

UDC 591.84:599.323.4

CHANGES IN THE STRUCTURE OF THE VASCULAR BED OF LONG BONES UNDER THE LOWERING OF A SUPPORT LOAD

Babak S.V.

**Summary.** In a model of a removal of a bearing burden from the posterior limbs of rats, histological studies revealed changes in the structure of vascular channels and circulatory bed in the bones, in particular, a deformation of channels and vessels and an increase in the diameter and specific area of the blood vessels and a reduction of blood filling of the vessels. Angiospasmms were noticed in some blood vessels. Sites of aggregation of formed elements of the blood were found in deformed vessels. Separate cells or cell aggregates having modified morphology were found on the outer surface of the blood vessels.

**Key words:** circulatory bed of long bones, vascular channels of bones, lowering of a support load.

Стаття надійшла 29.03.2011 р.

УДК 612.112.086.3:57.043

Л.А. Бабийчук, Р.К. Мигунова, В.П. Невзоров

## ОЦЕНКА УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ ДО И ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

Работа выполнялась в соответствии с научной темой: «Изучение механизмов структурно-функциональных изменений ядродержащих клеток кордовой крови и эритроцитов под влиянием экзо- и эндоцеллюлярных криопротекторов и низких температур»; государственный регистрационный номер темы: 0109U00278.

**Вступление.** В настоящее время кордовая кровь (КК) и полученные из нее препараты привлекают внимание все большего количества исследователей и клиницистов, в связи с высокой терапевтической эффективностью, обусловленной наличием в них прежде всего стволовых гемопоэтических клеток, а также различных ростовых, колониестимулирующих факторов и других биологически активных веществ [3, 6].

Широкое применение КК возможно только при наличии ее запасов, что привело к созданию банков КК, в которых образцы хранятся в жидком азоте при температуре -196°C в течение практически неограниченного времени [1].

Однако, учитывая небольшие объемы КК (в среднем, не более 100 мл), очень важным является как заготовка максимального количества крови, так и, особенно, полное выделение ядродержащих клеток (ЯСК) (в том числе и гемопоэтических) при сепарации с сохранением их качества, а также разработка новых и усовершенствования существующих технологий криоконсервирования.

Поскольку клиническая эффективность препаратов ЯСК КК, включающих стволовые гемопоэтические клетки, напрямую зависит от количества и структурно-функциональной полнотности клеток, необходимо проведение их комплексного тестирования после криоконсервирования.

Достаточно информативными методами оценки структурно-функционального состояния ЯСК является метод трансмиссионной электронной микроскопии [4], а также метод проточной цитофлуориметрии с использованием ДНК-красителя 7AAD для определения их жизнеспособности [2].

В связи с этим **целью данной работы** было изучение ультраструктурных характеристик и жизнеспособности ЯСК КК до и после криоконсервирования разработанными нами методами.

**Объект и методы исследования.** Сбор КК производили после получения информированного согласия у беременной, которая проходила тщательный дородовой скрининг на наличие противопоказаний к донорству КК. Эксфузию КК осуществляли закрытым способом в систему для забора крови из пупочной вены при естественных родах после рождения ребенка и отделения его от плаценты зажимом. Средний объем получаемой КК в одном образце составлял 80±20 мл.

Выделение фракции ЯСК из КК проводили методом седиментации в 6% растворе полиглюкина. В качестве

криопротектора использовали ДМСО в конечной концентрации 5%. Криоконсервирование клеток проводили в замораживателе фирмы Cryosan по специальной разработанной нами четырехэтапной программе [5]. Оттаивание проводили на водяной бане при 37-39°C.

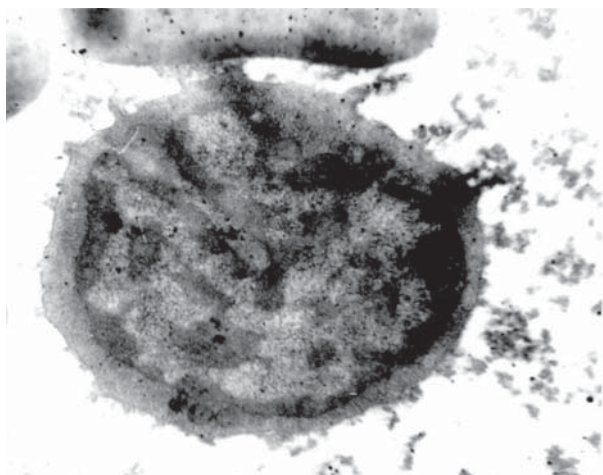
Фенотипирование ЯСК КК, в том числе и гемопоэтических, до и после криоконсервирования, проводилось методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре FACS Calibur фирмы Becton Dickinson (BD) (США) с использованием реагентов BD по международному ISHAGE протоколу. Жизнеспособность ЯСК КК оценивали с помощью флуоресцентного ДНК красителя 7-AAD (BD), используя метод проточной цитофлуориметрии.

Для электронно-микроскопического исследования выделенные ЯСК фиксировались в 2.5%-м растворе глutarового альдегида на фосфатном буфере (pH 7,3-7,4) в течение 5-6 часов при температуре 4°C. После промывки в буферном растворе клетки переносились для дофиксации в 1%-ный раствор четырех окиси осмия на 3-4 часа. Дегидратацию проводили в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне. После обезвоживания клетки заключали в смесь эпоксидных смол эпон-аралдит. Полимеризацию блоков осуществляли в термостате при температуре 60°C в течение двух суток.

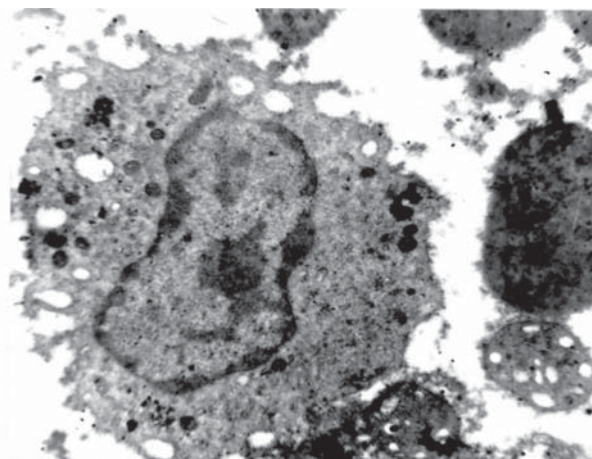
Ультратонкие срезы изготавливались на ультрамикротоме УМТП-3М, монтировали их на электролитические сеточки и, после контрастирования цитратом свинца, исследовали с помощью электронного микроскопа ЭМВ-100БР при ускоряющем напряжении 75 кВ. Увеличение подбиралось адекватно целям исследования.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Проведенные электронно-микроскопические исследования ультраструктуры ЯСК КК после выделения полиглюкином показали, что клетки имели типичную субмикроскопическую организацию. Ядра 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, имеющий мелкогранулярную структуру и среднюю электронную плотность. Цитоплазма содержала большое количество рибосом и полисом (**рис. 1**).

В цитоплазме выявлялись мелкие митохондрии, имеющие матрикс повышенной электронной плотности, содержащий единичные кристы. Цистерны эндоплазматической сети имели вид вакуолей, заполненных электронно-прозрачной субстанцией. Иногда встречались мелкие включения липидов. Цитоплазматическая мембрана имела разрыхленный вид и образовывала микроворсинки. Обнаруживались очаги лизиса и разрыхление плазматической мембраны (**рис. 2**).



**Рис. 1.** Ультраструктура ЯСК КК, выделенных полиглюкином. Глубокие инвагинации ядерной мембраны, рибосомы в цитоплазме.  $\times 20000$ .



**Рис. 2.** Ультраструктура ЯСК КК, выделенных полиглюкином. Электронно-плотный матрикс митохондрий, вакуолизация цистерн эндоплазматического ретикулума.  $\times 25000$  Контрастировано цитратом свинца.

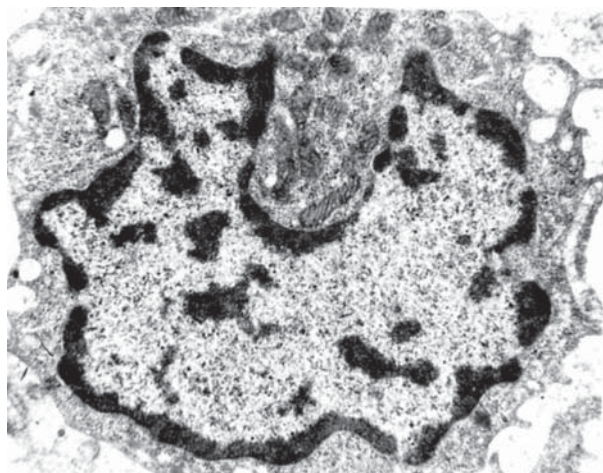
Существенных изменений ультраструктурной организации пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи не выявлено. Его гладкие мембраны параллельно ориентированы, однако, умеренно разрыхлены. Везикулы, окружающие стенки его мембран, заполнены тонко волокнистым веществом средней электронной плотности.

Электронно-микроскопическое исследование ядродержащих клеток кордовой крови, выделенных полиглюкином, выявило удовлетворительную сохранность субмикроскопической архитектоники. Наблюдаемые разрыхления ядерной мембраны, митохондрий, цитоплазматической мембраны и гранулярного эндоплазматического ретикулума по своей степени выраженности лежат в пределах физиологической компенсации и являются обратимыми.

Это согласуется с полученными нами данными по исследованию жизнеспособности ЯСК, где с помощью метода проточной цитофлуориметрии с использованием ДНК красителя 7 AAD было показано, что выделение клеток с помощью полиглюкина позволяет сохранять все ЯСК в жизнеспособном состоянии.

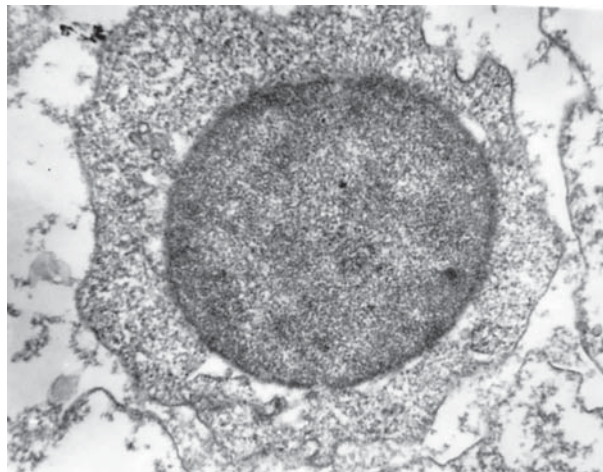
Оценка ультраструктуры ЯСК КК после криоконсервирования по разработанному нами методу [5] показала, что в этих препаратах присутствовали в большом количестве метаболически активные клетки (рис. 3). Ядра этих клеток

имели сохраненную ядерную мембрану, содержали большое количество гранул деконденсированного хроматина. Ядерная мембрана имела глубокие инвагинации. В цитоплазме много свободных рибосом и полисом. Цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума уплощены. Митохондрии имеют мелко гранулярный матрикс и многочисленные кристы. Цитоплазматическая мембрана без очагов деструкции, имеет большое количество удлинённых микроворсинок.



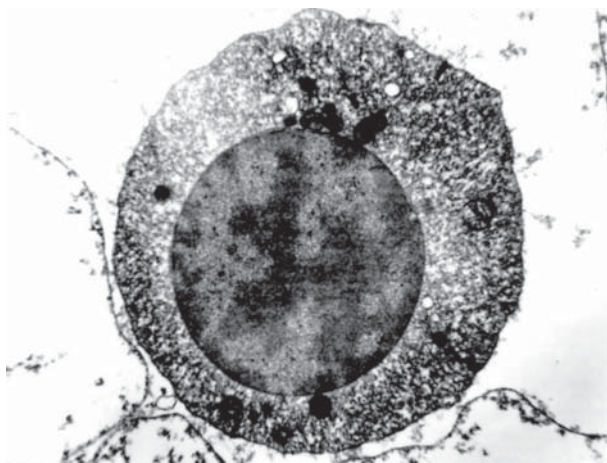
**Рис. 3.** Ультраструктура ЯСК КК после криоконсервирования. Митохондрии с большим числом крист.  $\times 23000$ .

Наряду с этим, встречались клетки, имеющие ядра округлой формы, в которых конденсированный хроматин отсутствовал, а гранулы деконденсированного хроматина были плотно упакованы в матрикс ядра, за счет чего возрастала его электронная плотность (рис. 4). Ядерная мембрана их утолщена. В цитоплазме присутствовало множество рибосом и полисом, цитоплазматическая мембрана имела типичное строение. Эти клетки по своей структуре были близки к стволовым клеткам. В их цитоплазме содержались, как и в стволовых клетках, многочисленные рибосомы, полисомы и небольшое количество органелл. Большую часть цитоплазмы занимало ядро.



**Рис. 4.** Ультраструктура ЯСК КК после криоконсервирования. Плотные упакованные гранулы деконденсированного хроматина в ядре.  $\times 18000$  Контрастировано цитратом свинца.

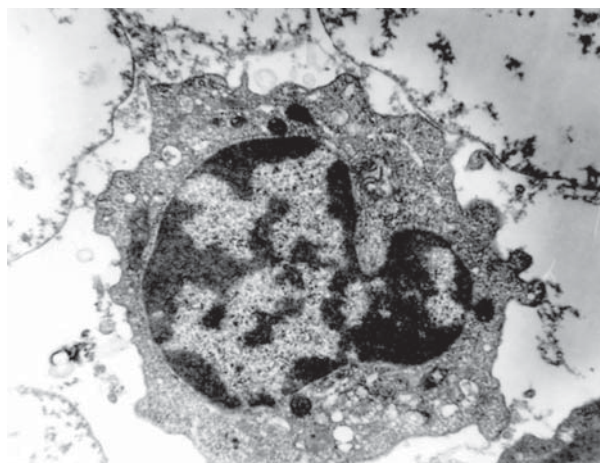
Митохондрии в отдельных ЯСК имели электронно-плотный матрикс. Цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума имели вид электронно-прозрачных везикул (рис.5).



**Рис. 5.** Ультраструктура ЯСК КК после криоконсервирования. Электронно-плотный матрикс митохондрий и везикулы эндоплазматической сети в цитоплазме. x19000.

Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи был представлен небольшим количеством беспорядочно ориентированных гладких мембран, окруженных многочисленными мелкими электронно-прозрачными везикулами (рис. 6).

Таким образом, несмотря на полиморфизм ЯСК, в ультраструктурной организации их отсутствовали повреждения, приводящие к гибели этих клеток. Ультраструктурная архитектура ЯСК КК, выделенных полиглобулином и криоконсервированных по разработанному нами методу, достаточно хорошо сохранена и клетки находятся в метаболически активном состоянии, имеют потенциал для полного восстановления. Клеток, подверженных необратимым изменениям, в препаратах крайне мало. Эти данные коррелируют с полученными нами результатами по исследованию жизнеспособности клеток, где было показано, что после криоконсервирования 85% ЯСК остаются в жизнеспособном состоянии.



**Рис. 6.** Ультраструктура ЯСК КК после криоконсервирования. Мелкие везикулы вокруг гладких мембран пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи. x20000 Контрастирование цитратом свинца.

**Выводы.** Проведенные электронно-микроскопические исследования субмикроскопической организации ЯСК КК свидетельствует, что у клеток, выделенных и криоконсервированных разработанными нами методами, ультраструктура хорошо сохранена. Выявленные изменения органелл ЯСК КК лежат в пределах физиологической компенсации и могут быть восстановлены репаративными возможностями клеток. Это подтверждается полученными данными по сохранению жизнеспособности клеток после размораживания.

**Перспективы дальнейших исследований.** Дальнейшие исследования будут направлены на изучение механизмов повышения криоустойчивости ЯСК КК и особенно стволовых гемопоэтических клеток в зависимости от методов выделения и криоконсервирования.

## Список литературы

1. Абдулкадыров К.М. Заготовка плацентарной крови. Особенности ее клеточного состава и гемопоэтического потенциала / К.М. Абдулкадыров, Н.А. Романенко // Трансфузиология. - 2003. - Т. 4, № 1. - С. 15-33.
2. Бабийчук Л. А. Новые подходы к проблеме криоконсервирования гемопоэтических клеток кордовой крови человека / Л. А. Бабийчук, В. И. Грищенко, В. В. Рязанцев [и др.] // Укр. журн. гематол. і трансфузіол. – 2005. – № 4 (д). – С. 122–123.
3. Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками / [Владимирская Е.Б., Майорова О.А., Румянцев С.А., Румянцева А.Г.]. - М.: Медпрактика, 2005. - 391с.
4. Пушкарь Н.С. Ультраструктура клетки при низких температурах / Н.С. Пушкарь, А.С. Капельянец, Е.Я. Панков. - К.: Наукова думка, 1978. -144 с.
5. Пат. 92227 Україна, МПК А01N1/02. Спосіб криоконсервування ядровмісних клітин кордової крові, у тому числі гемопоетичних стовбурових клітин. Бабийчук Л. А., Грищенко В. И., Гуріна Т.М., Зубов П. М., Рязанцев В. В., Кудкоцева О.В., Зубова О. Л.; заявник та патентовласник Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України. – № 200814009; заявл. 05.12.08; опубл. 11.10.10, Бюл. №19.
6. Gluckman E. Cord blood transplant: strategy of alternative donor search / E. Gluckman, V. Rocha // Springer Semin Immunopathol. – 2004. – Vol. 26. – № 1–2. – P. 143–54.

УДК 612.112.086.3:57.043

## ОЦЕНКА УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК КОРДОВОЙ КРОВИ ДО И ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

Бабийчук Л.А., Мигунова Р.К., Невзоров В.П.

**Резюме.** В работе проведены исследования ультраструктурных характеристик и жизнеспособности ядродержащих клеток кордовой крови (ЯСК КК) до и после криоконсервирования разработанными нами методами. С помощью метода электронной микроскопии показано, что после выделения и криоконсервирования ЯСК КК наблюдается высокая сохранность ультраструктуры. Выявленные изменения органелл ЯСК КК лежат в пределах физиологической компенсации и могут быть восстановлены репаративными возможностями клеток, что коррелирует с полученными данными по их жизнеспособности.

**Ключевые слова:** ядродержащие клетки, кордовая кровь, криоконсервирование, ультраструктура, жизнеспособность.

УДК 612.112.086.3:57.043

## ОЦІНКА УЛЬТРАСТРУКТУРИ ЯДРОВІСНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ ДО ТА ПІСЛЯ КРИОКОНСЕРВУВАННЯ

Бабійчук Л.О., Мігунова Р.К., Невзоров В.П.

**Резюме.** В роботі проведені дослідження ультраструктурних характеристик і життєздатності ядровмісних клітин кордової крові до та після криоконсервування розробленими нами методами. За допомогою метода електронної

мікроскопії було показано, що після виділення та криоконсервування ядровмісних клітин кордової крові спостерігається висока збереженість ультраструктури. Виявлені зміни органел ядровмісних клітин кордової крові лежать в межах фізіологічної компенсації та можуть бути відновлені репаративними можливостями клітин, що корелює з отриманими нами даними по їх життєздатності.

**Ключові слова:** ядровмісні клітини, кордова кров, криоконсервування, ультраструктура, життєздатність.

UDC 612.112.086.3:57.043

**EVALUATION OF CORD BLOOD NUCLEATED CELLS OF ULTRASTRUCTURE BEFORE AND AFTER CRYOPRESERVATION**  
**Babijchuk L.A., Migunova R.K., Nevzorov V.P.**

**Summary.** The study of ultrastructural traits and viability of cord blood nucleated cells (CB NC) before and after cryopreservation according our developed methods was carried out. Electron microscopy showed that ultrastructure of CB NC remained well after separation and cryopreservation. Reveled changes in CB NC organells were within physiological compensation and could be returned by cell reparation possibilities that correlated with cell viability data.

**Key words:** nucleated cells, cord blood, cryopreservation, ultrastructure.

Стаття надійшла 29.03.2011 р.

УДК 576.31+616.11+616.112

*І.В. Белінська, Т.В. Рибальченко, В.М. Кокозей, О.В. Врещ, В.К. Рибальченко*

## ДИНАМІКА ГЕМАТОТОКСИЧНОГО ВПЛИВУ РІЗНОМЕТАЛІЧНОГО Cu/Fe КОМПЛЕКСУ [Cu(dmen)<sub>2</sub>][Fe(CN)<sub>5</sub>(NO)]

Київський національний університет імені Тараса Шевченка (м.Київ)

Дослідження проведені в рамках наукової теми: „Прямий синтез та біологічні властивості гетерополіядерних комплексів перехідних металів” (№ держреєстрації 0106U006627).

**Вступ.** Різнометалічні комплексні сполуки, останнім часом, активно застосовують в біології і медицині. Їх використовують в діагностичних цілях [17], вони входять до складу терапевтичних препаратів з протипухлинною [3, 17], антипаразитарною [11, 17], протимікробною та фунгіцидною [14, 17] активностями. Показано, що введення до складу існуючих антибіотиків іонів різних металів, підсилює антимікробну дію останніх [13].

Різнометалічні комплексні сполуки, які синтезовані на хімічному факультеті Київського національного університету імені Тараса Шевченка [8], мають мембранотропну активність, взаємодіють з природними і штучними моношаровими та бішаровими мембранами, змінюють активність мембранозв'язаних ферментів гепатоцитів, проявляють гальмівну дію на об'ємну швидкість секреції жовчі печінкою [7, 9, 20], мають антифітотвірні [15], антимікробні, фунгіцидні [10] і протипухлинні [5] властивості, що обумовлює їх вивчення, як потенційної сировини для медичних препаратів.

Різнометалічний комплекс [Cu(dmen)<sub>2</sub>][Fe(CN)<sub>5</sub>(NO)], dmen=N,N'-диметилетилендіамін(кодKL447), містить іони міді (II) і заліза (II). KL447 і нітропрурид натрію (Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO]2H<sub>2</sub>O) мають однаковий аніон. Нітропрурид використовують в медицині як судинорозширювальний препарат (при внутрішньовенному введенні), завдяки здатності бути донором оксиду азоту [18]. За результатами досліджень останніх років, нітропрурид вивільнює і іони заліза [22]. Відомо, що іони заліза і міді відіграють важливу роль в диференціюванні і функціонуванні клітин крові. Так, іони заліза входять до складу гемоглобіну [16], а міді – до складу білків, які беруть участь в транспорті і зберіганні іонів заліза в організмі [19]. Тому дослідження ймовірних

ефектів різнометалічного комплексу KL447 на клітини крові є актуальним.

Метою роботи є дослідження динаміки змін показників крові щурів під впливом високої дози KL447, яка істотно перевищує терапевтичні дози заліза і міді, для встановлення токсичних ефектів даної сполуки.

**Об'єкт і методи досліджень.** Досліди проведені на безпородних білих самках щурів з початковою масою 160-190 г. Щурів утримували при стандартному світловому дні на нормальному харчовому раціоні. KL447 розводили у дистильованій воді в дозі 100 мг/кг і вводили зондом per os протягом 3-х тижнів (5 днів на тиждень) вранці до годування тварин. Доза 100 мг/кг перевищує за вмістом заліза терапевтичну дозу у 4 рази, а міді – майже у 200 раз. Щурам контрольної групи вводили per os дистильовану воду. В кожній групі було по 8 щурів.

Показники крові визначали перед дослідом (вихідні показники) та після 5, 10 та 15 введень досліджуваної речовини загальноприйнятими методами [4].

Математичну обробку експериментальних даних проводили з використанням програми SPSS-16.0. Для визначення вірогідних відмінностей між величинами використовували однофакторний дисперсійний аналіз з критерієм Даннета (q).

**Результати досліджень та їх обговорення.** Перед введенням KL447 були проаналізовані основні вихідні показники крові для створення однорідних груп за цими параметрами. Як видно з **табл. 1** показники крові експериментальної та контрольної груп істотно не відрізняються і знаходяться в межах фізіологічних значень.

Після п'яти введень KL447 у дозі 100 мг/кг спостерігається істотне зниження концентрації гемоглобіну в крові (**рис. 1**), кількості еритроцитів (**рис. 2**), концентрації гемоглобіну в еритроцитах (**рис. 5**). Гематокрит змінюється у напрямку зменшення, але різниця невірогідна через широкі межі коливань даного показника (**рис. 3**). Вміст гемоглобіну

Таблиця 1

Вихідні показники (M±m) крові щурів

Група	Гемоглобін, г/л	Еритроцити, 10 <sup>12</sup> /л	МСН, пг	Лейкоцити, 10 <sup>12</sup> /л
Контрольна група	154,1 ± 3,60	8,00 ± 0,14	19,26 ± 0,17	18,28 ± 2,02
KL447	154,1 ± 4,30	7,86 ± 0,22	19,62 ± 0,21	21,05 ± 1,06

**Примітка:** МСН – середній вміст гемоглобіну в еритроцитах.