

Влияние условий криоконсервирования на сохранность фибробластов человека

Л.Г. АБРАФИКОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Cryopreservation Protocols on Integrity of Human Fibroblasts

L.G. ABRAFIKOVA

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov

Клетки соединительной ткани (фибробласты) в настоящее время широко используются в различных областях медицины при многих патологиях.

Криоконсервирование – обязательный этап технологии получения фибробластов для дальнейшего клинического применения. Безальтернативным способом длительного хранения фибробластов является хранение при температуре жидкого азота.

Цель работы – изучение влияния режимов охлаждения и состава консервирующей среды на сохранность фибробластов человека.

Объектом исследования были фибробласты человека, полученные путем культивирования кожных биоптатов в питательной среде 199 с добавлением эмбриональной сыворотки. Образцы замораживали по двум режимам охлаждения: со скоростью 1°C/мин до –30°C с последующим погружением в жидкий азот; со скоростью 1°C/мин до –70°C с последующим погружением в жидкий азот.

Установлено, что на сохранность фибробластов при криоконсервировании и дальнейшем хранении при температуре –196°C с выбранными режимами охлаждения достоверное влияние оказывает присутствие криопротектора в среде криоконсервирования. Сохранность клеток, суспендированных в ростовой среде 199 без добавления криопротектора, замороженных по первому режиму, составила 7,3, а по второму – 9,1%.

При замораживании сохранность клеток, суспендированных в среде 199 с добавлением 10%-го ДМСО (по объему), составляла при первом режиме охлаждения 73,1, при втором – 78,1%.

Показатели по повышенной сохранности клеток, замороженных с и без ДМСО, коррелировали с результатами изучения конформационного состояния мембранных белков клеток после замораживания-отогрева методом дифференцирующей спектрофотометрии в УФ-области.

Cells of connective tissue (fibroblasts) now are widely used in different fields of medicine under various pathologies.

Cryopreservation is a mandatory technological stage for further clinical application. Storage at liquid nitrogen temperature is the way having no alternative for long-term storage of fibroblasts.

The research aim is to study the effect of cooling regimens and composition of preserving medium on the integrity of human fibroblasts.

Human fibroblasts obtained by culturing skin bioplates in nutritive medium 199 with adding embryonic serum served as research object. The samples were frozen according to two cooling regimens: with the rate of 1°C/min down to –30°C with following plunging into liquid nitrogen; with the rate of 1°C/min down to –70°C with following plunging into liquid nitrogen.

It has been found out that statistical effect on fibroblast integrity during cryopreservation and further storage at –196°C with chosen cooling regimens was caused by the presence of cryoprotectant in cryopreservation medium. Integrity of cells suspended in growth medium with no adding of cryoprotectant frozen according to the first regimen made 7.3 and 9.1% on the second one.

During freezing the integrity of cells suspended in medium 199 with adding 10% DMSO (v/v) made at first cooling regimen 73.1 and 78.1% at the second one.

Indices of increased integrity of the cells frozen with and with no DMSO were in correlation with the results of studying the conformational state of membrane proteins of cells after freeze-thawing by differentiating spectrophotometry in UV-region.