

I Міжнародна науково-практична інтернет-конференція

ПРОБЛЕМИ ТА ДОСЯГНЕННЯ СУЧАСНОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ

25 березня 2021 р.
м. Харків, Україна

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

MINISTRY OF HEALTH OF UKRAINE
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

ПРОБЛЕМИ ТА ДОСЯГНЕННЯ СУЧАСНОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ

PROBLEMS AND ACHIEVEMENTS OF MODERN BIOTECHNOLOGY

Матеріали
І міжнародної науково-практичної
Інтернет-конференції

Materials
of the I International Scientific and Practical
Internet Conference

ХАРКІВ
KHARKIV
2021

Спосіб підвищення кількості неушкоджених ядровмісних клітин кордової крові при кріоконсервуванні з ДМСО

Бабійчук Л.О., Зубов П.М., Макашова О.Є., Зубова О.Л.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

м. Харків, Україна

olena.makashova@gmail.com

Використання антиоксидантів для кріоконсервування різних біологічних об’єктів у теперішній час є предметом серйозних досліджень. У той же час застосування антиоксидантів та інгібіторів апоптозу при кріоконсервуванні ядровмісних клітин (ЯВК) кордової крові (КК) людини активно не досліджується. Тому метою нашої роботи було вивчити вплив таких антиоксидантів, як аскорбінова кислота (АК) та глутатіон, на кількість клітин, які перебувають на різних стадіях апоптозу/некрозу після кріоконсервування в кріопротекторних розчинах, що містять різні концентрації ДМСО.

У роботі використовували КК людини. Виділення фракції ЯВК із цільної КК проводили методом седиментації в поліглюкіні (6%-й розчин декстрану (ОАО «Біофарма», Україна) з молекулярною вагою 60000). У клітинну суспензію вносили 25%-й розчин ДМСО до кінцевих концентрацій у зразку 7,5 та 10%. Використовували аскорбінову кислоту («Sigma-Aldrich», США) у концентраціях 0,1 та 0,15 мМ та глутатіон у концентраціях 1 та 3 мМ, які перед кріоконсервуванням вносили в зразки з ДМСО. Проби кріоконсервували в програмному заморожувачі («Cryoson», Німеччина) зі швидкістю 1 град/хв до –80°С із наступним зануренням у рідкий азот (–196°С). Відігрівання здійснювали при 37°С на водяній бані при постійному погойдуванні до зникнення твердої фази. Для оцінки кількості та життєздатності ЯВК КК ($CD45^+$-клітини) використовували стандартний ISHAGE протокол. Оцінку стадій апоптозу ядровмісних клітин проводили з одночасним внесенням до зразків маркерів AnnexinV FITC, CD45 PE і 7-AAD. Вимірювання проводили

методом проточної цитофлуориметрії на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (BD) при довжині хвилі збудження 488 нм.

Отримані дані показали, що кріоконсервування ЯВК КК під захистом ДМСО у поєднанні з АК у концентрації 0,1 та 0,15 мМ, призводило до значущого зменшення кількості клітин, які знаходяться на стадії некрозу ($AnnexinV^-/7AAD^+$) (9,8±2,1), порівняно з контрольними даними (16,2±2,7), що може бути пов'язано зі здатністю АК запобігати або робити зворотним процес окислення відновленого глутатіону (GSH) до його функціонально неактивної форми (GSSG). Визначення кількості неушкоджених клітин ($AnnexinV^-/7AAD^-$) у групах, кріоконсервованих під захистом ДМСО у концентрації 7,5% та АК у концентрації 0,1 і 0,15 мМ, показало їх значуще підвищення. Аскорбінова кислота за даних концентрацій здатна зберігати до 78,8% клітин із неушкодженою структурою.

У зразках, кріоконсервованих із ДМСО у концентрації 7,5% та глутатіоном у концентраціях 1 та 3 мМ, кількість клітин із дезорганізованою мембраною ($AnnexinV^-/7AAD^+$) була значуще нижчою, у 2 та 2,5 рази, відповідно, порівняно з контрольними значеннями без додавання антиоксиданту та складала 8,2±1,3 та 6,7±1,1%, відповідно. Результати, отримані під час оцінки кількості клітин, які не зв'язались з жодним із використаних реагентів ($AnnexinV^-/7AAD^-$) показали, що додавання глутатіону у концентрації 1 та 3 мМ до кріозахисного середовища з 7,5% ДМСО дозволяло зберігати до 84,7% життєздатних ЯВК після кріоконсервування, а при додаванні до кріозахисного середовища з 10% ДМСО – до 80,1%.

Таким чином, оцінка кількості клітин, які перебувають на різних стадіях апоптозу/некрозу, після кріоконсервування ЯВК в середовищах із додаванням антиоксидантів, дозволяє зробити висновок, що використання АК та глутатіону здатне підвищити кількість живих неушкоджених клітин ($AnnexinV^-/7AAD^-$) при кріоконсервуванні з ДМСО.