МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДНІПРОВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ОЛЕСЯ ГОНЧАРА
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
ДЗ «ДНІПРОПЕТРОВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ»
УКРАЇНСЬКЕ БІОХІМІЧНЕ ТОВАРИСТВО

Присвячується 100-річчю ДНУ

ЧЕТВЕРТА МІЖНАРОДНА НАУКОВА КОНФЕРЕНЦІЯ АКТУАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ СУЧАСНОЇ БІОХІМІЇ ТА КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ

Матеріали конференції

5-6 жовтня, 2017
Дніпро, Україна

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF UKRAINE
OLES HONCHAR DNIPRO NATIONAL UNIVERSITY
MINISTRY OF HEALTH OF UKRAINE
DNIPROPETROVSK MEDICAL ACADEMY
UKRAINIAN BIOCHEMICAL SOCIATY

THE 4th INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE CURRENT PROBLEMS OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY

Program and abstracts
5-6 October, 2017
Dnipro, Ukraine

УДК 577.156+612.015+591.1+579

Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології: матеріали IV Міжнародної наукової конференції, 5-6 жовтня 2017 р., м. Дніпро, Україна/ за заг. ред. Ушакової Г.О. – Дніпро: видавництво «Ліра», 2017 – 270 с.

У збірнику подаються результати теоретичних, прикладних та наукових досліджень вчених із широкого спектру проблем сучасної біохімії та клітинної біології. Наукове видання розраховане на студентів, аспірантів, викладачів, науковців. Присвячується 100-річчю ДНУ.

Редакційна колегія: Ушакова Г.О. (відповідальний редактор),
Кириченко С.В.

Всі матеріали друкуються в авторській редакції. За достовірність фактів, власних імен та інші відомості відповідають автори публікації. Думка редакції може не збігатися з думкою авторів.

© Колектив авторів, 2017

ОЦІНКА СТАДІЙ АПОПТОЗУ ЯДРОВМІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ, КРІОКОНСЕРВОВАНИХ В РОЗЧИНАХ, ЩО МІСТЯТЬ ДМСО ТА АСКОРБІНОВУ КИСЛОТУ

Олена Макашова, Оксана Зубова, Павло Зубов, Любов Бабійчук
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна
Olena.makashova@gmail.com

ASSESMENT OF APOPTOSIS STAGES OF CORD BLOOD NUCLEATED CELLS, CRYOPRESERVED IN DMSO SUPLEMENTED WITH ASCORBIC ACID

Olena Makashova, Oksana Zubova, Pavlo Zubov, Lubov Babijchuk
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

The effect of ascorbic acid (AA) cryopreservation of human cord blood nucleated cells with different concentrations of DMSO was in the work. Ability of AA in 0.1 and 0.15 mmol to decries in amount of cells in the stage of necrosis and increase the number of intact cells was shown. Further incubation of nucleated cells for an hour under conditions similar to the physiological did not lead to significant changes in the amount of live cells.

Актуальність та ціль. У ряді робіт було показано, що процес кріоконсервування, окрім руйнування плазматичної мембрани з наступним некрозом, може викликати загибель клітин і шляхом апоптозу. Відмічалося також, що апоптоз, викликаний факторами кріоконсервування (збільшення кількості активних форм кисню), може розвиватися в клітинах не відразу після розморожування, а через деякий час, що значно ускладнює визначення реальної кількості функціонально активних клітин в препаратах. У зв'язку із цим перспективним напрямком може бути використання антиоксидантів (АО), які були б здатні «перехоплювати» вільні радикали та гальмувати інтенсивність вільнорадикального окислення на всіх стадіях заморожування-відігрівання. Одним з таких АО є аскорбінова кислота (АК).

Метою даної роботи було вивчення впливу АК на кількість клітин, що перебувають на різних стадіях апоптозу/некрозу після кріоконсервування в розчинах, що містять різні концентрації ДМСО та АК, а також перенесення до умов, моделюючих фізіологічні.

Методи. У виділену за допомогою поліглюкіну фракцію ЯВК вносили 25%-й розчин ДМСО до кінцевих концентрацій в пробі 5; 7,5 і 10%. АК використовували в концентраціях 0,1 і 0,15 мМ. Кріоконсервування проводили зі швидкістю 1-3ºС в хвилину до -80ºС на програмному заморожувачі Cryoson з наступним зануренням у рідкий азот. Для оцінки стадій апоптозу/некрозу клітин було застосовано цитофлуориметричний метод, що базується на використанні комбінації

AnnexinV з вітальним барвником 7-ААД (7-аміноактиноміцин D), який легко проникає в клітини на пізніх стадіях апоптозу або некрозу і не проникає до клітин з інтактною мембраною. Для визначення відстроченої загибелі частину клітин після розморожування переносили до розчину Хенкса й інкубували при 37ºС протягом години.

Результати. Аналіз стану ЯВК одразу після розморожування показав, що майже 30% збережених клітин знаходяться на різних стадіях апоптозу/некрозу. Кріоконсервування ЯВК КК під захистом ДМСО у поєднанні з АК у концентрації 0,1 та 0,15 мМ призводило до зменшення кількості клітин, що знаходяться на стадії некрозу ($AnnexinV^-/7AAD^+$) на 6-7%. Визначення кількості живих неушкоджених клітин ($AnnexinV^-/7AAD^-$) у групах, кріоконсервованих під захистом 7,5% ДМСО та 0,1 і 0,15 мМ АК, показало деяке їх підвищення до 78,8%, порівняно з 72,7% без додавання антиоксиданта. Слід зазначити, що у даних пробах також спостерігалось збільшення кількості $AnnexinV^+/7AAD^-$ - клітин (початкова стадія апоптозу) до 2,2% та пізній стадії апоптозу/некрозу ($AnnexinV^+/7AAD^+$) до 12%.

Отримані дані після годинної інкубації кріоконсервованих ЯВК в умовах, моделюючих фізіологічні, демонструють збільшення кількості некротичних клітин ($AnnexinV^-/7AAD^+$) в усіх зразках у 2 рази порівняно з даними, отриманими одразу після розморожування та зменшення числа живих неушкоджених клітин ($AnnexinV^-/7AAD^-$) на 30% у групі з 5% ДМСО, на 15% – у пробі з 7,5% ДМСО та на 17% у зразках з 10% ДМСО. Додавання до середовища кріоконсервування 0,1 та 0,15 мМ АК призводило до зменшення відсотка некротичних клітин у пробах, кріоконсервованих із різними концентраціями ДМСО на 5-12%, проте спостерігалось збільшення відсотка клітин на стадії пізнього апоптозу у групах, кріоконсервованих із 5% та 10% ДМСО. Найменше число некротичних клітин було отримано у пробі з 7,5% ДМСО. Однак, підрахунок числа живих $AnnexinV^-/7AAD^-$-клітин, які несуть найбільшу цінність після кріоконсервування показав, що додавання АК до кріозахисного середовища та перенесення клітин до умов, моделюючих фізіологічні, не призводило до зміни кількості цих клітин.

Висновки. Внесення в кріозахисне середовище аскорбінової кислоти в концентрації 0,1 та 0,15 мМ сприяє підвищенню кількості живих неушкоджених клітин в пробах ймовірно внаслідок активації антиоксидантної системи. Перенесення ЯВК, кріоконсервованих в середовищах із додаванням аскорбінової кислоти до умов, моделюючих фізіологічні, не виявило значущих відмінностей серед досліджуваних параметрів у порівнянні з пробами, де застосовувався тільки один кріопротектор. Отримані результати потребують подальших досліджень з метою оптимізації кріозахисного середовища.