УКРАЇНА

(19) UA (11) 80062 (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 ЦІЛЬНОЇ КОРДОВОЇ КРОВІ

(21) a200602122
(22) 27.02.2006
(24) 10.08.2007
(46) 10.08.2007, Бюл. № 12, 2007 р.
(72) Бабійчук Любов Олександрівна, Грищенко Валентин Іванович, Гуріна Тетяна Михайлівна, Рязанцев Володимир Васильович, Зубова Оксана Леонідівна, Зубов Павло Михайлович
(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ
(56) UA A 60238, 15.09.2003.
UA C1 2006, 20.12.94.
UA A 31847, 15.12.2000.
UA A 30888, 15.12.2000.
RU C1 2051580, 10.01.96.
Холодний В.С. Вивчення процесів, що відбуваються на різних етапах низькотемпературного кріоконсервування в суспензіях ядерних клітин кісткового мозку і кордової крові. Автореф. дис. ... канд.біол.наук. Харків, 2003.
(57) Спосіб кріоконсервування цільної кордової крові, що включає поступове дозоване додавання при температурі 0-4 °С 30%-го розчину кріопротектора поліетиленоксиду молекулярної маси 1500, виготовленого на фізіологічному розчині, до кінцевої концентрації 15% і заморожування до температури -196 °С шляхом занурення у рідкий азот, який **відрізняється** тим, що перед зануренням у рідкий азот кров охолоджують до температури -40...-45 °С зі швидкістю 60-70 °С/хв.

Винахід належить до галузі кріобіології та кріомедицини і може бути використаний для низькотемпературного консервування цільної кордової крові з метою її подальшої трансфузії.

Останнім часом цільна кордова кров, яка містить у собі велику кількість еритроцитів, ядровмісних клітин та біологічно активних речовин плазми, знаходить усе більше застосування у клінічній практиці. Тобто цільна кордова кров є комплексним препаратом, в якому терапевтичний ефект від дії клітин підсилюється біологічно активними речовинами плазми крові. Усе частіше кордову кров використовують як альтернативне кістковому мозку джерело гемопоетичних стовбурових клітин.

Проблема кріоконсервування цільної кордової крові надзвичайно складна. Це пов'язано з тим, що для еритроцитів та ядровмісних клітин, які входять до складу цільної кордової крові, для ефективного кріоконсервування застосовують як різні типи кріопротекторів, так і зовсім протилежні по швидкостям охолодження режими заморожування. Для еритроцитів найчастіше використовують великі швидкості заморожування, в той час як для ядровмісних клітин більш придатні повільні швидкості. Для кріоконсервування еритроцитів частіше використовують проникаючі кріопротектори, зокрема гліцерин, які після розморожування обов'язково треба відмивати. Для цільної кордової крові це стає неможливим, тому що при відмиванні кріопротектора в суспензії залишаються лише еритроцити, а ядровмісні клітини та плазма втрачаються.

Існує спосіб кріоконсервування еритроцитів донорської крові з непроникаючим кріопротектором поліетиленоксидом молекулярної маси 1500 (ПЕО-1500) [1]. Згідно зі способом кріопротектор додають до еритроцитів поетапно: спочатку додають 10-15%-ний розчин ПЕО-1500, а потім 35-40%-ний, але у кожному разі зберігають встановлену для даного кріопротектора оптимальну кінцеву концентрацію 15%. Отриману еритрозавись заморожують шляхом занурення у рідкий азот. Відігрів здійснюють на водяній бані при температурі 42-45°С. Недоліком цього способу кріоконсервування є те, що він може бути використаний тільки для одного компонента донорської крові - еритроцитів, тому що високі швидкості охолодження не придатні для заморожування ядровмісних клітин кордової крові.

Відомий спосіб кріоконсервування кровотворних клітин кордової крові [2], згідно з яким клітини змішують з непроникаючим кріопротектором декстраном молекулярної маси 60000 у концентрації

(19) UA (11) 80062 (13) C2

1,2%, охолоджують до -27...-28°С зі швидкістю 1-4°С/хв, витримують при цій температурі впродовж 15-20 хвилин і далі занурюють в рідкий азот. Розморожування здійснюють на водяній бані при температурі 41°С. Кількість збережених ядерних клітин, що визначено за методом суправітального забарвлення трипановим синім, після розморожування становить 97,1%, кількість життєздатних кровотворних клітин - попередників (КУОк) в суспензіях нативних (контроль) і кріоконсервованих клітин, що визначено за методом культивування в агарі, складає 79,4%.

Суттєвим недоліком даного способу є те, що його можна використовувати лише для кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові та її плазми, тому що повільні швидкості охолодження не придатні для заморожування еритроцитів.

Найбільш близьким до заявленого є спосіб консервування еритроцитів [3], згідно з яким до еритроцитів донорської крові при 0-4°С дозовано по краплям з інтервалом 4-6 хвилин додають однаковими порціями 30%-ний розчин непроникаючого кріопротектора ПЕО-1500, який приготовлено на фізіологічному розчині хлористого натрію, до кінцевої концентрації 15%. Потім отриману еритрозавись переносять у контейнер і заморожують до -196°С шляхом занурення у рідкий азот. Відігрів здійснюють на водяній бані при температурі 42-44°С. Після розморожування гемоліз еритроцитів становить 1,5%. Схоронність клітин після розморожування складає 98,5%. Осмотична крихкість складає 9,4%.

Недоліком цього способу є те, що він може бути застосований лише для кріоконсервування еритроцитів. Використання у даному способі високих швидкостей охолодження не дає змоги застосовувати його для кріоконсервування цільної кордової крові, тому що не забезпечує високий рівень схоронності ядровмісних клітин, які заморожують переважно з повільними швидкостями.

В основу винаходу поставлено задачу створити такий спосіб кріоконсервування цільної кордової крові, який би за рахунок зміни режиму охолодження забезпечив схоронність усіх компонентів кордової крові - як еритроцитів, так і ядровмісних клітин та плазми, на достатньо високому рівні, який потрібен для клінічних трансфузій.

Ця задача вирішується тим, що у способі кріоконсервування, який включає поступове дозоване додавання при температурі 0-4°С 30%-го розчину кріопротектора ПЕО-1500, виготовленого на фізіологічному розчині, до кінцевої концентрації 15% і заморожування до температури -196°С шляхом занурення у рідкий азот, згідно з винаходом, перед зануренням у рідкий азот кров охолоджують до температури -40...-45°С зі швидкістю 60-70°С/хв.

Спосіб кріоконсервування цільної кордової крові, що пропонується, дає можливість забезпечити схоронність усіх компонентів цільної кордової крові на достатньо високому рівні, який потрібен для практичного клінічного застосування.

Спосіб пояснюється наступними прикладами.

Приклад 1. Для кріоконсервування брали 50мл кордової крові людини, яка була заготовлена на консерванті "Глюгицир" із вени, що пульсує, після нормальних пологів. До цільної кордової крові у співвідношенні 1:1 дозовано по 1/10 від загального об'єму додавали 30%-ний розчин кріопротектора ПЕО-1500, який було виготовлено на фізіологічному розчині NaCl та 0,01мМ фосфатном буфері. Дозоване додавання проводили при температурі 0-4°С з інтервалом 4-6 хвилин до кінцевої концентрації кріопротектора 15%. Завись, що отримали, розливали у кріопробірки і заморожували: від 0...4°С до температури -40...-45°С зі швидкістю 60-70°С/хв з подальшим занурюванням у рідкий азот. Відігрівали на водяній бані при температурі 42-44°С. Схоронність еритроцитів після розморожування оцінювали по рівню їх гемолізу. Після розморожування гемоліз еритроцитів був 3,85%, осмотична крихкість - 16%. Схоронність ядровмісних клітин визначали за допомогою метода проточної цитофлюориметрії на проточному цитометрі FACS Calibur з використанням реагентів Becton Dickinson згідно з міжнародним ISHAGE протоколом. Вона складала 82%. Якість плазми визначали за кількістю біологічно активних речовин різного генезу, що зберігалися після кріоконсервування, а саме, за допомогою метода ІФА у плазмі кордової крові вимірювали концентрації трийодтироніна (1,1нМоль/л), тироксина (61нМоль/л), тиреотропного гормона (4,6МЕ/л), тестостерона (4,8нМоль/л) та альфа-фетопротеїна (2950мг/л).

Приклад 2. Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що охолодження до температури -40...-45°С проводили з різними швидкостями. Результати по схоронності еритроцитів та ядровмісних клітин наведено у таблиці 1, з якої видно, що оптимальною швидкістю охолодження є 60-70°С/хв. Кількість біологічно активних речовин різного генезу у плазмі кордової крові лишалося незмінним в незалежності від швидкості охолодження (таблиця 3).

Приклад 3. Спосіб здійснювали аналогічно прикладу 1, за винятком того, що перед занурюванням у рідкий азот охолодження проводили до різної кінцевої температури. Результати по схоронності еритроцитів та ядровмісних клітин наведено у таблиці 2, з якої видно, що ефективними є температури -40°С та нижче, однак знижувати кінцеву температуру охолодження більш, ніж до -45°С не є доцільним, тому що на схоронність клітин це не впливає, але вимагає додаткового часу та збільшує витрати рідкого азоту. Тому оптимальною кінцевою температурою охолодження перед занурюванням у рідкий азот є -40...-45°С. Кількість біологічно активних речовин різного генезу у плазмі кордової крові лишалося незмінним в незалежності від кінцевої температури охолодження перед занурюванням у рідкий азот (таблиця 3).

Таблиця 1

Схоронність компонентів цільної кордової крові в залежності від швидкості охолодження

Швидкість охолодження, °С/хв	50	60	70	80
Гемоліз еритроцитів, %	6,0±0,95	3,85±0,71	4,0±0,56	2,74±0,28
Схоронність ядровмісних клітин, %	81,0±2,4	82,0±1,5	80,5±2,3	58,1±4,2

Таблиця 2

Схоронність компонентів цільної кордової крові в залежності
від кінцевої температури охолодження перед занурюванням у рідкий азот

Кінцева температура охолодження, °С	-20	-40	-45	-60	-70
Гемоліз еритроцитів, %	2,5±0,17	3,85±0,71	4,0±0,56	3,8±0,42	3,6±0,68
Схоронність ядровмісних клітин, %	65,4±5,1	82,0±1,5	80,5±2,3	81,7±3,2	82,1±1,4

Таблиця 3

Кількість біологічно активних речовин у плазмі кордової крові в залежності
від швидкості охолодження та кінцевої температури охолодження перед занурюванням у рідкий азот

Біологічно активні речовини	Нативна кордова плазма	Швидкість охолодження, °С/хв.				Кінцева температура охолодження, °С			
		50	60	70	80	-20	-40	-45	-60
Трийодтиронін, нМоль/л	1,1	1,2	1,1	1,2	1,0	1,0	1,2	1,1	1,1
Тироксин, нМоль/л	65	60	61	62	60	60	61	62	61
Тиреотропний гормон, МЕ/л	4,7	4,6	4,7	4,5	4,5	4,4	4,6	4,4	4,5
Тестостерон, нМоль/л	5,0	4,7	4,9	4,8	4,6	4,6	4,8	4,9	4,8
Альфа-фето-протеїн, мг/л	3300	2900	2950	3000	2850	2880	2900	2950	2850

Джерела інформації

1. Липина О.В., Бредихина Л.П., Шраго М.И. Способ криоконсервирования эритроцитов. Патент Украины №2006, A01N1/02, 20.12.1994.

2. Цуцаєва А.О., Грищенко В.І., Кудокоцева О.В., Щеглов А.В., Тупчиєнко Г.С., Прокопюк О.С. Спосіб кріоконсервування кровотворних клітин кордової крові. Патент України №31847 А, A01N1/02, 15.12.2000.

3. Бабійчук Л.О., Грищенко В.І., Суміда С, Бондаренко В.А., Землянських Н.Г., Бондаренко Т.П. Спосіб консервування еритроцитів. Патент України №30888А , A01N1/02, 15.12.2000.

Комп'ютерна верстка О. Гапоненко Підписне Тираж 26 прим.

Міністерство освіти і науки України

Державний департамент інтелектуальної власності, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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