

УДК 636.7:612.419:57. 086.13

Водоп'янова Л.А., Югай К.Д., Бобрицька О. М., Антіпін С. Л. ©

E-mail: vodopyanova@mail.ru

Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків, Україна

**ВПЛИВ КРІОПРОТЕКТОРІВ ТА КРІОКОНСЕРВУВАННЯ НА
КЛІТИННИЙ СКЛАД КІСТКОВОГО МОЗКУ СОБАК**

Кістковий мозок - це комплекс клітин, які підтримують кровотворення тварини. Високий терапевтичний потенціал клітин кісткового мозку дає можливість використати їх при лікуванні різних порушень гемопоезу. Таким чином, клінічна потреба в кістковому мозку постійно зростає і вимагає створення резерву біоматеріалу. Використання криозахисту дозволяє зберегати клітинний вміст, близький до показників контролю.

Після заморожування-відігрівання без криозахисту зберігається не більше 6% ККМ собак, причому відсутні клітини еритроцитарного ряду, мегакаріоцитів і моноцитів. Різко скорочується кількість зрілих гранулоцитів, а кількість бластів і лімфоцитів значно знижується (на 46,7% і 73,8% відповідно). Після заморожування-відігрівання з гліцерином загальне число ККМ собак значно скорочувалося. При цьому гліцерин, в концентрації 10%, 20%, 30% зробив найменший захист клітин гранулоцитарного ряду. ПЭО-400 10%, 15%, 20% забезпечує досить високий рівень збереження клітин (від 60% до 75%). Найбільш виражені криозахисні властивості має ДМСО в концентрації 7% (до 98%), та зберігає широкий клітинний спектр. При цьому склад кісткового мозку змінюється, в основному, за рахунок зниження кількості клітин, що знаходяться на завершуючих етапах дозрівання.

Ключові слова: клітини кісткового мозку, криоконсервування.

УДК 636.7:612.419:57. 086.13

Водопьянова Л.А., Югай К.Д., Бобрицкая О. Н., Антипин С. Л.

Харьковская государственная зооветеринарная академия, г. Харьков

**ВЛИЯНИЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ И КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ
НА КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ КОСТНОГО МОЗГА СОБАК**

Костный мозг - это комплекс клеток, которые поддерживают кроветворение у животных. Высокий терапевтический потенциал клеток костного мозга дает возможность использовать их при лечении различных нарушений гемопоэза. Таким образом, клиническая потребность в костном мозге постоянно растет и требует создания резерва биоматериала. Использование криозащиты позволяет сохранять клеточный состав близкий к показателям контроля.

UDC 636.7:612.419:57. 086.13

L.A.Vodopyanova, K.D.Yugay, O.N. Bobritskaya, S.L.Antipin
*Kharkiv state zooveterinary academy, vul. Akademichna 1, Mala Danilivka,
Dergachi district., Kharkov, Ukraine*

EFFECT OF CRYOPROTECTANTS AND CRYOPRESERVATION ON THE CELLULAR STRUCTURE OF THE BONE MARROW OF DOGS

Bone marrow is a complex of cells, which give rise to the blood cells during animal's life. The bone marrow cells (BMC) have high therapeutic potential, it gives an opportunity to use them for treatment of different destructions of hematopoiesis. Thus, a clinical requirement in marrow constantly increases and requires creation of reserve of biomaterial.

Високий терапевтичний клітин кісткового мозку (ККМ) дає можливість використати їх при лікуванні різних порушень гемопоезу. Таким чином, клінічна потреба в кістковому мозку постійно зростає і вимагає створення резерву біоматеріалу. В клінічній ветеринарії і трансплантології актуальним стало зберігання (ККМ) за допомогою технології заморожування. Багато років ведуться дослідження, спрямовані на вивчення механізмів і боротьбу з негативними наслідками кріопшкодження [1, 2, 3, 4, 5].

Таким чином, **метою роботи** було дослідження впливу кріопротекторів і заморожування-відігріву на мієлограму кісткового мозку собак.

Матеріали і методи. ККМ були отримані від 3-4 літніх собак ($n = 10$). Усі тварини були вільні від паразитів і вакциновані. ККМ отримували із стегнової кістки методом кістковомозкової пункції з вимиванням середовищем 199. Концентрацію клітин в суспензії доводили до 1×10^7 /мл шляхом розведення середовищем, 3% ембріональної сироватки крові теляти, що містить, 91% - 199 середовища, 6% цитрату натрію (робоче середовище) [6, 7].

Заморожування проводили в пластикових контейнерах за двоетапною програмою після додавання кріопротекторів. Відігрів проводили у воді при 41°C . Після відігріву, кріопротектори вилучали з суспензії ККМ та визначали збереженості клітин. ККМ забарвлювали трипановим синім. В мазках, забарвлених за Романовським, визначали вид ККМ (мієлограму).

Отримані результати представлено як середнє значення ($M \pm m$) 10 незалежних експериментів. Статистичну обробку результатів проводили за методом Стюдента-Фішера з застосуванням програми Microsoft Office Excel.

Результати й обговорення. Відомо, що кріопротектори, які використовуються для зниження негативних ефектів заморожування-відігріву, самі можуть впливати на клітини при експозиції до заморожування. З даних, наведених на рис. 1, видно, що всі досліджені кріопротектори на етапі експозиції дещо знижують кількість клітин кісткового мозку собак. Можливо, це пов'язано з присутністю в суспензії клітин, пошкоджених під час отримання кісткового мозку, а також чутливих до дії самих кріопротекторів.

Заморожування кісткового мозку собак без кріопротектора негативно позначається на життєздатності клітин і робить такий біоматеріал непридатним для трансплантації (рис. 2).

Доведено, що гліцерин був недостатньо ефективним засобом захисту кісткового мозку собак при кріоконсервуванні. ПЕО-400 в 10% та 15% концентрації забезпечує більш високий рівень збереження клітин, ніж гліцерин, а найбільш виражені кріопротекторні властивості має ДМСО в 7% та 10% концентрації.

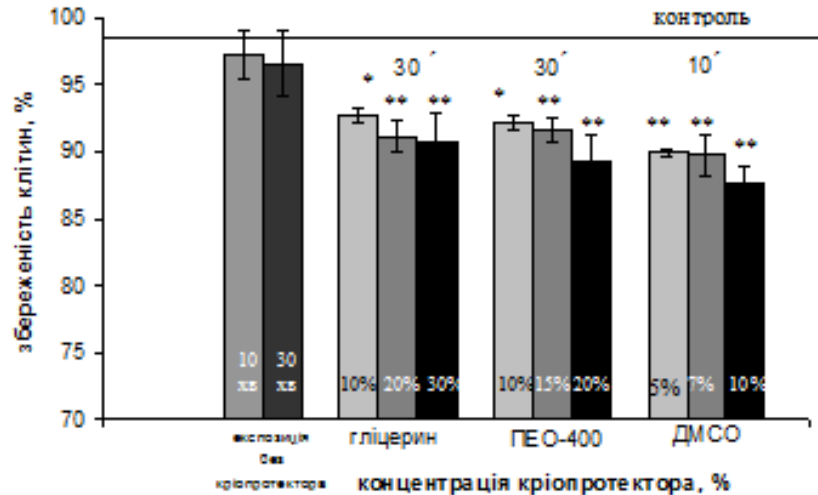


Рис. 1. Показники збереження кісткового мозку собак після експозиції (10', 30' – хвилин) з кріопротектором та без нього. Дані наведено як середні значення ($M \pm m$) 10 незалежних експериментів. ** - значення достовірні щодо контролю; $P < 0,001$. * - значення достовірні щодо контролю, $P < 0,01$. Контроль – інтактний кістковий мозок собак.

З метою успішної мієлотрансплантації важливо зберегти не тільки клітини, здатні до проліферації і диференціювання, але і весь клітинний спектр кісткового мозку на стабільному рівні. У зв'язку з цим реєстрація мієлограми при кріоконсервуванні клітин кісткового мозку набуває важливого практичного значення.

На рисунку 3 показано відсоткове співвідношення клітин кісткового мозку собак, що характеризує мієлограму свіжоотриманої суспензії і суспензії після заморожування-відігріву з кріопротектором та без кріопротектора. Використання кріопротекторів при заморожуванні кісткового мозку собак дозволяє зберегти клітинний склад після відігріву. При цьому мінімальні його зміни виявлено після заморожування-відігріву кісткового мозку собак у присутності ДМСО 7% і 10%.

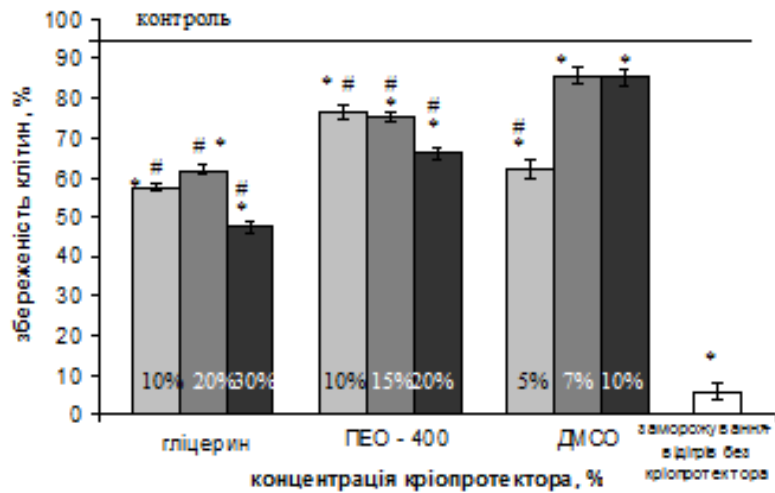


Рис. 2. Показники збереження кісткового мозку собак після заморожування-відігріву без криопротектора та з криопротектором в різних концентраціях. Дані наведено як середні значення ($M \pm m$) 10 незалежних експериментів. * - значення достовірні щодо контролю, $P < 0,001$. # - значення достовірні щодо клітин після експозиції з криопротектором, $P < 0,001$. Контроль – інтактний кістковий мозок собак.

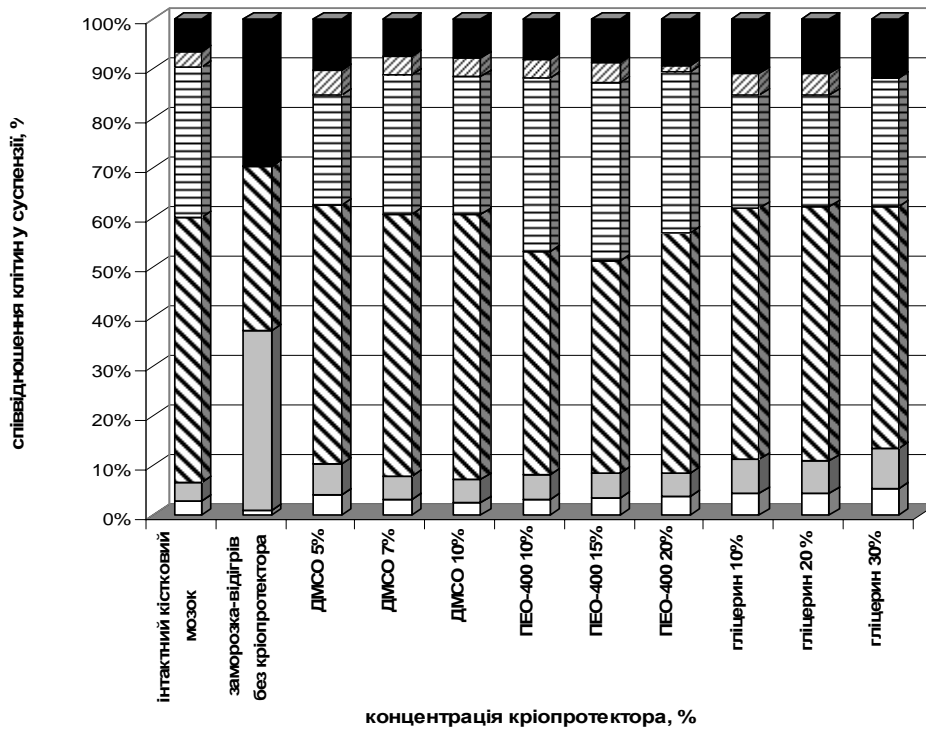


Рис. 3. Показники мієлограми до та після заморожування-відігріву кісткового мозку собак з криопротектором та без нього. □ - ретикулярні клітини, ■ - бласти, ▨ - гранулоцити, ▤ - еритроцити, ▩ - моноцити, ■ -

- лімфоцити, ■ -мегакаріоцити. Дані наведено як середні значення ($M \pm m$) 10 незалежних експериментів.

Висновки. Після заморожування-відігрівання без криозахисту зберігається не більше 6% ККМ собак, причому відсутні клітини еритроцитарного ряду, мегакаріоцитів і моноцитів. Різко скорочується кількість зрілих гранулоцитів, а кількість бластів і лімфоцитів значно знижується (на 46,7% і 73,8% відповідно). Після заморожування-відігрівання з гліцерином загальне число ККМ собак значно скорочувалося. При цьому гліцерин, в концентрації 10%, 20%, 30% зробив найменший захист клітин гранулоцитарного ряду. ПЭО-400 10%, 15%, 20% забезпечує досить високий рівень збереження клітин (від 60% до 75%). Найбільш виражені криозахистні властивості має ДМСО в концентрації 7% (до 98%), та зберігає широкий клітинний спектр. При цьому склад кісткового мозку змінюється, в основному, за рахунок зниження кількості клітин що знаходяться на завершуючих етапах дозрівання. Це, мабуть, не повинно відбиватися на терапевтичних властивостях, оскільки ефект, в основному, залежить від стовбурових клітин і клітин, що знаходяться на ранніх стадіях диференціювання, здатних забезпечити відновлення кровотворної функції кісткового мозку.

Таким чином, кістковий мозок собак криоконсервований з ДМСО може проявити максимальний терапевтичний ефект при лікуванні різних порушень гемопоезу у собак.

Література

1. Baust J. G. Advances in biopreservation / Baust J. G, Baust J. M. // Ed. by - By T aylor & Francis Group. LLC. - 2007. - P. 15 - 62.
2. Warry E.E. Autologous peripheral blood hematopoietic cell transplantation in dogs with T-cell lymphoma / Warry E.E., Willcox J.L., Suter S.E. // Vet. Intern. Med. – 2014.- Vol. 28 (2). - P. 529-37.
3. Petersen S.M. In utero hematopoietic stem cell transplantation in canines: exploring the gestational age window of opportunity to maximize engraftment / Petersen S.M., Gendelman M., Murphy K.M., Torbenson M., Jones R.J., Stetten G., Bird C., Blakemore K.J.// Fetal Diagn. Ther.- 2013.- Vol. 33(2). - P. 116-21.
4. Escobar C. Hematologic changes after total body irradiation and autologous transplantation of hematopoietic peripheral blood progenitor cells in dogs with lymphoma / Escobar C., Grindem C., Neel J.A., Suter S.E.// Vet. Pathol. – 2012.- Vol.49 (2). - P. 341-343.
5. Zhu X. Evaluation of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells after long-term cryopreservation / Zhu X., Yuan F., Li H., Zheng Y., Xiao Y., Yan F.// Zoolog Sci. – 2013. - Vol. 30 (12). - P.1032-1037.
6. Гольцев А.М. Оценка гемопоэтического потенциала стволовых кроветворных клеток костного мозга с измененным исходным статусом под действием факторов криоконсервирования / А. М. Гольцев, Т. Г. Дубрава, Ю. А. Козлова, Т. М. Гурина, М. В. Останков // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, №3. – С. 320-323.
7. Kawano Y. Cryopreservation of mobilized blood stem cells at a higher cell concentration without the use of a programmed freezer / Y. Kawano, C. L. Lee, T. Watanabe, T. Abe // Ann. Hematol.- 2004. – Vol. 83, №1. – P. 50-54.

Рецензент – д.вет.н., професор Головач П.І.