без зняття переохолодження

Режим охолодження	Кількісна збереженість клітин, %	Реакція на гіпотонічний шок, %	Агрегація на АДФ, %
Без зняття переохолодження	88,0±7,0	35,0±15,0	58,5±10,0
Зі зняттям переохолодження	90,0±8,0	40,0±13,0	66,7±12,0

Таблиця 2

Показники біологічної повноцінності кріоконсервованих тромбоцитів в залежності від концентрацій кріопротекторів 1,2-ПД та ДМАЦ

Концентрації кріопротекторів	Кількісна збереженість клітин, %	Реакція на гіпотонічний шок, %	Агрегація на АДФ, %
1,2-ПД(0,2М)+ДМАЦ (0,2М)	88,0±12,0	30,0±10,0	60,0±13,0
1,2-ПД(0,3М)+ДМАЦ (0,3М)	90,0±8,0	40,0±13,0	66,7±12,0
1,2-ПД(0,5М)+ДМАЦ (0,5М)	85,0±10,0	27,0±12,0	42,0±8,0

Таблиця 3

Показники біологічної повноцінності кріоконсервованих тромбоцитів в залежності від кінцевої температури охолодження перед занурюванням у рідкий азот

Кінцева температура охолодження, °C	-30	-35	-40	-50
Кількісна збереженість клітин, %	86,0±11,0	89,0±10,0	90,0±8,0	91,0±12,0
Реакція на гіпотонічний шок, %	37,0±15,0	39,0±10,0	40,0±13,0	40,0±11,0
Агрегація на АДФ, %	62,5±13,0	67,0±10,0	66,7±12,0	67,1±14,0

Джерела інформації:

1. Balint B., Paunovic D., Vucetic D., Vojvodic D., Petakov M., Trkuljic M., Stojanovic N. Controlled-rate versus uncontrolled-rate freezing as predictors for platelet cryopreservation efficacy // Transfusion.- 2006. - V. 46.-P. 230-235.

2. Кріоконсервирование клеточных суспензий / Цуцаева А.А., Аграненко В.А., Федорова Л.И. и др. - Киев, 1983. - С.112-113.

3. Аграненко В.А., Файнштейн Ф.Э., Голубева В.Л., Абакумов Е.М., Воробьева Г.С. Кріоконсервовані тромбоцити та їх клінічна ефективність // Гематологія та трансфузіологія.-1987.- №5.-С.8-12.

4. Arnaud F.G., Pegg D.E. Cryopreservation of human platelets with propane-1,2-diol//Cryobiology.- 1990. - №27. - P. 130-136.

5. Временная фармакопейная статья для 1,2-пропандиола, Москва, 1986. ВПС 42 - 1594 -86.

6. Аграненко В.А., Компаниец А.М., Балерина Л.В. и др. Выделение концентратов тромбоцитов из ЛТС донорской крови и их консервирование // Гематология и трансфузиология.- 1991.- Т.36, №3.- С. 29-32.

7. Грищенко В.І., Компанієць А.М., Книш О.В. Спосіб видалення кріопротектора із суспензії тромбоцитів. Патент України №15014, А01 N 1/02, 15.06.2006.

