

УДК: 576.53:[611.018.26+616.419+616.37]: 536.483: 576.316

**КОВПАК В.В.**, канд. вет. наук, e-mail: vitkovpak@ukr.net,

**МАЗУРКЕВИЧ А.Й.**, д-р вет. наук, професор,

e-mail: a.mazurkevich@nubip.edu.ua,

**КОВПАК О.С.**, аспірант\*, e-mail: kovpak8887@gmail.com

*Національний університет біоресурсів і природокористування України*

**ТАРАСОВ О.А.**, канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: ast97@ukr.net

*Інститут ветеринарної медицини НААН*

## ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА ГЕНЕТИЧНУ СТАБІЛЬНІСТЬ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН КОТА ЗАЛЕЖНО ВІД ДЖЕРЕЛА ЇХ ОТРИМАННЯ

*У статті описаний вплив кріоконсервування на генетичну стабільність стовбурових клітин, отриманих з жирової тканини, кісткового мозку та підшлункової залози. Дослідження показали, що культура стовбурових клітин кісткового мозку є найбільш сприйнятливою до генотоксичного впливу кріоконсервації, оскільки відсоток клітин зі зміненим каріотипом зріс у 1,7 рази у порівнянні з контролем. При заморожуванні-відтаюванні культури стовбурових клітин, отриманих з жирової тканини, відсоток клітин зі зміненим каріотипом зріс у 1,5 рази. Найбільш стійкою виявилася культура стовбурових клітин, отриманих із підшлункової залози: кількість клітин зі зміненим каріотипом зросла у 1,4 рази у порівнянні з контролем.*

**Ключові слова:** кріоконсервування, культура стовбурових клітин кісткового мозку, культура стовбурових клітин жирової тканини, культура стовбурових клітин підшлункової залози, генетична стабільність, кіт.

**Вступ.** Важливим питанням клітинної терапії є довготривале збереження клітинного матеріалу. На даний час з цією метою використовують кріоконсервування. Процес заморожування може бути причиною виникнення морфологічних та хромосомних аномалій у клітинах. Це, у свою чергу, призводить до зміни функціональної активності клітин, зокрема, проліферативної активності, диференційного потенціалу і, як наслідок, здатності до виживання. У процесі заморожування, так само, як і розморожування, важливу роль відіграє утворення всередині клітин та позаклітинно кристалів льоду і газових пухирців, що індукує аномальну сегрегацію хромосом шляхом руйнування мікротрубочок веретена поділу. Повільне заморожування клітинного матеріалу попереджає утворення внутрішньоклітинного льоду, який може викликати розрив клітинної мембрани, проте даний метод кріоконсервування може призводити до дегідратації клітин шляхом утворення позаклітинного льоду. Разом з цим, спільне використання повільного заморожування та кріопротекторів знижує значну частину цих порушень і проявляє стабілізуючий вплив на мікротрубочки [1].

\* Аспірант, науковий керівник – д-р ветеринарних наук, професор **Мазуркевич А.Й.**

Протягом останніх 40 років застосовували різноманітні види кріопротекторів, однак використання диметилсульфоксиду (ДМСО), на сьогоднішній день, дає найкращі результати [2]. ДМСО представляє собою невелику амфифільну молекулу з гідрофільною групою сульфоксиду і двох гідрофобних метил-груп [3]. Він є дипольним апротонним розчинником, який утворює стабільні розчини шляхом диполь-дипольних взаємодій через гідрофобні зв'язки. Завдяки здатності утворювати стабільні водневі зв'язки з молекулами води, ДМСО розчиняється у ній в будь-яких пропорціях [2]. Він добре проникає через плазматичні та внутрішньоклітинні мембрани, утворюючи комплекси з водою, солями, високомолекулярними біологічними речовинами [4].

ДМСО – ендоцелюлярний кріопротектор, механізм дії якого реалізується шляхом зв'язування внутрішньоклітинної води при швидкому проникненні через мембрану [1]. Зв'язування води призводить до зниження швидкості кристалізації та утворення кристалів льоду, що дозволяє зберегти клітину від осмотичного лізису. Однак, рядом авторів було показано, що ДМСО, окрім ефективного кріозахисного впливу, володіє вираженою цитотоксичністю [3, 5, 6]. Зважаючи на це, для успішного заморожування клітин необхідна оптимальна концентрація ДМСО [5]. Найбільш розповсюджена його концентрація для кріоконсервації клітин, при якій забезпечується висока збереженість, становить 10% [7–10]. Зважаючи на токсичність ДМСО, часто до складу середовища вводять додаткові компоненти, які володіють кріозахисними властивостями. Найчастіше ними виступають білкові сполуки, зокрема, ті, які містяться у фетальній сироватці [11, 12].

Зважаючи на вищесказане, **метою** нашого **дослідження** було вивчення впливу кріоконсервування на генетичну стабільність стовбурових клітин kota різного походження. Для досягнення мети були поставлені наступні *завдання*: отримати культури стовбурових клітин кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози; провести кріоконсервування вказаних клітини з використанням стандартного кріозахисного середовища (10% ДМСО з додаванням 90% фетальної сироватки телят (FBS)); оцінити генетичну стабільність стовбурових клітин після розморожування та порівняти з генетичною стабільністю клітин, що не піддавалися кріоконсервуванню.

**Матеріали і методи дослідження.** У досліді для отримання культур клітин використовували жирову тканину, кістковий мозок та підшлункову залозу котів. Всі маніпуляції з тваринами здійснювалися за попередньої згоди власників та з дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 230 від 2006 року).

Отримання культури стовбурових клітин жирової тканини (КСКЖТ) здійснювали з підшкірної жирової клітковини дорослих кішок, яку вилучали під час планової гістеректомії за стандартною методикою [13–15] у власній модифікації. Культуру стовбурових клітин кісткового мозку (КСККМ) отримували з кісткового мозку стегнових кісток дорослих котів за стандартною методикою [15, 16]. Культуру стовбурових клітин підшлункової залози

(КСКПЗ) виділяли із підшлункової залози завмерлих плодів кошенят, що залишалися після надання рододопомоги, модифікованим методом експланту [15]. Одержану клітинну масу культивували у CO<sub>2</sub>-інкубаторі за температури 37°C та 5% концентрації CO<sub>2</sub> [16] у стандартному середовищі: 80% – середовища Ігла модифіковане Дюльбеко (DMEM); 20% – FBS; 10 мкл/см<sup>3</sup> – антибіотика-антимікотика (Sigma, США).

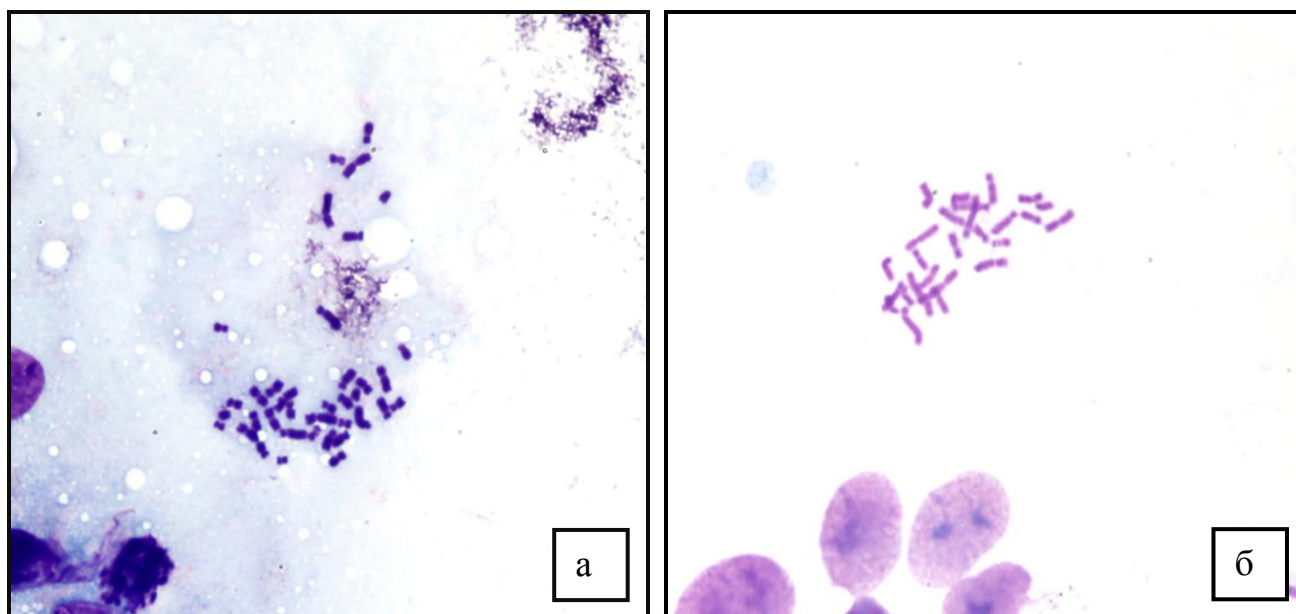
Клітини знімали з використанням 0,25 %-ого р-ну трипсину/ЕДТА) [16]. Подальше пасажування здійснювали у співвідношенні 1:3. Мікроскопічний аналіз і оцінку культури здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Карл Цейс).

У процесі кріоконсервування клітини (концентрація  $1 \times 10^6$  клітин/см<sup>3</sup>) розбавляли середовищем для кріоконсервування (10% ДМСО + 90% FBS). 0,5 мл суспензії переносили в пластикові кріопробірки (Corning, Канада) та інкубували при 4°C протягом 15 хв. Заморожування продовжували в полікарбонатному контейнері Nalgene Mr. Frosty (Sigma, США) зі швидкістю 1°C/хв до температури -80°C, з наступним перенесенням зразків в рідкий азот [17]. Перед подальшими дослідженнями зразки зберігали не менше 1 місяця при -196°C.

Відтаювання зразків проводили на водяній бані при температурі 37°C. Для відмивання від кріозахисного середовища суспензію клітин переносили в центрифужну пробірку, додаючи краплями при постійному перемішуванні середовище DMEM з додаванням 10 % FBS, і центрифугували при 200 g протягом 10 хвилин. Надосадову рідину відбирали, а осад суспендували в середовищі для культивування і використовували для подальших експериментів [16].

Цитогенетичний аналіз проводили на 50 метафазних пластинках кожної групи (n=3). Дослідження проводили на клітинах IV пасажу. Для отримання препаратів хромосом використовували модифікацію стандартного цитогенетичного методу [15, 16]. Отримані препарати забарвлювали за допомогою набору для фарбування «Лейкодиф 200» згідно інструкції виробника. У підготовлених вищезазначеним способом препаратах виявляли кількісні порушення хромосом – анеуплоїдію, поліплоїдію. Аналіз метафазних пластинок здійснювали за допомогою мікроскопа Leica DMR (Німеччина), збільшення  $\times 400$ ,  $\times 1000$ .

**Результати та їх обговорення.** Аналіз каріотипу досліджуваних стовбурових клітин показав, що для них характерні анеуплоїдія та поліплоїдія як за кріоконсервування, так і без (рис. 1.)

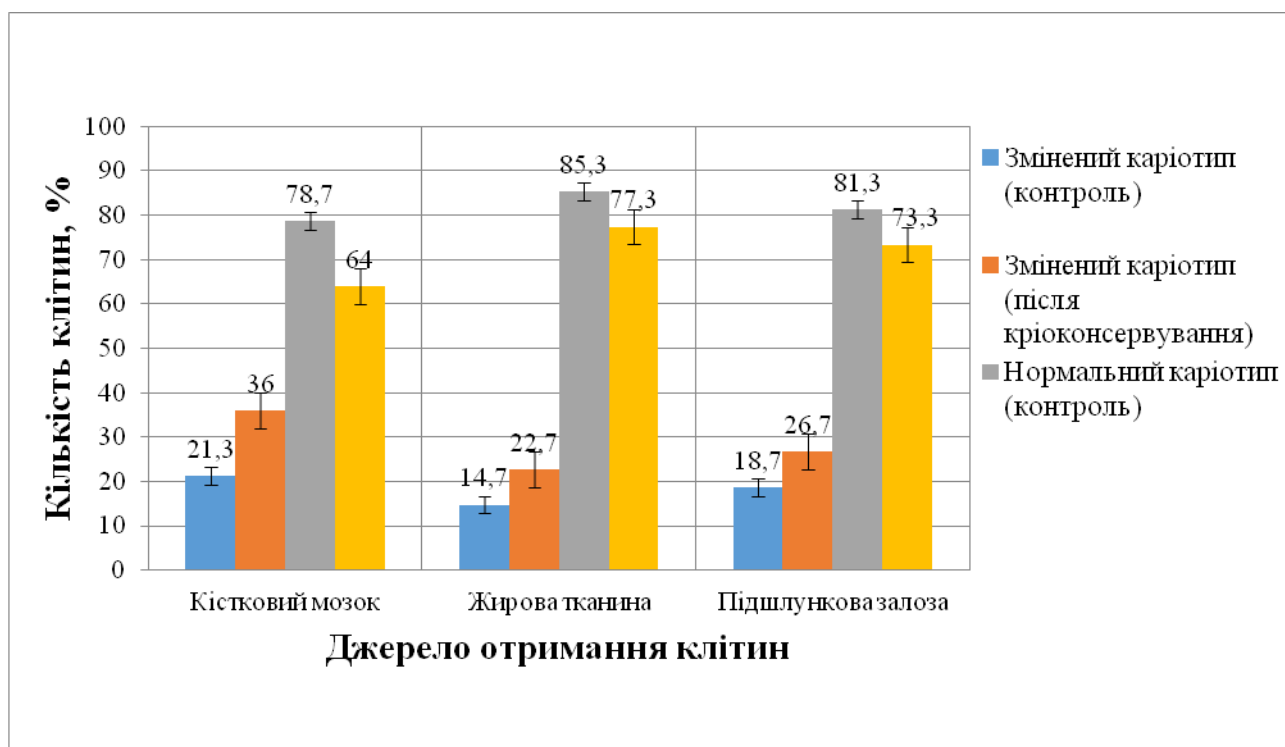


**Рис. 1. Мікрофотографії метафазних пластинок культури клітин жирової тканини kota (IV пасаж), забарвлення Лейкодиф 200: а) нормальний каріотип,  $n=38$ ; б) анеуплоїдія,  $n=26$ . Зб.  $\times 1000$ .**

Варто відмітити, що у культурах стовбурових клітин, що піддавалися кріоконсервуванню рівень хромосомних порушень був вищий, ніж у контролі (без кріоконсервування). Результати досліджень виявлених хромосомних порушень приведено на рисунку 2.

Так, у КСККМ кількість клітин зі зміненим каріотипом зросла до  $36,0 \pm 1,3\%$ , що у 1,7 рази ( $p < 0,001$ ) більше порівняно з контролем. У КСКЖТ даний показник збільшився у 1,5 рази ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем і становив  $22,7 \pm 1,3\%$ . КСКПЗ виявилася найбільш стійкою до токсичного впливу ДМСО: у дослідній групі чашок кількість клітин зі зміненим каріотипом зросла у 1,4 рази ( $p < 0,01$ ) порівняно з контролем і складала  $26,7 \pm 0,9\%$ .

За останній час питання генетичної стабільності стовбурових клітин піднімалося багатьма науковцями. Проте, питання впливу кріоконсервування, як основного методу збереження клітинного матеріалу, на каріотип стовбурових клітин вивчений недостатньо. Основна маса публікацій щодо цього питання присвячена ембріональним стовбуровим клітинам і ембріонам [18–20]. Проте, значна кількість даних щодо впливу кріоконсервування на генетичну стабільність клітин значно відрізняється. Так, наприклад, у дослідженнях Аве М. та ін. [18] описується відсутність генотоксичного впливу ДМСО при кріоконсервуванні клітин. У той же час, більшість науковців все ж вказують не тільки на генетичні, а і на фенотипові зміни у клітинах, які піддаються впливу ДМСО [18, 21].



**Рис. 2. Зміни каріотипу стовбурових клітин kota, отриманих з різних джерел, після криоконсервування,  $M \pm m$ ,  $n = 3$ .**

Науковцями описується різні механізми прояву токсичності ДМСО на клітини. Так, за даними Lin C. K. та ін. і Liu J. ДМСО проапоптично впливає на клітини при концентрації понад у 2%. Разом з тим, Nakura A. та ін. [22] при проведенні теста Еймса виявили пряму кореляцію між мутагенністю та концентрацією ДМСО: так 33%-ва концентрація ДМСО з експозицією 10 хв призводить до 10 кратного збільшення мутагенності у клітинах. З даних, представлених Sanmartín-Suárez C. та ін. [23] та Snow J.T. [24], стало відомо, що ДМСО може бути прооксидантом, завдяки окисленню тіольних груп на білках. При цьому, впливаючи на функції останніх, ДМСО індукує зупинку циклу мейозу шляхом порушення хромосомного вирівнювання і конденсації хроматину / хромосом [25].

Окрім впливу на генетичний апарат клітин, ДМСО здатний впливати і на їх фенотип. Загальновідомо, що метилювання і ацетилювання ДНК контролює хід клітинної диференціації [26]. ДМСО здатний впливати на один чи декілька Dnmts (DNA-methyltransferases), а також ферменти, які змінюють гістони. Гіпер- чи гіпометилювання (під дією ДМСО), яке може зустрічатися у декількох геномних і генних локусах, здатне впливати на фенотип стовбурових клітин [27].

Проте, варто зазначити, що у літературних даних описані відмінності впливу ДМСО на клітини різного походження. Так, Lawson A. та ін. [28] у своїх дослідженнях вказують, що токсичність ДМСО вища для клітин з вищою метаболічною активністю. Що, у свою чергу, може бути поясненням

отриманих нами результатів, зокрема, відмінностей у змінах генетичної стабільності клітин після кріоконсервування залежно від джерела отримання.

Отримані нами дані щодо хромосомної стабільності культури стовбурових клітин, різного походження (кісткового мозку, жирової тканини та підшлункової залози), підтверджують, що за кріоконсервування збільшується кількість клітин із порушеним каріотипом. Отже, дослідження безпечності культури клітин є важливою умовою перед їх подальшим застосуванням.

#### **Висновки та перспективи подальших досліджень:**

1. За результатами цитогенетичного аналізу встановлено, що у культурі стовбурових клітин кісткового мозку у процесі кріоконсервування-відтаювання у 1,7 рази збільшується відсоток клітин зі зміненим каріотипом (у порівнянні з контролем).

2. У культурі стовбурових клітин, отриманих з жирової тканини, відсоток клітин зі зміненим каріотипом збільшився у 1,5 рази (у порівнянні з контролем).

3. Найбільш стійкою до генотоксичного впливу кріоконсервування виявилася культура стовбурових клітин, отриманих з підшлункової залози: кількість клітин зі зміненою кількістю хромосом зросла у 1,4 рази у порівнянні з контролем.

Отримані дані щодо генотоксичного впливу кріоконсервування на КСККМ, КСКЖТ та КСКПЗ будуть використовуватися з метою оцінки біобезпечності вказаних культур при їх використанні з лікувальною метою.

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Vincent C. Dimethylsulphoxide affects the organisation of microfilaments in the mouse oocyte / C. Vincent, S.J. Pickering, M.H. Johnson et al // *Mol Reprod Dev.* – 1990. – № 26 (3). – P. 227–235.
2. Пушкарь Н.С. Криопротекторы / Н.С. Пушкарь [и др.]. – Киев: Наук. думка, 1978. – 204 с.
3. Gurtuvenko A. A. Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethylsulfoxide / A. A. Gurtuvenko, J. Anwar // *J. Phys. Chem. B.* – 2007. – Vol. 6, № 111. – P. 10453–10460.
4. Цунаева А.А. Кріоконсервирование клеточных суспензий / А.А. Цунаева [и др.]. – Киев: Наук. думка, 1983. – 240 с.
5. Rossi C. Viral contamination of bovine fetal lung cultures and bovine fetal serum / C. Rossi, C. Bridgman, G. Kiesel // *Am. J. Vet. Res.* – 1980. – Vol. 41, № 10. – P. 1680–1681.
6. Sperling S. Toxicity of dimethylsulfoxide (DMSO) to human corneal endothelium *in vitro* / S. Sperling, I.G. Larsen // *Acta. Ophthalmology (Copenh).* – 1979. – Vol. 57, № 5. – P. 891–898.
7. Bakken A.M. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells / A.M. Bakken // *Current Stem Cell Research & Therapy.* – 2006. – №1. – P. 47–54.
8. Gorlin J. Stem cell cryopreservation / J. Gorlin // *Infusional Chemother.* – 1996. – Vol. 6. – P. 23–27.
9. Rowley S.D. Post-thaw removal of DMSO does not completely abrogate infusional toxicity or the need for pre-infusion histamine blockade / S.D. Rowley, Z. Feng, D. Yadock et al. // *Cytotherapy.* – 1999. – Vol. 1, № 6. – P. 439–446.
10. Абдулкадыров К.М. Получение и клиническое применение периферических гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови / К.М. Абдулкадыров, Н.А. Романенко, Н.Н. Старков и др. // *Вопросы онкологии.* – 2000. – № 46. – С. 513–520.

11. Grill G. Role of serum on cryopreservation and subsequent viability of mouse bone marrow hemopoietic stem cells / G. Grill, A. Porcellini, G. Lucarelli // *Cryobiology*. – 1980. – Vol. 17, № 5. – P. 516–520.
12. Malinin G. Cytotoxic effect of dimethylsulfoxide on the ultrastructure of cultured Rhesus kidney cells / G. Malinin // *Cryobiology*. – 1973. – Vol. 10, № 1. – P. 22–32.
13. Bunnell B.A. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation / B.A. Bunnell, M. Flaatz, Ch. Gagliardi, et al. // *Methods*. 2008. – № 45 (2). – P. 115–120.
14. Carswell K. A. Culture of isolated human adipocytes and isolated adipose tissue / K.A. Carswell, Mi-Jeong Lee, S.K. Fried // *Methods Mol Biol*. – 2012. – № 806. – P. 203–214.
15. Ian Freshney R. Culture of animal cells: a manual of basic technique: 5<sup>th</sup> ed. / R. Ian Freshney. – USA: John Wiley & Sons. – 2005. – 642 p.
16. Мазуркевич А.Й. Клітинні технології у ветеринарній медицині: Навчальний посібник / А.Й. Мазуркевич, В.В. Ковпак, В.Б. Данілов. – К.: КОМПРИНТ. – 2014. – 132 с.
17. Colter D.C. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow / D.C. Colter, R. Class, C.M. Digirolamo et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2000. – Vol. 97, № 7. – P. 3213–3218.
18. Aye M. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol / M. Aye, C. Di Giorgio, M. De Mo et al. // *Food Chem Toxicol*. – 2010 № 48 (7) . – P. 1905–1912.
19. Wang X. Cryopreservation of tissue-engineered dermal replacement in Me<sub>2</sub>SO: Toxicity study and effects of concentration and cooling rates on cell viability / X. Wang, T. C. Hua, D. W. Sun et al. // *Cryobiology*. – 2007. – № 55 (1). – P. 60–65.
20. Karlsson J.O.M. optimization of cryoprotectant loading into murine and human oocytes / J.O.M. Karlsson, E.A. Szurek, A.Z. Higgins et al. // *Cryobiology*. – 2014. – № 68 (1). – P. 18–28.
21. Preisler H.D. Differentiation of erythroleukemic cells in vitro: irreversible induction by dimethyl sulfoxide (DMSO) / H.D. Preisler, M. Giladi // *J Cell Physiol*. – 1975. – № 85 (3). – P. 537–546.
22. Hakura A. Dimethyl sulfoxide (DMSO) is mutagenic for bacterial mutagenicity tester strains / A. Hakura, H. Mochida, K. Yamatsu // *Mutat Res*. – 1993. – № 303. – P. 127–133
23. Sanmartín-Suárez C. Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants / C. Sanmartín-Suárez, R. Soto-Otero, I. Sánchez-Sellero et al. // *J Pharmacol Toxicol Methods*. – 2011. – № 63 (2). – P. 209–215.
24. Snow J.T. Oxidation of sulfhydryl groups to disulfides by sulfoxides / J.T. Snow, J.W. Finley, M. Friedman // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1975. – № 64 (1). – P. 441–447.
25. Zhang D.X. Involvement of ER-calreticulin-Ca<sup>2+</sup> signaling in the regulation of porcine oocyte meiotic maturation and maternal gene expression / D.X. Zhang, X.P. Li, S.C. Sun et al. // *Mol Reprod Dev*. – 2010. – № 77. – P. 462–471.
26. Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development / E. Li // *Nat Rev Genet*. – 2002. – № 3 (9). – P. 662–673.
27. Iwatani M. Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body / M. Iwatani, K. Ikegami, Y. Kremenska et al. // *Stem Cells*. – 2006. – № 24. – P. 2549–2556.
28. Lawson A. Cytotoxicity effects of cryoprotectants as single-component and cocktail vitrification solutions / Lawson A., Ahmad H., Sambanis A. // *Cryobiology*. – 2011. – № 62(2). – P. 115–122.

**ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ НА ГЕНЕТИЧЕСКУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОТА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСТОЧНИКА ИХ ПОЛУЧЕНИЯ / Ковпак В.В., Мазуркевич А.И., Ковпак О.С., Тарасов О.А.**

*В статье описано влияние криоконсервирования на генетическую стабильность стволовых клеток, полученных из жировой ткани, костного мозга и поджелудочной*

железы. Исследования показали, что культура стволовых клеток костного мозга является наиболее восприимчивой к воздействиям криоконсервации, поскольку процент клеток с измененным кариотипом вырос в 1,7 раза по сравнению с контролем. При замораживании-оттаивании культуры стволовых клеток, полученных из жировой ткани, процент клеток с измененным кариотипом вырос в 1,5 раза. Наиболее устойчивой оказалась культура стволовых клеток полученных из поджелудочной железы, количество клеток с измененным кариотипом выросла в 1,4 раза по сравнению с контролем.

**Ключевые слова:** криоконсервирование, культура стволовых клеток костного мозга, культура стволовых клеток жировой ткани, культура стволовых клеток поджелудочной железы, генетическая стабильность, кот.

## INFLUENCE OF CRYOPRESERVATION ON THE GENETIC STABILITY OF THE CAT STEM CELLS IN DEPENDENCE ON THEIR SOURCE / Kovpak V.V., Mazurkevich A.I., Kovpak O.S., Tarasov O.A.

**Introduction.** An important issue of the cell therapy is the long-term preservation of the cell material. Currently, cryopreservation is used for this purpose. In the process of the cell material freezing, there are two main problems of its safe use: morphological and chromosomal abnormalities. This in turn leads to a change in the functional activity of the cells such as proliferative activity, differentiation and, as a consequence, ability to survive. In the process of freezing, and especially unfreezing, the important role is played by formation of ice crystals and gas bubbles both intra- and extracellularly, which in turn induces anomalous segregation of chromosomes by destroying the spindle microtubules. Slow freezing of the cell material prevents formation of intracellular ice (which can cause rupture of the cell membrane), but such cryopreservation method can lead to cell dehydration by formation of extracellular ice. However, the combined use of slow freezing and cryoprotectants reduces a significant part of these disorders and has a stabilizing effect on microtubules.

Over the past 40 years, various types of cryoprotectants have been used, but dimethylsulfoxide (DMSO) yields the best results for today. However, in spite of the DMSO toxicity, additional components that contain cryoprotective properties are often introduced into the medium, most often these are protein compounds (for our experience we used fetal calf serum).

In view of the foregoing, the purpose of our research was to study the effect of dimethylsulfoxide (DMSO) on the genetic stability of the cat stem cells, depending on their source.

**Materials and methods.** During the experiment, we used fat tissue, bone marrow and pancreas of cats to obtain cell cultures. The material was obtained in parallel, during planned surgical operations. All manipulations with animals were carried out with the prior consent of their owners and in compliance with the requirements of the Law of Ukraine "On the Protection of Animals from Cruel Treatment" (Article 230 dated on 2006).

During cryopreservation, cells (concentration  $1 \times 10^6$  cells/cm<sup>3</sup>) were diluted with a cryopreservation medium (10% DMSO + 90% FBS) and subjected to slow freezing. Before further studies, the samples were stored during at least 1 month at -196 °C. Cytogenetic analysis was performed on 50 metaphase plates of each group ( $n = 3$ ) according to a standard procedure. The studies were carried out on cells of passage IV.

**Results of research and discussion.** In culture of the bone marrow stem cells the number of cells with altered karyotype increased to  $36.0 \pm 1.3\%$ , which is in 1.7 times ( $p < 0.001$ ) more than in the control group (without cryopreservation). Whereas in culture of the fat tissue stem cells this indicator increased in 1.5 times ( $p < 0.05$ ) in comparison with the control and was  $22.7 \pm 1.3\%$ . Culture of the pancreas proved to be the most resistant to the toxic effect of DMSO, in the experimental group of cups the number of cells with altered karyotype increased in 1.4 times ( $p < 0.01$ ) as compared to the control group and was  $26.7 \pm 0.9\%$ .



**Conclusions and prospects for further research:**

1. According to the results of cytogenetic analysis, it was established that in the culture of the bone marrow stem cells in the process of cryopreservation-defrosting, the percentage of cells with altered karyotype (in comparison with the control) increases in 1.7 times.

2. In the culture of the fat tissue stem cells, this indicator increased in 1.5 times (in comparison with the control).

3. The culture of the pancreas stem cells turned out to be the most resistant to the effects of cryopreservation, the number of cells with a changed number of chromosomes increased in 1.4 times in comparison with the control.

The obtained data on the differences in the effects of cryopreservation on culture of stem cell bone marrow, fat tissue and pancreas will be used to establish biosafety of these cultures.

**Keywords:** cryopreservation, culture of the bone marrow stem cells, culture of the fat tissue stem cells, culture of the pancreas stem cells, genetic stability, cat.

**REFERENCES**

1. Vincent, C., Pickering, S.J., Johnson, M.H. et al. (1990). Dimethylsulphoxide affects the organisation of microfilaments in the mouse oocyte. *Mol Reprod Dev*, 26 (3), 227-235.

2. Pushkar, N.S., Shrago, M.I. & Belous, A.M. (1978). *Krioprotektory [Cryoprotectors]*. K.: Nauk. dumka [in Russian].

3. Gurtuvenko, A.A. & Anwar, J. (2007). Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethylsulfoxide. *J. Phys. Chem. B*, 6 (111), 10453-10460.

4. Tsunayeva, A.A., Agranenko, V.A. & Fedorova, L.I. (1983). *Kriokonservirovaniye kletochnykh suspenziy [Cryopreservation of cell suspensions]*. K.: Nauk. dumka [in Russian].

5. Rossi, C., Bridgman, C. & Kiesel, G. (1980). Viral contamination of bovine fetal lung cultures and bovine fetal serum. *Am. J. Vet. Res*, 41, 10, 1680-1681.

6. Sperling, S. & Larsen, I.G. (1979). Toxicity of dimethylsulfoxide (DMSO) to human corneal endothelium *in vitro*. *Ophthalmology (Copenh)*, 57, 5, 891-898.

7. Bakken, A.M. (2006). Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 1, 47-54.

8. Gorlin, J. (1996) Stem cell cryopreservation. *Infusional Chemother.*, 6, 23-27.

9. Rowley, S. D., Feng, Z., Yadock, D. et al. (1999). Post-thaw removal of DMSO does not completely abrogate infusional toxicity or the need for pre-infusion histamine blockade. *Cytotherapy*, 1, 6, 439-446.

10. Abdulkadyrov, K.M., Romanenko, N.A., Starkov, N.N. et al. (2000). Polucheniye i klinicheskoye primeneniye perifericheskikh gemopoeticheskikh stvolovykh kletok iz pupovinnoy krovi [Preparation and clinical application of peripheral hematopoietic stem cells from umbilical cord blood]. *Voprosy onkologii – Oncology question*, 46, 513-520 [in Russian].

11. Grill, G., Porcellini, A. & Lucarelli, G. (1980). Role of serum on cryopreservation and subsequent viability of mouse bone marrow hemopoetic stem cells. *Cryobiology*, 17, 5, 516-520.

12. Malinin, G. (1973). Cytotoxic effect of dimethylsulfoxide on the ultrastructure of cultured Rhesus kidney cells. *Cryobiology*, 10, 1, 22-32.

13. Bunnell, B.A., Flaat, M., Gagliardi, Ch. et al. (2008). Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation, *Methods*, 45 (2), 115-120.

14. Carswell, K.A., Mi-Jeong, Lee & Fried, S.K. (2012). Culture of Isolated Human Adipocytes and Isolated Adipose Tissue, *Methods Mol Biol.*, 806, 203-214.

15. Ian, Freshney R. (2005). *Culture of animal cells: a manual of basic technique (5<sup>th</sup> ed)*. USA: John Wiley & Sons.

16. Masurkewitsch, A.J., Kowpak, V.V. & Danilow, W.B. (2014). *Klitinni tehnologii u weterinarnij medizini. Nawtschal'nij pocibnik [Cellular technologies in veterinary medicine. Manual]*. Kyev : KOMPRINT [in Ukrainian].

17. Colter, D.C., Class, R., Digirolamo, C.M. et al. (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 7, 3213-3218.
18. Aye, M., Di Giorgio, C., De Mo, M., et al. (2010). Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. *Food Chem Toxicol.*, 48 (7), 1905-1912.
19. Wang, X, Hua, T. C., Sun, D.W et al. (2007). Cryopreservation of tissue-engineered dermal replacement in Me<sub>2</sub>SO: Toxicity study and effects of concentration and cooling rates on cell viability. *Cryobiology*, 55 (1), 60-65.
20. Karlsson, J.O.M., Szurek, E.A., Higgins, A.Z. et al. (2014). Optimization of cryoprotectant loading into murine and human oocytes. *Cryobiology*, 68 (1), 18-28.
21. Preisler, H.D. & Giladi, M. (1975) Differentiation of erythroleukemic cells in vitro: irreversible induction by dimethyl sulfoxide (DMSO). *J Cell Physiol.*, 85(3), 537-546.
22. Hakura, A., Mochida, H. & Yamatsu, K. (1993). Dimethyl sulfoxide (DMSO) is mutagenic for bacterial mutagenicity tester strains. *Mutat Res.*, 303, 127-133.
23. Sanmartín-Suárez, C., Soto-Otero, R., Sánchez-Sellero, I. et al. (2011). Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 63 (2), 209-215.
24. Snow, J.T., Finley, J.W. & Friedman, M. (1975). Oxidation of sulfhydryl groups to disulfides by sulfoxides. *Biochem Biophys Res Commun*, 64 (1), 441-447.
25. Zhang, D.X., Li, X.P., Sun, S.C. et al. (2010). Involvement of ER-calreticulin-Ca<sup>2+</sup> signaling in the regulation of porcine oocyte meiotic maturation and maternal gene expression. *Mol Reprod Dev.*, 77, 462-471.
26. Li, E. (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 3 (9), 662-673.
27. Iwatani ,M., Ikegami, K., Kremenska, Y., et al. (2006). Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem Cells*, 24, 2549-2556.
28. Lawson, A., Ahmad, H. & Sambanis, A. (2011). Cytotoxicity effects of cryoprotectants as single-component and cocktail vitrification solutions. *Cryobiology*, 62 (2), 115-122.