



УКРАЇНА

(19) UA (11) 12355 (13) A

(51) 6 A 01 N 1/02

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДбез проведення експертизи по суті
на підставі Постанови Верховної Ради України
№ 3769 XII від 23 XII 1993 рПублікується
в редакції заявника

(54) СПОСІБ КОНСЕРВУВАННЯ ЕРИТРОЦИТІВ

1

(21) 94052995

(22) 26.05 94

(24) 02 12 96

(46) 28 02 97. Бюл. № 1

(47) 02.12 96

(56) Долгосрочное хранение эритроцитов методом замораживания при умеренно низких (-60 - -40°) температурах. - Методические рекомендации МЗ СССР, Киев, 1986, с 15 (прототип).

(72) Межидов Султанбек Хумалдович, Вороти́лін Олексій Михайлович, Мойсєєв Віктор Олексійович

(73) Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (UA)

(57) Способ криоконсервирования эритроцитов, включающий добавление к эритроцитам криоконсерванта, содержащего поливинилпирролидон молекулярной мас-

2

сы 12600 и воду бидистиллированную, с последующим замораживанием и хранением при умеренно низких температурах, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что криоконсервант дополнительно содержит 1,2 пропандиол, сахарозу и натрия хлорид, причем добавля- ют его к эритроцитам в соотношении (0,3-1):1 до конечной концентрации 1,2-пропандиола в надосадке 23-42%, а компоненты берут в следующем соотноше- нии, %

| | |
|------------------------------|-----------|
| 1,2-Пропандиол | 35-75 |
| Поливинилпирролидон | |
| м.м. 12600 | 8-16 |
| Сахароза | 2-6 |
| Натрия хлорид | 0,4-0,9 |
| Вода бидистиллиро- ванная | Остальное |

Изобретение относится к кріобіології, а именно низкотемпературному консервированию эритроцитов, и может быть использовано на станциях переливания крови

Известен способ криоконсервирования эритроцитов при (-70)-(-80)°С с использованием криоконсерванта, содержащего глицерин, маннит, фосфорнокислый натрий и воду бидистиллированную который добав- ляют к эритроцитам в соотношении 1:1 [1]

Недостатком способа является его тру- доемкость, связанная с необходимостью

проведения 4-х отмывок, поскольку глице- рин является токсичным (DL₅₀ = 7,35 г/кг при внутрибрюшинном введении крысам 20%- ного раствора [2]).

Наиболее близким к заявляемому явля- ется способ криоконсервирования эритро- цитов, согласно которому к эритроцитам в соотношении 2:1 добавляют криоконсер- вант, содержащий диметилсульфоксид (ДМСО), поливинилпирролидон м.м. 12600 (ПВП-12600), глюкозу, фосфорнокислый на- трий, хлористый калий и воду бидистиллиро-

(19) UA (11) 12355 (13) A

ванную, после чего замораживают и хранят при умеренно низких температурах.

Недостатком способа является то, что он требует больших затрат труда и средств, что связано с использованием больших объемов криоконсерванта по отношению к эритроmasсе.

Кроме этого в способе используется токсичный препарат ДМСО ($DL_{50} = 12,9 \text{ г/кг}$ при внутрибрюшинном введении крысам 25%-ного раствора [4]).

В основу изобретения поставлена задача создания такого способа криоконсервирования эритроцитов, в котором путем изменения состава криоконсерванта обеспечивается возможность уменьшения его расхода и за счет этого снижения трудоемкости способа и затрачиваемых на его осуществление средств.

Эта задача решается тем, что в способе криоконсервирования эритроцитов, включающем добавление к эритроmasсе криоконсерванта, содержащего поливинилпирролидон молекулярной массы 12600 (ПВП-12600) и воду бидистиллированную (б/д) с последующим замораживанием и хранением при умеренно низких температурах, криоконсервант дополнительно содержит 1,2-пропанодиол (1,2 ПД), сахарозу и натрия хлорид, причем добавляют его к эритроmasсе в соотношении (0,3–1):1 до конечной концентрации 1,2ПД в надосадке 23–42%, а компоненты берут в следующем соотношении, %:

| | |
|-----------|-----------|
| 1,2ПД | 35–75 |
| ПВП-12600 | 8–16 |
| Сахароза | 2–6 |
| NaCl | 0,4–0,9 |
| Вода б/д | остальное |

Применение криоконсерванта нового состава позволяет использовать его на одну и ту же дозу эритроmasсы в 3–5 раз меньше, чем в прототипе.

В табл. 1 приведены объемы растворов, с которыми приходится работать при дозе крови от одного донора 500 мл (250 мл эритроmasсы).

Из табл. 1 видно, что при осуществлении заявляемого способа необходимо работать с меньшими объемами растворов, в связи с чем снижаются в 2–5 раз трудозатраты на приготовление и разлив растворов, обработку и стерилизацию емкостей, загрузку-выгрузку холодильников, стерилизационных камер, транспорта. Соответственно снижаются в затрачиваемые на это средства. Кроме этого, криоконсервант разработан на основе малотоксичного 1,2ПД ($DL_{50} = 23,4$ при внутрибрюшинном введе-

нии крысам [2], что снижает ее токсичность [5].

Способ осуществляют следующим образом.

5 Эритроциты центрифугируют при 2000 об/мин в течение 20–25 мин, удаляют надосадок и к эритроmasсе в соотношении (0,3–1,0):1 добавляют криоконсервант, содержащий, %

| | |
|-----------|---------|
| 10 1,2ПД | 35–75 |
| ПВП-12600 | 8–16 |
| Сахароза | 2–6 |
| NaCl | 0,4–0,9 |

15 Вода б/д остальное
Конечная концентрация 1,2ПД в надосадке после добавления должна составлять 23–42%.

20 Полученную суспензию помещают в электрохолодильник. Отогрев проводят на водяной бане (41–45°C) до комнатной температуры. После отогрева отмыывают и переводят в раствор 8°.

Пр и м е р 1. Эритроциты центрифугировали при 2000 об/мин в течение 20 мин, удаляли надосадок и к 125 мл эритроmasсы добавляли 50 мл (1:0,4) криоконсерванта, содержащего, %

| | |
|-----------|-----------|
| 25 1,2ПД | 65 |
| ПВП-12600 | 14 |
| Сахароза | 2 |
| NaCl | 0,6 |
| Вода б/д | остальное |

30 Конечная концентрация 1,2ПД составляла 27%.

35 Суспензию в полимерном мешке однократного использования помещали в электрохолодильник. После замораживания до -70°C суспензию размораживали на водяной бане при 45°C.

40 Отмывку проводили растворами [3]:

| | |
|---------------|----|
| № 1 Сорбитол | 8% |
| Натрия хлорид | 7% |
| № 2 Сорбитол | 3% |
| Натрия хлорид | 1% |

45 К 175 мл суспензии добавляли 75 мл раствора № 1 и 250 мл раствора № 2. После 10 мин центрифугирования при 1500 об/мин удаляли надосадок и к эритроmasсе добавляли 375 мл раствора № 2 (1:3). После центрифугирования при 1500 об/мин удаляли надосадок и эритроциты переводили в раствор 8° (1:3).

Результаты представлены в табл.2.

50 Из табл.2 видно, что сохранность эритроцитов после криоконсервирования заявляемым способом не ниже, чем в прототипе.

Пр и м е р 2. Способ осуществляли аналогично примеру 1, за исключением того, что криоконсервант добавляли к эритро-

массе в соотношении 1:1 при следующем соотношении компонентов, %

| | |
|-----------|-----|
| 1,2ПД | 35 |
| ПВП-12600 | 8 |
| сахароза | 2 |
| NaCl | 0,4 |

Вода б/д остальное

После отмывки общие потери составили $11,4 \pm 1,6\%$, гемолиз в растворе 8° через 24 ч — $1,0 \pm 0,1\%$.

Пример 3. Способ осуществляли аналогично примеру 1, за исключением того, что криоконсервант добавляли 1:1 при следующем соотношении компонентов, %

| | |
|-----------|-----|
| 1,2ПД | 32 |
| ПВП-12600 | 8 |
| Сахароза | 1 |
| NaCl | 0,3 |

Вода б/д остальное

После отмывки общие потери 58,0 4,0%, в суспензии много стромы. Таким образом если компоненты среды брать в количествах, ниже заявляемых, резко увеличиваются потери клеток.

Пример 4. Способ осуществляли аналогично примеру 1, за исключением того, что криоконсервант добавляли 0,5:1 при следующем соотношении компонентов, %

| | |
|-----------|-----|
| 1,2ПД | 75 |
| ПВП-12600 | 16 |
| Сахароза | 2 |
| NaCl | 0,9 |

Вода б/д остальное

После отмывки общие потери — $11,4 \pm \pm 0,5\%$, гемолиз в растворе 8° через 24 часа — $0,6 \pm 0,1\%$.

Пример 5. Способ осуществляли аналогично примеру 1, за исключение того, что криоконсервант добавляли 0,5:1 при следующем соотношении компонентов, %

| | |
|-----------|-----|
| 1,2ПД | 75 |
| ПВП-12600 | 10 |
| Сахароза | 6 |
| NaCl | 0,9 |

Вода б/д остальное

После отмывки общие потери $14,5 \pm \pm 1,5\%$, гемолиз в растворе 8° через 24 ч $0,7 \pm 0,1\%$. Поскольку увеличение содержания любого компонента среды, приведенной в примере 4, на 1 г приводит к потере растворимости, содержание сахарозы было увеличено за счет уменьшения количества ПВП. Таким образом максимальные количества компонентов криоконсерванта определяются их растворимостью.

Пример 6. Способ осуществляли аналогично примеру 1, за исключением того, что изменяли конечную концентрацию 1,2ПД в надосадке, которую определяли методом Н-ЯМР (точность определения $\pm 0,1\%$).

Результаты представлены в табл.3.

Из табл. 3 видно, что при концентрациях 1,2ПД в надосадке выше 42% и ниже 23% эритроциты теряют свою полноценность и не пригодны для переливания.

Пример 7. Для проверки влияния неконтролируемого размораживания на сохранность эритроцитов проводили трехразовое циклирование температуры $(-30)-(-85)^{\circ}\text{C}$ при различных количествах ПВП, минимальной (35%) концентрации 1,2ПД. Содержание сахарозы — 2%, NaCl — 0,6%.

Результаты представлены в табл.4.

Из табл.4 видно, что возможные случайные отогревы холодильника мало влияют на сохранность эритроцитов.

Пример 8. Способ осуществляли аналогично примеру 1. Эритромассу хранили в холодильнике в течение 10 мес. в гемоконских полимерных мешках. После отогрева и отмывки общие потери составили $10,9 \pm 1,6\%$. Гемолиз в растворе 8° через 24 ч — $0,8 \pm 0,2\%$. Остаточный 1,2ПД меньше 0,1%. Эритроциты имели нормальную форму и более 90% клеток образовывали монетные столбики, поглощали кислород.

Таблица 1

| Виды работ | Объемы растворов | |
|---|------------------|---------------------|
| | Прототип | Предлагаемый способ |
| 1. Приготовление и добавление криоконсерванта | 500 мл | 100 мл |
| 2. Разлив в емкости для помещения в холодильник | 2 емкости | 1 емкость |
| 3. Отогрев одной дозы крови | 2 емкости | 1 емкость |
| 4. Разлив при отмывке | 4 емкости | 2 емкости |

Таблиця 4

Сохранность эритроцитов после 3-разового циклирования температуры

n = 6

| Концентрация ПВП-12600 | 0 | 3 | 6 | 8 | 12 | 16 |
|---------------------------|----------|----------|---------|---------|---------|---------|
| Гемолиз, % | 25,4±0,6 | 21,3±1,6 | 9,6±0,3 | 5,0±0,3 | 5,0±0,3 | 4,6±0,4 |

Упорядник

Техред М.Моргентал

Коректор Л. Лукач

Замовлення 4061

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101

