



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **106776** (13) **U**  
(51) МПК (2016.01)  
**A01N 1/00**  
**G01N 24/14** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2015 10201</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Улізко Павло Юрійович (UA),</b> <b>Боброва Олена Миколаївна (UA),</b> <b>Нардід Олег Анатолійович (UA),</b> <b>Зінченко Олександра Василівна (UA),</b> <b>Жегунов Геннадій Федорович (UA),</b> <b>Водоп'янова Лариса Анатоліївна (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>19.10.2015</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.05.2016</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.05.2016, Бюл.№ 9</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І</b> <b>КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ</b> <b>АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,</b> вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015 (UA)

**(54) СПОСІБ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЕРИТРОЦИТІВ ТВАРИН**

**(57) Реферат:**

Спосіб кріоконсервування еритроцитів тварин шляхом заморожування клітин до  $-196^{\circ}\text{C}$  з використанням кріоконсерванта, що містить 10 % ДМСО, 0,9 % NaCl, 10 мМ фосфатного буфера і воду дистильовану. В кріоконсервант додатково вводять ПЕО-1500 в концентрації 15 %, 1,2-ПД в концентрації 5 % і сахарозу в концентрації 5 %.

UA 106776 U



Корисна модель належить до галузі кріобіології і може бути використана при розробці методів тривалого низькотемпературного зберігання еритроцитів тварин з метою трансфузії.

Відомим аналогом є спосіб кріоконсервування еритроцитів тварин, згідно з яким еритромасу заморозжують у кріозахисному середовищі ЦОЛІПК 1U, що містить 30 % гліцерину, 4 % маніту, 0,7 % NaCl, 0,03 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , до температури  $-196^\circ\text{C}$  шляхом занурення контейнера у рідкий азот [1]. Відігрівають зразки на водяній бані при температурі  $42-44^\circ\text{C}$ .

Недоліком аналога є низька збереженість еритроцитів (гемолізує близько 74 % клітин) [1]. Це пов'язано з низьким коефіцієнтом проникності гліцерину до еритроцитів тварин [2].

Відомим аналогом є спосіб кріоконсервування еритроцитів тварин з використанням кріоконсерванта, що містить 15 % ПЕО-1500, 0,9 % NaCl, 10 мМ фосфатного буфера і воду дистильовану. Кріоконсервант додають до еритромаси у співвідношенні 1:1, заморозжують до  $-196^\circ\text{C}$  зануренням в рідкий азот, відігрівають при  $42-44^\circ\text{C}$  [3].

Недоліком аналога є те, що одразу після розморожування, хоч і залишається 95 % негемолізованих клітин, але знижується осмотична стійкість еритроцитів і при моделюванні трансфузії спостерігається гемоліз до 50 % клітин.

Найближчим аналогом до корисної моделі є спосіб кріоконсервування еритроцитів тварин з використанням кріоконсерванта, що містить 10 % ДМСО, 0,9 % NaCl, 10 мМ фосфатного буфера і воду дистильовану. Кріоконсервант додають до еритромаси у співвідношенні 1:1, заморозжують до  $-196^\circ\text{C}$  зануренням в рідкий азот, відігрівають при  $42-44^\circ\text{C}$  [4].

Недоліком аналога є високий рівень гемолізу еритроцитів після кріоконсервування (43,7-46,9 %) і при моделюванні трансфузії (7,2-7,6 %).

В основу корисної моделі поставлена задача вдосконалити відомий спосіб кріоконсервування еритроцитів тварин шляхом зміни складу кріоконсерванта, що дозволить знизити рівень гемолізу еритроцитів після кріоконсервування і при моделюванні трансфузії.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб кріоконсервування еритроцитів тварин, який включає заморожування клітин до  $-196^\circ\text{C}$  з використанням кріоконсерванта, що містить 10 % ДМСО, 0,9 % NaCl, 10 мМ фосфатного буфера і воду дистильовану, згідно з корисною моделлю, в кріоконсервант додатково вводять ПЕО-1500 в концентрації 15 %, 1,2-ПД в концентрації 5 % і сахарозу в концентрації 5 %.

Додавання ПЕО-1500, 1,2-ПД і сахарози у кріозахисне середовище дозволяє знизити гемоліз еритроцитів після кріоконсервування на 19,2-22,1 % і при моделюванні трансфузії на 1,9-2,5 %.

Корисну модель виконують наступним чином:

Кров центрифугують при 800 об/хв протягом 5 хвилин і видаляють надосад, а еритромасу ще тричі відмивають фізіологічним розчином, що містить 0,9 % NaCl. До відмитої еритромаси у об'ємному співвідношенні 1:1 додають кріоконсервант, що містить 15 % ПЕО-1500, 10 % ДМСО, 5 % 1,2-ПД, 5 % сахарози, 0,9 % NaCl, 10 мМ фосфатного буфера і воду дистильовану.

Еритромасу з кріоконсервантом перемішують і витримують 15 хвилин при кімнатній температурі ( $20-22^\circ\text{C}$ ). Отриману суспензію розливають в пластикові контейнери об'ємом 1 мл і занурюють в рідкий азот ( $-196^\circ\text{C}$ ), де зберігають до моменту використання. Відігрівання здійснюють на водяній бані при  $40^\circ\text{C}$  до появи рідкої фази. Після відігрівання еритроцити відмивають від середовища кріоконсервування в два етапи. На першому етапі до суспензії еритроцитів додають у об'ємному співвідношенні 1:1 розчин, який містить 0,6 М NaCl, 10 мМ фосфатного буфера, рН 7,4. На другому етапі еритроцити двічі промивають розчином, який містить 0,15 М NaCl, 10 мМ фосфатного буфера.

Корисна модель пояснюється прикладами конкретного виконання.

Приклад 1

До відмитої еритромаси з крові тварин (кінь, бугай, кірль) у об'ємному співвідношенні 1:1 додавали кріозахисне середовище, яке містить 15 % ПЕО-1500, 10 % ДМСО, 5 % 1,2-ПД, 5 % сахарози, 0,9 % NaCl, 10 мМ фосфатного буфера і воду дистильовану.

Еритромасу з кріоконсервантом перемішували і витримували 15 хвилин при кімнатній температурі ( $20-22^\circ\text{C}$ ). Отриману суспензію занурювали у рідкий азот ( $-196^\circ\text{C}$ ) в пластиковому контейнері об'ємом 1 мл. Відігрівання здійснювали на водяній бані при  $40^\circ\text{C}$  до появи рідкої фази. Після відігрівання еритроцити відмивали від середовища кріоконсервування спочатку розчином, який містить 0,6 М NaCl, 10 мМ фосфатного буфера, а потім ще двічі промивали розчином, який містить 0,15 М NaCl, 10 мМ фосфатного буфера.

Збереженість еритроцитів оцінювали за виходом гемоглобіну [5] шляхом вимірювання на спектрофотометрі оптичної щільності в надосаді при довжині хвилі 543 нм, виражали у відсотках відносно 100 % гемолізованих клітин. Оцінювали сумарний гемоліз після відігрівання заморожених еритроцитів і відмивання від кріозахисного середовища. Для порівняння

моделювання трансфузії після кріоконсервування проводили перенесенням еритроцитів у аутоплазму при 37 °С та інкубуванням протягом 24 годин. Моделювання трансфузії проводили також після кріоконсервування еритроцитів з кріоконсервантом за прототипом. Результати наведені у таблиці 1.

З таблиці 1 видно, що гемоліз еритроцитів тварин після кріоконсервування заявленим способом на 19,2-22,1 % менше, ніж у прототипі. При моделюванні трансфузії гемоліз на 1,9-2,5 % нижче, ніж у прототипі.

Приклад 2

Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що в кріоконсерванті ПЕО-1500 брали в різних концентраціях: 10, 15 і 20 %. Результати наведені у таблиці 2.

З таблиці 2 видно, що як при зменшенні концентрації ПЕО-1500, так і при її збільшенні гемоліз еритроцитів збільшується.

Приклад 3

Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що в кріоконсерванті 1,2-ПД і сахарози брали в концентраціях 5 і 10 %. При цьому ПЕО-1500 брали у концентрації 10 %, щоб сумарна концентрація кріопротекторів у кріоконсерванті сильно не збільшувалась. Результати наведені у таблиці 3.

З таблиці 3 видно, що збільшення концентрації 1,2-ПД або одночасно 1,2-ПД і сахарози призводить до збільшення гемолізу еритроцитів після кріоконсервування. Збільшення концентрації ПЕО-1500 у відсутності 1,2-ПД і сахарози також призводить до збільшення гемолізу еритроцитів і є недоцільним.

Таблиця 1

Гемоліз еритроцитів тварин після кріоконсервування, % (n=6)

Показники	Тварини	Спосіб кріоконсервування	
		Найближчий аналог	Корисна модель
Після кріоконсервування	кінь	46,9±2,8	25,4±2,0
	бугай	45,5±2,5	23,4±2,0
	крінь	43,7±2,3	24,5±2,1
При моделюванні трансфузії	кінь	7,5±0,6	5,6±0,4
	бугай	7,2±0,5	5,1±0,3
	крінь	7,6±0,7	5,2±0,3

Таблиця 2

Гемоліз еритроцитів тварин після кріоконсервування залежно від концентрації ПЕО-1500, % n=6)

Тварини	Концентрація ПЕО-1500, %		
	10	15	20
кінь	54,5±3,5	25,4±2,0	42,2±3,8
бугай	47,3±4,1	23,4±2,0	41,1±4,0
крінь	49,5±3,4	24,5±2,1	43,8±4,2

Таблиця 3

Гемоліз еритроцитів тварин після кріоконсервування у залежності від концентрації 1,2-ПД і сахарози, % (n=6)

Тварини	Склад кріоконсерванта			
	5 % 1,2-ПД, 5 % сахарози, 15 % ПЕО-1500	10 % 1,2-ПД, 5 % сахарози, 10 % ПЕО-1500	10 % 1,2-ПД, 10 % сахарози, 10 % ПЕО-1500	20 % ПЕО-1500
кінь	25,4±2,0	54,5±3,5	44,3±3,2	39,5±2,7
бугай	23,4±2,0	47,3±4,1	38,4±2,7	35,5±2,4
крінь	24,5±2,1	49,5±3,4	40,4±3,5	36,5±2,5

Джерело інформації:

1. Денисова О.Н., Жегунов Г.Ф., Бабийчук Л.А. Криоконсервирование эритроцитов животных под защитой диметилсульфоксида, полиэтиленгликоля, глицерина // Проблемы криобиологии. - 2005. - № 2. - С. 195-201.
- 5 2. Жегунов Г.Ф., Денисова О.Н. Проницаемость эритроцитов млекопитающих для молекул глицерина и ДМСО и степень сохранности клеток после замораживания // Доповіді Національної академії наук України. - 2010. - № 2. - С. 139-143.
3. Денисова О.М. Кріочутливість еритроцитів різних видів ссавців: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. - Харків, 2006. - 20 с.
- 10 4. Улизко П.Ю., Жегунов Г.Ф., Денисова О.Н. Влияние криоконсервирования с ДМСО на сохранность и осмотическую эритроцитов различных видов млекопитающих // Проблемы криобиологии. - 2005. - № 2. - С. 195-201.
5. Клінічна лабораторна діагностика: Навч. посібник / Аксененко Л.П., Баркоган З.С., Гетте З.П. та ін.; За ред. Базарнової М.А., Гетте З.П. - К.: Вища шк., 1994. - С. 186-187.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

20 Спосіб кріоконсервування еритроцитів тварин шляхом заморожування клітин до -196 °С з використанням кріоконсерванта, що містить 10 % ДМСО, 0,9 % NaCl, 10 мМ фосфатного буфера і воду дистильовану, який **відрізняється** тим, що в кріоконсервант додатково вводять ПЕО-1500 в концентрації 15 %, 1,2-ПД в концентрації 5 % і сахарозу в концентрації 5 %.

---

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601