

Цитохимическое выявление фосфолипидов в гематопозитических клетках костного мозга собак после замораживания в жидком азоте

Л.А. Водопьянова, Г.Ф. Жегунов

Харьковская государственная зооветеринарная академия

Среди различных методов исследования клеток костного мозга особое место занимают цитохимические, которые сочетают чувствительность биохимических методов с наглядностью цитологических. Они позволяют выявить клеточную разнородность и изменения цитохимического спектра, так липиды в элементах лимфопоэза в норме не выявляются ни на одной стадии клеточного созревания [1, 4], поэтому некоторые ученые использовали в своих экспериментах окраску суданом черным для идентификации клеток лимфопоэза от недифференцированных бластных клеток [8].

Цитохимическое изучение содержания фосфолипидов в элементах гемопоэза позволит получить ряд данных, важных для понимания метаболических особенностей кроветворных клеток, подверженных действию криопротекторов и низких температур (-196°C).

Целью исследования являлось цитохимическое выявление и оценка содержания фосфолипидов в клетках костного мозга собак после замораживания-отогрева. В частности, предлагалось цитохимически оценить содержание фосфолипидов после действия криопротекторов, а также исследовать показатели фосфолипидов после замораживания без применения криопротекторов, и после замораживания под защитой различных концентраций ДМСО, ПЭО-400, глицерина.

Материалы и методы

Объектом исследования служил костный мозг половозрелых собак (3-4 летние самцы, массой 5-10 кг). Для получения клеток костного мозга за основу бралась методика [10, 11].

Конечная концентрация ДМСО при добавлении к суспензии костного мозга была 10, 7, 5%, ПЭО-400 – 10, 15, 20%, глицерина – 10, 20, 30%. Инкубация с растворами ДМСО проводилась 10 минут, ПЭО-400 и глицерином 30 минут в условиях 4°C.

Замораживание клеток костного мозга проводили в микротюбиках («Eppendorf», Spektr) по методикам [9, 12].

Фосфолипиды в клетках костного мозга собак окрашивали по методике [4, 6]. После действия криопротектора время окраски мазка сокращали

[5]. Показатели интенсивности реакции выражали с помощью SGK (среднего гистохимического коэффициента) вычисляемого по формуле:

$$СКГ = \frac{0 + 1a + 2b + 3c}{100},$$

где цифры 3, 2, 1 и 0 – степени интенсивности окраски, а буквы – число клеток с той или иной интенсивностью реакции. Цифра 100 в знаменателе – число подсчитанных клеток. SGK дает значительно больше информации по сравнению с подсчетом процентного содержания положительно реагирующих клеток [5].

Пробы изучали в световом микроскопе (10×100, ZEISS, Germany) с камерой (Microocular for PC connection).

Эксперименты проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001).

Результаты и обсуждение

Инкубация клеток костного мозга собак с растворами криопротекторов снижает содержание фосфолипидов в клетках, особенно в клетках эритроцитарного ряда, изначально характеризующихся невысоким содержанием фосфолипидов (табл. 1). Причем, чем выше концентрация криопротекторов, тем ниже SGK. В большей степени это выражено в клетках костного мозга после инкубации с растворами ДМСО. А в клетках, инкубированных с растворами глицерина, SGK наиболее близок к показателям в нативных клетках (табл. 2-4).

Показано, что процесс замораживания-отогрева без криопротектора оказывается очень неблагоприятным для клеток костного мозга собак. После указанного воздействия, содержание фосфолипидов в клетках значительно сокращается. В меньшей степени этот процесс выражен в недифференцированных бластах (табл. 1).

В клетках эритроцитарного ряда содержится небольшое количество фосфолипидов. Их роль берет на себя холестерол [1, 7]. В данных клетках после замораживания в жидком азоте, даже под защитой криопротекторов, не сохранились фосфолипиды в количестве, достаточном для определения цитохимическими методами.

Адрес для корреспонденции: Водопьянова Л.А. Харьковская государственная зооветеринарная академия, пгт. Малая Даниловка, Харьковская обл., Украина 62341

Таблица 1. Показатели СГК фосфолипидов в мазках из суспензии костного мозга собак (самцов 3-4 лет) до и после замораживания в жидком азоте без применения криопротекторов

Показатель миелограммы	Натив	Замораживание без криопротектора (контроль)
Ретикулярные клетки	0,743±0,053	0,325±0,011
Недифференцированные бласты	1,986±0,075	1,634±0,086
Миелобласты	1,843±0,029	0,986±0,088
Промиелоциты	1,886±0,067	0,981±0,026
Миелоциты	1,958±0,021	0,901±0,063
Метамиелоциты	2,338±0,096	0,624±0,054
Палочкоядерные	2,894±0,081	–
Сегментоядерные	2,898±0,099	–
Моноцитарный ряд	1,255±0,018	–
Лимфоцитарный ряд	0	–
Макрофаги	1,212±0,071	–
Мегакариоцитарный ряд	1,693±0,072	–
Пронормоциты	0,581±0,018	–
Нормоциты базофильные	0,580±0,019	–
Нормоциты полихроматофильные	0,558±0,051	–
Нормоциты оксифильные	0,352±0,017	–
Полихроматофильные эритроциты	0,075±0,001	–

Примечание: “–” – отсутствие клеток.

Глицерин во всех использованных концентрациях был малоэффективен (табл. 4). Лучшие показатели СГК были в клетках, криоконсервированных с ПЭО-400 (табл. 3). ДМСО оказался наиболее эффективным из примененных криопротекторов. Так, 7%-й раствор ДМСО оказал лучшие защитные свойства. Под его защитой в ретикулярных клетках, недифференцированных бластах, миелобластах, промиелоцитах, миелоцитах, палочкоядерных клетках и клетках моноци-

тарного ряда значение СГК было наиболее высоким. Схожие данные у ДМСО 10%. А сегментоядерные клетки и макрофаги только после замораживания с 7, 10%-м ДМСО сохраняли цитохимически определяемое количество фосфолипидов (табл. 2).

Скорее всего причиной снижения количества фосфолипидов является перекисное окисление липидов (ПОЛ). Известно, что при разных воздействиях на клетку (в том числе и действии

Таблица 2. Показатели СГК фосфолипидов в мазках из суспензии костного мозга собак (самцов 3-4 лет) после действия криопротектора ДМСО без замораживания и после замораживания в жидком азоте с применением в качестве криопротектора растворов ДМСО

Показатель миелограммы	ДМСО 5%	ДМСО 7%	ДМСО 10%	ДМСО 5%	ДМСО 7%	ДМСО 10%
	Без замораживания			После замораживания		
Ретикулярные клетки	0,708±0,01	0,704±0,023	0,689±0,034	0,594±0,066	0,684±0,02	0,682±0,019
Недифференцированные бласты	1,8±0,039	1,800±0,023	1,786±0,069	1,701±0,031	1,731±0,083	1,723±0,041
Миелобласты	1,52±0,081	1,51±0,008	1,508±0,048	1,281±0,062	1,384±0,042	1,303±0,075
Промиелоциты	1,6±0,033	1,598±0,088	1,585±0,076	1±0,009	1,305±0,057	1,283±0,086
Миелоциты	1,485±0,069	1,413±0,028	1,401±0,096	1,185±0,061	1,184±0,075	1,165±0,089
Метамиелоциты	1,971±0,086	1,964±0,036	1,931±0,064	1,108±0,057	1,726±0,082	1,726±0,082
Палочкоядерные	1,986±0,058	1,795±0,083	1,713±0,076	0,952±0,002	1,035±0,051	1,032±0,066
Сегментоядерные	1,959±0,05	1,932±0,041	1,816±0,055	—	1,008±0,076	1,001±0,055
Моноцитарный ряд	0,931±0,042	0,901±0,093	0,814±0,069	0,631±0,001	0,886±0,024	0,794±0,057
Лимфоцитарный ряд	0	0	0	0	0	0
Макрофаги	0,918±0,065	0,804±0,063	0,758±0,066	—	0,786±0,022	0,746±0,085
Мегакариоцитарный ряд	0,916±0,076	0,842±0,049	0,801±0,035	—	—	—
Пронормоциты	0,145±0,004	0,102±0,005	0,053±0,013	0	0	0
Нормоциты базофильные	0,112±0,004	0	0	0	0	0
Нормоциты полихроматофильные	0,058±0,002	0	0	0	0	0
Нормоциты оксифильные	0	0	0	0	0	0
Полихроматофильные эритроциты	0	0	0	0	0	0

растворов криопротекторов, замораживания) усиливается перекисное окисление фосфолипидов [3]. Таким образом, содержание фосфолипидов снижается уже после инкубации с криопротектором и чем токсичнее криопротектор и выше его концентрация, тем интенсивнее идет окисление фосфолипидов. В биохимических реакциях

перекиси липидов выступают как активные окислители. Они повреждают клеточные мембраны и органеллы. Процессы ПОЛ особенно активно протекают в структурах, содержащих катализаторы ПОЛ – Fe-содержащие белки (цитохромы) [3]. Как результат, повреждающее действие перекисей на митохондрии выражено в

Таблица 3. Показатели СГК фосфолипидов в мазках из суспензии костного мозга собак (самцов 3-4 лет) после действия криопротектора ПЭО-400 без замораживания и после замораживания в жидком азоте с применением в качестве криопротектора растворов ПЭО-400

Показатель миелограммы	ПЭО – 400 10%	ПЭО – 400 15%	ПЭО – 400 20%	ПЭО – 400 10%	ПЭО – 400 15%	ПЭО – 400 20%
	Без замораживания			После замораживания		
Ретикулярные клетки	0,721±0,083	0,72±0,027	0,719±0,013	0,68±0,014	0,608±0,003	0,525±0,031
Недифференцированные бласты	1,816±0,081	1,813±0,093	1,805±0,083	1,72±0,048	1,718±0,021	1,655±0,088
Миелобласты	1,635±0,054	1,635±0,066	1,524±0,016	1,3±0,081	1,294±0,094	1,001±0,019
Промиелоциты	1,618±0,041	1,617±0,016	1,601±0,065	1,276±0,095	1,201±0,023	0,984±0,039
Миелоциты	1,612±0,029	1,594±0,029	1,498±0,09	1,135±0,054	1,276±0,088	0,923±0,056
Мегамиелоциты	2,041±0,088	2,04±0,084	1,975±0,034	1,725±0,072	1,131±0,046	1,006±0,009
Палочкоядерные	2,318±0,055	2,313±0,087	1,988±0,072	1,021±0,102	0,989±0,089	0,901±0,004
Сегментоядерные	2,081±0,076	1,985±0,092	1,96±0,036	–	–	–
Моноцитарный ряд	1,025±0,085	1±0,011	0,931±0,021	0,788±0,067	0,785±0,069	0
Лимфоцитарный ряд	0	0	0	0	0	0
Макрофаги	1,015±0,022	1±0,006	0,925±0,028	–	–	–
Мегакариоцитарный ряд	1,241±0,02	1,118±0,019	0,916±0,016	–	–	–
Пронормоциты	0,403±0,069	0,338±0,071	0,318±0,033	0	0	0
Нормоциты базофильные	0,408±0,017	0,382±0,089	0,308±0,01	0	0	0
Нормоциты полихроматофильные	0,372±0,034	0,364±0,021	0,305±0,049	0	0	0
Нормоциты оксифильные	0	0	0	0	–	–
Полихроматофильные эритроциты	0	0	0	0	–	–

большей степени, чем на лизосомы, тем самым, нарушая энергетический баланс в клетке [7].

Выводы

Таким образом, криопротекторы и процесс замораживания-отогрева оказывает отрицательный эффект на фосфолипиды мембран, что может быть причиной нарушения барьерно-транспортных свойств мембран клеток.

Замораживание-отогрев приводит к снижению количества фосфолипидов в клетках костного мозга собак.

Инкубация клеток костного мозга собак с растворами криопротекторов приводит к снижению содержания фосфолипидов в клетках.

В недифференцированных клетках костного мозга, замороженных без защиты криопротекторов, ПОЛ фосфолипидов выражены меньше

Таблица 4. Показатели СГК фосфолипидов в мазках из суспензии костного мозга собак (самцов 3-4 лет) после действия криопротектора глицерина без замораживания и после замораживания в жидком азоте с применением в качестве криопротектора растворов глицерина

Показатель миеелограммы	Глицерин 10%	Глицерин 20%	Глицерин 30%	Глицерин 10%	Глицерин 20%	Глицерин 30%
	Без замораживания			После замораживания		
Ретикулярные клетки	0,74±0,064	0,738±0,035	0,712±0,004	0,592±0,031	0,591±0,087	0,594±0,066
Недифференцированные бласты	1,983±0,053	1,982±0,31	1,795±0,082	1,699±0,074	1,7±0,091	1,701±0,031
Миелобласты	1,84±0,050	1,84±0,055	1,508±0,047	1,205±0,081	1,235±0,038	1,281±0,062
Промиеоциты	1,88±0,046	1,864±0,044	1,586±0,024	0,992±0,089	0,994±0,032	1±0,009
Миелоциты	1,952±0,088	1,896±0,087	1,403±0,079	0,975±0,026	1±0,019	1,185±0,061
Метамиеоциты	2,332±0,055	2,174±0,044	1,952±0,095	1,163±0,039	1,117±0,089	1,108±0,057
Палочкоядерные	2,889±0,031	2,581±0,038	1,768±0,089	0,925±0,058	0,933±0,061	0,952±0,002
Сегментоядерные	2,787±0,052	2,387±0,067	1,902±0,071	—	—	—
Моноцитарный ряд	1,251±0,049	1,238±0,081	0,873±0,051	0,601±0,025	0,622±0,005	0,631±0,001
Лимфоцитарный ряд	0	0	0	0	0	0
Макрофаги	1,212±0,089	1,213±0,091	0,801±0,081	—	—	—
Мегакариоцитарный ряд	1,682±0,061	1,546±0,017	0,825±0,071	—	—	—
Пронормоциты	0,581±0,045	0,418±0,003	0,1±0,008	0	0	0
Нормоциты базофильные	0,443±0,065	0,109±0,038	0,102±0,002	0	0	0
Нормоциты полихроматофильные	0,431±0,028	0,081±0,008	0	0	0	0
Нормоциты оксифильные	0	0	0	0	0	—
Полихроматофильные эритроциты	0	0	0	0	0	0

чем в других гематопозитических клетках.

Из криопротекторов наиболее эффективным оказался 7, 10%-й ДМСО, после криоконсервирования с этими растворами показатели содержания фосфолипидов были наиболее высокие.

Литература

1. *Абрамов Г.* Гематологический атлас.— М.: Медицина, 1985.— 344с.
2. *Белоус А.М., Грищенко В.И.* Криобиология.— Киев. Наукова думка, 1994.— 430с.
3. *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен).* Учебное пособие/ Под ред. М.И. Прохоровой.— Л., 1982.— 272с.
4. *Цитохимия и электронная микроскопия клеток крови и кроветворных органов / В.Г. Пинчук.*— Киев: Наукова думка, 1974.— 248с.

5. *Цитохимия костного мозга при криоконсервировании: Атлас/* Обозная Э.И., Панков Е.Я.– Киев: Наукова думка, 1989.– 256 с.
6. *Энергетика биологических мембран/*В. П. Скулачев.– М.: Наука, 1989.– 564 с.
7. *Янович В.Г., Лагодюк П.З.* Обмен липидов у животных в онтогенезе.– М.: Агропромиздат, 1991.– 317с.
8. *Guo Z. K., Yang J. Q., Liu X. D. et al.* Biological features of mesenchimal stem cells from human bone marrow // *Clin. Med. J.*– 2001.– Vol. 114, N9.– P. 950-953.
9. *Kawano Y., Lee C.L., Watanabe T. et al.* Cryopreservation of mobilized blood stem cells concentration without the use of a programmed freezer // *Ann. Hematol.*–2004.–Vol.83, N1.– P. 50-54.
10. *Kushida T., Inaba M., Ikebukuro K. et al.* A new method for bone marrow harvesting // *Stem Cells.*– 2000.– Vol. 18, N6.– P. 453-456.
11. *Kushida T., Inaba M., Ikebukuro K. et al.* Comparison of bone marrow cells harvested from various bones of cynomolgus monkeys at various ages by perfusion or aspiration methods: a preclinical study for human BMT // *Stem Cells.*– 2002.– Vol. 20.– P. 155-162.
12. *Stiff P.J., Murgu A.J., Zaroulis C.G. et al.* Ulfracationated human marrow cell cryopreservation usin dimethylsuifoxide and hydroxyethyl starch // *Cryobiology.*– 1983.– Vol.20, N1.– P. 17-24.