

Г. Ф. Жегунов, Л. А. Водопьянова

## Влияние ДМСО и замораживания—отогрева на сохранность и содержание субстратов энергетического обмена в клетках костного мозга собак

(Представлено академиком НАН Украины А. Н. Гольцевым)

*Визначено вміст глюкозо-6-фосфату, АТФ, пірвіноградної та молочної кислот в клітинах кісткового мозку собак до та після кріоконсервування з ДМСО. Показано, що 7% ДМСО є ефективним кріопротектором, забезпечуючи  $83,51 \pm 1,9\%$  збереження клітин. Показники рівня АТФ, пірвіноградної та молочної кислот в клітинах кісткового мозку собак після заморожування—відігріву в присутності ДМСО залишалися близькими до контролю.*

Костный мозг — это комплекс гемопоэтических клеток и элементов микроокружения, которые активно участвуют в кроветворении. Гемопоэтические клетки костного мозга (ККМ) через репликацию и дифференцировку поддерживают гемопоэз в течение жизни животного, а клетки микроокружения (ретикулярные, эндотелиальные, остеогенные и др.) координируют процесс их дифференцировки. Высокий терапевтический потенциал ККМ дает возможность использовать их при лечении различных нарушений гемопоэза, восстановления дефицита иммунной системы, коррекции гомеостаза организма после химио- и радиотерапии [1]. Подобные методы терапии являются новыми для ветеринарии, однако уже показали свою результативность. Таким образом, клиническая потребность в ККМ постоянно возрастает и требует создания резерва ККМ домашних животных.

Несмотря на то, что в последнее время клетки гемопоэтической системы активно изучаются, многие аспекты их биохимии все еще неопределенны и заслуживают особого внимания. В клинической ветеринарии и трансплантологии актуальным стало хранение ККМ с помощью технологии замораживания. Известно, что в замороженном состоянии биообъекты хранятся продолжительное время, это позволяет создавать банки клеточного материала. Многие годы ведутся исследования, направленные на изучение механизмов и борьбу с негативными последствиями криоповреждения. Применение криопротекторов позволяет повысить сохранность клеток, но связь между изменением энергетического потенциала и сохранностью клеток после кріоконсервирования мало изучена.

Известно, что всем клеткам постоянно необходима энергия в виде АТФ. Вместе с тем запаса АТФ в клетках практически не существует и идет его постоянный синтез [2]. Нарушение какого-либо этапа метаболизма, приводящего к прекращению синтеза АТФ, губительно для клетки. В связи с этим наша цель состояла в изучении связи между энергетическим статусом ККМ собак и их сохранностью после действия криопротектора и замораживания—отогрева.

**Материалы и методы.** *Получение интактных ККМ.* ККМ были получены от 3–4-летних собак ( $n = 10$ ). Все животные были свободны от паразитов и вакцинированы. ККМ из бедренной кости получали методом костномозговой пункции с вымыванием средой 199.

Концентрацию клеток в суспензии доводили до  $1 \cdot 10^7$ /мл путем разведения средой, содержащей 3% эмбриональной сыворотки крови теленка, 91% среды 199, 6% цитрата натрия (рабочая среда) [3].

*Обработка ККМ ДМСО и замораживание—отогрев.* ДМСО постепенно добавляли в суспензию ККМ до конечной концентрации 5, 7 и 10% при 4 °С. Инкубация при 4 °С с ДМСО длилась 10 мин. Замораживание проводили в пластиковых контейнерах “Eppendorf” по двухэтапной программе: охлаждение от 4 °С со скоростью 2–3 °С/мин, до –80 °С, с дальнейшим погружением контейнера в жидкий азот (–196 °С на 24 ч) [4–7]. Отогрев осуществляли в воде при 41 °С. После отогрева ДМСО удаляли путем двухступенчатого разбавления суспензии ККМ рабочей средой с последующим центрифугированием (90g, при 4 °С, 10 мин). Затем клетки переносили в фосфатный буфер (рН 7,4) и сразу определяли содержание метаболитов.

*Определение сохранности клеток.* ККМ окрашивали трипановым синим [6]. Поврежденные клетки окрашиваются в синий цвет, жизнеспособные клетки остаются неокрашенными. Количество окрашенных и неокрашенных клеток выражали в процентах.

*Определение содержания АТФ, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-Ф), пировиноградной кислоты (ПВК) и лактата.* Содержание метаболитов определяли в безбелковом экстракте из свежеполученных ККМ собак, а также отмытых от 7 и 10% ДМСО после инкубации и замораживания—отогрева [8].

Уровень АТФ и Г-6-Ф определяли в ходе одной ферментативной реакции, где АТФ в присутствии гексокиназы фосфорилирует глюкозу, образующийся при этом Г-6-Ф, в свою очередь, служит субстратом для глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакции. Уровень ПВК и лактата определяли в ходе ферментативных реакций с лактатдегидрогеназой. Данные регистрировали спекрофотометрически на СФ-46 (ЛОМО, Россия) при длине волны 340 нм. Содержание метаболитов выражали в мкмоль/г белка.

*Определение содержания белка.* Общее количество белка определяли по методу Бредфорд [9]. К разведенным аликвотам белка добавляли в равном объеме реактив Бредфорд. После появления окраски измеряли оптическую плотность на СФ-46 (ЛОМО, Россия) при длине волны 595 нм. Рассчитывали концентрацию белка по калибровочной кривой.

*Статистический анализ.* Данные представлены как средние значения ( $M \pm m$ ) восьми независимых экспериментов. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента–Фишера с использованием программы Microsoft Office Excel.

**Результаты и их обсуждение.** Ранее нами были проведены сравнительные исследования показателей сохранности ККМ собак после замораживания—отогрева в присутствии непроникающих и проникающих криопротекторов [10]. Было установлено, что при замораживании ККМ собак по двухэтапной программе глицерин (10, 20 и 30%) как криопротектор был не эффективен. Также было установлено, что ПЭО-400 (10, 15, 20%) не способствует достаточно высокой сохранности ККМ собак после замораживания—отогрева. ДМСО показал себя более перспективным криопротектором, поэтому при изучении сохранности и важнейших энергетических субстратов клетки мы использовали ряд концентраций ДМСО. Показано, что ДМСО в концентрации 7 и 10% обеспечивает максимальную сохранность биоматериала (выше 80%) как после инкубации, так и после замораживания—отогрева (табл. 1).

При изучении содержания энергетических субстратов установлено, что изменения в содержании АТФ и Г-6-Ф в клетках происходят уже на этапе инкубации. Причем уровень этих веществ снижается как в присутствии криопротектора в среде инкубации, так и без

него (табл. 2). При этом не отмечено достоверных изменений в содержании ПВК. Уровень молочной кислоты в клетках, инкубированных без криопротектора, не повышается относительно контроля, а в присутствии ДМСО в концентрации 10 и 7% повышается на 25 и 9% соответственно.

После криоконсервирования клеток с ДМСО наблюдается небольшое увеличение уровня Г-6-Ф и лактата в сравнении с данными контроля. При этом отмечено незначительное снижение уровня АТФ.

Известно, что при воздействии растворов криопротекторов и температур, близких к 0 °С, скорость и согласованность биохимических процессов в клетках изменяется [1, 2]. При этом повышаются расходы энергетического потенциала, что обусловлено многочисленными факторами: переходом на анаэробный гликолиз в клетках *in vitro*, угнетением биологического окисления различными ингибиторами, формированием дополнительных путей метаболизма, идущих на устранение повреждающих факторов и др. [1]. Этим можно объяснить изменения в содержании АТФ и Г-6-Ф в ККМ собак на этапе инкубации.

Установлено, что ККМ зачастую используют анаэробный гликолиз для синтеза АТФ [11–13]. Это характерно для клеток эритроцитарного, макрофагального ряда, гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов, клеток, генетически приспособленных к выполнению своих функций как в условиях нормоксии, так и гипоксии (ишемии при воспалении) [11–13]. Продолжительное хранение ККМ *in vitro* невозможно, так как в клетках уменьшается окислительное декарбоксилирование ПВК и повышается образование лактата, а его накопление губительно

Таблица 1. Влияние ДМСО на сохранность ККМ собак, %

Вариант	Инкубация	Замораживание—отогрев
Интактные ККМ	98,26 ± 0,3	—
Без криопротектора	97,16 ± 1,84	5,7 ± 2*
ДМСО, 10%	87,63 ± 1,69*	82,92 ± 2*
ДМСО, 7%	89,72 ± 1,68*	83,51 ± 1,9*
ДМСО, 5%	89,91 ± 1,23*	60,43 ± 2,34*#

\*Значения достоверны относительно интактных ККМ собак (контроль),  $P < 0,001$ .

#Значения достоверны относительно клеток после инкубации с криопротектором,  $P < 0,001$ .

Таблица 2. Влияние ДМСО на содержание субстратов энергетического обмена в ККМ собак, мкмоль/г белка

Вариант	АТФ	Г-6-Ф	ПВК	Лактат
Интактные ККМ	2,318 ± 0,067	0,702 ± 0,042	0,141 ± 0,01	1,256 ± 0,063
Инкубированные без криопротектора	2,000 ± 0,028*	0,500 ± 0,06***	0,145 ± 0,004	1,310 ± 0,079
Инкубированные с ДМСО 10%	2,091 ± 0,05*	0,750 ± 0,045	0,156 ± 0,002	1,318 ± 0,07**
Инкубированные с ДМСО 7%	2,208 ± 0,09	0,686 ± 0,052	0,149 ± 0,003	1,130 ± 0,08
Криоконсервированные с ДМСО 10%	1,737 ± 0,108**	0,809 ± 0,027*	0,166 ± 0,004**,#	1,567 ± 0,069**,#
Криоконсервированные с ДМСО 7%	2,046 ± 0,087*	0,852 ± 0,052***,#	0,163 ± 0,003*	1,371 ± 0,043***,#

\*Значения достоверны относительно интактных ККМ собак (контроль),  $P < 0,05$ .

\*\*Значения достоверны относительно контроля,  $P < 0,01$ .

\*\*\*Значения достоверны относительно контроля,  $P < 0,001$ .

#Значения достоверны относительно клеток после экспозиции с криопротектором,  $P < 0,05$ .

для клетки [11]. Замедление метаболизма, вплоть до минимальной потребности в глюкозе и АТФ, возможно только при криоконсервировании.

Снижение уровня АТФ после криоконсервирования может быть связано с повышением затрат энергетического материала на восстановление структуры и функций в клетках, что влечет за собой компенсаторное увеличение уровня Г-6-Ф (см. табл. 2) [1].

Снижение уровня ПВК и повышенное содержание молочной кислоты после отогрева свидетельствует о доминировании анаэробных процессов в размороженных клетках, однако аэробное получение энергии возможно сразу после введения клеток *in vivo*.

Полученные данные, подтверждают предположение о существовании зависимости между уровнем энергетического обмена и сохранностью криоконсервированных ККМ. Применение 7% ДМСО способствует не только высокой сохранности ККМ собак, но и сохранению уровня Г-6-Ф, АТФ, ПВК.

Естественно, что восстановление метаболизма и прежде всего энергетических процессов произойдет быстрее в клетках, где биохимические сдвиги были минимальны [1]. Таким образом, можно сделать заключение, что сохранение уровня основных метаболитов энергетического обмена свидетельствует о том, что клетки после криоконсервирования с ДМСО могут поддерживать метаболизм на приемлемом для трансплантации уровне.

1. *Taylor M. J.* Biology of cell survive in the cold: the basis for biopreservation of tissues and organs / Ed. by J. G. Baust, J. M. Baust. – Boca Raton: CRC Press, 2007. – P. 15–62.
2. *Mamprin M. E., Vega F., Rodrigues J. V.* Adenosine 5 triphosphate transport and accumulation during the cold preservation of rat hepatocytes in University of Wisconsin solution // *World J. Gastroenterol.* – 2005. – **11**, No 13. – P. 1957–1964.
3. *Гольцев А. М., Дубрава Т. Г., Козлова Ю. А. и др.* Оценка гемопоэтического потенциала стволовых кроветворных клеток костного мозга с измененным исходным статусом под действием факторов криоконсервирования // *Проблемы криобиологии.* – 2005. – **15**, № 3. – С. 320–323.
4. *Белоус А. М., Шраго М. И., Пушкарь Н. С.* Криоконсерванты. – Киев: Наук. думка, 1979. – 197 с.
5. *Kawano Y., Lee C. L., Watanabe T. et al.* Cryopreservation of mobilized blood stem cells at a higher cell concentration without the use of a programmed freezer // *Ann. Hematol.* – 2004. – **83**, No 1. – P. 50–54.
6. *Пушкарь Н. С., Цуцаева А. А., Итжин Ю. А., Шраго М. И.* Консервирование костного мозга при ультранизких температурах с ПЭО-400: Методич. рекомендации. – Москва, 1984. – 11 с.
7. *Idei K., Matsuura S., Fujino Y. et al.* Investigation of Various Methods for the Cryopreservation of Canine Bone Marrow – Derived CD34 + Cells // *J. Vet. Med. Sci.* – 2008. – **70**, No 11. – P. 1211–1217.
8. *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)* / Под ред. М. И. Прохоровой. – Ленинград: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 272 с.
9. *Bredford M. M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**, No 1. – P. 248–254.
10. *Водопьянова Л. А., Жегунов Г. Ф.* Сохранность клеток костного мозга собак после экспозиции с криопротекторами и замораживания в жидком азоте // *Пробл. криобиологии.* – 2006. – **16**, № 2. – С. 207–210.
11. *Patel S. D., Paroutsakis E. T., Winter J. N., Muller W. M.* The lactate issue revisited: novel feeding protocols to examine inhibition of cell proliferation and glucose metabolism in hematopoietic cell cultures // *Biotechnol. Prog.* – 2000. – **16**, No 5. – P. 885–892.
12. *Murdoch C., Muthana M., Lewis C. E.* Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation // *J. Immunol.* – 2005. – **175**, No 10. – P. 6257–6263.
13. *Weisdorf D. J., Craddock P. R., Jacob H. S.* Granulocytes utilize different energy sources for movement and phagocytosis // *Inflammation.* – 1982. – **6**, No 3. – P. 245–256.

G. F. Zhegunov, L. A. Vodop'yanova

**Effects of DMSO and freezing — thawing on the preservation and the content of energy-exchange substrates in dog's bone marrow cells**

*The researches of glucoso-6-phospate, ATP, pyruvic acid, and lactic acid in the dog's bone marrow cells before and after cryopreservation with DMSO have been performed. It has been found that 7% DMSO is the most effective cryoprotectant, and  $83.51 \pm 1.9\%$  of cells survive. The ATP, pyruvic and lactic acids levels in dogs' bone marrow cells after freezing-thawing with DMSO were near control values.*