



УДК 636.7:611.018.46:577.121:57.086.13

## Біохімічні критерії оцінки функціонального стану кісткового мозку собак

Л.А. Водоп'янова, К.Д. Югай, О.М. Бобрицька, С.Л. Антіпін  
vodopyanova@mail.ru

Харківська державна зооветеринарна академія,  
вул. Академічна, 1, смт Мала Данилівка, Дергачівський р-н, Харківська обл., 62341, Україна,

Кістковий мозок – це комплекс клітин, що підтримують кровотворення в організмі тварини. Високий терапевтичний потенціал клітин кісткового мозку (ККМ) дає можливість використати їх за лікування тварин різних захворювань, що викликають порушення гемопоезу, а також після застосування хіміотерапії. Отже, клінічна потреба в клітинах кісткового мозку постійно зростає і вимагає створення резерву біологічного матеріалу. У клінічній ветеринарії і трансплантології є нагальна потреба в довгостроковому зберіганні клітин кісткового мозку за допомогою технології заморожування. Використання криозахисту дозволяє зберігати клітинний вміст близький до показників контрольної групи, але багато років ведуться дослідження, спрямовані на вивчення механізмів і боротьбу з негативними наслідками крипошкодження. Незважаючи на те, що в останній час клітини гемопоетичної системи активно вивчаються, багато аспектів їх біохімії все ще невизначені і заслуговують на особливу увагу. Визначали вміст глюкозо-6-фосфату (Г-6-Ф), аденозинтрифосфату (АТФ), піровиноградної та молочної кислот у клітинах кісткового мозку собак до та після криоконсервування з диметилсульфоксидом (ДМСО). Доведено, що 7% ДМСО виявився ефективним криопротектором, що сприяє збереженню  $83,51 \pm 1,9\%$  клітин. Показники рівня АТФ, піровиноградної та молочної кислот у клітинах кісткового мозку собак після заморожування відігріву в присутності ДМСО залишалися близькими до контрольної групи.

**Ключові слова:** кістковий мозок, кровотворення, крипошкодження, криоконсервування, глюкозо-6-фосфат, аденозинтрифосфат, піровиноградна кислота, молочна кислота.

## Биохимические критерии оценки функционального состояния костного мозга собак

Л.А. Водопянова, К.Д. Югай, О.Н. Бобрицкая, С.Л. Антипин  
vodopyanova@mail.ru

Харьковская государственная зооветеринарная академия,  
ул. Академическая, 1, пгт Малая Даниловка, Дергачёвский р-н, Харьковская обл., 62341, Украина

Костный мозг – это комплекс клеток, поддерживающих кроветворения в организме животного. Повышенный терапевтический потенциал клеток костного мозга (ККМ) дает возможность использовать их при лечении различных заболеваний, вызывающих нарушение гемопоэза, а также после применения химиотерапии. Таким образом, клиническая потребность в клетках костного мозга постоянно растет и требует создания резерва биоматериала. В клинической ветеринарии и трансплантологии есть необходимость в долгосрочном хранении клеток костного мозга с помощью технологии замораживания. Использование криозащиты позволяет сохранить клеточный состав близкий к показателям контроля, но ведутся исследования, направленные на изучение механизмов и борьбу с негативными последствиями криоповреждения.

Несмотря на то, что в последнее время клетки гемопоэтической системы активно изучаются, многие аспекты их биохимии все еще неопределенны и заслуживают особого внимания. Определяли содержание глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф), аденозинтрифосфата (АТФ), пирувинуградной и молочной кислот в клетках костного мозга собак до и после криоконсервирования с диметилсульфоксидом (ДМСО). Показано, что 7% ДМСО оказался эффективным криопротекторами, и спо-

### Citation:

Vodopyanova, L.A., Yugay, K.D., Bobritskaya, O.N., Antipin, S.L. (2017). Biochemical criteria for evaluation of functional status of dogs bone marrow. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 19(73), 37–39.

соответствует сохранению  $83,51 \pm 1,9\%$  клеток. Показатели уровня АТФ, пировиноградной и молочной кислот в клетках костного мозга собак после замораживания-отогрева в присутствии ДМСО оставались близкими к контролю.

**Ключевые слова:** костный мозг, кроветворение, криоповреждение, криоконсервирование, глюкозо-6-фосфат, аденозинтрифосфат, пировиноградная кислота, молочная кислота.

## Biochemical criteria for evaluation of functional status of dogs bone marrow

L.A. Vodopyanova, K.D. Yugay, O.N. Bobritskaya, S.L. Antipin  
vodopyanova@mail.ru

Kharkov State Zooveterinary Academy,  
Akademichna Str., 1, Mala Danylivka, Kharkiv region, Dergachi district, 62341, Ukraine

*Bone marrow is a complex of cells, that support hematopoiesis in an organism of animal. The bone marrow cells (BMC) have high therapeutic potential, it gives an opportunity to use them for treatment of different destructions of hematopoiesis and after chemotherapy. Thus, a clinical requirement in marrow increases constantly and requires creation of pool of biomaterial.*

*In clinical veterinary and transplantation there is a requirement to create long-term storage of bone marrow cells by freezing technology. Using cryoprotectant preserves cell structure close to the control, but research is conducted, to study the mechanisms and the fight against the negative effects of cryodestruction.*

*Despite the fact that these days the hematopoietic system cells are studied actively many aspects of their biochemistry are still uncertain and deserve special attention. The glucose-6-phosphate, ATP, pyruvic acid and lactic acid in the dogs' bone marrow cells before and after cryopreservation with dimethylsulfoxide have studied.*

*It was found that 7% DMSO was the most effective cryoprotectant and survive  $83.51 \pm 1.9\%$  of cells. The ATP, pyruvic and lactic acids levels in dogs' bone marrow cells after freezing-thawed with DMSO were near to the control measure.*

**Key words:** bone marrow, blood, cryodestruction, cryopreservation, glucose-6-phosphate, adenosinetriphosphate, pyruvic acid, lactic acid.

### Вступ

Відомо, що всім клітинам постійно необхідна енергія у вигляді АТФ. Одночасно з тим, запасу АТФ у клітинах практично не існує і здійснюється його постійний синтез (Mamprin et al., 2005). Порушення, будь-якого етапу метаболізму, що призводить до припинення синтезу АТФ, згубно для клітини, в зв'язку з цим метою дослідження було оцінювання біохімічних критеріїв та енергетичного стану ККМ собак.

### Матеріал і методи досліджень

ККМ були отримані від 3–4 літніх собак ( $n = 10$ ). Усі тварини були вільні від паразитів і вакциновані. ККМ отримували із стегнової кістки методом кістково-мозкової пункції з вимиванням середовищем 199. Концентрацію клітин в суспензії доводили до  $1 \times 10^7$ /мл шляхом розведення середовищем, 3% ембріональної сироватки крові теляти, що містить, 91% – 199 середовища, 6% цитрату натрію (робоче середовище) (Kawano et al., 2004; Goltsev et al., 2005; Wargy et al., 2014).

Заморожування проводили в пластикових контейнерах по двоетапній програмі після додавання криопротекторів. Відігрів проводили у воді за температури  $41^\circ\text{C}$ . Уміст метаболітів в ККМ собак встановлювали спектрофотометрично в свіжоотриманих ККМ, відмитих від криопротектору після експозиції та заморожування-відігріву (Cusaeva et al., 1983).

Наукові дані наведені як середні значення ( $M \pm m$ ) 10 незалежних експериментів. Статистичну обробку результатів проводили за методом Стьюдента-Фишера з використанням програми Microsoft Office Excel.

### Результати та їх обговорення

Відомо, що криопротектори, які використовуються для зниження негативних ефектів заморожування-відігріву, самі можуть впливати на клітини за криоконсервування. Раніше нами було проведено порівняльні дослідження показників збереження ККМ собак після заморожування-відігріву за наявності непроникаючих і проникаючих криопротекторів (ДМСО, гліцерин, поліетиленгліколь-400) (Vodop'janova and Zhegunov, 2006). ДМСО показав себе як перспективніший криопротектор, саме тому, за вивчення енергетичних субстратів клітини ми використовували ряд концентрацій ДМСО.

Встановлено, що зміна в змісті АТФ і Г-6-Ф у клітинах відбуваються вже на етапі інкубації. Зниження рівня цих речовин, відбувається як в присутності криопротектора в середовищі інкубації, так і без нього (табл. 1). За цих умов не відбувається вірогідних змін у змісті ПВК. Рівень молочної кислоти в клітинах, інкубованих без криопротектора, не підвищується щодо контролю, а за наявності ДМСО підвищується на 25% і 9% відповідно з ДМСО – 10% і ДМСО – 7%. Після криоконсервування клітин з ДМСО виникає невелике збільшення рівня Г-6-Ф і лактату порівняно з даними контролю. За цих умов відзначено незначне зниження рівня АТФ. Встановлено, що за тривалої інкубації швидкість і узгодженість біохімічних процесів у клітинах змінюється, за цих умов підвищуються витрати енергетичного потенціалу, викликане численними чинниками, а саме: перехід на анаеробний гліколіз в клітинах *in vitro*, пригноблення біологічного окислення різними інгібіторами, формування додаткових шляхів метаболізму. ККМ використовують анаеробний гліколіз для синтезу АТФ.

Зміст субстратів енергетичного обміну в ККМ собак

ККМ	Субстрат енергетичного обміну (мкмоль / г білка)			
	АТФ	Г-6-Ф	ПВК	лактат
інтактні ККМ	2,318 ± 0,067	0,702 ± 0,042	0,141 ± 0,01	1,256 ± 0,063
інкубовані без кріопротектора	2,000 ± 0,028*	0,500 ± 0,06***	0,145 ± 0,004	1,310 ± 0,079
інкубовані з ДМСО 10%	2,091 ± 0,05*	0,750 ± 0,045	0,156 ± 0,002	1,318 ± 0,07**
інкубовані з ДМСО 7%	2,208 ± 0,09	0,686 ± 0,052	0,149 ± 0,003	1,130 ± 0,08
кріоконсервовані з ДМСО 10%	1,737 ± 0,108**	0,809 ± 0,027*	0,166 ± 0,004**#	1,567 ± 0,069**#
кріоконсервовані з ДМСО 7%	2,046 ± 0,087*	0,852 ± 0,052***#	0,163 ± 0,003*	1,371 ± 0,043**#

\* – значення вірогідні щодо інтактних ККМ собак (контроль),  $P < 0,05$ . \*\* – рначення достовірні щодо контролю,  $P < 0,01$ . \*\*\* – значення достовірні щодо контролю,  $P < 0,001$ . # – значення достовірні щодо клітин після експозиції з кріопротекторів,  $P < 0,05$ .

Отже, підтверджується необхідність якнайшвидшого проведення трансплантації біологічного матеріалу, а тривале зберігання ККМ *in vitro* неможливе, оскільки в клітинах підвищується утворення лактату, що згубне для клітини (Prohorova et al., 1982; Idei et al., 2008; Gajduk et al., 2016). Уповільнення метаболізма, аж до мінімальної потреби в глюкозі та АТФ, можливо тільки за кріоконсервування.

Зниження рівня АТФ після кріоконсервування, може бути пов'язано з підвищенням витрат енергетичного матеріалу на відновлення структури і функцій у клітинах, що веде за собою компенсаторне збільшення рівня Г-6-Ф (табл. 1) (Patel et al., 2000; Baust and Baust, 2007).

Зниження рівня ПВК і підвищений вміст молочної кислоти після відігрівання, вказує на домінування анаеробних процесів у розморожених клітинах, однак аеробне отримання енергії можливо відразу після введення клітин *in vivo*.

### Висновки

Отримані дані, підтверджують припущення про існування залежності між рівнем енергетичного обміну та збереженням ККМ. Застосування 7% ДМСО сприяє високому збереженню ККМ собак та збереженню рівня Г-6-Ф, АТФ, ПВК. Відновлення функціонування, метаболізму та енергетичних процесів після трансплантації відбувається швидше в клітинах, де біохімічні зрушення були мінімальні.

*Перспективи подальших досліджень.* Кріоконсервування ККМ собак із застосуванням ДМСО дозволяє зберегти рівень енергетичного обміну в клітинах на прийнятному для трансплантації рівні, зміни мінімальні і це не повинно відбиватися на функціональних та терапевтичних властивостях ККМ, що застосовуються за лікування різних порушень гемопоезу у собак.

### Бібліографічні посилання

Warry, E.E., Willcox, J.L., Suter, S.E. (2014). Autologous peripheral blood hematopoietic cell transplantation in dogs with T-cell lymphoma. *Vet. Intern. Med.* 28(2), 529–37.

Baust, J.G., Baust, J.M. (2007). *Advances in biopreservation*. Ed. by - By Taylor & Francis Group. LLC, 15–62.

Mamprin, M.E., Vega, F., Rodrigues, J.V. (2005). Adenosine 5 triphosphate transport and accumulation during the cold preservation of rat hepatocytes in University of Wisconsin solution. *World J. Gastroenterol.* 11(13), 1957–1964.

Gajduk, M.B., Gutyj, B.V., Gufrij, D.F. (2016). Therapeutic effectiveness of the drug RBS – DOG as immune modulating means in the treatment of dogs with wounds at hypo ergic type of inflammation. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 18, 2(66), 35–39.

Goltsev, A.M., Dubrava, T.G., Kozlova, Yu.A., Gurina, T.M., Ostankov, M.V. (2005). Ocenka gemopojeticheskogo potenciala stvolovyh krovotvornyh kletok kostnogo mozga s izmenennym ishodnym statusom pod dejstviem faktorov kriokonservirovanija. *Problemy kriobiologii.* 15(3), 320–323 (in Russian).

Kawano, Y., Lee, C.L., Watanabe, T., Abe, T. (2004). Cryopreservation of mobilized blood stem cells at a higher cell concentration without the use of a programmed freezer. *Ann. Hematol.* 83(1), 50–54.

Cucaeva, A.A., Agranenko, V.A., Fedorova, L.I. (1983). Kriokonservirovanie kletocnyh suspenzij. Pod red. A.A. Cucaevoj. – K.: Nauk. dumka (in Russian).

Vodop'janova, L.A., Zhegunov, G.F. (2006). Sohrannost' kletok kostnogo mozga sobak posle jekspozicii s krioprotektorami i zamorazhivaniya v zhidkom azote. *Problemy kriobiologii.* 16(2), 207–210 (in Russian).

Idei, K., Matsuura, S., Fujino, Y. (2008). Investigation of Various Methods for the Cryopreservation of Canine Bone Marrow-Derived CD34+ Cells. *J. Vet. Med. Sci.* 70(11), 1211–1217.

Prohorova, M.I., Zolotova, L.A., Flerov, M.A. (1982). (1982). *Metody biohimicheskikh issledovanij (lipidnyj i jenergeticheskij obmen)*. L.: Izd. Leningrad. univer. (in Russian).

Patel, S.D., Paroutsakis, E.T., Winter, J.N., Muller, W.M. (2000). The lactate issue revisited: novel feeding protocols to examine inhibition of cell proliferation and glucose metabolism in hematopoietic cell cultures. *Biotechnol. Prog.* 16(5), 885–892.

Стаття надійшла до редакції 17.03.2017