

## Влияние факторов криоконсервирования на структурно-функциональные свойства клеток адгезивной фракции костного мозга

Е.Е. Ямпольская, А.Н. Гольцев, И.Ю. Малевитая, Т.Г. Дубрава, Е.Д. Луценко, К.А. Гольцев  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Одной из главных проблем, возникающих при пересадке гистонесовместимого костного мозга (КМ), является иммунный конфликт в виде синдрома реакция трансплантат против хозяина (РТПХ). Предложена концепция и экспериментальное ее подтверждение, согласно которых криоконсервирование может выступать в роли фактора управления “внутренним состоянием” (intrinsic state) биологического объекта гемопоэтической ткани [2, 3, 6], в частности, что изменение компонентного состава костного мозга (КМ) посредством удаления фракции адгезирующих клеток, содержащей элементы МФС, может способствовать модификации степени проявления РТПХ [3]. В свою очередь, в состав МФС входит фракция антиген презентующих клеток (АПК), которые обладают “трансплантабельностью” и реализуют акцессорные функции в отношении регуляции функционального статуса донорских кроветворных предшественников и гемопоэза в целом.

Поэтому целесообразно рассмотреть определенные режимы замораживания-оттаивания как возможный вариант селективной элиминации клеток адгезивной фракции КМ с целью минимизации иммунных осложнений при трансплантации гистонесовместимого костного мозга и повышения эффективности его применения.

Цель работы – изучить структурно-функциональный потенциал адгезирующих клеток костного мозга (АККМ), участвующих в реализации иммунных взаимодействий с организмом реципиента, под действием факторов криоконсервирования.

### Материалы и методы

Эксперименты выполнены на мышах линии СВА/Н 8-10-недельного возраста, массой 22-24 г. Клетки КМ получали из бедренных костей путем вымывания средой 199 с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки и 2% цитрата натрия. Адгезию клеток КМ проводили в чашках Петри при 37°C в течение 1 часа [5]. Экспозицию АК с криопротекторами до криоконсервирования осуществляли в течение 15 мин при 4°C. После выдержки с криопротекторами до и после

*Адрес для корреспонденции:* Ямпольская Е.Е., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-57-89, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

криоконсервирования проводили морфологический учет фракции АККМ в световом микроскопе на препаратах окрашенных по Романовскому-Гимза. Функциональный потенциал АККМ оценивали по следующим показателям: фагоцитарному индексу (ФИ), фагоцитарному числу (ФЧ) и абсолютному показателю фагоцитарной активности (АПФАМ) [1].

Криоконсервирование КМ осуществляли в полиэтиленовых ампулах (1,5 мл) с 10% диметилсульфоксида (ДМСО) (режим К-1) или 7,5% полиэтиленоксида с молекулярной массой 400 (ПЭО-400) (режим К-2) на установке УОП-6 (ИПКК НАН Украины, г.Харькова). Скорость замораживания составила 1С/мин до –25°C с последующим погружением ампул в жидкий азот. Размораживание осуществляли на водяной бане при 39-40°C [4].

Уровень экспрессии МАС-1<sup>+</sup> антигена на АККМ определяли методом прямой иммунофлуоресценции на люминесцентном микроскопе “Люмам” Р1 (Ломо) с использованием моноклональных антител фирмы Caltag.

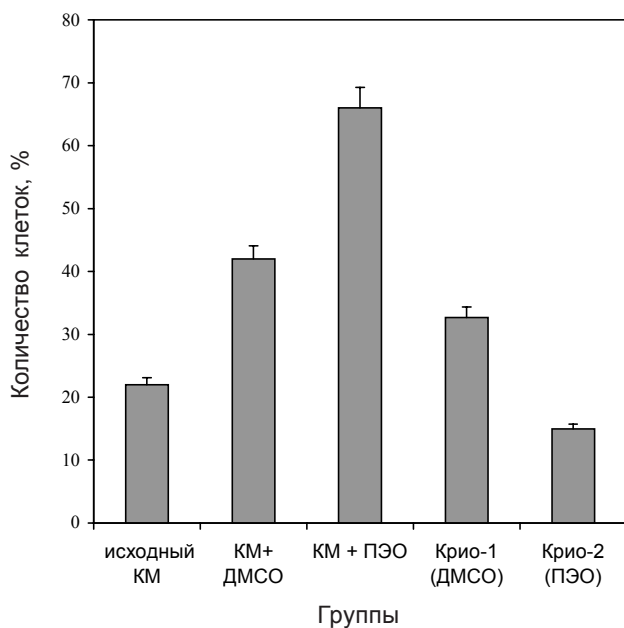
Полученные экспериментальные данные статистически обрабатывались в электронных таблицах “Microsoft Excel 2000”.

### Результаты и обсуждение

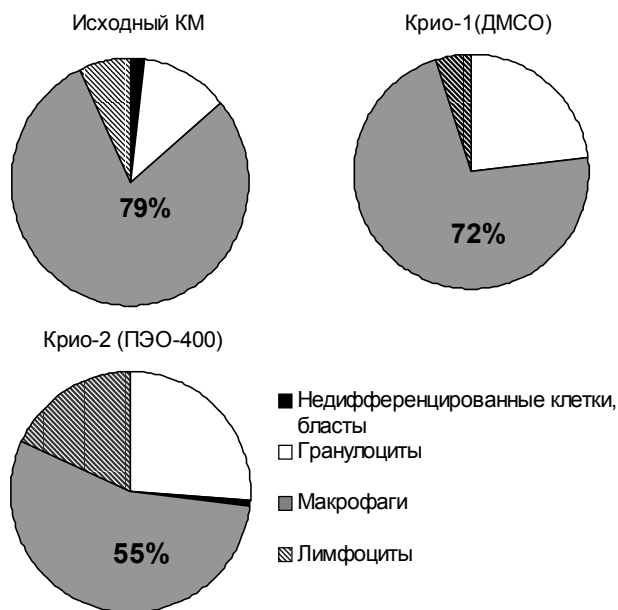
Криоконсервирование, являясь мощным физико-химическим фактором, существенным образом изменяет стабильное структурно-функциональное состояние разных клеток гетерогенной популяции КМ. В нашем исследовании была предпринята попытка рассмотреть возможность дифференцированного воздействия криоконсервирования на АПК фракции МФС, которые представляют собой компоненты координирующие гемопоэтическую активность кроветворного микроокружения.

Известно, что устойчивость клеток к действию факторов криоконсервирования определяется их исходной структурно-функциональной организацией.

Как видно из представленных на рис. 1 данных, экспозиция с криопротекторами вызывала значительное повышение процента элиминируемых из КМ клеток методом адгезии, что свидетельствует о том, что ДМСО и, тем более ПЭО-400,



**Рис. 1.** Содержание АККМ после экспозиции с криопротектором и последующего криоконсервирования



**Рис. 2.** Клеточный состав адгезивной фракции клеток нативного и криоконсервированного в разных режимах КМ.

способствует повышению степени экспрессии молекул адгезии на клетках КМ.

После криоконсервирования под защитой указанных протекторов, было отмечено снижение степени экспрессии молекул адгезии в суспензии криоконсервированного КМ особенно под действием ПЭО-400. О меньшей способности ПЭО-400 обеспечивать протективный эффект в отношении клеток МФС говорят и результаты оценки морфологического состава этой фракции.

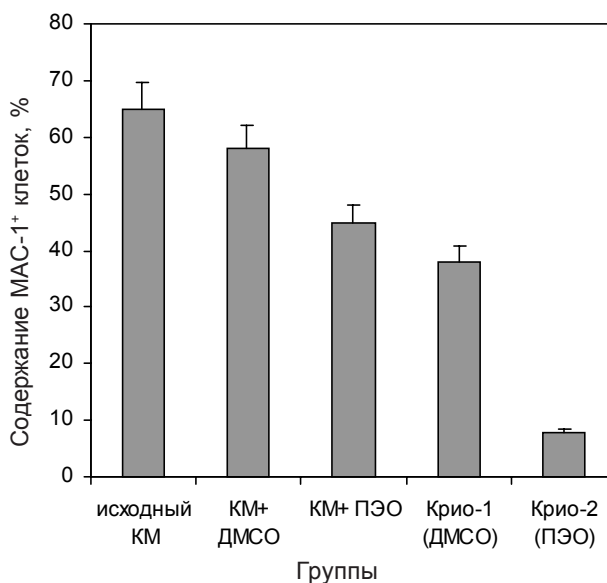
В случае использования ПЭО-400 процент макрофагов в общей фракции АК был существенно меньше (не более 55%) по сравнению с материалом, криоконсервированным под защитой ДМСО (около 72%) (рис.2).

Для подтверждения различной эффективности обоих режимов криоконсервирования в обеспечении сохранности присутствующих во фракции АККМ антиген презентующих клеток (АПК) [3, 6], мы исследовали количественное содержание МАС-1<sup>+</sup>-клеток в этой фракции КМ (рис.3).

Криоконсервирование с ДМСО обеспечивало сохранность клеток, экспрессирующих данный мембранный маркер примерно на 40%, тогда как с ПЭО-400 – не более чем на 7-8 %. То есть криоконсервирование в режиме-2 оказывает более мощный эффект на фракцию АККМ, а также входящих в нее макрофагальных элементов с фенотипом МАС-1<sup>+</sup>. Такого рода изменения, подобно наблюдавшимся при экспозиции с протекторами, являются видимо универсальным откликом клеток на стресс-индуцирующее действие факторов криоконсервирования. Анало-

гичная ситуация была отмечена при оценке экспрессии на АККМ маркера Thy-1,2 [2, 6].

Далее, мы провели оценку фагоцитарной активности клеток адгезивной фракции после экспозиции с криопротекторами (Рис. 4). Наиболее выраженная ингибиция функциональных показателей АК имела место после экспозиции суспензии КМ с ПЭО-400, так АПФА снижался в 3,5 раза в сравнении с контролем. Таким образом, чем большее повышение содержания АК в суспензии



**Рис. 3.** Содержание МАС-1<sup>+</sup>-клеток в адгезивной популяции миелокарицитов после экспозиции с криопротекторами и последующего криоконсервирования.

имело место после криоконсервирования, тем в меньшей степени сохранялась их фагоцитарная активность.

### Выводы

Таким образом, условия температурной “предобработки” КМ существенным образом сказываются на качественном и, очевидно, количественном составе фракции клеток, проявляющих адгезивную способность. Судя по представленным данным, второй режим криоконсервирования выступает, как бы в роли “инактиватора” структурно-функционального потенциала тканевых субстратов кроветворного микроокружения, в частности макрофагальных и стромальных клеток миелотрансплантата. То есть такая трансформация происходит и с теми клетками, которые выполняют в трансплантате функцию АПК и участвуют в реализации иммунных взаимодействий КМ с организмом реципиента [6]. Становится очевидным необходимость поиска таких режимов обработки КМ, которые при минимизации РТПХ активности, обеспечивали максимум его защитного потенциала.

### Литература

1. Александров М.Г., Кудрявицкий А.И., Румянцева Е.Г. и др. Метод вычисления абсолютных показателей фагоцитоза // Лаб. дело.– 1988.– №9.– С. 30-33.
2. Гольцев А. Н., Луценко Е. Д., Дубрава Т. Г., Опанасенко Е.В. Возможность криобиологии в решении иммуноконфликтных проблем при пересадке гистонесовместимого костного мозга // Пробл. криобиологии.– 1996.– №2.– С.3-10.
3. Гольцев А.Н., Луценко Е.Д. Криоконсервирование как возможный метод оценки роли компонентного состава миелотрансплантата в проявлении функциональной активности кроветворных клеток // Пробл. криобиологии.– 1994.– №1.– С. 3-14.
4. Криоконсервирование клеточных суспензий // Под. ред. А.А. Цуцаевой.– Киев: Наук. думка, 1983.– 240 с.
5. Лабораторные методы исследования в клинике // Под ред. В.В. Меньшикова.– М.: Медицина, 1987.– 368 с.
7. Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Dubrava, T.G. et al. The importance of myelotransplant component content in the manifestation of cryopreserved haemopoietic precursors functional activity. 2. Adequate methods for assessing. The role of adhesive cells // Cryo-Letters.– 1996.– N17.– P. 195-200.

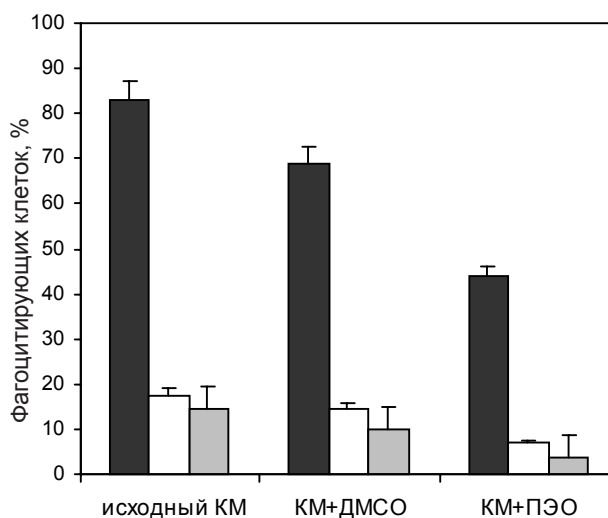


Рис. 4. Фагоцитарная активность клеток адгезивной фракции КМ после экспозиции с криопротекторами: ■ – фагоцитирующий индекс; □ – фагоцитарное число; ▒ – АПФА.