УКРАЇНА

(19) UA (11) 92227 (13) C2

(51) МПК (2009)
A01N 1/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЯДРОВМІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ, У ТОМУ ЧИСЛІ ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

(21) a200814009
(22) 05.12.2008
(24) 11.10.2010
(46) 11.10.2010, Бюл.№ 19, 2010 р.
(72) БАБІЙЧУК ЛЮБОВ ОЛЕКСАНДРІВНА, ГРИЩЕНКО ВАЛЕНТИН ІВАНОВИЧ, ГУРІНА ТЕТЯНА МИХАЙЛІВНА, ЗУБОВ ПАВЛО МИХАЙЛОВИЧ, РЯЗАНЦЕВ ВОЛОДИМИР ВАСИЛЬОВИЧ, КУДОКОЦЕВА ОЛЬГА ВАЛЕНТИНІВНА, ЗУБОВА ОКСАНА ЛЕОНІДІВНА
(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ
(56) UA 31847, 15.12.2000
UA 80062, 10.08.2007
UA 58997, 15.08.2003
UA 46673, 15.04.2005
Гришина В.В. Разработка оптимальных методов криоконсервирования кроветворных клеток пуповинной крови человека для трансплантации // Клеточная трансплантация и тканевая инженерия.-2006.-№1(3).-с.52-59
(57) Спосіб кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, у тому числі гемопоетичних стовбурових клітин, який включає додавання до клітинної суспензії кріозахисного розчину, що містить ДМСО, виготовлений на поліглюкіні, до концентрації ДМСО у суспензії 5 % і заморожування до температури -196 °С, який **відрізняється** тим, що після змішування з кріозахисним розчином суспензію клітин поміщують на 20 хвилин у камеру програмного заморожувача, попередньо охолоджену до 0 °С, після чого охолоджують зі швидкістю 3...3,5 °С/хв до температури -60...-65 °С з подальшим зануренням у рідкий азот.

Винахід належить до галузі кріобіології та кріомедицини і може бути використаний для низькотемпературного консервування ядровмісних клітин кордової крові (ЯВК) з метою подальшого використання їх як джерела гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) у клінічній медицині.

Останнім часом кордова кров визнана повноцінним та рівноправним джерелом гемопоетичних стовбурових клітин поряд з кістковим мозком та периферичною кров'ю. Кордова кров є безпечним, таким, що легко отримати, джерелом стовбурових клітин, які мають високий проліферативний потенціал та ефективно використовуються для лікування цілого ряду захворювань.

Існує спосіб кріоконсервування кровотворних клітин кордової крові [1], згідно з яким клітини змішують з непроникаючим кріопротектором декстраном молекулярної маси 60000 у концентрації 1,2%, охолоджують до -27...-28°С зі швидкістю 1-4°С/хв, витримують при цій температурі впродовж 15-20 хвилин і далі занурюють у 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 кріоконсервованих клітин, що визначено за методом культивування в агарі, - 79,4%.

Суттєвим недоліком даного способу є відносно низький показник життєздатності КУОк в суспензіях кріоконсервованих клітин через використання у кріозахисному розчині лише одного типу кріопротектора - декстрану молекулярної маси 60000. Відомо, що традиційний метод кріоконсервування ГСК передбачає додавання до кріозахисного розчину кріопротектора диметилсульфоксиду (ДМСО) у концентрації 10%. Однак окрім захисної функції ДМСО у високих концентраціях може чинити токсичну дію на клітини крові, яка, у кінцевому рахунку, призводить до зниження життєздатності клітин після процесу заморожування-нагріву.

Останнім часом при розробці методів кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові в кріозахисному розчині використовують декілька кріопротекторних речовин у низьких концентраціях, але з різним механізмом дії (інтрацелюлярний розчин ДМСО та екстрацелюлярний розчин гідроксіетиленкрохмалю, альбуміну та ін.).

Виходячи з вищесказаного, для кріоконсервування клітин кордової крові необхідно використовувати ДМСО в мінімально можливих концентра-

(19) UA (11) 92227 (13) C2

ціях (до 5%) у поєднанні з речовиною, яка б не тільки сама по собі була кріопротектором, але була б і найбільш сприятливим середовищем для ядровмісних клітин, а також не потребувала відмивання клітинної суспензії при використанні її після кріоконсервування. Найбільш перспективним з цієї точки зору на сьогоднішній день є використання кріопротектора поліглюкіну. Для приготування кріозахисних розчинів використовують фармацевтичну форму, яка являє собою 6% розчин поліглюкіну, виготовлений на фізіологічному розчині.

Відомий спосіб консервування кровотворних клітин кордової крові людини із застосуванням кріозахисного розчину, що містить ДМСО, приготований на поліглюкіні [2]. Згідно зі способом до сконцентрованої суспензії клітин загальним об'ємом 25-30мл додають, при постійному перемішуванні, рівний об'єм попередньо приготовленого кріозахисного розчину до кінцевої концентрації ДМСО у суспензії клітин 5-6%. Як контейнер використовують кріомішок «Hemofreeze DF2005». Для заморожування кріомішок з клітинною суспензією приміщують горизонтально в кріобокс, виконаний з багатошарової фанери загальною товщиною 10мм. Далі кріобокс переносять в пари рідкого азоту з температурою – 167±2°С і охолоджують з середньою швидкістю 1,53±0,9°С/хв від 0°С до -40°С. Через 1-2 години від початку заморожування кріомішок з біоматеріалом переносять у сховище з рідким азотом, де заморожують до -196°С для подальшого довгострокового зберігання. Розморожують біоматеріал на водяній бані при температурі 38°С до моменту переходу замороженого матеріалу у рідку фазу.

Кількість життєздатних клітин після процедури заморожування-нагріву, визначена шляхом суправітального забарвлення трипановим синім, становить 92,81±3,2%. Абсолютна кількість клітин з імунофенотипом CD34+ (ГСК), яку визначали в проточному цитометрі FAC Scan (Becton Dickinson USA), складає $2,74\pm2,67\times10^7$ (від $0,13\times10^7$ до $16,37\times10^7$).

Недоліком цього способу є те, що абсолютна кількість ГСК у відігрітих зразках коливається у дуже великих межах - від $0,13\times10^7$ до $16,37\times10^7$, що вказує на значну нестабільність якості кінцевого біологічного матеріалу. Окрім того, спосіб передбачає використання кріобоксу, який пристосований для заморожування зразків лише в упаковці конкретного типу і розміру, з певним об'ємом зразка, що значно звужує можливості використання даного способу.

В основу винаходу поставлено задачу створити такий спосіб кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, у тому числі гемопоетичних стовбурових клітин, в якому би, шляхом зміни режиму охолодження, забезпечувалась можливість одержувати більш високі та стабільні показники життєздатності ГСК у розмороженому зразку.

Ця задача вирішується тим, що у способі кріоконсервування кровотворних клітин кордової крові, який включає додавання до клітинної суспензії кріозахисного розчину, що містить ДМСО, виготовлений на поліглюкіні, до концентрації ДМСО у суспензії 5% і заморожування до температури – 196°С, згідно з винаходом, після змішування з кріозахисним розчином суспензію клітин поміщують на 20 хвилин у камеру програмного заморожувана, попередньо охолоджену до 0°С, після чого охолоджують зі швидкістю 3...3,5°С/хв до температури -60...-65°С з подальшим зануренням у рідкий азот (-196°С).

Заявлений спосіб кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, у тому числі гемопоетичних стовбурових клітин, забезпечує високу життєздатність ядровмісних клітин кордової крові і гарантує стабільність показників життєздатності ГСК за рахунок того, що насичення клітин розчином кріопротекторів відбувається при постійній температурі 0°С, яка сприяє стабілізації плазматичних мембран і білків цитоскелету клітин. Підтримка постійної температури 0°С допомагає також одержувати однаковий рівень проникнення кріопротектора у клітини та компенсує підвищення температури суспензії клітин, яке відбувається при змішуванні під час додавання кріозахисного розчину. Охолодження зразків з постійною швидкістю 3...3,5°С/хв у програмному заморожувачі забезпечує однаковість режиму заморожування від зразка к зразку, а, таким чином, і однакові стабільні показники життєздатності. Швидкість охолодження 3...3,5°С/хв є найбільш сприятливою для заморожування ЯВК, особливо ГСК. Охолодження зразків з постійною контрольованою швидкістю до -60...-65°С пов'язано з тим, що інтервали температур, в яких найбільш імовірне пошкодження клітин під час заморожування суспензії, знаходяться вище цих значень.

Спосіб пояснюється наступними прикладами.

Приклад 1. Для виділення ЯВК брали дозу кордової крові об'ємом 60-90мл, яка була заготовлена на консерванті „Глюгіцир" після нормальних пологів. Середня абсолютна кількість ЯВК в 1мл складала $(1,7\pm0,52)\times10^7$. Середня абсолютна кількість ЯВК та ГСК в дозі складала $(1,0\pm02,2)\times10^9$ та $(4,24\pm1,4)\times10^6$, відповідно. До цільної кордової крові у співвідношенні 1:1 додавали 6% розчин поліглюкіну, виготовлений на фізіологічному розчині. Седиментацію еритроцитів проводили в залежності від об'єму цільної кордової крові протягом 30-50 хвилин до утворення чіткої границі між шаром еритроцитів та надосаду, який містить у собі ЯВК та ГСК. Надосад відділяли у окремий флакон та центрифугували 12-18 хвилин при 1500 g. Після центрифугування залишали концентрат клітини об'ємом 10-12мл. Середня абсолютна кількість ЯВК в 1мл складала $(6,7\pm1,3)\times10^7$. Середня абсолютна кількість ЯВК та ГСК в дозі складала $(8,3\pm1,6)\times10$ та $(3,7\pm1,3)\times10^6$, відповідно.

Схоронність і життєздатність ЯВК та ГСК визначали за допомогою метода проточної цитофлуориметрії на проточному цитометрі FACS Calibur з використанням реагентів Becton Dickinson згідно з міжнародним ISHAGE протоколом. За допомогою цього методу виділення був отриманий середній вміст ЯВК та ГСК, відповідно, 89,0±4,9% та 95,0±3,1%. Життєздатність клітин була на рівні 99,0%.

При температурі 0...4°С до отриманої суспензії ЯВК додавали 2,5мл 25% розчину ДМСО, який заздалегідь готували на поліглюкіні. Кінцева концентрація ДМСО у суспензії клітин становила 5%. Отриману зависьклітин розливали у кріоампули і приміщали у камеру програмного заморожувача, яка попередньо була охолоджена до 0°С. Протягом наступних 20 хвилин суспензію клітин витримували при цій температурі, після чого зразки охолоджували до температури -60...-65°С зі швидкістю 3...3,5°С/хв і далі занурювали у рідкий азот. Відігрівали на водяній бані при температурі 40...42°С до зникнення кристалів льоду.

Середня абсолютна кількість ЯВК в 1мл складала $(4,9\pm0,4)\times10^7$. Середня абсолютна кількість ЯВК та ГСК в дозі складала $(5,1\pm0,4)\times10^8$ та $(2,7\pm0,68)\times10^6$, відповідно.Після розморожування життєздатність ЯВК, яка була визначена за допомогою суправітального барвника трипанового синього, становила 93,6±5,2%. Показники життєздатності, які були визначені таким чином, не можна вважати адекватними, тому що низьке прокрашування клітин трипановим синім не свідчить про їх дійсну життєздатність, а лише віддзеркалює проникність плазматичних мембран клітин для цього барвника. Окрім того, клітинна суспензія, що підлягає заморожуванню, містить у собі високомолекулярну речовину - поліглюкін, який створює навколо клітин захисний каркас і додатково перешкоджає прокрашуванню клітин трипановим синім. Тому показники життєздатності, визначені за таким методом, не є адекватними і не відповідають дійсності. При застосуванні адекватного метода оцінки показників життєздатності - проточного цитофлуориметра з використанням ДНК-барвника 7AAD, життєздатність ЯВК та ГСК були на рівні 85,1±8,6% і 95,4±4,6 %, відповідно.

Приклад 2. Спосіб здійснювали аналогічно Прикладу 1, за винятком того, що охолодження до температури -60...-65°С проводили з різними швидкостями. Результати по життєздатності ЯВК кордової крові та ГСК наведені у Таблиці 1, з якої видно, що оптимальною швидкістю охолодження є 3...3,5°С/хв. Статистичне достовірної різниці між показниками життєздатності ЯВК та ГСК при швидкості охолодження 1°С/хв та 3...3,5°С/хв немає, але швидкість охолодження 1°С/хв потребує додаткових витрат часу (приблизно 40...45 зайвих хвилин) та рідкого азоту. Однак при швидкості охолодження 5°С/хв життєздатність ГСК значно знижується. Таким чином, для отримання високих показників життєздатності ГСК і гарантії їх стабільної повторюваності необхідно охолоджувати зразки від 0°С до -60...-65°С з постійною швидкістю 3...3,5°С/хв.

Приклад 3. Спосіб здійснювали аналогічно Прикладу 1, за винятком того, що перед занурюванням у рідкий азот охолодження проводили до різної кінцевої температури. Результати по життєздатності ЯВК та ГСК наведені у Таблиці 2, з якої видно, що зниження кінцевої температури охолодження до -80°С не впливає на кінцеву життєздатність клітин, але вимагає додаткових витрат рідкого азоту, тому оптимальною кінцевою температурою охолодження перед занурюванням у рідкий азот є -60...-65°С. Вибір кінцевої температури охолодження на рівні -60...-65°С обумовлено також тим фактором, що інтервали температур, які найбільш впливають на пошкодження клітин за рахунок механічних та осмотичних чинників, знаходяться вище температури -60...-65°С і пов'язані, в першу чергу, з затвердінням усієї системи при температурі кристалізації та до кристалізаційними процесами у суміші кріопротекторів евтектичної концентрації. Охолодження зразків у цих інтервалах температур з постійною контрольованою швидкістю гарантує стабільність і повторюваність кінцевих результатів життєздатності клітин після кріоконсервування.

Приклад 4. Спосіб здійснювали аналогічно Прикладу 1, за винятком того, що насичення клітин розчином кріопротекторів проводили при кімнатній температурі та при температурі 0°С у камері програмного заморожувача. Життєздатність ЯВК та ГСК після заморожування-нагріву у першому випадку була нижчою (ЯВК - 79,8±5,3%, ГСК - 87,2±3,9%), ніж у другому (ЯВК - 85,1±8,6%, ГСК - 95,4±4,6%). Це пов'язано з тим, що процес насичення клітин кріопротектором в значній мірі залежить від температури. Кімнатна температура коливається в залежності від пори року та мікроклімату у приміщенні, що в значній мірі впливає на швидкість проникнення розчину кріопротектору в клітини. Окрім цього, при додаванні розчинів кріопротекторів з ДМСО до суспензії клітин підвищується температура розчину, що у поєднанні з підвищеною температурою навколишнього середовища призводить до розвитку руйнівних процесів у клітинах. Температура 0°С сприяє гальмуванню таких явищ.

Таблиця 1

Життєздатність ЯВК та ГСК кордової крові в залежності від швидкості охолодження

Швидкість охолодження, °С/хв	1	3	3,5	5	10
Життєздатність ЯВК, %	78,3±4,9	85,1±8,6	85,1±9,1	69,3±9,2	59,0±6,3
Життєздатність ГСК ,%	91,2±5,1	95,4±4,6	95,4±4,8	77,3±4,9	65,2±7,2

Таблиця 2

Життєздатність ЯВК та ГСК кордової крові в залежності
від кінцевої температури охолодження перед занурюванням у рідкий азот

Кінцева температура охолодження, °С	-40	-50	-60	-65	-80
Життєздатність ЯВК,%	80,9±9,0	83,4±8,8	85,1±8,6	85,0±9,2	85,1±8,9
Життєздатність ГСК,%	87,7±5,8	91,2±5,2	95,4±4,6	94,9±5,3	95,1±3,6

Джерела інформації

1. 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, АО IN 1/02, публ. 15.12.2000.

2. Гришина В.В. Разработка оптимальных методов криоконсервирования кроветворных клеток пуповинной крови человека для трансплантации // Клеточная трансплантация и тканевая инженерия.- 2006.- № 1(3).- С. 52-59 (прототип).

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський 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