УКРАЇНА

(19) UA **(11) 83734** **(13) U**

(51) МПК
A01N 1/02 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 04364**

(22) Дата подання заявки: **08.04.2013**

(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **25.09.2013**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.09.2013, Бюл.№ 18**

(72) Винахідник(и):
Бабійчук Любов Олександрівна (UA),
Гуріна Тетяна Михайлівна (UA),
Зубов Павло Михайлович (UA),
Рязанцев Володимир Васильович (UA),
Зубова Оксана Леонідівна (UA)

(73) Власник(и):
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,
вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015 (UA)

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

(57) Реферат:

Спосіб кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, в тому числі гемопоетичних стовбурових клітин включає додавання до суспензії клітин при 0-4 °С розчину кріопротектору і програмне заморожування до -60…-65 °С з наступним зануренням у рідкий азот. Як кріопротектор використовують непроникаючий кріопротектор поліетиленоксид м.м. 1500, виготовлений на фізіологічному розчині хлористого натрію. Додавання розчину кріопротектору до суспензії клітин проводять по краплям протягом 20 хв до кінцевої концентрації кріопротектору в суспензії клітин 10 %. Заморожування до температури -60…-65 °С здійснюють зі швидкістю 5…5,5 °С/х з наступною 10-хвилинною витримкою при цій температурі.

UA 83734 U

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

Існує спосіб кріоконсервування кровотворних клітин кордової крові [1], згідно з яким клітини змішують з непроникаючим кріопротектором декстраном молекулярної маси 60 000 у концентрації 1,2 %, охолоджують до -27…-28 °С зі швидкістю 1-4 °С/хв, витримують при цій температурі впродовж 15-20 хв 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 60 000. 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 та певного обмеження у практичному використанні.

Відомий спосіб кріоконсервування кровотворних клітин кордової крові людини [2], згідно з яким заздалегідь готують розчин ДМСО в поліглюкіні, до сконцентрованої суспензії клітин, що містить в собі ГСК, при постійному перемішуванні додають рівний об'єм приготовленого кріозахисного розчину до кінцевої концентрації ДМСО у суспензії клітин 5-6 %. Контейнер з клітинною суспензією приміщують в кріобокс з щільною кришкою і переносять в пари рідкого азоту при температурі -167±2 °С. Через 1-2 години від початку заморожування контейнер з біоматеріалом переносять у сховище з рідким азотом (-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±3,20 %. Абсолютна кількість клітин з імунофенотипом $CD34^+$ (ГСК), яку визначали в проточному цитометрі FAC Scan (Becton Dickinson USA), складає 2,74±2,67 * 10^7 (від 0,13 × 10^7 до 16,37 x 10^7).

Недоліком цього способу є те, що абсолютна кількість ГСК у відігрітих зразках коливається у дуже великих межах - від 0,13 х 10 до 16,37 × 10, 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.

Найбільш близьким до заявленого за своєю суттю є спосіб кріоконсервування кровотворних клітин кордової крові людини, в тому числі гемопоетичних стовбурових клітин [3]. В даному способі при температурі 0…4 °С до суспензії ЯВК одноразово додають 2,5мл 25 %-го розчину ДМСО, який заздалегідь готують на поліглюкіні. Кінцева концентрація ДМСО у суспензії клітин становить 5 %. Отриману зависьклітин розливають у кріоампули і поміщають у камеру програмного заморожувача, попередньо охолоджену до 0 °С. Протягом наступних 20 хв суспензію клітин витримують при цій температурі, після чого зразки заморожують до температури -60…-65 °С зі швидкістю 3….3,5 °С/хв і далі занурюють у рідкий азот. Відігрівають на водяній бані при температурі 40….42 °С до зникнення кристалів льоду.

При оцінки після розморожування показників життєздатності методом проточної цитофлуориметрії з використанням ДНК-барвника 7AAD, життєздатність ЯВК та ГСК становить 85,1±8,6 % і 95,4±4,6 %, відповідно.

Суттєвим недоліком цього способу є те, що в ньому використовують розчин кріопротектору ДМСО, який навіть у такій незначній кінцевій концентрації (5 %) потребує процедури видалення його із клітинної суспензії після розморожування. Відмивання клітин від кріопротектору ускладнює спосіб кріоконсервування, а також призводить до втрати від 15 до 30 % гемопоетичних стовбурових клітин.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити такий спосіб кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, у тому числі гемопоетичних стовбурових клітин, в якому би, за рахунок заміни кріопротектору та удосконалення режиму заморожування, забезпечувалась можливість виключити процедуру відмивання клітин від кріопротектору за умови збереження високих показників життєздатності ГСК у розмороженому зразку.

Ця задача вирішується тим, що у способі кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, в тому числі гемопоетичних стовбурових клітин, який включає додавання до суспензії клітин при 0-4 °С розчину кріопротектору і програмне заморожування до -60…-65 °С з наступним зануренням у рідкий азот, згідно з корисною моделлю, як кріопротектор використовують непроникаючий кріопротектор поліетиленоксид м.м. 1500, виготовлений на фізіологічному розчині хлористого натрію, додавання розчину кріопротектору до суспензії клітин проводять по краплям протягом 20 хв до кінцевої концентрації кріопротектору в суспензії клітин 10 %, а заморожування до температури -60…-65 °С здійснюють зі швидкістю 5…5,5 °С/хв з наступною 10-хвилинною витримкою при цій температурі.

Додавання ПЕО-1500 до суспензії клітин по краплям забезпечує поступову адаптацію клітин до зростаючих концентрацій кріопротектору. Заморожування зразків з постійною швидкістю охолодження 5…5,5 °С/хв є найбільш сприятливим для ЯВК, особливо ГСК. Витримка протягом 10 хв. перед зануренням у рідкий азот дозволяє вирівняти температуру по всьому об'єму зразка і таким чином гарантувати однаковість режиму заморожування для всіх клітин. Таким чином, використання непроникаючого кріопротектору ПЕО-1500 у поєднанні з удосконаленим режимом заморожування надає можливість виключити процедуру відмивання клітин від кріопротектору після розморожування при збереженні високих показників життєздатності ГСК та ЯВК. Виключення процедури відмивання клітин від кріопротектору після їх розморожування дозволяє запобігти втрати клітин, яка відбувається під час видалення кріопротектору, спрощує використання клітинної суспензії та сприяє більш широкому її застосуванню в практичній медицині.

Спосіб пояснюється наступними прикладами.

Приклад 1. Для виділення ядровмісних клітин, до складу яких входять гемопоетичні стовбурові клітини, брали дозу кордової крові об'ємом від 60 до 90 мл, яка була заготовлена на консерванті "Глюгіцир" після нормальних пологів. Середня абсолютна кількість ЯВК в 1 мл складала $(1,7\pm0,52)x10^7$. Середня абсолютна кількість ЯВК та ГСК в дозі складала $(1,0\pm02,2)x10^9$ та $(4,24\pm1,4)x10^6$, відповідно. Седиментацію еритроцитів проводили центрифугуванням цільної кордової крові протягом 20-30 хвилин при 1000 g до утворення надосаду, який містить у собі ЯВК та ГСК. Надосад відділяли у окремий флакон та повторювали центрифугування при тих же умовах. По закінченню центрифугування ще раз видаляли шар ядровмісних клітин та об'єднували з отриманими після першого центрифугування. Загалом після центрифугування залишали концентрат клітин об'ємом 10 мл. Середня абсолютна кількість ЯВК в 1 мл складала $(9,4\pm1,3) \times 10^7$.

Життєздатність ЯВК та ГСК визначали методом проточної цитофлуориметрії на проточному цитометрі FACS Calibur з використанням реагентів Becton Dickinson згідно міжнародному ISHAGE протоколу. Середній вміст ЯВК та ГСК становив, відповідно, 95,0±4,9 % та 97,0±3,1 %. Життєздатність клітин була на рівні 99,0 %.

При температурі 0…4 °С до отриманої суспензії ЯВК дозовано, по краплям протягом 20 хв, додавали 10 мл 20 %-го розчину ПЕО-1500, який заздалегідь готували на фізіологічному розчині. Кінцева концентрація ПЕО-1500 у суспензії клітин становила 10 %. Отриману зависі клітин розливали у кріоампули і приміщали у камеру програмного заморожувача, яка попередньо була охолоджена до 0 °С, після чого зразки охолоджували до температури -60…-65 °С зі швидкістю 5…5,5 °С/хв, витримували при цій температурі 10 хв і далі занурювали у рідкий азот. Відігрівали на водяній бані при температурі 40….42 °С до зникнення кристалів льоду.

Життєздатність визначали методом проточної цитофлуориметрії, який є найбільш адекватним для даного типу клітин, з використанням ДНК-барвника 7AAD. Життєздатність ЯВК та ГСК були на рівні 85,1±7,3 % і 95,4±4,1 %, відповідно.

Приклад 2. Спосіб здійснювали аналогічно Прикладу 1, за винятком того, що заморожування до температури -60…-65 °С проводили з різними швидкостями. Результати по життєздатності ЯВК кордової крові та ГСК наведені у Таблиці, з якої видно, що при використанні кріопротектору ПЕО-1500 оптимальною є швидкість охолодження 5…5,5 °С/хв., яка забезпечує збереження показників життєздатності після розморожування на рівні прототипу.

Таблиця

Життєздатність ЯВК та ГСК кордової крові в залежності від швидкості охолодження

Швидкість охолодження, °С/хв	1	3	3,5	5	5,5	10
Життєздатність ЯВК, %	70,3±7,2	74,3±3,9	75,0±4,3	87,1±7,6	85,1±7,3	58,4±5,7
Життєздатність ГСК, %	78,3±5,9	85,2±4,1	85,8±3,7	95,0±4,6	95,4±4,1	63,2±6,2

Джерела інформації:

1. Патент України № 31847 А, A01N1/02, 2000. Спосіб кріоконсервування кровотворних клітин кордової крові.

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.

3. Патент України № 92227, A01N1/02, 2010. Спосіб кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, у тому числі гемопоетичних стовбурових клітин (прототип).

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб кріоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, в тому числі гемопоетичних стовбурових клітин, який включає додавання до суспензії клітин при 0-4 °С розчину кріопротектору і програмне заморожування до -60…-65 °С з наступним зануренням у рідкий азот, який **відрізняється** тим, що як кріопротектор використовують непроникаючий кріопротектор поліетиленоксид м.м. 1500, виготовлений на фізіологічному розчині хлористого натрію, додавання розчину кріопротектору до суспензії клітин проводять по краплям протягом 20 хв до кінцевої концентрації кріопротектору в суспензії клітин 10 %, а заморожування до температури -60…-65 °С здійснюють зі швидкістю 5…5,5 °С/х з наступною 10-хвилинною витримкою при цій температурі.

Комп'ютерна верстка В. Мацело

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