



УКРАЇНА

(19) UA (11) 92678 (13) C2  
(51) МПК (2009)  
A01N 1/02  
C12N 1/04  
C12N 5/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

### (54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ КЛІТИН ДО ЗАМОРОЖУВАННЯ-ВІДІГРІВУ

1

2

(21) а200904395

(22) 05.05.2009

(24) 25.11.2010

(46) 25.11.2010, Бюл.№ 22, 2010 р.

(72) ВИСЕКАНЦЕВ ІГОР ПАВЛОВИЧ, НАРДІД ОЛЕГ АНАТОЛІЙОВИЧ, КУДОКОЦЕВА ОЛЕНА ВАЛЕНТИНІВНА, КОЩІЙ СВІТЛАНА ВОЛОДИМИРІВНА, РОЗАНОВА СВІТЛАНА ЛЕОНІДІВНА, АБ-РАФІКОВА ЛІЛІЯ ГЕННАДІВНА

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

(56) Залюбовская Н. П., Киселев Р. И. Консервирование микробов рода *Neisseria* методом глубин-

ного замораживания //Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1977. - №8. - С. 127-130

US 3852155 A 03.12.1974

UA 81368 C2 25.12.2008

US 7112576 B1 26.09.2006

(57) Спосіб підвищення резистентності клітин до заморожування-відігріву шляхом додавання до суспензії клітин перед заморожуванням біологічно активного засобу, який **відрізняється** тим, що як такий засіб використовують екстракт плаценти людини або великої рогатої худоби в концентрації 20-40 % за об'ємом.

Винахід належить до галузі кріобіології і кріомедицини і може бути використаний для кріоконсервування різних біологічних об'єктів з метою подальшого застосування в медицині, ветеринарії, сільському господарстві, біотехнологічних виробництвах.

Як відомо, найбільша кількість летальних та нелетальних пошкоджень клітин в процесі кріоконсервування відбувається на етапах заморожування-відігріву [1]. Запобігають розвитку цих пошкоджень шляхом додавання до суспензій клітин різних кріозахисних речовин - кріопротекторів [2]. Одним з провідних механізмів дії кріопротекторів є зв'язування поза- та внутрішньоклітинної води. Більшість кріопротекторів взаємодіють також із клітинними структурами, підвищуючи резистентність клітин до заморожування-відігріву.

Відомі способи підвищення резистентності до заморожування-відігріву гепатоцитів [3], тканин фетоплацентарного комплексу [4], адренокортикальної тканини [5] та ін. із застосуванням кріопротектора диметилсульфоксиду (ДМСО).

Недоліком цих способів є те, що після відігріву необхідно відмивати клітини від кріопротектору, що ускладнює процедуру кріоконсервування та призводить до втрати клітин [6]. Крім того, ДМСО має високу хімічну активність у середовищах з біологічними об'єктами, тому виникає ефект зменшення його концентрації у зразку, який заморо-

жують і, як наслідок, зниження його захисного ефекту [7].

Як альтернативу синтезованим хімічним сполукам в якості агентів, які підвищують кріорезистентність клітин, використовують природні білкові речовини. Так відомий спосіб підвищення резистентності клітин до заморожування-відігріву шляхом застосування білкових фракцій із тканин риб [8]. Однак використання цього способу обмежено тим, що технологія одержання таких речовин є складною і потребує великих матеріальних витрат.

За прототип нами обраний спосіб підвищення резистентності бактерій роду *Neisseria* до заморожування-відігріву за допомогою кінської сироватки крові [9]. Згідно зі способом, бактерії після культивування змивають з поверхні агару середовищем для консервування, яке включає 40 % фізіологічного розчину, 60 % кінської сироватки, 10 % поліетиленоксиду з м.м. 400 (ПЕО-400). Одержану суспензію бактерій вносять в кріопробірку і заморожують до -196 °С.

Недоліком цього способу є те, що ліпопротеїди, які входять до складу сироватки, ініціюють перекисне окислення ліпідів [10]. Це негативно впливає на якість клітин, суспендованих у середовищі з сироваткою. У випадку парентерального введення таких клітин можуть виникнути алергічні реакції на білки сироватки [11]. Ризик таких реакцій зростає при використанні клітинних суспензій в середови-

UA (11) 92678 (13) C2

щі, яке містить кінську сироватку крові в концентраціях 60 %. А саме така концентрація, згідно з прототипом, підвищує ефект резистентності клітин до заморожування - відігріву. Крім того, в сироватці крові можуть знаходитися збудники антропозоонних інфекційних хвороб [12].

В основу винаходу поставлено задачу створити такий спосіб підвищення резистентності клітин до заморожування - відігріву, в якому би, шляхом використання біологічно активного засобу іншого походження, забезпечувалась можливість підвищення резистентності клітин до заморожування-відігріву і зниження ризику інфікування біоматеріалу мікроорганізмами.

Ця задача вирішується тим, що в способі підвищення резистентності клітин до заморожування - відігріву шляхом додавання до суспензії клітин перед заморожуванням біологічно активного засобу, згідно з винаходом, як такий засіб використовують екстракт плаценти людини або великої рогатої худоби в концентрації 20-40 % за об'ємом.

Використання екстракту плаценти дозволяє підвищити резистентність клітин різного походження до заморожування-відігріву на 30-80 %.

Препарати екстракту плаценти при виготовленні стерилізують шляхом автоклавування, тому він не містить високомолекулярних білків-алергенів та збудників інфекційних хвороб [14]. Все це дозволяє використовувати клітини, заморожені з екстрактом плаценти, в медичній практиці (клітинна трансфузіологія, репродуктивні технології, гематологія та ін.).

Спосіб здійснюють таким чином.

До суспензії клітин додають екстракт плаценти людини або великої рогатої худоби до кінцевої концентрації 20-40 % за об'ємом. Клітинну суспензію з екстрактом плаценти витримують при кімнатній температурі протягом 10-20 хв., після чого заморожують за програмами, розробленими для даного виду біологічних об'єктів. Відігрівають зразки в водяній бані при 37-40 °С.

Спосіб пояснюється прикладами.

#### Приклад 1

Проводили порівняльне вивчення ефективності різних кріозахисних середовищ.

Клітини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, вирощені на кошеному сусло-агарі, змивали з поверхні агару середовищами для кріоконсервування: 60 % розчин кінської сироватки крові на фізіологічному розчині, у 60 % розчин сироватки крові людини на фізіологічному розчині, 20 % та 40 % розчини екстракту плаценти людини і великої рогатої худоби на фізіологічному розчині. Після витримання при кімнатній температурі протягом 10 хв. клітинні суспензії переносили в кріопробірки і заморожували до -196 °С за двома програмами:

- програма №1: охолодження до -70 °С зі швидкістю 2 °С/хв., потім занурення у рідкий азот;
- програма №2: охолодження шляхом занурення кріопробірок у рідкий азот.

Відігрівали зразки в водяній бані при 37 °С.

Резистентність клітин до заморожування-відігріву оцінювали по їх життєздатності «чашковим методом» Коха [14] за кількістю макроколоній, які сформувалися на сусло-агарі.

Після заморожування-відігріву клітин дріжджів відсоток життєздатних клітин у всіх варіантах експерименту був достовірно вище в зразках, заморожених у 20-40 % розчинах екстракту плаценти людини і великої рогатої худоби, в порівнянні зі зразками, які заморожували в 60% розчинах сироватки крові. Кількість життєздатних клітин, заморожених в екстрактах плаценти людини і великої рогатої худоби, достовірно не відрізнялась (Табл. 1).

#### Приклад 2

Проводили порівняльне вивчення ефективності різних кріозахисних середовищ на клітинах фібробластів людини, одержаних за стандартним методом із шкіри людини, заморожених до -196 °С у 60 % розчині кінської сироватки на живильному середовищі 199, у 60 % розчині сироватки крові людини на живильному середовищі 199, у 40 % екстракті плаценти людини на живильному середовищі 199, у 40 % екстракті плаценти великої рогатої худоби на живильному середовищі 199.

До суспензії фібробластів людини на живильному середовищі 199 додавали, відповідно, 60 % за об'ємом кінської сироватки, або 60 % за об'ємом сироватки крові людини, або 40 % екстракту плаценти людини, або 40 % екстракту плаценти великої рогатої худоби. Через 15 хв. отримані суспензії клітин вносили в кріопробірки. Зразки заморожували до -196 °С за таким режимом: охолодження зі швидкістю 1-3 °С/хв. до -40 °С, потім - занурення кріопробірок в рідкий азот. Після зберігання зразків при -196 °С протягом місяця їх відігрівали в водяній бані при температурі 40 °С. Резистентність клітин до заморожування-відігріву оцінювали по їх збереженості стандартним методом суправітального фарбування пошкоджених клітин фарбником трипановим синім.

Кількість збережених клітин фібробластів, заморожених в екстрактах плаценти людини і великої рогатої худоби, достовірно вища, ніж кількість збережених клітин, заморожених в 60 % розчинах кінської сироватки і сироватки крові людини. Кількість збережених клітин, заморожених в екстрактах плаценти людини і великої рогатої худоби, достовірно, не відрізнялась (Табл. 2).

#### Приклад 3

Проводили вивчення резистентності клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* і клітин фібробластів людини до заморожування-відігріву у розчинах екстракту плаценти людини різної концентрації (від 5 до 40 %).

Клітини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* суспендували у 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 % розчинах екстракту плаценти людини на фізіологічному розчині. Через 20 хв. суспензії клітин дріжджів вносили в кріопробірки і заморожували до -70 °С зі швидкістю 2 °С/хв., потім занурювали у рідкий азот;

Клітини фібробластів людини суспендували у 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 % розчинах екстракту плаценти людини на живильному середовищі 199. Через 20 хв. суспензії клітин фібробластів вносили в кріопробірки і заморожували до -196 °С шляхом занурення у рідкий азот. Через 10 діб зра-

ски відігрівали в водяній бані при температурі 40 °С.

Резистентність клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* до заморожування-відігріву оцінювали по їх життєздатності «чашковим методом» Коха за кількістю макроколоній, які сформувалися на суло-агарі. Резистентність клітин фібробластів людини до заморожування-відігріву оцінювали по їх збереженості стандартним методом суправітального фарбування пошкоджених клітин фарбником трипановим синім.

Зразки, які заморожували у 5-15 % розчинах екстрактів плаценти, містили достовірно меншу кількість життєздатних клітин дріжджів та збережених клітин фібробластів у порівнянні з 20-40 % розчинами. Починаючи з концентрації 20 % життєздатність і збереженість клітин, відповідно, дріжджів і фібробластів, не змінювалась (Табл. 3).

#### Приклад 4

Проводили порівняльне вивчення резистентності клітин, що перевиваються, лінії СПЕВ (ембріональна нирка свині) до заморожування-відігріву в живильному середовищі 199 з додаванням 60 % за об'ємом кінської сироватки або 60 % за об'ємом

сироватки крові людини та в живильному середовищі 199 з додаванням 20 % за об'ємом екстракту плаценти людини або екстракту плаценти великої рогатої худоби. Перед заморожуванням культуру клітин знімали з поверхні культурального матрацу за допомогою суміші трипсину з розчином Версена. Клітини осаджували центрифугуванням і ресуспендували у відповідних середовищах для кріоконсервування. Зразки охолоджували зі швидкістю 1°С/хв. до -40 °С з подальшим занурюванням у рідкий азот. Після зберігання зразків при -196 °С протягом місяця їх відігрівали в водяній бані при температурі 40 °С. Резистентність клітин до заморожування-відігріву оцінювали по їх збереженості стандартним методом суправітального фарбування пошкоджених клітин фарбником трипановим синім.

Збереженість клітин лінії СПЕВ, заморожених в 20 % розчинах екстракту плаценти людини або великої рогатої худоби, достовірно вища від збереженості клітин, заморожених в середовищі 199 з додаванням 60 % за об'ємом кінської сироватки або 60 % за об'ємом сироватки крові людини (Табл. 4).

Таблиця 1

Резистентність клітин *Saccharomyces cerevisiae* до заморожування-відігріву в залежності від середовища заморожування, n=18.

Середовище консервування	Програма охолодження	Кількість життєздатних клітин в 1 мл $\left( \pm S\bar{x} \right) \cdot 10^8$	P1	P2	P3
60 % розчин кінської сироватки на фізіологічному розчині	Контроль до заморожування	5,05±0,3	-	-	-
	Програма №1	3,0±0,52	<0,05	-	-
	Програма №2	1,2±0,03	<0,05	<0,05	-
60 % розчин сироватки людини на фізіологічному розчині	Контроль до заморожування	6,0±0,3	-	-	-
	Програма №1	3,3±0,2	<0,05	-	-
	Програма №2	2,5±0,3	<0,05	<0,05	<0,05
20 % розчин екстракту плаценти людини	Контроль до заморожування	4,5±0,2	-	-	-
	Програма №1	3,5±0,2	<0,05		<0,05
	Програма №2	2,7±0,2	<0,05	<0,05	<0,05
40 % розчин екстракту плаценти людини	Контроль до заморожування	4,8±0,3	-	-	-
	Програма №1	3,9±0,2	<0,05		<0,05
	Програма №2	2,9±0,3	<0,05	<0,05	<0,05
20 % розчин екстракту плаценти великої рогатої худоби	Контроль до заморожування	5,8±0,3	-	-	-
	Програма №1	4,6±0,3	<0,05		<0,05
	Програма №2	3,1±0,3	<0,05	<0,05	<0,05
20 % розчин екстракту плаценти великої рогатої худоби	Контроль до заморожування	5,1±0,3	-	-	-
	Програма №1	4,2±0,2	<0,05	-	<0,05
	Програма №2	3,0±0,3	<0,05	<0,05	<0,05

Примітка: P1 - рівень довірчої імовірності між кількістю життєздатних клітин до та після заморожування; P2 - рівень довірчої імовірності між кількістю життєздатних клітин після заморожування за програмами №1 і №2, P3 - рівень довірчої імовір-

ності між відсотком кількості життєздатних клітин, заморожених за відповідними програмами у 60 % розчині кінської сироватки та в інших випробуваних середовищах консервування.

Таблиця 2

Резистентність клітин фібробластів людини до заморожування-відігріву в залежності від середовища заморожування, n=18.

Середовище консервування	Умови експерименту	% збережених клітин $\bar{x} \pm S\bar{x}$	P1	P2
60 % розчин кінської сироватки на середовищі 199	Контроль, до заморожування	100	-	-
	Заморожування до -196 °C	54±2,5	<0,05	-
60 % розчин сироватки крові людини на середовищі 199	Контроль, до заморожування	100	-	-
	Заморожування до -196 °C	56,2±3,1	<0,05	>0,05
40 % розчин екстракту плаценти людини на середовищі 199	Контроль, до заморожування	100	-	-
	Заморожування до -196 °C	74,2±3,5	<0,05	<0,05
40 % розчин екстракту плаценти великої рогатої худоби на середовищі 199	Контроль, до заморожування	100	-	-
	Заморожування до -196 °C	73,5±3,8	<0,05	<0,05

Примітка: P1- рівень довірчої імовірності між відсотком кількості збережених клітин фібробластів до і після заморожування; P2 - рівень довірчої імовірності між відсотком збережених клітин фіб-

робластів, заморожених у 60 % розчині кінської сироватки та в інших випробуваних середовищах консервування.

Таблиця 3

Резистентність клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* і клітин фібробластів людини до заморожування-відігріву у розчинах екстракту плаценти людини різної концентрації (від 5 до 40 %), n=18.

Концентрація екстракту, %	Життєздатність дріжджів <i>Saccharomyces cerevisiae</i> після заморожування $\bar{x} \pm S\bar{x}$	P	% збережених клітин фібробластів людини після заморожування $\bar{x} \pm S\bar{x}$	P
5	61±3	<0,05	48,6±4	<0,05
10	65,1±1,6	0,05	52,3±2,7	<0,05
15	69,0±3,2	<0,05	60,0±3	<0,05
20	81,5±2	-	73,2±3,5	-
30	81,1±3,5	>0,05	74,4±3	>0,05
40	83±3	>0,05	73,9±3,2	>0,05

Примітка: P - рівень довірчої імовірності між відсотком життєздатних клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* і відсотком кількості збе-

режених клітин фібробластів, заморожених в 20 % розчинах екстракту плаценти та в розчинах екстракту плаценти з іншими концентраціями.

Таблиця 4

Порівняльне вивчення резистентності клітин, що переживаються, лінії СПЕВ до заморожування-відігріву в залежності від середовища заморожування, n=18.

Середовище консервування	Умови експерименту	% збережених клітин $\bar{x} \pm S\bar{x}$	P1	P2
60 % розчин кінської сироватки на середовищі 199	Контроль, до заморожування	100	-	-
	Заморожування до -196 °C	72±2,5	<0,05	-
60 % розчин сироватки крові людини на середовищі 199	Контроль, до заморожування	100	-	-
	Заморожування до -196 °C	69±3,1	<0,05	>0,05
20 % розчин екстракту плаценти людини на середовищі 199	Контроль, до заморожування	100	-	-
	Заморожування до -196 °C	84±3,5	<0,05	<0,05
20 % розчин екстракту плаценти великої рогатої худоби на середовищі 199	Контроль, до заморожування	100	-	-
	Заморожування до -196 °C	85±3,8	<0,05	<0,05

Примітка: P1- рівень довірчої імовірності між відсотком кількості збережених клітин лінії СПЕВ до та після заморожування; P2 - рівень довірчої імовірності між відсотком збережених клітин лінії СПЕВ, заморожених у 60 % розчині кінської сиро-

ватки та в інших випробуваних середовищах консервування.

Джерела інформації:

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология. - Киев: Наук, думка, 1994. - С.32-51.

2. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы. - Киев: Наук, думка, 1978. - 304с.

3. Патент №2010 UA, A61K47/00. Публ.20.12.1994.

4. Патент №30808 UA, A01N1/02. Публ. 15.12.2000.

5. Патент №34848A UA, C12N5/02. Публ. 15.03.2001.

6. Машковский М.Д. Лекарственные средства. - М.: ООО «Издательство Новая Волна»: Издатель СБ. Дидов. - 2002. - Т.1. - 14 изд. - С.175-176.

7. Боброва Е.Н., Зинченко А.В., Щетинский М.И. Динамика насыщения ткани плаценты диметилсульфоксидом // Проблемы криобиологии. - 2005. - Т.15, №1. - С. 20-26.

8. Fish antifreeze proteins/ Editors K.V.Ewart, C.L. Hew. World Scientific. London, 2002. - P. 187-213.

9. Залюбовская Н.П., Киселев Р.И., Морозова Н.С., Семишев В.И. Консервирование микробов рода *Neisseria* методом глубинного замораживания //Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии. - 1977. - №8. - С. 127-130.

10. Жибурт Е.Б. 3 Всемирный форум по гемофилии: вопросы трансфузиологии //Трансфузиология. - 2004. - Т.5, №3. - С. 104-131.

11. Барбер Х.Р.К. Иммунобиология для практических врачей. - М.: Медицина. - 1980. - С. 91-98.

12. Гураль А.Л., Криштоф А.Н., Шагинян В.Р. и др. Оптимизация методов обеспечения вирусной безопасности в службе крови //Лабораторная диагностика. - 2004. - №3. - С. 3-9.

13. Машковский М.Д. Лекарственные средства. - М.: Медицина. - 1984. - 4.2. - С.136-137.

14. Луста К.Е., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов /Ред. Ерошин В.К. - Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СССР. - 1990. - 186с.