

зберігання. Альтернативою для короткочасного зберігання є консервування за температури навколишнього середовища. Кожен тип тканинно-інженерних конструкцій (ТІК) потребує індивідуальних протоколів консервування.

Метою даної роботи було дослідження властивостей МСК під час 3D культивування в складі різних конструкцій, та також за зберігання різними методами.

Експерименти проводили на МСК людини, виділених з біоптатів шкіри дорослих донорів після їх інформованої згоди згідно правил біомедичної етики та вимог Комітету з біоетики ІПКіК НАН України. Культивування здійснювали в стандартних умовах за температури 37°C, 5% CO₂ і 95% вологості в середовищі, що складалося з α -Minimal Essential Medium (α -MEM), доповненої 10% фетальної бичачої сироватки (ФБС), 50 мкг/мл пеніциліну, 50 мкг/мл стрептоміцину та 0,2 мМ/л-глутаміну. Сфероїди отримували методом висячої краплі. Інкапсуляцію МСК в альгінатні мікросфери (АМС) проводили шляхом електророзпилення. Кріоконсервування проводили шляхом повільного охолодження під захистом 10% диметилсульфоксиду (ДМСО). Гіпотермічне зберігання проводили за температури 22 °C в герметичних контейнерах в α -MEM з 10% ФБС. Визначали показники життєздатності, проліферативної активності, здатності до диференціювання, метаболічної активності і метаболічного режиму клітин за культивування і після зберігання в складі різних ТІК.

Визначено умови культивування (концентрацію клітин та строк культивування) для створення сфероїдів у вигляді щільних агрегатів з обмеженою швидкістю дифузії. Встановлено, що клітини, виділені зі сфероїдів, є життєздатними та мають підвищену колонієутворюючу активність. Встановлено, що МСК за культивування в альгінатних мікросферах не проліферують, мають знижену метаболічну активність, зберігають життєздатність і здатність до багатолінійного диференціаціонування та характеризуються підвищеною стійкістю до активних форм кисню.

за численними літературними даними про якісний склад продуктів життєдіяльності *P. aureofaciens*, що утворюються за умов періодичного культивування в аеробному середовищі. Відомо, що серед метаболітів наявні аміак, індол, сполуки амонію та аміни, які утворюються внаслідок гідролізу пептидів та метаболізму амінокислот та інших азотовмісних сполук та мають основні властивості. Приблизно з 72-ї години культивування культура переходила до фази деградації, про що свідчило зниження як кількості життєздатних клітин, так і концентрації біомаси.

Таким чином, було розроблено оптимальні технологічні умови культивування *P. aureofaciens*, при цьому тривалість культивування складала 16-20 годин, за цей час культура сягала максимальних значень концентрації біомаси (6,6-6,8 г/л) та життєздатних клітин ($1,7-2,0 \times 10^{10}$ КУО/мл), відбувалась майже повна утилізація цукрів (залишкова концентрація 0,3 %) та стабілізувався рівень кислотності середовища (8,6-8,9 од. pH).

Біотехнологічні аспекти розробки і зберігання тканинно-інженерних конструкцій на основі мезенхімальних стовбурових клітин

¹Труфанова Н.А., ¹Рогульська О.Ю., ¹Губеня О.С., ¹Труфанов О.В.,

²Кот Ю.Г., ¹Ревенко О.Б., ¹Мазур С.П., ¹Петренко О.Ю.

¹Відділ кріобіохімії Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
м. Харків, Україна

²Кафедра біохімії Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна,
м. Харків, Україна
n.a.trufan@gmail.com

Мезенхімальні стовбурові/стромальні клітини (МСК) мають унікальний біологічний потенціал. Культивування в різних конструкціях (сфероїди, альгінатні мікросфери, скаффолди) впливає на властивості МСК різним чином, що створює підґрунтя для їх широкого застосування в лабораторній і клінічній практиці. Ефективна стратегія збереження є важливою умовою для доступності подібних конструкцій. Кріоконсервування – єдиний спосіб для тривалого

K_2HPO_4 (0,5 г/л) та $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2 г/л). Компоненти перемішували в воді до повного розчинення, доводили рівень рН до 7,0-7,2 та стерилізували протягом 1,5 години за температури 121 °С. Середовище охолоджували до 28 °С, вносили маточну культуру *P. aureofaciens* та культивували за даної температури, надлишковому тиску 0,25 атм. при перемішуванні та аерації стерильним повітрям рівного об'єму за хвилину. Культуру вирощували протягом 80 годин, періодично беручи проби для визначення концентрації біомаси, кількості життєздатних клітин, концентрації цукрів та рівень рН.

Для визначення біомаси проби культури центрифугували при 8 тис. об/хв. протягом 15 хвилин, осад висушували за 90-100 °С, видаляли залишки вологи шляхом витримування у скляному ексікаторі з безводним $CaCl_2$, зважували на аналітичних вагах та порівнювали отриману вагу з вагою пустої пробірки до внесення проби культури. Кількість життєздатних клітин визначали методом десятикратних серійних розведень та посівом у чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром. Концентрацію цукрів визначали рефрактометричним методом, а рівень рН із застосуванням лабораторного рН-метра.

Впродовж перших чотирьох годин культивування концентрація біомаси, вміст життєздатних клітин та цукрів залишалися на рівнях початкових значень даних показників і становили 1,1-1,5 г/л, $0,8-1,0 \times 10^8$ КУО/мл та 1,05 г/л відповідно, а рівень кислотності коливався в межах 7,2-7,5 од. рН. Це свідчить про те, що перші 4 години культура перебувала у лаг-фазі, протягом якої, згідно класичних уявлень, відбувається адаптація клітин до умов культивування підготовка до поділу.

Результати аналізів проб, відібраних через 8 та 16 годин після початку культивування, свідчать про перехід культури до лог-фази, оскільки криві росту кількості біомаси та життєздатних клітин мають вигляд графіку експоненційної функції. При цьому зниження концентрації цукрів у поживному середовищі відбувалося обернено-пропорційно до росту культури. Цікаво, що лужність поживного середовища підвищувалася під час росту культури, сягаючи рівнів рН 8,1 та 8,6 на восьму та шістнадцяту години культивування. Це узгоджується