

Влияние ДМСО и криоконсервирования на фосфолипиды мембран клеток костного мозга собак

Л.А. ВОДОПЬЯНОВА, О.Н. ДЕНИСОВА, Г.Ф. ЖЕГУНОВ
Харьковская государственная зооветеринарная академия

Influence of DMSO and Cryopreservation on Phospholipids of Cell Membranes of Canine Bone Marrow

L.A. VODOPYANOVA, O.N. DENISOVA, G.F. ZHEGUNOV
Kharkov State Zooveterinary Academy, Kharkov, Ukraine

В клинической ветеринарии и трансплантологии актуально хранение клеток костного мозга (ККМ) с помощью замораживания. Применение криопротекторов позволяет повысить сохранность клеток, при этом малоизученной остается проблема влияния криоконсервирования на мембраны клеток. Изменение уровня фосфолипидов (ФЛ) является важным индикатором повреждения мембраны клетки. Среди различных методов исследования ФЛ особое место занимают цитохимические, сочетающие чувствительность биохимических методов с наглядностью цитологических. В данной работе изучали содержание ФЛ в ККМ собак после действия ДМСО, замораживания и размораживания.

Клетки костного мозга получали из бедренных костей 3–4-летних собак ($n = 8$). Диметилсульфоксид постепенно добавляли в суспензию ККМ до конечной концентрации 5, 7 и 10% при 4°C с дальнейшей инкубацией 10 мин. Замораживание проводили в пластиковых контейнерах «Eppendorf» по двухэтапной программе. Отогрев контейнеров осуществляли в воде при 41°C. Мазки изучали под увеличением $\times 100$, определяли интенсивность окраски суданом черным, вычисляя средний гистохимический коэффициент (СГК).

Фосфолипиды были обнаружены во всех ККМ, за исключением лимфоцитов. Наибольшее количество – в клетках гранулоцитарного ряда. При экспозиции клеток в среде получения (4°C, 30 мин) цитохимическая реакция не меняет степени выраженности. После инкубации ККМ с растворами ДМСО снижение уровня ФЛ наблюдалось в клетках эритроцитарного ряда. Отмечено, чем выше концентрация ДМСО, тем ниже степень выраженности окраски. После размораживания ККМ с 7%-м раствором ДМСО в бластных клетках, миелобластах, промиелоцитах, миелоцитах, палочкоядерных клетках и клетках моноцитарного ряда значение СГК было наиболее близким к показателям контроля, следовательно, данная концентрация ДМСО обладает высокими криопротекторными свойствами по отношению к мембранным фосфолипидам ККМ собак.

Установлено, что в исследованных ККМ собак изменения фосфолипидного матрикса мембран происходят уже на этапе подготовки к криоконсервированию с ДМСО. Максимальную защиту ФЛ бислоя мембраны обеспечил 7%-й раствор ДМСО.

The storage of bone marrow cells (BMC) using freezing is actual for clinical veterinary science and transplantology. The application of cryoprotectants allows the increasing of cell survival, herewith the problem of cryopreservation influence on cell membranes has been poorly studied. Change in the level of phospholipids (PL) is an important index of cell membrane damage. Among various research methods of PL the cytochemical methods take a special place, combining sensitivity of biochemical methods with visualization of cytologic ones. The content of PL in canine BMC after the effect of DMSO, freezing and thawing, was investigated.

Bone marrow cells were derived from femurs of 3–4-year-old dogs ($n = 8$). Dimethyl sulfoxide was gradually added to BMC suspension in final concentration of 5, 7 and 10% at 4°C with following 10 min-long incubation. Freezing was performed in plastic containers (Eppendorf) according to the two-stage program. The containers were warmed in water at 41°C. The smears were studied at $\times 100$ magnification, Sudan Black staining intensity was assessed by calculation of mean histochemical coefficient (MHC).

Phospholipids were found in all BMC, except lymphocytes. The maximum amount was revealed in granulocyte cells. After the exposure of cells in isolation medium (4°C, 30 min) the manifestation degree of cytochemical reaction does not change. After BMC incubation in DMSO solutions the decrease of PL level was observed in erythrocytes. It is noted that the higher concentration of DMSO is, the lower the degree of staining manifestation is. After thawing BMC frozen in 7% DMSO solution the value of MHC was the closest to the control index in blast cells, myeloblasts, promyelocytes, myelocytes, rod nuclear cells and the cells of monocyte row, therefore, this concentration of DMSO possessed high cryoprotective properties in relation to membrane phospholipids of canine BMC.

It is established that in the investigated canine BMC the changes of phospholipid matrix of membranes occur at the stage of preparation to cryopreservation with DMSO. DMSO solution in 7% concentration provided the maximum protection of membrane bilayer PL.