(19) U (11) 157988 (13) UA

(98) вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61016
(85) null
(74) null
(45) [2024-12-18]
(43) null
(24) 2024-12-19
(22) 2024-05-20
(12) Патент на корисну модель
(21) u202402674
(46) 2024-12-18

(86)
(30)
(54) СПОСІБ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЕРИТРОЦИТІВ СОБАКИ METHOD OF CRYOPRESERVATION OF DOG RED BLOOD CELLS
(56)
(71) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ UA 03534630 I NSTITUTE FOR PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY AND CRYOMEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF UKRAINE UA 03534630
(72) Шпакова Наталія Михайлівна UA Shpakova Nataliia Mykhailivna UA Гуріна Тетяна Михайлівна UA Hurina Tetia na Mykhailivna UA Єршова Наталя Анатоліївна UA Yershova Natalia Anatoliivna UA Ніпот Олена Євгенівна UA Nipot Olena Yevhenivna UA Руденко Сергій Віталійович UA Rudenko Serhii Vitaliiovych UA
(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ UA 03534630 I NSTITUTE FOR PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY AND CRYOMEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF UKRAINE UA 03534630

Корисна модель належить до галузі кріобіології і ветеринарії та може бути використана для низькотемпературного консервування еритроцитів собаки для їх подальшої трансфузії.

Останнім часом у ветеринарії зріс попит на кріоконсервовану кров різних видів тварин через те, що досить часто виникають ситуації, коли необхідно швидко відновити втрату крові твариною, але відповідного донора в цей момент неможливо знайти, через що тварина зазвичай гине на операційному столі. Найчастішим показанням для трансфузії є гостра або хронічна крововтрата, а також анемії різного ґенезу.

На сьогоднішній день, особливо гостра ця проблема стоїть для таких тварин, як собаки, бо саме спеціально навчені службові собаки долучаються до пошукових робіт під час обвалу багатоповерхових будинків, розмінування, пошуку зброї і вибухівки та, навіть, при фізичній реабілітації військових. Навчання службових собак коштує чималих грошей та займає багато часу, тому використання трансфузії крові тваринам з лікувальною метою знаходить усе більше застосування у сучасній ветеринарній практиці. Отже, створення запасів кріоконсервованої донорської крові тварин допоможе у вирішенні цього питання.

Відомий спосіб кріоконсервування еритроцитів собаки [Bala DA, Ozcan M. The effects of freezing on long-term storage of canine erythrocytes. Pol J Vet Sci. 2016. - 19(2). - 401-6], який включає піддавання зразків тристадійній гліцеринізації, заморожування та зберігання за температури -80 °С, розморожування на водяній бані за температури 36-38 °С та піддавання розморожених клітин дегліцеринізації. Збереженість клітин складає 70-80 %.

Недоліком відомого способу є тривала та складна процедура введення кріопротектора в суспензію клітин та його видалення після розморожування.

Відомий спосіб кріоконсервування еритроцитів собаки [Pogozhykh D, Pakhomova Y, Pervushina O, Hofmann N, Glasmacher B, Zhegunov G Exploring the Possibility of Cryopreservation of Feline and Canine Erythrocytes by Rapid Freezing with Penetrating and Non-Penetrating Cryoprotectants. PLoS ONE. 2017. - 12(1). - e0169689. doi: 10.1371/journal.pone.0169689], який включає швидке охолодження клітин собаки до -196 °С з використанням проникного кріопротектора гліцерину з концентрацією 5-20 %, який додають до еритроцитів у співвідношенні 1:1 (об/об), інкубують впродовж 10-30 хв. за температури 22 °С, потім заморожують шляхом занурення в рідкий азот, розморожування зразків на водяній бані за температури 42 °С при постійному струшуванні, а відмивання розморожених еритроцитів від гліцерину проводять методом серійного центрифугування.

Недоліком способу є високий рівень гемолізу еритроцитів 75-99 %, що свідчить про низьку збереженість еритроцитів собаки і недоцільність використання гліцерину для консервування еритроцитів собаки.

Найближчим аналогом корисної моделі є спосіб консервування еритроцитів собаки [Bala DA, Özcan M. The effects of freezing on long-term storage of canine erythrocytes. Pol J Vet Sci. 2016. - 19(2). - 401-6], який включає додавання до еритроцитів крові диметилсульфоксиду (ДМСО) з концентрацією 10 %, інкубування отриманої суспензії еритроцитів у кріопротекторі протягом 20 хв. за температури 22 °С, заморожування у кріопробірках об'ємом 5 мл до -196 °С шляхом занурення у рідкий азот, відтаювання на водяній бані за температури 42 °С при постійному струшуванні, відмивання тричі розморожених еритроцитів від ДМСО методом серійного центрифугування із застосуванням розчину 0,6 М NaCl та двічі розчином 0,15 М NaCl. Рівень гемолізу клітин складає 42,41±1,06 %.

Недоліком найближчого аналога є високий рівень гемолізу за рахунок втрати великої кількості клітин під час заморожування і при відмиванні їх від кріопротектора.

В основу корисної моделі поставлена задача створити спосіб кріоконсервування еритроцитів собаки, який за рахунок зміни режиму охолодження забезпечує можливість підвищити збереженість еритроцитів.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі кріоконсервування еритроцитів собаки, який включає додавання до еритроцитів кріопротектора диметилсульфоксиду з концентрацією 10 % за температури 22 °С, інкубування отриманого розчину протягом 20 хв, його заморожування до -196 °С шляхом занурення кріопробірки з розчином у рідкий азот, відтавання на водяній бані, відмивання розморожених еритроцитів від кріопротектора методом серійного центрифугування, згідно з корисною моделлю, попередньо перед заморожуванням занурюють у рідкий азот 2-3 мм нижньої частини кріопробірки з розчином та витримують протягом 18-20 секунд, а відтавання проводять за температури 38-40 °С.

Застосування режиму охолодження з попереднім утворенням початкового центру кристалізації в нижній частині кріопробірки за рахунок утворення початкового центру кристалізації та направленого росту кристалів льоду вздовж стінок пробірки дає можливість зменшити механічне пошкодження клітин під час заморожування, що забезпечує низький рівень гемолізу еритроцитів.

Проведення відтавання за температури 38-40 °С обумовлено фізіологічним значенням температури тіла собаки.

У Таблиці наведено гемоліз еритроцитів собаки після кріоконсервування способом за корисною моделлю та аналогів.

Спосіб пояснюється наступним прикладом.

Приклад. Спосіб консервування еритроцитів собаки.

Для кріоконсервування беруть 5 мл еритромаси з крові собаки, заготованої на цитратно-глюкозному антикоагулянтному консерванті. До еритромаси у співвідношенні 1:1 додають 20 %-ий розчин кріопротектора ДМСО, виготовленого на фізіологічному розчині та 0,01 М фосфатному буфері, pH 7,4. Додавання проводять за температури 22 °С до кінцевої концентрації кріопротектора 10 %. Отриману суспензію еритроцитів інкубують у кріопротекторі протягом 20 хв. за температури 22 °С, потім розливають у кріопробірки об'ємом 10 мл і заморожують до -196 °С шляхом занурення у рідкий азот з попереднім витримуванням нижньої частини кріопробірки 2 мм у рідкому азоті протягом 20 секунд та відтають на водяній бані за температури 38 °С. Відмивання тричі розморожених еритроцитів від ДМСО методом серійного центрифугування із застосуванням розчину 0,6 М NaCl та двічі розчином 0,15 М NaCl.

Таблиця

	Спосіб кріоконсервування		
Показники гемолізу після відповідного етапу	Заморожування способом за корисною моделлю	Заморожування в парах азоту з подальшим зануренням у рідкий азот	Заморожування шляхом занурення у рідкий азот
Гемоліз еритроцитів після заморожування, %	17±3	61±6	22±4
Гемоліз еритроцитів після процедури відмивання, %	11±2	12±3	16±3
Загальний гемоліз еритроцитів, %	28±5	73±10	38±6

Збереженість еритроцитів оцінюють по рівню їх гемолізу, який визначають спектрофотометричним методом при довжині хвилі 543 нм і виражають у відсотках відносно 100 %-го гемолізу клітин. За 100 % приймають поглинання зразка, до якого додають детергент тритон Х-100 у концентрації 0,1 %. Загальний гемоліз складається з гемолізу після відтавання заморожених еритроцитів та гемолізу після процедури відмивання клітин від кріопротектора. Вимірювання гемолізу після кожної процедури дозволяє окремо оцінити їх внесок у загальне пошкодження клітин (Таблиця).

Із Таблиці видно, що оптимальним режимом охолодження еритроцитів собаки є заморожування способом за корисною моделлю. Підвищення збереженості клітин забезпечується за рахунок удосконалення режиму заморожування.

Створено спосіб кріоконсервування еритроцитів собаки, який забезпечує підвищення збереженості еритроцитів та можливість їх подальшого використання для потреб медичної ветеринарії.

The method of cryopreservation of dog erythrocytes involves adding dimethyl sulfoxide with a concentration of 10% to the erythrocytes at 22 °C, incubating the resulting solution for 20 minutes, freezing it to -196 °C by immersing the cryotube with the solution in liquid nitrogen, thawing it in a water bath, and washing the thawed erythrocytes from the cryoprotectant by serial centrifugation. This method involves immersing 2-3 mm of the lower part of the cryotube with the solution in liquid nitrogen before freezing and holding it for 18-20 seconds, and thawing at a temperature of 38-40 °C.

Спосіб кріоконсервування еритроцитів собаки включає додавання до еритроцитів кріопротектора диметилсульфоксиду з концентрацією 10 % за температури 22 °С, інкубування отриманого розчину протягом 20 хв, його заморожування до -196 °С шляхом занурення кріопробірки з розчином у рідкий азот, відтавання на водяній бані, відмивання розморожених еритроцитів від кріопротектора методом серійного центрифугування. При якому попередньо перед заморожуванням занурюють у рідкий азот 2-3 мм нижньої частини кріопробірки з розчином та витримують протягом 18-20 секунд, а відтавання проводять за температури 38-40 °С.

Спосіб кріоконсервування еритроцитів собаки, який включає додавання до еритроцитів кріопротектора диметилсульфоксиду з концентрацією 10 % за температури 22 °С, інкубування отриманого розчину протягом 20 хв, його заморожування до -196 °С шляхом занурення кріопробірки з розчином у рідкий азот, відтавання на водяній бані, відмивання розморожених еритроцитів від кріопротектора методом серійного центрифугування, який **відрізняться** тим, що попередньо перед заморожуванням занурюють у рідкий азот 2-3 мм нижньої частини кріопробірки з розчином та витримують протягом 18-20 с, а відтавання проводять за температури 38-40 °С.