

Ультраструктура ядродержащих клеток донорской и кордовой крови на различных этапах криоконсервирования.

Сообщение 1. Изменения на этапе выделения клеток

UDC 612.112.086.3:57.043

L.A.BABIYCHUK^{1*}, R.K. MIGUNOVA¹, O.F. NEVZOROVA², V.P. NEVZOROV²

Ultrastructure of Nucleated Cells of Cord Blood and Blood of Adult Donors at Different Stages of Cryopreservation. Report 1. The Changes on the Stage of Cells Isolation

Исследовали ультраструктурные характеристики ядродержащих клеток (ЯСК) донорской и кордовой крови, выделенных различными методами. С помощью электронной микроскопии показано, что ЯСК донорской и кордовой крови, выделенные методами двухэтапного центрифугирования и седиментации в полиглюкине, достаточно хорошо сохраняют свойственную им ультраструктурную архитектуру. Наличие в цитоплазме большого количества рибосом и полисом свидетельствует о высокой активности синтезирующей и репаративной функций этих клеток. Выделение ЯСК донорской и кордовой крови с помощью фикола приводит к деструктивным нарушениям мембранных структур и органелл, что не позволяет восстановить нормальную метаболическую активность путем внутриклеточной репарации.

Ключевые слова: ядродержащие клетки, донорская кровь, кордовая кровь, ультраструктура.

Досліджено ультраструктурні характеристики ядровмісних клітин донорської та кордової крові, які виділені різними методами. За допомогою електронної мікроскопії показано, що ядровмісні клітини донорської та кордової крові, виділені методами двохетапного центрифугування і седиментації у поліглюкіні, досить добре зберігають властиву їм ультраструктурну архітектуру. Наявність у цитоплазмі великої кількості рибосом й полісом свідчить про високу активність синтезуючої та репаративної функцій цих клітин. Виділення ядровмісних клітин донорської та кордової крові за допомогою фіколу призводить до деструктивних порушень мембраних структур та органел, що перешкоджає відновленню нормальної метаболічної активності шляхом внутрішньоклітинної репарації.

Ключові слова: ядровмісні клітини, донорська кров, кордова кров, ультраструктура.

Ultrastructure characteristics were studied in the nucleated cells from adult donor blood and cord blood isolated by different methods. Electron microscopical investigation revealed quite good preservation of characteristic ultrastructure in nucleated cells of adult donor blood and cord blood isolated by two-step centrifugation and sedimentation in Poliglyukin. Presence of large amount of ribosomes and polysomes in cytoplasm testifies to a high activity of synthesizing and reparative function of the cells. Isolation of nucleated cells from adult donor blood and cord blood using Ficoll leads to destructions of membrane structures and organelles, which impedes the restoration of normal metabolic activity by intracellular repair.

Key words: nucleated cells, adult donor blood, cord blood, ultrastructure.

В последние десятилетия интенсивно развивается новое направление в медицине – клеточная терапия [4] с использованием гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) из кордовой крови (КК) и донорской крови (ДК) [10]. Ввиду востребованности препаратов ГСК в составе ядродержащих клеток крови (ЯСК) необходимо создать низкотемпературные банки, в которых образцы хранятся в замороженном состоянии при температуре -196°C в течение длительного времени.

Учитывая небольшие полученные объемы КК и трудности, связанные с выделением ГСК из ДК, важно сохранить максимальное количество ЯСК

Recent decades have been characterized with rapidly developing new area of medicine, cell therapy [4] with application of hematopoietic stem cells (HSCs) from cord blood (CB) and blood of adult donors (DB) [10]. In view of the demand of HSC preparation as a part of nucleated blood cells (NCs) it is necessary to establish the low-temperature banks where the samples could be stored at -196°C for a long time.

Taking into account the small volumes of procured CB as well as the difficulties associated with the isolation of HSCs from DC, it is important to preserve as much NCs and their structural and functional value at every stage of the cryopreservation process.

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²ГУ «Институт общей и неотложной хирургии» АМН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Перяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-30-04, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: aniger_ova@mail.ru

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine
Institute of General and Emergency Surgery" Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3004, fax: +380 57 373 3084, e-mail: aniger_ova@mail.ru

и их структурно-функциональную полноценность на каждом этапе технологического процесса криоконсервирования.

Наиболее повреждающими этапами криоконсервирования являются замораживание и отогрев клеточной суспензии. Однако выделение ЯСК из цельной крови может также приводить к повреждению клеток и, как следствие, к снижению их устойчивости и утрате жизнеспособности на этапах добавления криопротектора и замораживания-отогрева [2].

В наших предыдущих работах было показано [1], что сохранность и жизнеспособность ЯСК после криоконсервирования во многом зависит от того состояния, в котором эти клетки входят в процесс замораживания-отогрева, т. е. от их структурно-функционального состояния после выделения. Поэтому исследование структурно-функционального состояния ЯСК после их выделения из цельной крови имеет очень важное значение. Информативным методом, позволяющим оценить структурно-функциональное состояние ЯСК, является трансмиссионная электронная микроскопия [6].

Целью данной работы было изучение ультраструктуры ядросодержащих клеток донорской и кордовой крови после выделения различными методами.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись ЯСК донорской и кордовой крови человека, заготовленной на глюкозо-цитратном растворе. Кордовую кровь получали из вены пульсирующей пуповины после информированного согласия роженицы.

Концентраты ЯСК выделяли несколькими методами: седиментации в 3%-м полиглюкине («Юрия-Фарм», Украина) [5], центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина («Медбиоспектр», Россия) [9] и двухэтапного центрифугирования цельной крови с последующим получением концентрата ЯСК в аутоплазме [8].

Для электронно-микроскопического исследования выделенные ЯСК фиксировали в 2,5%-м растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере (рН 7,3–7,4) в течение 5–6 ч при температуре 4°C. После отмывки в буферном растворе клетки переносили для дофиксации в 1%-й раствор четырехокси осмия на 3–4 ч. Дегидратацию проводили в растворах спиртов возрастающей концентрации и ацетоне. После обезвоживания клетки заключали в смесь эпоксидных смол эпон-аралдит («Fluka», Германия). Полимеризацию блоков осуществляли в термостате при температуре 60°C в течение двух суток.

Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме УМТП-3М («Электрон», Украина), кото-

The most damaging stages of cryopreservation are freezing and thawing of the cell suspension. However NC selection from whole blood can also cause injuries to the cells and, as a consequence, to decrease their resistance and result in loss of viability at the step of adding a cryoprotectant and freeze-thawing [2].

Our previous studies had shown [1] that the survival and viability of nucleated cells after cryopreservation depended mainly on the state in which the cells enter the process of freeze-thawing, *i. e.* their structural and functional status after isolation. Therefore, the investigation of the structural and functional state of nucleated cells after isolation from whole blood is very important. Transmission electron microscopy is an informative method to assess the structural and functional state of NCs [6].

The aim of this work was to study the ultrastructure of nucleated cells of adult donor and cord blood after separation by different methods.

Materials and methods

The object of the study were NCs of adult donor and cord blood procured in a glucose-citrate buffer. Cord blood was obtained from the throbbing umbilical vein after informed consent of puerpera.

Concentrates of NCs were isolated by several methods: sedimentation in 3% Poliglyukin (Yuria-Farm, Ukraine) [5], centrifugation in Ficoll-Verografin density gradient (Medbiospekt, Russia) [9] and two-step centrifugation of whole blood with the following sampling of NC concentrate in autoplasm [8].

For electron-microscopic examination the NCs were fixed in 2.5% glutaraldehyde solution in the phosphate buffer (pH 7.3–7.4) during 5–6 hours at 4°C. After washing in buffer the cells were transferred for additional stabilization in 1% osmium tetroxide solution for 3–4 hours. Dehydration was carried out in alcohol solutions of increasing concentrations and acetone. After dehydration the cells were embedded in Epon-Araldite epoxy resins (Fluka, Germany). The polymerization was carried out in thermostatic chamber at 60°C for two days.

Ultrathin sections were cut with UMTP-3M ultramicrotome (Elektron, Ukraine), and mounted on electrolytic meshes. After counterstaining with lead citrate they were examined with an electron microscope EMW-100BR (Elektron, Ukraine) at an accelerating voltage of 75 kV. The magnification was chosen in accordance with the purposes of the study.

Results and discussion

Investigation of ultrastructure of NCs isolated using the method of two-phase centrifugation revealed the satisfactory preserved membrane structures. Most NCs had nuclei filled with predominantly condensed chromatin (Fig. 1) concentrated on the nuclear memb-

рые монтировали на электролитические сеточки. После контрастирования цитратом свинца их исследовали с помощью электронного микроскопа ЭМВ-100БР («Электрон», Украина) при ускоряющем напряжении 75 кВ. Увеличение подбирали в соответствии с целями исследования.

Результаты и обсуждение

При изучении ультраструктуры ЯСК, выделенных с применением метода двухэтапного центрифугирования, выявлена удовлетворительная сохранность мембранных структур. Большая часть ЯСК имела ядра, заполненные преимущественно конденсированным хроматином (рис. 1), концентрирующимся на ядерной мембране. Центральная часть ядра заполнена диффузно рассеянными гранулами деконденсированного хроматина. Ядерная мембрана образовывала многочисленные мелкие и глубокие инвагинации и была умеренно разрыхлена. В цитоплазме сохранено большое количество рибосом и полисом.

Митохондрии имели различную форму и размеры. Кристы в них сохраняли параллельную ориентацию. На мембранах гранулярного эндоплазматического ретикула располагалось множество рибосом. Цитоплазма была заполнена многочисленными рибосомами и полисомами.

Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи развит слабо, его параллельно ориентированные гладкие мембраны окружены небольшим количеством мелких электронно-прозрачных везикул. Цитоплазматическая мембрана была четко контурирована и образовывала микроворсинки различной длины.

При электронно-микроскопическом исследовании ультраструктуры ЯСК донорской крови, выделенных с помощью фикола, выявлены ультраструктурные изменения в виде очагов деструкции мембранных структур. Цитоплазматическая мембрана была сильно разрыхлена и утратила четко контурированную структуру. В цитоплазме клеток сохранялось большое количество рибосом и полисом.

Цистерны гранулярного эндоплазматического ретикула сильно расширены и имели вид электронно-прозрачных вакуолей, а в мембранах определялись многочисленные очаги деструкции (рис. 2). В некоторых ЯСК внутриклеточные мембраны были фрагментированы. Ядра лейкоцитов содержали конденсированный хроматин, локализующийся вдоль ядерной мембраны, а внутренняя область ядра имела низкую электронную плотность. Наружные мембраны митохондрий сильно разрыхлены и очагово разрушены. Матрикс митохондрий сохранял мелко гранулярную структуру и имел среднюю электронную плотность. Выявлялись ми-

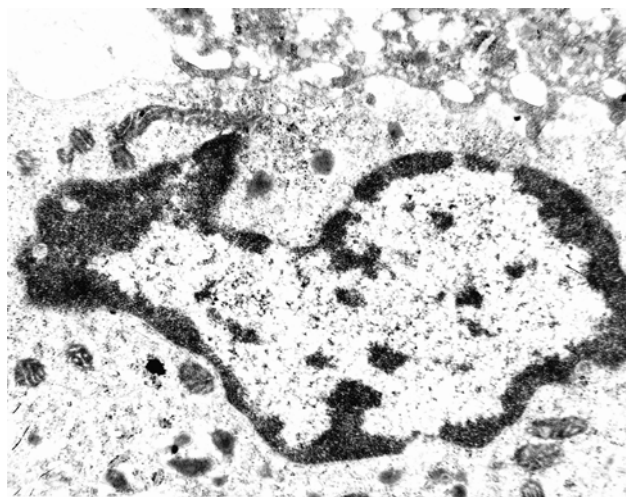


Рис. 1. Ультраструктура ЯСК донорской крови, выделенных методом двухэтапного центрифугирования. Конденсация хроматина, электронно-плотные митохондрии с параллельно ориентированными кристами, $\times 16000$.

Fig. 1. Ultrastructure of adult donor blood NCs, isolated by two-step centrifugation. Condensation of chromatin, electron-dense mitochondria with parallel cristae, $\times 16000$.

rane. The central part of the nuclei was filled with diffusely located granules of decondensed chromatin. Nuclear membranes formed numerous shallow or deep invaginations and was moderately loosened. The cytoplasm contained preserved ribosomes and polysomes.

Mitochondria were of a different shape and size. The cristae kept their parallel orientation. Many ribosomes were located on the membranes of rough endoplasmic reticulum. Cytoplasm was filled with numerous ribosomes and polysomes.

Laminar cytoplasmic Golgi complex was poorly developed, its parallel smooth membranes were surrounded by a small number of small electron-transparent vesicles. Cytoplasmic membrane was clearly contoured and formed microvilli of different lengths.

Electron-microscopic study of the ultrastructure of adult donor blood NCs, isolated by Ficoll, revealed ultrastructural changes in the form of membrane structures destruction foci. The cytoplasmic membrane was greatly loosened and its structure lost clear contours. Cell cytoplasm preserved most ribosomes and polysomes.

The cisterns of rough endoplasmic reticulum were significantly expanded and were visualized as electron-transparent vacuoles, and its membranes had multiple foci of destruction (Fig. 2). Some NCs had fragmented intracellular membrane. Leukocyte nuclei contained condensed chromatin, localized along the nuclear membrane, and the inner region of the nuclei was of low electron density. The outer membranes of mitochondria were significantly loosened and somewhere destroyed. Matrix of mitochondria preserved fine granular structure and was of high electron density. Part of mitochondrial cristae were destroyed (Fig. 3).

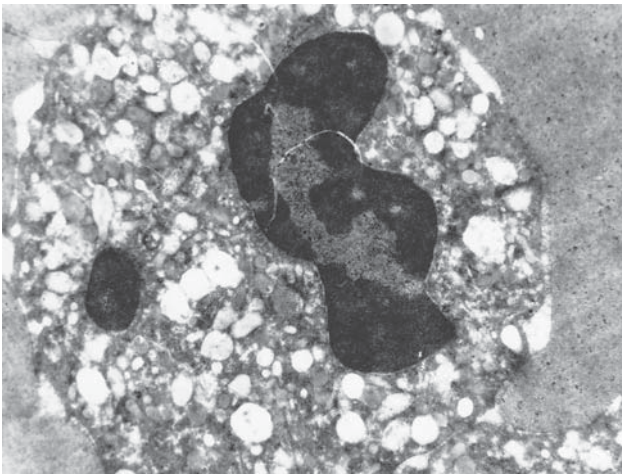


Рис. 2. Ультраструктура ЯСК донорской крови, выделенных с помощью фиколла. Конденсация хроматина ядра, вакуолизация цитоплазмы и фрагментация мембран эндоплазматической сети, $\times 20000$.

Fig. 2. Ultrastructure of NCs of adult donor blood isolated with Ficoll. Nuclear chromatin condensation, vacuolization of cytoplasm and fragmentation of endoplasmatic membranes, $\times 20000$.

тохондрии, кристы которых подвержены разрушению (рис. 3).

Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи содержал беспорядочно ориентированные гладкие мембраны с очагами деструкции и крупные электронно-прозрачные вакуоли.

После выделения ЯСК донорской крови методом седиментации в полиглиукине ультраструктурная организация клеток сохранялась лучше, чем после выделения фиколлом (рис. 4). Ядра ЯСК имели неправильную форму с глубокими инвагинациями ядерной мембраны, содержали конденсированный хроматин. Центральная часть ядра заполнена равномерно распределенными гранулами деконденсированного хроматина и свободными рибосомами. Перинуклеарные пространства умеренно и равномерно расширены. В цитоплазме выявляются многочисленные рибосомы и полисомы. Цитоплазматическая мембрана не имела очагов деструкции.

В цитоплазме определялись мелкие митохондрии с большим количеством крист и мелкозернистым матриксом. Разрушений наружных мембран и крист митохондрий не выявлено. Наблюдается умеренное расширение цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулула.

Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи представлен гладкими параллельно ориентированными и собранными в стопки мембранами, которые окружены мелкими везикулами. Цитоплазматические выросты на поверхности ЯСК не нарушены. Деструкций внутриклеточных мембранных структур не наблюдается.

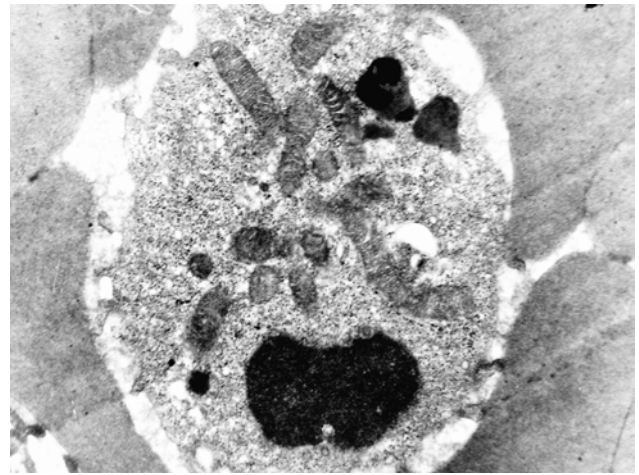


Рис. 3. Ультраструктура ЯСК донорской крови, выделенных с помощью фиколла. Разрыхление и деструкция наружных мембран митохондрий, $\times 19000$.

Fig. 3. Ultrastructure of NCs of adult donor blood, isolated with Ficoll. Loosening and destruction of outer membranes of mitochondria, $\times 19000$.

Laminar cytoplasmic Golgi complex contained randomly oriented smooth membranes with foci of destruction and large electron-transparent vacuoles.

After isolation of NCs of adult donor blood by sedimentation in Poliglyukin the ultrastructure of cells was better preserved than after Ficoll separation (Fig. 4). The nuclei of NCs were of irregular shape with deep invaginations of the nuclear membrane, and contained condensed chromatin. The central part of the nuclei was filled with evenly distributed decondensed chromatin granules and free ribosomes. Perinuclear spaces

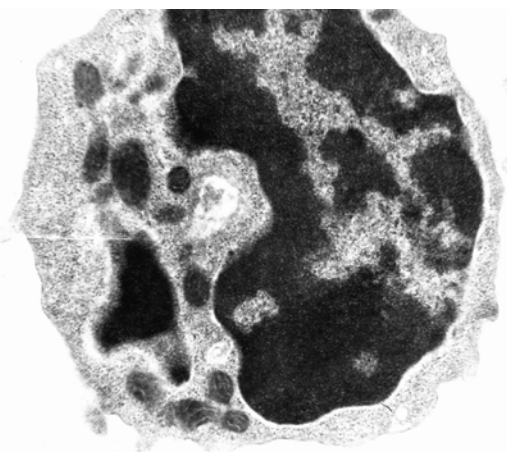


Рис. 4. Ультраструктура ЯСК донорской крови, выделенных полиглиукином. Конденсация хроматина, многочисленные рибосомы и полисомы в цитоплазме, $\times 18000$.

Fig. 4. Ultrastructure of NCs of adult donor blood, isolated by Poliglyukin. Chromatin condensation, numerous ribosomes and polysomes in cytoplasm, $\times 18000$.

Результаты исследования ультраструктуры ЯСК кордовой крови показали, что после выделения методом двухэтапного центрифугирования клетки имели хорошо сохранившуюся субмикроскопическую организацию. Ядра ЯСК кордовой крови занимали большую часть цитоплазмы (рис. 5), были округлой формы и располагались в центральной области цитоплазмы.

Ядерная мембрана гладкая с неглубокими инвагинациями, четко контурирована. Перинуклеарные пространства не расширены. Ядерный хроматин находился как в конденсированном, так и в деконденсированном состоянии. Узкая полоска цитоплазмы, окружающая ядро, заполнена многочисленными рибосомами и полисомами. Гранулярный эндоплазматический ретикулум развит слабо. В цитоплазме определялись единичные митохондрии округлой формы с мелкозернистым матриксом. Наружные мембраны и кристы были без очагов деструкции. Цитоплазматическая мембрана гладкая, четко контурирована, образует микроворсинки.

После выделения ЯСК кордовой крови в градиенте плотности фиколла ядра клеток содержали конденсированный хроматин с разрыхленной структурой. Ядерная мембрана была сильно разрыхлена и имела множественные очаги лизиса. Большая часть внутриклеточных структур и мембранных комплексов разрушена (рис. 6). Мембраны гранулярного эндоплазматического ретикулума разрыхлены, его цистерны приобретали вид электронно-прозрачных вакуолей. Достаточно часто наблюдалась фрагментация внутриклеточных мембран. На мембранах эндоплазматической сети связанные рибосомы практически отсутствовали. Цитоплазма обладала высокой электронной плотностью.

Митохондрии ЯСК кордовой крови имели вид вакуолей, заполненных грубоволокнистой субстанцией. Кристы митохондрий подвергались тотальной деструкции. Цитоплазматическая мембрана образовывала многочисленные выросты и местами была разрушена.

Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи представлен фрагментами беспорядочно ориентированных разрыхленных и зачастую разрушенных гладких мембран. Везикулярная часть комплекса Гольджи состояла из деструктивно измененных электронно-плотных везикул.

При выделении ЯСК кордовой крови методом седиментации в полиглюкине установлено, что ядра клеток занимали большую часть цитоплазмы. Ядерная мембрана умеренно разрыхлена, образовывала глубокие инвагинации. Перинуклеарные пространства не расширены. Ядерный хроматин частично конденсирован, его глыбки располагались равномерно по площади среза ядра. Между ними локализовался деконденсированный хроматин.

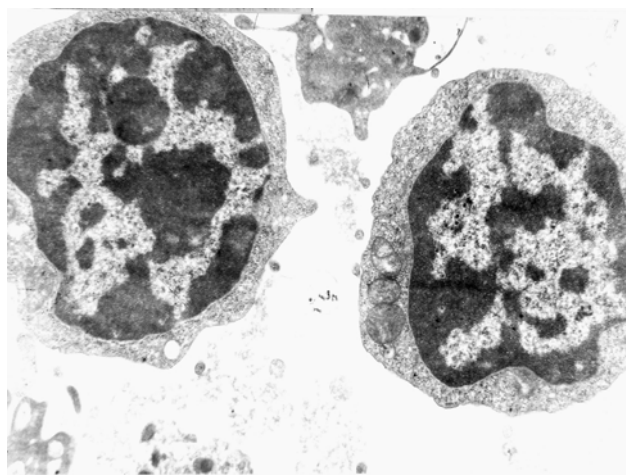


Рис. 5. Ультраструктура ЯСК кордовой крови, выделенных методом двухэтапного центрифугирования. Конденсация хроматина, скопление рибосом и полисом в цитоплазме, митохондрии с мелкозернистым матриксом, $\times 16000$.

Fig. 5. Ultrastructure of NCs from cord blood, isolated by two-step centrifugation. Chromatin condensation, numerous ribosomes and polysomes in cytoplasm, mitochondria with fine-grained matrix, $\times 16000$.

were moderately and evenly extended. The cytoplasm had numerous ribosomes and polysomes. Cytoplasmic membrane had no foci of destruction.

The cytoplasm had small mitochondria with many cristae and fine-grained matrix. No destructions of outer membrane and cristae of mitochondria were observed. A moderate expansion of rough endoplasmic reticulum cisterns was found. Lamellar cytoplasmic Golgi complex was represented by smooth parallel-oriented stacked membranes, surrounded by small vesicles. Cytoplasmic processes on the surface of NCs were not damaged. No destructions of intracellular membrane structures were observed.

Investigation of ultrastructure of NCs from cord blood showed that after isolation by two-step centrifugation the cells had well preserved submicroscopic organization. The nuclei of cord blood NCs occupied the most part of the cytoplasm (Fig. 5), were round and located in the central part of the cytoplasm.

Nuclear membrane was smooth, had shallow invaginations and clear contours. Perinuclear spaces were not extended. The nuclear chromatin was either condensed or decondensed. A narrow strip of cytoplasm surrounding the nucleus was filled with numerous ribosomes and polysomes. The rough endoplasmic reticulum was poorly developed. The cytoplasm had single mitochondria of round shape and with fine-grained matrix. Outer membranes and cristae had no destruction foci. The cytoplasmic membrane was smooth, well-contoured and formed microvilli.

After isolation of NCs from cord blood in Ficoll density gradient the cell nuclei contained condensed

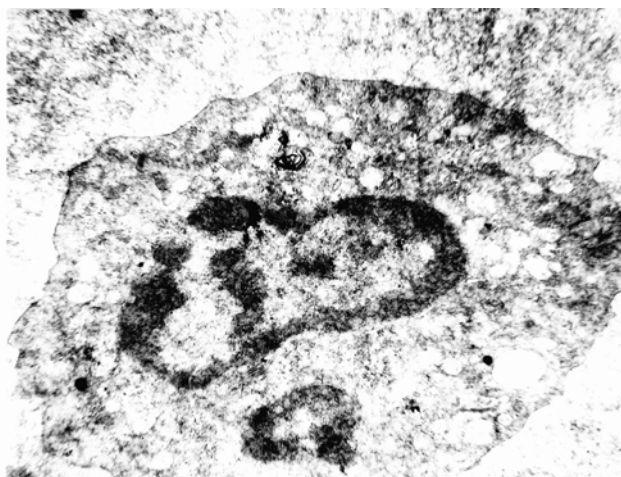


Рис. 6. Ультраструктура ЯСК кордовой крови, выделенных фикоаллом. Разрушение ядерной мембраны, вакуолизация цистерн эндоплазматического ретикулума, миелиноподобные структуры в цитоплазме, $\times 25000$.

Fig. 6. Ultrastructure of NCs from cord blood, isolated in Ficoll. Destroyed nuclear membrane, vacuolization of endoplasmatic reticulum cisterns, myelin-like structures in cytoplasm, $\times 25000$.

Цитоплазма ЯСК кордовой крови содержала большое количество рибосом и полисом (рис. 7), а также мелкие митохондрии, имеющие матрикс повышенной электронной плотности и единичные кристы. Цистерны эндоплазматической сети имели вид вакуолей, заполненных электронно-прозрачной субстанцией. Иногда выявлялись мелкие включения липидов. Цитоплазматическая мембрана была разрыхлена и образовывала микроворсинки. Существенных изменений ультраструктурной организации пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи не выявлено.

Проведенные электронно-микроскопические исследования ЯСК донорской крови после выделения методом двухэтапного центрифугирования свидетельствуют, что у клеток сохраняется типичная субмикроскопическая организация. Описанные изменения, вероятно, связаны с различными стадиями метаболизма этих клеток, а также с их длительным нахождением вне кровеносных сосудов.

Выделение ЯСК донорской крови с помощью фикоалла приводит к деструктивным нарушениям мембранных структур и органелл этих клеток. Существенной деструкции подвержены гранулярный эндоплазматический ретикулум, наружные мембраны и кристы митохондрий, ядерная мембрана и гладкие мембраны пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи. Большинство ЯСК, имеющие такие нарушения, вероятно, не способны восстановить свою нормальную метаболическую активность путем внутриклеточной репарации. Это подтверждается данными, полу-

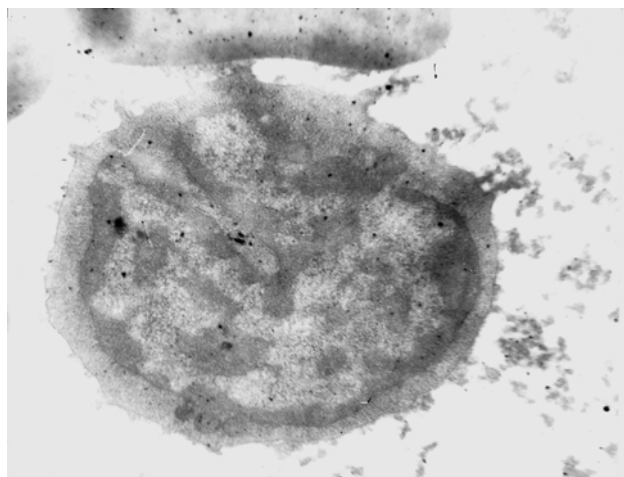


Рис. 7. Ультраструктура ЯСК кордовой крови, выделенных полиглюкином. Глубокие инвагинации ядерной мембраны, рибосомы в цитоплазме, $\times 20000$.

Fig. 7. Ultrastructure of NCs from cord blood, isolated in Poliglyukin. Deep invaginations of nuclear membranes, ribosomes in cytoplasm, $\times 20000$.

chromatin with loosened structure. Nuclear membrane was significantly loosened and had multiple foci of lysis. Most of the intracellular structures and membrane complexes was destroyed (Fig. 6). Rough endoplasmic reticulum membranes were loosened and its cisterns were in the form of electron-transparent vacuoles. Fragmentation of intracellular membranes was commonly observed. Almost no bound ribosomes were observed on the membranes of the endoplasmic reticulum. The cytoplasm was of high electron density.

Mitochondria of cord blood NCs appeared as vacuoles filled with coarse fibrous substance. Cristae of mitochondria were totally destroyed. Cytoplasmic membrane formed numerous processes and was sometimes destroyed.

Laminar cytoplasmic Golgi complex was represented by fragmented, randomly oriented, loosened and mainly destroyed smooth membranes. Vesicular part of the Golgi complex was consisted of destroyed electron-dense vesicles.

Cord blood NCs isolated by sedimentation in Poliglyukin possessed cell nuclei which occupied the most part of cytoplasm. Nuclear membrane was moderately loosened and formed deep invaginations. Perinuclear spaces were not extended. Nuclear chromatin was partially condensed, its clumps were located evenly over the nuclei section. Decondensed chromatin localized the clumps.

Cytoplasm of cord blood NCs contained a large number of ribosomes and polysomes (Fig. 7), as well as small mitochondria with matrix of increased electron density and single cristae. Endoplasmic reticulum cis-

ченными нами ранее [3]. Было показано, что метаболическое состояние ЯСК зависит от метода их выделения из цельной крови. Установлено, что после выделения фико́ллом метаболическая активность клеток значительно снижается, а применение методов двухэтапного центрифугирования и седиментации в полиглиукине для выделения фракций ЯСК характеризуется отсутствием достоверных отличий в метаболической активности клеток по сравнению с контролем.

Хорошо сохраняют ультраструктуру ЯСК донорской крови, выделенные седиментацией в полиглиукине. В их цитоплазме обнаружены неповрежденные митохондрии, что важно для протекания окислительно-восстановительных реакций и обеспечения высокого уровня внутриклеточной биоэнергетики. Наличие в цитоплазме большого количества рибосом и полисом свидетельствует о синтезирующей и репаративной активности этих клеток. Обнаруженные изменения органелл и внутриклеточных мембран – проявление адаптационно-компенсаторных реакций и их обратимости.

Типичную неизменную субмикроскопическую архитектуру имели ЯСК кордовой крови, выделенные методом двухэтапного центрифугирования. Следует отметить, что по сравнению с ЯСК донорской крови кордовая кровь содержит значительно большее количество клеток, соответствующих по своей ультраструктурной организации стволовым клеткам, которые содержат крупные ядра и узкую полосу цитоплазмы, заполненную многочисленными рибосомами, что предопределяет их высокую потенциальную способность к дифференцировке [7].

Электронно-микроскопическое исследование ядросодержащих клеток кордовой крови, выделенных с помощью полиглиукина, выявило удовлетворительную сохранность субмикроскопической архитектуры. Наблюдаемые разрыхления ядерной мембраны, мембран митохондрий, гранулярного эндоплазматического ретикулума и плазмолеммы по глубине и степени выраженности были в пределах физиологической компенсации.

В ЯСК кордовой крови, выделенных с помощью фико́лла, как и в препаратах донорской крови, выделенных тем же методом, в большом количестве присутствуют клетки с очагами деструкции субмикроскопических структур. Под воздействием фико́лла разрушаются митохондрии, мембраны эндоплазматической сети, ядерная и цитоплазматическая мембраны. Следует отметить, что ЯСК кордовой крови, выделенные фико́ллом, имели существенные изменения ультраструктуры, степень выраженности которых находилась за пределами физиологической компенсации. Клетки, способные

were in the form of vacuoles filled with electron-transparent substance. Small inclusions of lipids were sometimes revealed. The cytoplasmic membrane was loosened and formed microvilli. No significant changes in ultrastructure of laminar cytoplasmic Golgi complex have been found.

The conducted electron microscopy studies of NCs from adult donor blood after isolation by two-step centrifugation revealed that the cells retained the typical submicroscopic organization. The found changes are likely to be associated with different stages of metabolism of the cells, as well as with their long-term presence outside of the blood vessels.

Isolation of NCs from adult donor blood using Ficoll leads to destructions of membrane structures and organelles of these cells. The subjects of destruction are rough endoplasmic reticulum, the outer membranes and cristae of mitochondria, the nuclear membrane and the smooth membranes of laminar cytoplasmic Golgi complex. Most NCs with such violations are likely not able to recover its normal metabolic activity by intracellular repair. This is confirmed by the reported data [3] revealed the dependence of NC metabolic state on the method of their isolation from the whole blood. It was found that after Ficoll separation the metabolic activity of cells was significantly reduced, and the application of two-step centrifugation and sedimentation in Poliglyukin to isolate the NC fractions was characterized by the absence of significant differences in the metabolic activity of the cells as compared to the control.

The NCs of adult donor blood isolated by sedimentation in Poliglyukin quite good retain their ultrastructure. Their cytoplasm had intact mitochondria, that was important for oxidation-reduction reactions and to provide a high level of intracellular bioenergetics. The presence in the cytoplasm of large number of ribosomes and polysomes testifies to preserved synthesizing and reparative activity of these cells. The detected changes in intracellular membranes and organelles are likely the manifestation of adaptive-compensatory reactions and are reversible.

Typical unmodified submicroscopic structure was found in the NCs from cord blood isolated by two-step centrifugation. It should be noted that if compared with adult donor blood the cord blood contains significantly larger number of cells that correspond by their ultrastructural organization to stem cells, which contain large nuclei and a narrow strip of cytoplasm filled with numerous ribosomes, which determines their high potential ability to differentiate [7].

Electron microscopic study of cord blood nucleated cells isolated by Poliglyukin revealed their satisfactory preserved submicroscopic structure. Observed loosening of the nuclear membrane, mitochondrial membrane,

к активному восстановлению и дальнейшему функционированию, встречались редко.

Эти результаты согласуются с полученными нами данными [5] по оценке жизнеспособности и степени нарушения асимметрии мембран ЯСК кордовой и донорской крови в зависимости от методов выделения. Исследования, проведенные с помощью метода проточной цитофлуориметрии, свидетельствуют, что после выделения ядродержащих клеток методом двухэтапного центрифугирования и седиментации в полиглюкине потери жизнеспособности и изменения в асимметричном распределении фосфолипидов в мембране не наблюдались, а при выделении фикоаллом снижалась жизнеспособность клеток и нарушалась асимметрия мембран.

Представленные в данной работе результаты имеют важное значение для последующих этапов криоконсервирования, так как структурно-функциональные нарушения при выделении ЯСК могут приводить к тому, что криоконсервированию будут подвергаться заведомо поврежденные клетки, что проявится как в снижении их устойчивости, так и в потере жизнеспособности на этапах добавления криопротектора и замораживания-отогрева [1].

В следующем сообщении будут представлены данные об изменениях ультраструктуры ЯСК кордовой и донорской крови после криоконсервирования клеток, выделенных вышеуказанными методами.

Выводы

1. Выделение ЯСК донорской и кордовой крови методом двухэтапного центрифугирования позволяет сохранять типичную субмикроскопическую организацию этих клеток.

2. Выделение ЯСК донорской и кордовой крови с помощью фикоалла приводит к деструктивным нарушениям мембранных структур и органелл.

3. Выделенные с помощью полиглюкина ЯСК донорской и кордовой крови сохраняют свойственную им ультраструктуру. Цитоплазма данных клеток сохраняет большое количество рибосом и полисом.

Литература

1. Бабийчук Л.А., Zubov П.М., Михайлова О.А., Рязанцев В.В. Оценка стадий апоптоза ядродержащих клеток кордовой крови до и после криоконсервирования // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15, №3, Ч. 2. – С. 22–26.
2. Бабийчук Л.А., Zubov П.М., Рязанцев В.В., Зубова О.Л. Выделение и криоконсервирование ядродержащих клеток пуповинной крови: оценка их качественного и количественного состава // Новое в гематологии и трансфузиологии: Международный научно-практический рецензируемый сборник. – Киев, 2006. – С.16–20.

rough endoplasmic reticulum and plasmolemma were within physiological compensation limits by their depth and severity.

In NCs of cord blood isolated by Ficoll like in preparations of adult donor blood isolated by the same method a large number of cells with foci of destruction of submicroscopic structures are present. Under the influence of Ficoll the mitochondria, endoplasmic reticulum membrane, nuclear and cytoplasmic membrane are being destroyed. It should be noted that the cord blood NCs isolated by Ficoll had significant changes in the ultrastructure, the severity of which was outside the physiological compensation limits. There were only single cells likely capable of active restoration and the following functioning.

These results are consistent with the reported by us data [5] on the assessment of the viability and degree of membrane asymmetry impairments in NCs of cord and blood, depending on the selection method. The research carried out by flow cytometry showed that after the isolation of nucleated cells using a two-step centrifugation and sedimentation in Poliglyukin there was no loss of viability and no changes in the asymmetric distribution of phospholipids in the membrane, and in the case of isolation with Ficoll we have found a decrease in cell viability and impaired membrane asymmetry.

The results presented in this paper are important for the following stages of cryopreservation, as structural and functional impairments arised during NC isolation can lead to the fact that *a priori* damaged cells will undergo cryopreservation, which will result in both decrease in their stability and loss of viability at the steps of adding cryoprotectant and freeze-thawing [1].

In the next report we will present the data on changes in the ultrastructure of NCs from cord blood and adult donor blood after cryopreservation of cells isolated by stated methods.

Conclusion

1. Isolation of NCs from adult donor blood and cord blood by a two-step centrifugation allows to preserve a typical submicroscopic organization of these cells.

2. Isolation of NCs from adult donor blood and cord blood using Ficoll leads to a destruction of membrane structures and organelles.

3. The NCs from adult donor blood and cord blood, isolated in Poliglyukin retain their characteristic ultrastructure. The cytoplasm of these cells preserved a high number of ribosomes and polysomes.

References

1. Babiychuk L.A., Zubov P.M., Mikhailova O.A., Ryazantsev V.V. Evaluation of apoptosis stages in nucleated cells of cord blood prior to and after cryopreservation // Tavricheskiy Mediko-

3. *Бабийчук Л.А., Рязанцев В.В., Зубов П.М., Михайлова О.А.* Оценка продукции активных форм кислорода ядросодержащими клетками пуповинной крови на этапах криоконсервирования // *Вісник проблем біології і медицини.* – 2010. – Вип.3– С.50–55.
4. *Владимирская Е.Б., Майорова О.А., Румянцев С.А., Румянцева А.Г.* Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками.– М.: Медпрактика, 2005. – 391 с.
5. *Михайлова О.А., Бабийчук Л.А., Рязанцев В.В., Зубов П.М.* Оценка жизнеспособности и степени нарушения асимметрии мембран ядросодержащих клеток при различных методах их выделения из цельной кордовой и донорской крови // *Вісник проблем біології і медицини.* – 2011. – Вип.4(90).– С.118–122.
6. *Пушкар Н.С., Капрельянц А.С., Панков Е.Я.* Ультраструктура клетки при низких температурах. – Киев: Наук. думка, 1978. – 144 с.
7. *Хэм А., Кормак Д.* Гистология.– М.: Мир, 1983.– Т. 1. – 272 с.
8. Пат. 23499 Україна, МПК С 12 N 5/00. Спосіб виділення ядровмісних клітин кордової крові / Л.О. Бабійчук, В. І. Грищенко, В. В. Рязанцев, П.М. Зубов, О.Л. Зубова; Заявлено 22.01.07; Опубл. 25.05.07, Бюл. №7.
9. *Gluckman E., Broxmeyer H.E., Auerbach A.D. et al.* Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling // *N. Engl. J. Med.* – 1989.– Vol. 321, №17.– P.1174–1178.
10. *Siena S., Bregni M., Brando B. et al.* Circulation of CD34⁺ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor // *Blood.* – 1989. – Vol.74, №6.– P. 1905–1914.
2. *Babiychuk L.A., Zubov P.M., Ryazantsev V.V., Zubova O.L.* Isolation and cryopreservation of cord blood nucleated cells: evaluation of qualitative and quantitative composition // *Novoye v Gematologii i Perelivanii Krovi: International Scientific and Practical Perr-Reviewed Collected Papers.* – Kyiv, 2006. – P.16–20.
3. *Babiychuk L.A., Ryazantsev V.V., Zubov P.M., Mikhailova O.A.* Estimation of production of reactive oxygen species by nucleated cells of umbilical cord blood at the stages of cryopreservation // *Visnyk Problem Biologii i Meditsyny.* – 2010. – Issue 3. – P. 50–55.
4. *Vladimirskaya E.B., Mayorov O.A., Rumyantsev S.A., Rumyantseva A.G.* Biological basics and perspectives of stem cell therapies. – Moscow: Medpraktika, 2005. – 391 p.
5. *Mikhailova O.A., Babiychuk L.A., Ryazantsev V.V., Zubov P.M.* Assessment of viability and degree of impairments of asymmetry of membranes of nucleated cells with different methods of their isolation from whole cord and donor blood // *Visnyk Problem Biologii i Meditsyny.* – 2011. – Issue 4(90). – P. 118–122.
6. *Pushkar N.S., Kaprelyants A.S., Pankov E.Ya.* Ultrastructure of cell at low temperatures. – Kiev: Naukova Dumka, 1978. – 144 p.
7. *Ham A., Cormac J.* Histology. – Moscow: Mir, 1983. – Vol. 1. – 272 p.
8. Patent of Ukraine 23499, IPC C 12 N 5/00. The way of isolation of nucleated cell from cord blood / L.O. Babiychuk, V.I. Grishchenko, V.V. Ryazantsev et al.; Filed 22.01.07; Publ. 25.05.07, Bull. Nr. 7.
9. *Gluckman E., Broxmeyer H.E., Auerbach A.D. et al.* Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling // *N. Engl. J. Med.* – 1989.– Vol. 321, N17.– P.1174–1178.
10. *Siena S., Bregni M., Brando B. et al.* Circulation of CD34⁺ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor // *Blood.* – 1989. – Vol.74, N6.– P. 1905–1914.

Поступила 25.06.2012

Accepted 25.06.2012