

Outcomes of granulocyte colony-stimulating factor administration to patients with severe coronary artery disease // *Circulation*. – 2004. – Vol. 110 (suppl III). – P. 352.

3. Kawamoto A., Tkebuchava T., Yamaguchi J., Nishimura H., Yoon Y. S., Milliken C., Uchida S., Masuo O., Iwaguro H., Ma H., Hanley A., Silver M., Kearney M., Losordo D. W., Isner J. M., Asahara T. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia // *Circulation*. – 2003. – Vol.107, №3 – P. 461–468.

4. Leobon B., Garcin I., Menasche P., Vilquin J. T., Audinat E., Charpak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from

5. Philip R. Fox. Textbook of canine and feline cardiology: principles and clinical practice / Philip R. Fox, David Sisson, N. Sydney Moise. – [2nd ed.] – Philadelphia: W.B.SAUNDERS COMPANY, 1999. – 955 p.

6. Skobel E., Schuh A., Schwarz E. R., Liehn E. A., Franke A., Breuer S., Gunther K., Reffelmann T., Hanrath P., Weber C. Transplantation of fetal cardiomyocytes into infarcted rat hearts results in long-term functional improvement // *Tissue Eng*. – 2004. – Vol.10, № 5 (6). – P. 849–864.

7. Smits P. C., van Geuns R. J. Poldermans D., Bountiokos M., Onderwater E. E., Lee C. H., Maat A. P., Seruys P.W. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up // *J Am Coll Cardiol*. – 2003. – Vol.42. – P. 2063–2069.

8. Xu X., Xu Z., Xu Y., Gul G. Effects of mesenchymal stem cell transplantation on extracellular matrix after myocardial infarction in rats // *Coron Artery Dis*. – 2005. – Vol. 16, № 4. – P. 245–255.

Стаття надійшла до редакції 3.03.2015

УДК 619:57.085.21.086

Ковпак В. В., к.вет.н.; **Харкевич Ю. О.**, к.вет.н.;
Каленюк Ю. В., студентка 2 курсу ОКР «Магістр»
E-mail: vitkovpak@mail.ru

*Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ,
Україна*

ВПЛИВ СЕРЕДОВИЩА НА ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПІД ЧАС КРІОКОНСЕРВУВАННЯ

У даній статті представлені результати дослідження впливу кріоконсервування мезенхімальних стовбурових клітин різного складу кріосередовищ. Порівняно захисні властивості п'яти середовищ. Вплив кріосередовищ оцінювали на підставі визначення життєздатності та збереження адгезивних властивостей клітин після розмороження. Дослідження проведенні на клітинах собаки, kota та кроля.

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини, кріоконсервування, диметилсульфоксид, адгезивні властивості клітин, життєздатність клітин.

УДК 619:57.085.21.086

Ковпак В. В., **Харкевич Ю. А.**, **Каленюк Ю. В.**

*Національний університет біоресурсів і природопользования Украины, Киев,
Украина*

ВЛИЯНИЕ СРЕДЫ НА СОХРАННОСТЬ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ

В данной статье представлены результаты исследования влияния кріоконсервирования мезенхимальных стволовых клеток состава криозащитных сред. Представлены результаты защитных свойства пяти сред. Действие

криосред оценивали на основании определения жизнеспособности и сохранения адгезивных свойств клеток после размораживания. Исследование проведено на клетках собаки, коша и кролика.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, криоконсервирование, диметилсульфоксид, адгезивные свойства клеток, жизнеспособность клеток.

UDC 619:57.085.21.086

Ковпак В., Kharkevych Y., Kalenyuk Y.

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

INFLUENCE OF MEDIUM ON SAFETY OF STEM CELLS DURING CRYOPRESERVATION

This article presenting results of investigations on depending on the composition of cryoprotective media of cryopreservation of mesenchymal stem cells. Compared protective properties of the five cryopreservation medium. Action cryopreservation medium evaluated on the basis of the definition of sustainability and conservation adhesive properties of cells after thawing. Research on cells carrying a dog, cat and rabbit.

Key words: mesenchymal stem cell cryopreservation, dimethyl sulfoxide, adhesive properties of cells, cell viability.

Здатність стовбурових клітин після введення їх в організм реципієнта продовжувати ділитися, проникати в місця ушкоджень тканин і відновлювати їх клітинну структуру, виділяти активні речовини протягом тривалого часу відповідно до тяжкості захворювання і стану організму реципієнта дає унікальні можливості для використання їх в клітинній терапії.

Практична необхідність в тривалому зберіганні клітин привела до пошуку методів їх консервування. Найбільш перспективним підходом для вирішення цього завдання виявилось низькотемпературне консервування (кріоконсервування), оскільки зниження температури призупиняє перебіг обмінних процесів в біологічних системах. Так, обмін речовин в спорах і насінні рослин при $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$ протікає в 815×10^4 повільніше, ніж при $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [1].

Показано, що необмежено довге зберігання біологічних об'єктів при температурі рідкого азоту ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) не призводить до зміни їх властивостей [2].

У той же час ряд фізико-хімічних факторів шкідливо впливає на живі системи в процесі кріоконсервування.

Експериментальне і подальше клінічне застосування МСК потребує удосконалення традиційних та розроблення нових методів кріоконсервування, які б дозволили більшою мірою зберегти їх життєздатність і морфофункціональні властивості [3, 4].

Метою нашої роботи було дослідити вплив кріозахисних середовищ на збереженість та адгезивні властивості мезенхімальних стовбурових клітин собаки, коша та кроля.

Матеріали і методи. Заморожування клітин проводили в полікарбонатному контейнері Nalgene Mr. Frosty (Sigma, США) зі швидкістю $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до температури $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, після чого зразки переносили в рідкий азот [5]. Кріоконсервування клітин здійснювали при концентрації 1×10^6 клітин/ cm^3 захисного середовища.

Кріоконсервованні зразки зберігали при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ не менше 1-го місяця перед подальшими дослідженнями. Розморожування клітин здійснювали в умовах водяної бані при $t\ 38\text{ }^{\circ}\text{C}$.

В дослідженнях використовували 4 комбінації кріозахисних середовищ:

Дослід 1: (середовище Ігла модифіковане Дюльбеко (ДМЕМ) – 80 %, ембріональна сироватка теляти (ЕСТ) – 20 %) + 10 % диметилсульфоксид (ДМСО);

Дослід 2: ЕСТ – 90 % + ДМСО – 10 %;

Дослід 3: ЕСТ – 45 % + ДМЕМ – 45 % + ДМСО – 10 %;

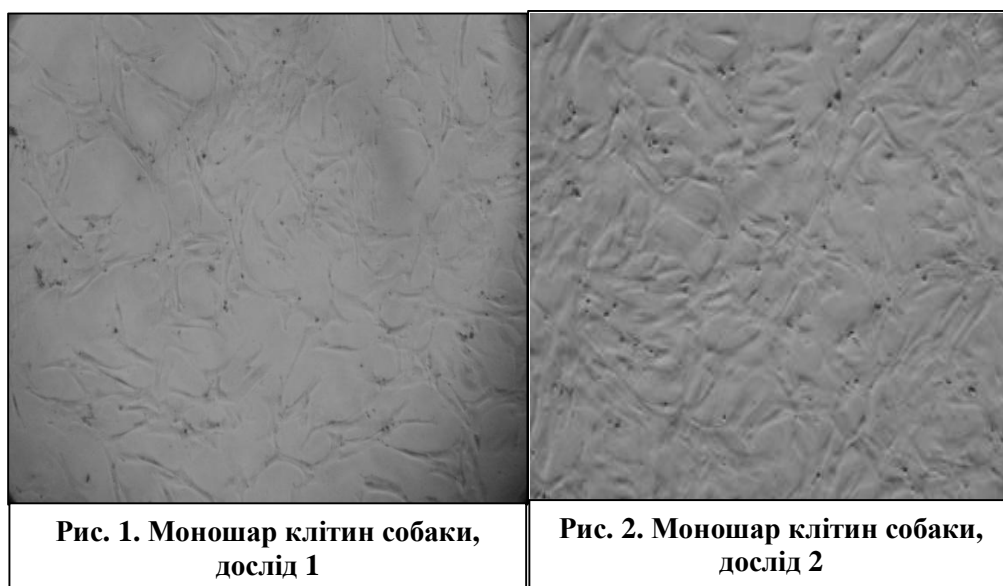
Дослід 4: ЕСТ – 95 % + ДМСО – 5 %.

Життєздатність клітин визначали за допомогою фарбування вітальним барвником трипановим синім, при цьому живі клітини не зафарбовуються, а мертві набувають синього кольору.

Адгезивні властивості МСК оцінювали за здатністю клітин прикріпитися до поверхні культурального посуду (ефективність прикріплення) і за кількістю клітин, здатних розпластуватись на культуральному посуді серед загальної кількості клітин. Для цього клітини висаджували у культуральний посуд із щільністю 3×10^4 клітин/см² площі та культивували в стандартних умовах протягом 24 год.

Результати дослідження.

Результати впливу захисних середовищ на збереженість МСК собаки під час кріоконсервування представлені в таблиці 1 та рис. 1, 2, 3, 4.



Як видно із даних таблиці, найвищу життєздатність МСК собаки спостерігали у досліді 2, при використанні середовища для кріоконсервування до складу якого входять 90% ЕСТ та 10% ДМСО.

Таблиця 1

Ефективність заморожування МСК собаки залежно від складу середовища (M±m, n=3)

Середовище для заморожування	Життєздатність, %	Адгезивні клітини, %
Дослід 1	65±0,5**	69±1,7**
Дослід 2	77,6±1,5	79.3±0,9
Дослід 3	72,3±0,9*	75±1,7
Дослід 4	65,6±1,3**	67.3±1,5*

Примітки: *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

Результати впливу захисних середовищ на збереженість МСК kota під час кріоконсервування представлені в таблиці 2 та рис. 5, 6, 7, 8.

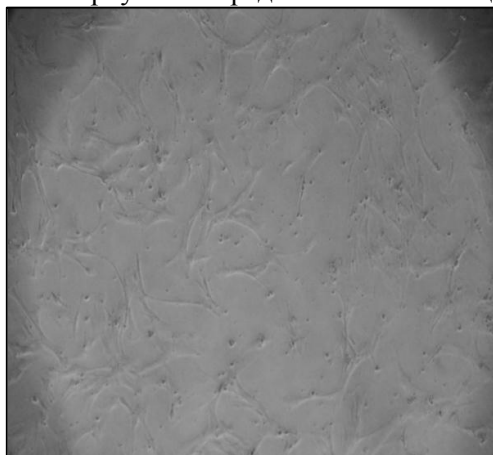


Рис. 3. Моношар клітин собаки, дослід 3

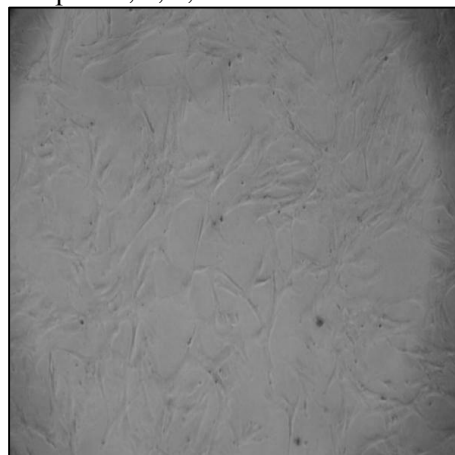


Рис. 4. Моношар клітин собаки, дослід 4

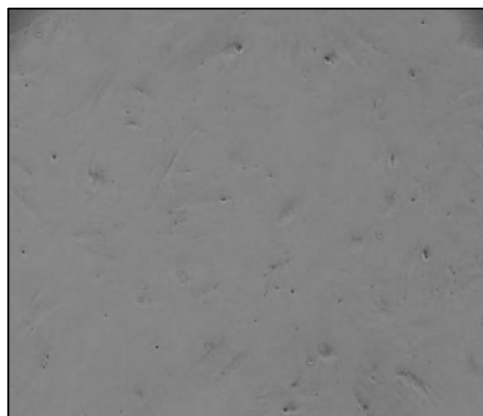


Рис. 5. Моношар клітин kota, дослід 1

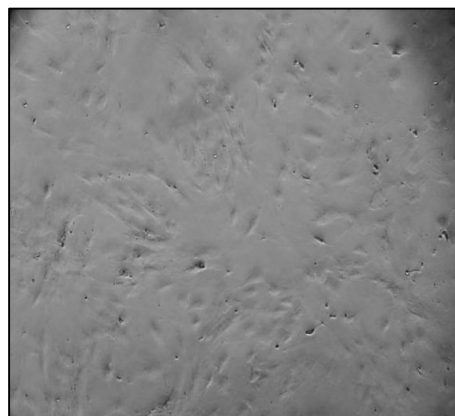


Рис. 6. Моношар клітин kota, дослід 2

Таблиця 2

Ефективність заморожування МСК kota залежно від складу середовища (M±m, n=3)

Середовище для заморожування	Життєздатність, %	Адгезивні клітини, %
Дослід 1	47±1,1 ^{***}	47±0,5 ^{***}
Дослід 2	56,3±0,9 ^{**}	60,6±1,3
Дослід 3	58±1,1 ^{**}	58±1,1
Дослід 4	65,66±0,9	67±2,3

Примітки: ^{***}P<0,001; ^{**}P<0,01; ^{*}P<0,05.

Як видно із даних таблиці, найвищу життєздатність МСК kota спостерігали у досліді 2, при використанні середовища для кріоконсервування у склад якого входять 95 % ЕСТ та 5% ДМСО.

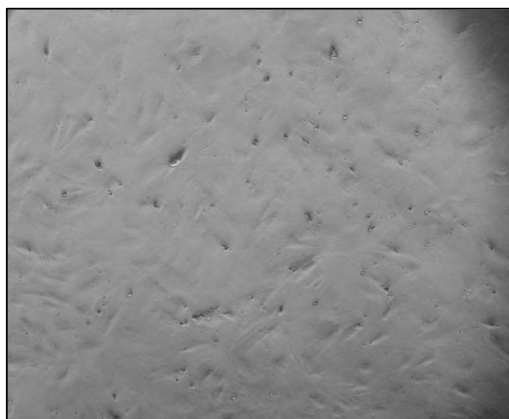


Рис. 7. Моношар клітин kota, дослід 3

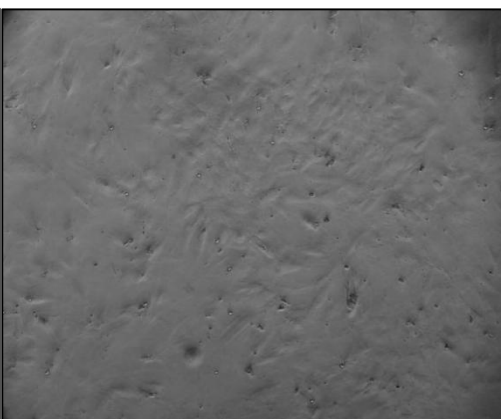


Рис. 8. Моношар клітин kota, дослід 4

Результати впливу захисних середовищ на збереженість МСК кроля під час кріоконсервування представлені в таблиці 3 та рис. 9, 10, 11, 12.

Таблиця 3

Ефективність заморожування МСК кроля залежно від складу середовища (M±m, n=3)

Середовище для заморожування	Життєздатність, %	Адгезивні клітини, %
Дослід 1	51.3±1.3 ^{***}	57.3±1.5 ^{**}
Дослід 2	71.3±2.1	75.6±0.7
Дослід 3	60.3±1.3 ^{**}	61±1.7 ^{**}
Дослід 4	58.3±0.9 ^{**}	59.3±1.9 ^{**}

Примітки: ^{***}P<0,001; ^{**}P<0,01; ^{*}P<0,05.

Як видно із даних таблиці, найвищу життєздатність МСК кроля спостерігали у досліді 2 при використанні середовища для кріоконсервування до складу якого входять 90 % ЕСТ та 10 % ДМСО.

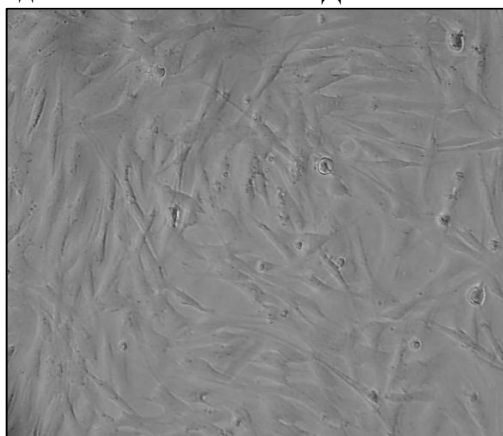


Рис. 9. Моношар клітин кроля, дослід 1

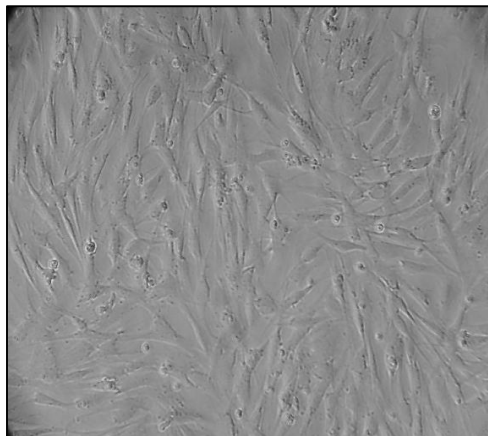


Рис. 10. Моношар клітин кроля, дослід 2

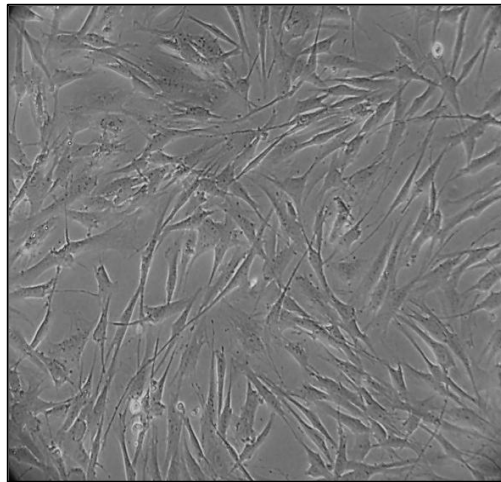


Рис. 11. Моношар клітин кроля, дослід 3

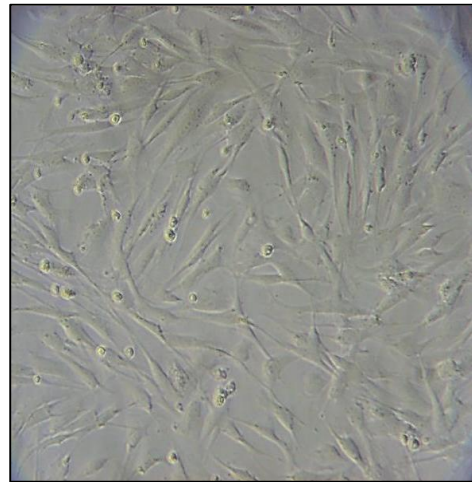


Рис. 12. Моношар клітин кроля, дослід 4

Висновки:

1. Збереженість клітин під час кріоконсервування суттєво залежить від виду тварин та складу кріосередовищ.

2. Кріоконсервування мезенхімальних стовбурових клітин собаки та кроля у середовищі, що містить у своєму складі 90 % ембріональної сироватки теляти та 10 % диметилсульфоксиду, зберігає найвищу життєздатність клітин та запобігає втраті їх адгезивних властивостей.

3. Кріоконсервування мезенхімальних стовбурових клітин kota у середовищі, що містить у своєму складі 95 % ембріональної сироватки теляти та 5 % диметолсульфоксиду, зберігає найвищу життєздатність клітин та запобігає втраті їх адгезивних властивостей.

В подальшому будуть проведенні дослідження щодо заморожування мезенхімальних стовбурових клітин тварин методом вітрифікації.

Література

1. Белоус А. М., Грищенко В. И. Кробиология. – К. : Наук. думка, 1994. – 431 с.
2. Franks F. Biophysics and biochemistry at low temperatures. – Cambridge: Cambridge University Press, 1985. – 210 p.
3. Baust J. M., Buskirk R., Baust J. G. Modulation of the cryopreservation cap: elevated survival with reduced dimethyl sulfoxide concentration // Cryobiology. – 2002. – Vol. 45, № 2. – P. 97–108.
4. Mukherjee N., Chen Z., Sambanis A. et al. Effects of cryopreservation on cell viability and insulin secretion in a model tissue-engineered pancreatic substitute (TEPS) // Cell Transplant. – 2005. – Vol. 14, № 7. – P. 449–456.
5. Colter D. C., Class R., DiGirolamo C. M. et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97, № 7. – P. 3213–3218.

Стаття надійшла до редакції 31.03.2015