



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **69651**

(13) **U**

(51) МПК

A01N 1/02 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2011 11993**

(22) Дата подання заявки: **12.10.2011**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.05.2012**

(46) Публікація відомостей **10.05.2012, Бюл.№ 9**
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Труфанова Наталя Анатоліївна (UA),
Петренко Юрій Олександрович (UA),
Петренко Олександр Юрійович (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І
КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,
вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015
(UA)**

(54) СПОСІБ ВІТРИФІКАЦІЇ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

(57) Реферат:

Спосіб вітрифікації мезенхімальних стромальних клітин включає двоетапну експозицію клітин з розчином, що містить кріопротектори диметилсульфоксид, етиленгліколь та цукрозу, і швидке охолодження в кріоконтейнерах шляхом занурення в рідкий азот. В розчин вводять кріопротектор 1,2-пропандіол в концентрації 20 %, а як кріоконтейнери використовують кріопробірки.

UA 69651 U

Корисна модель належить до галузі клітинної біології, також може бути використана в біотехнології для кріоконсервування клітин і тривимірних тканинно-інженерних конструкцій.

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) мають такі властивості як здатність до самооновлення, спрямованого мультилінійного диференціювання і регуляції імунної відповіді, тому привертають увагу фахівців у галузях клітинної біології, експериментальної та клінічної медицини. Експериментальне і подальше клінічне застосування МСК потребує удосконалення традиційних та розроблення нових методів кріоконсервування, які б дозволили більшою мірою зберегти їх життєздатність і морфофункціональні властивості. Для кріоконсервування МСК, як правило, застосовують повільне заморожування в середовищах, що містять диметилсульфоксид (ДМСО) [1]. Недоліком таких методів є розвиток кристалізації і цілої групи пов'язаних з нею кріоушкоджень. Крім того, для кріоконсервування клітин шляхом повільного заморожування є необхідним складне устаткування, таке як програмний заморожувач, низькотемпературний холодильник. Альтернативою повільному заморожуванню під захистом ДМСО є вітрифікація, яка включає затвердіння розчину в аморфному (склоподібному) стані без кристалізації, що відкриває нові перспективи для низькотемпературного консервування різних біологічних систем від ізольованих клітин до біоінженерних конструкцій, які розробляють із залученням стовбурових клітин, зокрема МСК [2]. Для вітрифікації клітин дороге устаткування не є необхідним.

На теперішній час відомі різні способи вітрифікації клітин.

Відомий спосіб вітрифікації сперми без використання кріопротекторів шляхом швидкого заморожування у вигляді тонкої плівки в мідній кріопетлі [3]. Відомий спосіб вітрифікації ембріональних стовбурових клітин в відкритих соломинках в розчині, що складається з 20 % ДМСО, 20 % етиленгліколю (ЕГ) та 0,5 М цукрози [4]. Недоліком цих способів є відсутність стерильності за умови використання кріоконтейнерів відкритого типу [5], що не відповідає сучасним стандартам роботи з біологічним матеріалом [6].

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб вітрифікації суспензії МСК фетальної печінки [7]. Відповідно до способу експозицію суспензії клітин з багатокомпонентним розчином кріопротекторів проводять в два етапи при кімнатній температурі. На першому етапі осад клітин протягом 2 хв ресуспендують в 50 мкл розчину, що містить 10 % ДМСО, 10 % ЕГ та 0,1 М цукрози. Далі отриману суспензію протягом 20-25 сек. змішують з 500 мкл розчину, що містить 20 % ДМСО, 20 % ЕГ та 0,5 М цукрози (17 %), після цього переносять у соломинки об'ємом 0,25 мл і занурюють у рідкий азот. Відігрівання проводять на водяній бані при 37 °С. Для видалення кріопротекторів використовують ступеневе розведення 0,75, 0,5, 0,25 та 0,125 М розчинами цукрози.

Недоліком способу є те, що він дозволяє проводити вітрифікацію суспензії клітин тільки в соломинці об'ємом 0,25 мл, що не відповідає потребам консервування МСК і біоінженерних конструкцій для експериментальних та клінічних потреб. Використання в способі кріопробірок, в яких зазвичай консервують 0,5-1,8 мл суспензії клітин, унеможливується тим, що такий тип кріоконтейнера характеризується низьким поверхнево-об'ємним співвідношенням, тому швидкість охолодження в ньому є значно нижчою, ніж у соломинці, і під час охолодження розчину з сумарною концентрацією кріопротекторів 57 % (7 моль/л), який зазначено у способі, відбувається процес нуклеації льоду [8].

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити такий спосіб вітрифікації МСК, який би дозволив вітрифікувати клітини в об'ємі не менше 0,5 мл.

Ця задача вирішується тим, що в способі вітрифікації МСК, який включає двоетапну експозицію клітин з розчином, який містить кріопротектори ДМСО, ЕГ та цукрозу, і швидке охолодження в кріоконтейнерах шляхом занурення в рідкий азот, згідно з корисною моделлю, в розчин додатково вводять кріопротектор 1,2-пропандіол (1,2-ПД) в концентрації 20 %, а як кріоконтейнери використовують кріопробірки.

Введення в розчин 1,2-ПД, який характеризується значно більшою склоформуючою здатністю, ніж ДМСО і ЕГ [9], запобігає нуклеації льоду і дає можливість отримання вітрифікації під час охолодження розчину в кріоконтейнерах з низьким поверхнево-об'ємним співвідношенням, таких як кріопробірки. Використання кріопробірок дозволяє вітрифікувати клітини в об'ємі 0,5-1,8 мл і при цьому виключає ризик контамінації біоматеріала під час вітрифікації, зберігання і транспортування в рідкому азоті відповідно до вимог належної виробничої та клінічної практики [6, 10].

Таким чином, спосіб, що заявляється, дає змогу отримати новий технічний результат, а саме здійснити вітрифікацію МСК в об'ємі не менше 0,5 мл в стерильному кріоконтейнері.

Спосіб здійснюють таким чином.

Проводять двоетапну експозицію суспензії клітин з багатокомпонентним розчином кріопротекторів при кімнатній температурі в кріопробірках. На першому етапі клітини протягом 1 хв інкубують в розчині, що містить 5 % ДМСО, 10 % ЕГ, 10 % 1,2-ПД та 0,25 М цукрози. Після цього отриману суспензію змішують з концентрованим розчином кріопротекторів так, щоб кінцеві концентрації складали 10 % ДМСО, 20 % ЕГ, 20 % 1,2-ПД та 0,5 М цукрози, і через 15-20 сек. занурюють у рідкий азот. Відігрівання проводять на водяній бані при 40 °С. Для видалення кріопротекторів використовують розведення 0,5 М розчином цукрози і культуральним середовищем з подальшим центрифугуванням. Осад клітин розводять культуральним середовищем.

Приклад 1

Суспензію МСК людини ранніх стадій органогенезу з 5-12 пасажу об'ємом 50 мкл змішували з 50 мкл розчину кріопротекторів в кріопробірці, через 1 хв додавали 400 мкл розчину кріопротекторів. Отриману суспензію клітин в розчині з концентраціями 10 % ДМСО, 20 % ЕГ, 20 % 1,2-ПД та 0,5 М цукрози занурювали в рідкий азот. Зразки зберігали у рідкому азоті протягом 1 місяця. Відігрівання проводили на водяній бані за температури 40 °С. Для видалення кріопротекторів деконсервовані зразки переносили у 0,5 М розчин цукрози (розведення 1:10), після чого повільно додавали культуральне середовище (розведення 1:2). Отриману суспензію центрифугували при 450 g протягом 10 хв.

Збереженість МСК людини ранніх стадій органогенезу, оцінена шляхом прижиттєвого забарвлення трипановим синім, в контрольній групі складала $90,3 \pm 2,9$ %. Після вітрифікації цей показник дорівнював $86,2 \pm 2,2$ %, що не відрізняється від результатів прототипу (табл.). Крім того, після вітрифікації клітини зберігали здатність прикріплюватись до культуральної поверхні. Так, ефективність адгезії, оцінена через 24 години після поміщення клітин до культуральної посудини, складала $94,2 \pm 2,8$ % в контрольній групі і $68,3 \pm 1,7$ % після вітрифікації.

При подальшому культивуванні клітин після вітрифікації спостерігали, що вони розпластувались і мали фібробластоподібну морфологію. Клітини проліферували і формували моношар на 3-5 добу культивування. Після пофарбування фіксованих зразків азур-еозином не спостерігали змін тинкторіальних властивостей ядра та цитоплазми в культурі клітин після вітрифікації порівняно з клітинами контрольної групи, що не відрізняється від результатів прототипу.

Для визначення диференціовального потенціалу суспензію клітин до та після вітрифікації вносили в лунки 24-лункового планшета та індукували остеогенне диференціювання культивуванням в середовищі, що містило 10 % сироватки ембріонів великої рогатої худоби, 100 нМ дексаметазону, 10 мМ β -гліцерофосфату, 0,2 мМ L- аскорбінової кислоти-2-фосфату (всі виробництва Sigma, США). Через 3 тижні в культурі клітин після вітрифікації і в культурі клітин контрольної групи за допомогою набору "Fast Blue RR Salt, Naphtol AS-MX Phosphate Alkaline Solution kit № 85" (Sigma, США) виявлялася експресія раннього маркера остеогенезу - лужної фосфатази. Сріблення культур за Ван Косом виявило відкладення солей кальцію, що свідчить про характерне для остеобластів накопичення мінералізованого матрикса.

При культивуванні клітин контрольної групи і клітин після вітрифікації в адипогенному середовищі, що складалось з середовища культивування, доповненого 10 % адипогенних стимулюючих добавок (Adipogenic Stimulatory Supplements № 05403 (StemCell Inc., Канада), на 3 тиждень спостерігали появу адипоцитів, які мали вигляд великих округлих клітин з вакуолями нейтральних ліпідів, що профарбовувалися масляним червоним Oil Red O (Sigma, США).

Приклад 2

Проводили експозицію суспензії МСК об'ємом 100 мкл з розчином кріопротекторів в два етапи при кімнатній температурі в кріопробірках. Отримані суспензії в розчині з концентрацією кріопротекторів 10 % ДМСО, 20 % ЕГ, 20 % 1,2-ПД та 0,5 М цукрози об'ємом 1 мл занурювали в рідкий азот. Відігрівання зразків і видалення кріопротекторів проводили, як зазначено вище. Збереженість МСК за забарвленням трипановим синім після вітрифікації в об'ємі 1 мл складала $82,9 \pm 2,4$ %, що значимо не відрізнялось від цього показника після вітрифікації в об'ємі 0,5 мл, який дорівнював $86,2 \pm 2,2$ %. Після вітрифікації в об'ємі 1 мл клітини прикріплювались до культуральної поверхні, проліферували і формували моношар. Здатність клітин до спрямованого диференціювання після вітрифікації в об'ємі 1 мл була визначена за умов культивування в остеогенному та адипогенному середовищах.

Наведені дані свідчать про те, що після вітрифікації МСК в об'ємі 0,5-1 мл за допомогою способу, що заявляється, клітини зберігають життєздатність, здатність до проліферації і спрямованого диференціювання в остеогенному та адипогенному напрямках.

Таблиця

Вплив вітрифікації на життєздатність
мезенхімальних стромальних клітин (n=6, p<0,05)

Спосіб вітрифікації	Життєздатність клітин, %	
	До вітрифікації (контроль)	Після вітрифікації
Корисна модель	90,3±2,9	86,2±2,2
Прототип	93,5±1,7	86,0±4,7

Джерела інформації:

- 5 1. The influence of cryoprotectant Me2SO on differentiation capacity of stromal stem/progenitor cells derived from human fetal liver / N.G. Skorobogatova, N.A.Volkova, A.Y. Petrenko // Cryobiology.-2007. - Vol. 55, № 3. - P. 366.
2. Effects of cryopreservation on cell viability and insulin secretion in a model tissue-engineered pancreatic substitute (TEPS) / N. Mukherjee, Z. Chen, A. Sambanis, Y. Song // Cell Transplant.-2005. - Vol. 14, № 7. - P. 449-456.
- 10 3. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability / V. Isachenko, E. Isachenko, I. Katkov, M. Montag, S. Dessole, F. Nawroth, H. Van der Ven// Biol. Reprod.-2004. - Vol. 71, № 4. - P. 1167-1173.
- 15 4. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method / B.E. Reubinoff, M.E. Pera, G. Vajta, A.O. Trounson // Hum. Reprod.-2001. - Vol.16, № 10. - P. 2187-2194.
5. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units / A. Bielanski, G. Vajta // Human Reprod.-2009.-24. - P. 2457-2467.
- 20 6. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2008 Лікарські засоби. Належна виробнича практика. - К.: Міністерство охорони здоров'я України.-2009. - С 255.
7. Comparative studies of different cryopreservation methods for mesenchymal stem cells derived from human fetal liver / P. Todorov, E. Hristova, R. Konakchieva, A. Michova, J. Dimitrov // Cell Biol. Int.-2010. - Vol.34, № 5. - P. 455-462.
- 25 8. Vitrification as an approach to cryopreservation / G.M. Fahy, D.R. MacFarlane, C A. Angell // Cryobiology.-1984. - Vol. 21, № 4. - P. 407-426.
9. Stability of the amorphous state in the system water-1,2-propanediol / P. Boutron, A. Kaufmann // Cryobiology.-1979. - Vol. 16, № 6. - P. 557-568.
- 30 10.Настанова СТ-Н МОЗУ 42-7.0:2008 Лікарські засоби. Належна клінічна практика. - К.: Міністерство охорони здоров'я України.-2009. - С. 41.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 35 Спосіб вітрифікації мезенхімальних стромальних клітин, який включає двоетапну експозицію клітин з розчином, що містить кріопротектори диметилсульфоксид, етиленгліколь та цукрозу, і швидке охолодження в кріоконтейнерах шляхом занурення в рідкий азот, який **відрізняється** тим, що в розчин додатково вводять кріопротектор 1,2-пропандіол в концентрації 20 %, а як кріоконтейнери використовують кріопробірки.

Комп'ютерна верстка Л. Купенко

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

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