

УДК 547.963

## Действие факторов замораживания на изменения внутриклеточного метаболизма при криоконсервации костного мозга человека

Д-р биол. наук В. И. ВАЩЕНКО<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Vladimir-vaschenko@yandex.ru

Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова  
194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6

Д-р мед. наук А. Б. ЧУХЛОВИН, Г. И. ПЕТРЕНКО

Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова  
197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

Канд. мед. наук В. Н. ВИЛЯНИНОВ<sup>2</sup>, д-р биол. наук Ш. М. БАГАУТДИНОВ

<sup>2</sup>Viljaninov@mail.ru

Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова  
194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6

Проведены исследования донорского и аутологичного костного мозга, подвергнутого замораживанию с последующим оттаиванием. Регистрацию изоферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ) проводили на аппарате SUPER CELLO-5 (HOSPITEX, Швейцария). Показано, что в размороженных клетках меняется спектр изоферментов ЛДГ от М-форм в сторону Н-форм, свидетельствуя о быстром восстановлении клеточного метаболизма. Изменения изоферментного спектра ЛДГ, происходящие под действием сверхнизких температур, являются отражением внутриклеточной перестройки обменных процессов, как ключевого элемента адаптации клетки к понижению температуры. Полученные результаты свидетельствуют, что биохимические изменения согласуются со значительным уменьшением содержания АТФ в размороженных клетках костного мозга; при использовании ПЭО-400 в 1,5, а ПВП в 1,8 раза соответственно. Образование пировиноградной кислоты (элемента реакции гликолиза) значительно больше во взвеси размороженных клеток. Сохранность клеток костного мозга при криоконсервировании с криопротектором поливинилпирролидоном (ПВП) значительно выше, чем при использовании криофилактика ПЭО-400 (с ПВП около 85% и 57,2% для ПЭО-400). Выявлено, что степень структурных изменений сверхспиральной ДНК коррелировала ( $r = 0,92$ ;  $p < 0,01$ ) с изменением количества аденозинтрифосфата (АТФ) и пировиноградной кислоты (ПВК) во внеклеточной среде.

**Ключевые слова:** криоконсервирование, изоферменты лактатдегидрогеназы, сверхспиральная ДНК, биохимические изменения, клетки костного мозга, диметилацетамид, поливинилпирролидон, полиэтиленоксид 400.

## Impact of preserving agents upon on intracellular metabolic changes during cryoconservation of human bone marrow

Dr. biol. Sc. V. I. VASHCHENKO

Army medical college of MAUD RF, Russia, St. Petersburg

Dr. medical Sc. A. B. CHUKLOVIN, G. I. PETRENKO

Federal Almazov North-West Medical Research Centre, Russia, St. Petersburg

Ph.D. in medicine V. N. VILYANINOV, Dr. biol. Sc. Ch. M. BAGAUTDINOV

Army medical college of MAUD RF, Russia, St. Petersburg

Bone marrow samples (autologous and donor cells) harvested for transplantation were studied in present work. Typing of lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes was performed by means of the SUPER CELLO-5 device (HOSPITEX, Switzerland). We have shown that, the thawed cells exhibited a shift of the LDH isozyme profile from M-forms towards N-forms, thus presuming a fast restoration of cellular metabolism. Changes of the LDH isoenzyme spectrum detected under the influence of ultralow temperatures may reflect an intracellular rearrangement of metabolic processes and intracellular redistribution of LDH isoforms, being an important element of cell adaptation to the temperature shifts. First of all, these biochemical changes are in accordance with considerable reduction of ATP contents in thawed cells from the bone marrow when using PEO-400 or PVP as cryoprotectants (resp., 1.5- and 1.8-fold decrease in ATP). Secondly, synthesis of pyruvic acid proved to be sufficiently increased in a suspension of the thawed cells. Thirdly, intactness of the bone marrow cells if conserved with polyvinylpyrrolidone cryoprotectant was considerably higher than when applying the polyethylene oxide (PEO-40) (resp., 85% with PVP versus 57.2% for PEO). Forthly, structural changes of the supercoiled DNA in the cell samples did well correlated ( $r = 0.92$ ;  $p < 0.01$ ) with changes in ATP and pyruvate quantities in their extracellular space.

**Keywords:** cryopreservation, isoenzymes lactate dehydrogenase, supercoiled DNA, biochemistry changes, bone marrow cells, dimethylacetamid, polyvinylpyrrolidone, polyethilenoxid 400.

Одной из основных проблем криобиологии и криомедицины является сохранение живых систем от повреждающего действия холода специализированными технологиями криоконсервации. Они важны для создания запасов и длительного хранения в жизнеспособном состоянии аутологичного костного мозга (аТКМ) и донорского костного мозга (КМ) и последующей их трансплантации в процессе лечения онкогематологических больных. Наличие криобанков аутологичного костного мозга необходимо также для лиц, профессиональная деятельность которых связана с повышенным риском при выполнении воинского долга и для работников предприятий повышенной опасности [1]. Среди различных способов длительного хранения органов и тканей наиболее надежным и разработанным является метод криоконсервирования при сверхнизких температурах. Учеными различных специальностей интенсивно изучается структурно-функциональное состояние органов и тканей криоконсервированных под защитой различных криофилактиков [2, 3]. Однако, до настоящего времени имеется немного сведений о связи изменений изоферментного состава лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в клетках КМ и конформационной стабильности сверхспиральной ДНК (ссДНК) при использовании эндо- и экзоклеточных криофилактиков.

Цель исследования. Изучить влияние глубокого замораживания на внутриклеточные изменения конформации ссДНК, содержание отдельных элементов энергетического цикла и изоферментов ЛДГ на разных этапах криоконсервирования клеток костного мозга человека.

**Материалы и методы.** В работе использовался донорский КМ и аТКМ, заготовленные общепринятыми методами [4]. Регистрацию изоферментного состава ЛДГ в клетках костного мозга осуществляли до замораживания и после размораживания а также в супернатанте после размораживания и осаждения клеток на аппарате SUPER CELLO-5 (HOSPITEX, Швейцария). Оценку структурных нарушений ссДНК клеток костного мозга, криоконсервированного под защитой криофилактиков поливинилпирролидона (ПВП), полиэтиленоксида — 400 (ПЭО-400) и диметилацетамида (ДМАЦ) осуществляли на лазерном проточном цитометре [5] а вискозиметрию «нуклеоидов» по методам, описанным ранее [6, 7].

Результаты и обсуждение. При экстремальных ситуациях (воздействие сверхнизких температур) важно знать чувствительность клеток костного мозга к непосредствен-

ному действию физико-химических факторов на разных этапах криоконсервирования, которые могут изменять физиологическую устойчивость этих клеток и оказывать влияние на сохранность их функциональной активности, в частности, на скорость и согласованность биохимических процессов. В качестве обособленного раздела теории восстановления функций живых объектов после криоконсервирования, можно принять гипотезу о стимулирующем действии сверхнизких температур на процессы репарации внутриклеточных дефектов и дифференцировки клеточных популяций после замораживания [8, 9]. В табл. 1 приведены результаты исследования изоферментного состава ЛДГ при обработке клеток донорского костного мозга криофилактиками ПВП и ПЭО-400.

Представленные данные показывают, что обработка костного мозга криофилактиками приводит к существенным изменениям энергетики клеток. На фоне понижения общей активности ЛДГ [10] происходит перераспределение состава ее изоферментов. Процедуры обработки клеток криофилактиками перед замораживанием вызывают существенное возрастание относительного количества М-форм ЛДГ (ЛДГ<sub>4</sub>, ЛДГ<sub>5</sub>) и соответствующего уменьшения Н-фракций ЛДГ (ЛДГ<sub>1</sub>, ЛДГ<sub>2</sub>). Такая перестройка изоферментов ЛДГ свидетельствует о снижении активности энергозависимых обменных процессов. После размораживания и отмывания КМ от криопротекторов состав изоферментов ЛДГ восстанавливается и практически не отличается от спектра изоферментов в нативном костном мозге. Можно предположить, что уменьшение суммарной активности обусловлено отмыванием части разрушенных клеток, содержащих основную часть активности ЛДГ. Однако, такое утверждение справедливо лишь отчасти, так как в супернатанте (табл. 2) спектр изоферментов был весьма близок к существующему в плазме доноров и отличался от имеющегося в клетках, что подтверждает высокую выживаемость клеток КМ после размораживания.

Таким образом, перераспределение в размороженных клетках спектра изоферментов ЛДГ от М-форм в сторону Н-форм свидетельствует о быстром восстановлении клеточного метаболизма и, прежде всего, энергетических обменных процессов. Следовательно, происходящие под действием сверхнизких температур изменения изоферментного спектра ЛДГ являются отражением внутриклеточной перестройки обменных процессов, как ключевого элемента адаптации клетки к понижению температуры.

Таблица 1

Распределение фракций ЛДГ (%) в присутствии криофилактиков ПЭО-400 и ПВП

Условия обработки костного мозга	Фракции (изоферменты) ЛДГ ( $n = 12, M \pm m$ )				
	ЛДГ <sub>1</sub>	ЛДГ <sub>2</sub>	ЛДГ <sub>3</sub>	ЛДГ <sub>4</sub>	ЛДГ <sub>5</sub>
Нативный КМ	35,0±4,5	33,1±2,0	14,2±4,6	8,6±2,6	9,1±3,8
После смешивания с ЦОЛИПК-3	45,8±5,2	28,8±5,4	14,7±4,5	7,3±2,2	2,9±0,6
После смешивания с ПЭО-400	11,0±3,7**	15,5±5,6**	16,7±5,8	19,0±4,3**	37,9±5,2**
После оттаивания с ПЭО-400	42,5±6,6	42,1±4,0	7,8±2,5**	4,2±1,2	3,4±1,2*
После смешивания с ПВП	12,2±1,4**	16,0±3,3**	15,3±1,4	21,8±1,8**	34,7±0,7**
После оттаивания с ПВП	27,4±4,8	31,0±2,3	16,1±1,8	10,3±2,6	15,2±3,2

Примечание:

\* различия значимы в сравнении с нативным КМ,  $p < 0,05$ ;

\*\*  $p < 0,01$ .

Таблица 2

**Содержание фракций ЛДГ (%) в супернатанте после осаждения КМ ( $n = 12, M \pm m$ )**

Условия обработки супернатанта костного мозга	Исследуемые фракции (изоферменты) ЛДГ				
	ЛДГ <sub>1</sub>	ЛДГ <sub>2</sub>	ЛДГ <sub>3</sub>	ЛДГ <sub>4</sub>	ЛДГ <sub>5</sub>
Исходный	30,8±5,1	28,9±4,0	24,2±2,4	10,8±5,3	5,2±1,5
после смешивания с ЦОЛИПК	21,1±4,2	31,6±4,7	28,4±4,4	13,6±3,2	5,3±0,7
после оттаивания с ПВП	19,2±6,5	26,5±3,1	27,2±4,4	15,3±4,1	11,9±2,8*
после оттаивания с ПЭО-400	29,7±5,8	26,0±2,2	17,0±2,1	13,1±2,5	14,1±3,1**

Примечание:

\* различия значимы в сравнении с исходными образцами супернатанта КМ (до замораживания),  $p < 0,05$ ;

\*\*  $p < 0,01$ .

Таблица 3

**Изменение содержания АТФ, ПВК и параметров структуры ссДНК при обработке клеток КМ ( $n = 12, M \pm m$ ) криофилактиками ПЭО-400, ПВП и ДМАЦ**

Исследуемые показатели	Условия обработки клеток костного мозга				
	После смешивания с раствором или криофилактиком				
	Хенкс	ЦОЛИПК	ДМАЦ	ПЭО-400	ПВП
ИКН ссДНК, $\eta/\eta_0$	1,24±0,02	1,14±0,03	1,33±0,03	1,47±0,03	1,62±0,04
Количество АТФ, %	100	95,6±4,4	65,3±4,7	66,7±4,0	52,9±5,0
Количество ПВК, %	100	91,4±8,6	274,5±22,0	308,6±21,5	400,2±22,6

Примечание: ИКН ссДНК — индекс конформационной напряженности ссДНК.

Эти биохимические изменения согласуются со значительным уменьшением содержания аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) в размороженных клетках КМ; причем, при использовании ПЭО-400 — в 1,5, а ПВП — в 1,8 раза соответственно. Во-вторых, образование пировиноградной кислоты (элемента реакции гликолиза) значительно больше во взвеси размороженных клеток. В-третьих, сохранность клеток костного мозга при криоконсервировании с криопротектором ПВП была значительно выше, чем при использовании криофилактика ПЭО-400 (с ПВП около 85% и 57,2% для ПЭО-400). В-четвертых степень структурных изменений ссДНК коррелировала ( $r = 0,92$ ;  $p < 0,01$ ) с изменением количества АТФ и пировиноградной кислоты (ПВК) во внеклеточной среде (табл. 3).

Ранее было показано, что после кратковременной инкубации опухолевых клеток с клеточной суспензией аТКМ, обработанных криофилактиком и криоконсервированных, в размороженном образце аТКМ полностью отсутствовала пролиферативная активность раковых клеток. При этом, здоровые клетки размороженного КМ сохраняли свою функциональную полноценность без существенных изменений [11].

Отметим, что, как и при обработке донорского костного мозга криофилактиками, функциональное состояние клеток аТКМ изменяется под влиянием смешивания их с различными средами и криопротекторами. Структурные изменения ссДНК (показателя ИКН ссДНК) при использовании ДМАЦ в растворе Хенкса выше, чем в стандартном растворе ЦОЛИПК ( $p < 0,05$ ). Статистический корреляционный анализ показал, что понижение уровня ИКН ссДНК после процедуры оттаивания коррелирует

с уменьшением пролиферативной активности аутологичного костного мозга заготовленного для лечения больных с онкопролиферативными заболеваниями ( $r = 0,87$ ;  $p < 0,01$ ).

В работах, опубликованных ранее, мы уже отмечали, что для нормального функционирования топологической структуры ссДНК необходимо поддержание динамического равновесия между уровнем и соотношением топоизомераз I и II типа, как стабилизаторов топологической структуры ссДНК [10]. Следовательно, можно предположить, что изменение величины ИКН ссДНК связано с блокированием функционирования топоизомераз II класса. Вероятно, их функции частично замещаются повышением активности топоизомераз I класса. Однако, восстановить плотность сверхспирализации (ПСС) ссДНК топоизомеразы I типа не способны. Действительно, в размороженном кадаверном костном мозге нами зарегистрировано отсутствие бифазности ссДНК при применении криофилактиков ПВП и ПЭО-400, но не ДМАЦ и диметилсульфоксидом (ДМСО) [10]. Этот результат вполне согласуется с представлением о ДМСО как индукторе дифференцировки [12] и регистрируемой пролиферативной активностью клеток размороженного костного мозга. Не исключено также, что при трансплантации размороженного костного мозга больным его пролиферативная активность восстанавливается как результат корректировки структурной активности топо II. Во всяком случае, работами сотрудников Центра крови и тканей ВМедА им. С. И. Кирова доказано, что даже после 10 лет хранения криоконсервированного под защитой ДМАЦ кадаверного костного мозга в нем сохраняется значительная пролиферативная активность [1, 10].

В какой мере результаты, полученные при изучении активности топоизомераз костного мозга согласуются с фактами, представленными в данном исследовании при оценке структурного состояния ссДНК и изоферментных спектров ЛДГ в этих же клетках до и после криоконсервирования под защитой криофилактиков ДМАЦ, ПВП и ПЭО 400 необходимо выяснить в дальнейших исследованиях.

### Выводы

1. При криоконсервировании аутологичного и донорского костного мозга под защитой криофилактиков ПВП, ПЭО-400 и ДМАЦ изоферментный спектр ЛДГ в их клетках претерпевает значительные изменения. После оттаивания клеток костного мозга происходит конвертирование М-форм ЛДГ в Н-фракции ЛДГ в соотношении наблюдаемом в нативном костном мозге.

2. При криоконсервировании костного мозга под защитой криофилактиков ПВП, ПЭО-400 и ДМАЦ в клетках сохраняется топологическая структура ссДНК. В процессе подготовки к криоконсервированию и после оттаивания изменяется только показатель ИКН ссДНК, а уровень ПСС остается неизменным.

### Список литературы

1. Багаутдинов Ш. М. Совершенствование методов долгосрочного хранения крови и костного мозга в замороженном состоянии в службе крови Вооруженных Сил.: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Л., 1998. 37 с.
2. Белоус А. М., Грищенко В. И. Криобиология. — Киев.: Наукова думка, 1994. 431 с.
3. Горбунов Л. В., Салина А. С. Оценка эффективности технологии криоконсервирования ооцитов и эмбрионов млекопитающих // Проблемы криобиологии. 2005. т. 15. № 3. С. 255–262.
4. Михайлов В. Г. Консервация костного мозга. — М.: Медицина, 1979. 144 с.
5. Ващенко В. И., Никитин В. Ю., Вильянинов В. Н., Ващенко Т. Н., Титулова Т. Б. Особенности изменений сверхспиральной ДНК лимфоцитов и иммунитета человека при хронических перегрузках // Medline.ru. 2012. т. 13. С. 185–194.
6. Ващенко В. И., Комар В. Е. Оценка конформационных изменений суперспиральной ДНК эукариотических клеток методом прямой флуориметрии «нуклеоидов». I. Сравнительная информативность различных методов изучения нарушений структуры суперспиральной ДНК в тимоцитах и макрофагах // Цитология. 1986. т. 28. № 7. С. 750–754.
7. Ващенко В. И., Вильянинов В. Н. Развитие представлений о молекулярных механизмах действия криопротекторов при криоконсервировании костного мозга человека / В кн: Актуальные проблемы трансфузиологии. — СПб.: ВМедА, 2011. С. 24–25.
8. Грищенко В. И., Алексеевская Э. И. Криообновление, его роль в сохранении здоровья и долголетия. — Киев.: Наукова думка, 2009. 288 с.
9. Вильянинов В. Н. и др. Резервирование компонентов крови и гемопоэтических клеток с использованием низких температур: состояние и перспективы внедрения в интересах обеспечения пострадавших в чрезвычайных условиях. / В. Н. Вильянинов, С. П. Калек, С. В. Сидоркевич, Ш. М. Бага-

- утдинов, В. Н. Семелев, Г. И. Петренко, Н. Н. Попова // Вестник Международной академии холода. 2014. № 4. С. 48–53.
10. Ващенко В. И., Четкин А. В., Ващенко Т. Н., Петренко Г. И., Борисова Т. К. Особенности изменений сверхспиральной ДНК и активности топоизомераз костного мозга человека, пригодного для миелотрансплантации // Цитология, 2004. т. 46. № 10. — С. 903.
  11. Dietrfelbinger H. F., Kuhn D., Zafferani M. Removal breast cancer from bone marrow by in vitro purging with ether lipids and cryopreservation // Cancer Res. 1993. Vol. 53. No 16. P. 3744–3751.
  12. Лучник А. Н. Изменение сверхспирализации ДНК при дифференцировке, старении и злокачественной трансформации // Онтогенез. 1983. т. 14, No 3. С. 227–237.

### References

1. Bagautdinov Sh. M. Improvement of methods of long-term storage of blood and marrow in the frozen state in service of blood of Armed Forces.: Avtoref. dis. ... d-ra biol.nauk. — L., 1998. 37 p. (in Russian)
2. Belous A. M., Grishchenko V. I. Cryobiology. — Kiev.: Naukova dumka, 1994. 431 p. (in Russian)
3. Gorbunov L. V., Salina A. S. Assessment of efficiency of technology of krio-conservation of oocytes and embryos of mammals. *Problemy kriobiologii*. 2005. vol. 15. No 3. p. 255–262. (in Russian)
4. Mikhailov V. G. Preservation of marrow. — M.: Meditsina, 1979. 144 p. (in Russian)
5. Vashchenko V. I., Nikitin V. Yu., Vil'yaninov V. N., Vashchenko T. N., Titulova T. B. Features of changes of superspiral DNA of lymphocytes and immunity of the person at chronic overloads. *Medline.ru*. 2012. vol. 13. p. 185–194. (in Russian)
6. Vashchenko V. I., Komar V. E. Assessment of conformational changes of superspiral DNA of eukaryotic cells by method of a direct fluorimetry of «nukleoid». I. Comparative informational content of various methods of studying of violations of structure of superspiral DNA in the timotsitakh and macrophages. *Tsitologiya*. 1986. vol. 28. No 7. p. 750–754. (in Russian)
7. Vashchenko V. I., Vil'yaninov V. N. Development of ideas of molecular mechanisms of action of cryoprotectors at cryoconservation of marrow of the person / In the book: Actual problems of transfusiology. — SPb.: VMEdA, 2011. p. 24–25. (in Russian)
8. Grishchenko V. I., Alekseevskaya E. I. Cryopreservation, its role in preservation of health and longevity. — Kiev.: Naukova dumka, 2009. 288 p. (in Russian)
9. Vilyaninov V. N., Kaleko S. P., Bagautdinov Sh. M., Semelev V. N., Popova N. N., Sidorkevich S. V., Petrenko G. I. Reserving components of the blood and hematopoietic cells using low temperatures: current status and prospects for implementation in the interests of victims in emergency situations. *Vestnik Mezhdunarodnoi akademii kholoda*. 2014. No 4. p. 48–53. (in Russian)
10. Vashchenko V. I., Chechetkin A. V. Vashchenko T. N., Petrenko G. I., Borisova T. K. Features of changes of superspiral DNA and activity of topoisomerase marrow of the person suitable for a myelotransplantation. *Tsitologiya*, 2004. vol. 46. No 10. p. 903. (in Russian)
11. Dietrfelbinger H. F., Kuhn D., Zafferani M. Removal breast cancer from bone marrow by in vitro purging with ether lipids and cryopreservation. *Cancer Res*. 1993. Vol. 53. No 16. P. 3744–3751.
12. Luchnik A. N. Change of superspiralling of DNA at a differentiation, aging and malignant transformation. *Ontogenes*. 1983. vol. 14, No 3. p. 227–237. (in Russian)

Статья поступила в редакцию 29.05.2015