



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **107969**

(13) **U**

(51) МПК

A01N 1/02 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 00063**

(22) Дата подання заявки: **04.01.2016**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **24.06.2016**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **24.06.2016, Бюл.№ 12**

(72) Винахідник(и):

Сидоренко Ольга Сергіївна (UA),

Божок Галина Анатоліївна (UA),

Легач Євген Іванович (UA),

Бондаренко Тетяна Петрівна (UA)

(73) Власник(и):

ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І

КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ

АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,

вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015
(UA)

(54) СПОСІБ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ КЛІТИН НАДНИРНИКІВ НОВОНАРОДЖЕНИХ ПОРОСЯТ

(57) Реферат:

Спосіб кріоконсервування клітин наднирників новонароджених поросят включає заморожування клітин зі швидкістю 1 °/хв. до -40 °С в кріозахисному середовищі, що містить 10 % ДМСО. Перед заморожуванням клітини культивують протягом 3-5 діб, а в кріозахисне середовище додатково вводять фетальну телячу сироватку концентрацією 25 %.

UA 107969 U

Корисна модель належить до кріобіології і кріомедицини і може бути використана для довгострокового зберігання первинної культури клітин наднирників новонароджених поросят (ПККННТТ) з метою подальшого її використання в експериментальній та клінічній медицині.

Різноманіття клітинного складу наднирників і, як наслідок, широкий спектр речовин, які в них секретуються, обумовлює можливість використання клітин наднирників в якості трансплантата при лікуванні багатьох патологій: первинної та вторинної гормональної надниркової недостатності, полегшенні больових відчуттів при травмах і на термінальних стадіях онкологічних захворювань. Крім цього, деякі популяції клітин наднирників здатні до спонтанного та індукованого диференціювання, а також трансдиференціювання в нейрональному напрямку, що дозволяє використовувати їх для лікування нейродегенеративних патологій в експериментальних умовах та клінічній медицині.

Відомий спосіб, який включає заморожування клітин наднирників новонароджених поросят у кріозахисному середовищі, що містить 5 % ДМСО, зі швидкістю охолодження 0,5-1 7хв. до -70...-72 °С [1].

Недоліками цього способу є зниження гормоносекретуючої активності клітин після кріоконсервування, яка становила 85 % в порівнянні з нативними клітинами.

Найбільш близьким до заявленого є спосіб кріоконсервування клітин наднирників новонароджених поросят, в якому клітини заморожують зі швидкістю 1°/хв... до -40 °С у кріозахисному середовищі, що містить 10 % ДМСО [2].

Недоліками цього способу є низька збереженість (50 %) та життєздатність (5 %) клітин після кріоконсервування.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити такий спосіб кріоконсервування клітин наднирників новонароджених поросят, який би дозволив підвищити їх збереженість та життєздатність.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі кріоконсервування клітин наднирників, який включає заморожування клітин зі швидкістю 1°/хв... до -40 °С в кріозахисному середовищі, що містить 10 % ДМСО, згідно з корисною моделлю, перед заморожуванням клітини культивують протягом 3-5 діб, а в кріозахисне середовище додатково вводять фетальну телячу сироватку (ФТС) концентрацією 25 %.

Попереднє культивування дозволяє адаптувати клітини до умов *in vitro*, при цьому відбувається відновлення клітин, пошкоджених під час отримання клітинної суспензії внаслідок дії ферментів або механічних факторів.

Після кріоконсервування запропонованим способом зберігається 79 % клітин із життєздатністю 87 %, які є функціонально активними та придатними для подальшого культивування та використання в експериментальних дослідженнях.

Спосіб здійснюють таким чином.

Клітини, отримані ферментативним методом, культивують протягом 3-5 діб при 37 °С в умовах 5 % CO₂ в середовищі DMEM/F12 в культуральних флаконах з площею поверхні 25 см², посадкова концентрація клітин -1-3 млн/мл, по 4 мл клітинної суспензії у кожному флаконі. Коли конфлюентність моношару досягає близько 70 %, клітини відкріплюють за допомогою суміші розчинів трипсину та Версена (у співвідношенні 1:1, при цьому кінцева концентрація трипсину складає 0,25 %). Після видалення трипсину шляхом відмивання клітини концентрують у 0,5 мл живильного середовища і додають рівний об'єм кріозахисного середовища з 20 % ДМСО та 50 % ФТС (кінцева концентрація цих речовин в середовищі становить 10 % та 25 %, відповідно). Заморожування клітин здійснюють на програмному заморожувачі зі швидкістю охолодження 1°/хв. від кімнатної температури до -40 °С, після чого занурюють у рідкий азот. Відтаювання заморожених зразків здійснюють на водяній бані при +40 °С до зникнення твердої фази. Після відмивання клітини рекультивують при 37 °С, 5 % CO₂ в середовищі DMEM/F12 3 10 % ФТС.

Приклад.

Клітини культивували та відкріплювали за описаним методом, після чого заморожували в кріозахисних середовищах, які містили 10 % ДМСО з додаванням 25 % ФТС або без ФТС. Після відтаювання визначали кількість збережених клітин та їх життєздатність. Для контролю брали клітини без попереднього культивування та заморожували їх в кріозахисному середовищі, що містило 10 % ДМСО (за прототипом). Результати наведено в Таблиці, з якої видно, що попереднє культивування клітин протягом 3-5 діб перед заморожуванням дозволяє підвищити їх збереженість на 24,6 % та життєздатність на 12,4 % в порівнянні з заморожуванням клітин без попереднього культивування. Додавання ФТС у концентрації 25 % до кріозахисного середовища дозволяє додатково підвищити збереженість та життєздатність клітин на 6,1 % та 8,6 %, відповідно.

- В усіх зразках клітин, які культивувалися перед заморожуванням, в процесі подальшого рекультивування спостерігалось формування моношару, утворення цитосфер та спонтанне диференціювання/трансдиференціювання клітин в нейрональному напрямку. При рекультивуванні клітин, які були заморожені одразу після отримання, моношар не утворювався, а формування цитосфер та диференціювання/трансдиференціювання клітин в нейрональному напрямку не спостерігалось.

Таблиця

Збереженість та життєздатність клітин в залежності від способу кріоконсервування та складу кріозахисного середовища

Спосіб кріоконсервування	Склад кріозахисного середовища	Збереженість клітин, %	Життєздатність клітин, %
Культивування протягом 3-5 діб перед заморожуванням	10 % ДМСО	73,3±27,4*	78,7±14,5*
	10 % ДМСО+25 % ФТС	79,4±28,0*	87,3±8,3*#
Без культивування перед заморожуванням (за прототипом)	10 % ДМСО	48,7±4,5	66,3±9,1

- Примітки: *- відмінності статистично значимі в порівнянні з відповідними даними для клітин, заморожених у кріозахисному середовищі, що містить 10 % ДМСО, без попереднього культивування; # - відмінності статистично значимі в порівнянні з відповідними даними для культивованих клітин, заморожених у кріозахисному середовищі, що містить 10 % ДМСО без ФТС.

Джерела інформації:

1. Патент 34848 А, Україна, МПК⁵ C12N 5/02. Опубл. 15.03.01. Спосіб кріоконсервування культури клітин адренкортикальної тканини.
2. Устиченко В. Д. Функциональные свойства надпочечных желез новорожденных поросят при действии различных режимов замораживания. Автореф. дис. канд. биол. наук. Харьков, 2008. - 20 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Спосіб кріоконсервування клітин наднирників новонароджених поросят, який включає заморожування клітин зі швидкістю 1 °/хв. до -40 °С в кріозахисному середовищі, що містить 10 % ДМСО, який **відрізняється** тим, що перед заморожуванням клітини культивують протягом 3-5 діб, а в кріозахисне середовище додатково вводять фетальну телячу сироватку концентрацією 25 %.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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