

**Влияние изолированных физико-химических факторов
криоконсервирования на клетки костного мозга с различным
исходным структурно-функциональным статусом**

Ю.А. КОЗЛОВА, А.Н. ГОЛЬЦЕВ, М.В. ОСТАНКОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

**Influence of Certain Physical and Chemical Factors
of Cryopreservation on Bone Marrow Cells with Various Initial
Structural and Functional Status**

KOZLOVA YU.A., GOLTSEV A.N., OSTANKOV M.V.

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy
of Sciences of the Ukraine, Kharkov*

Оценена структурно-функциональная организация клеток костного мозга (КМ) интактных крыс и с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом (ЭАЭ) после действия физико-химических факторов, реализуемых в процессе криоконсервирования (рН и осмолярности). Полученные данные ориентируют на возможность модификации (оптимизации) условий эквilibрации КМ доноров с указанной патологией на этапе его предварительной подготовки к замораживанию.

Ключевые слова: костный мозг, аутоиммунные заболевания, осмолярность, рН.

Було оцінено структурно-функціональну організацію клітин кісткового мозку (КМ) інтактних щурів та з експериментальним алергічним енцефаломієлітом після дії фізико-хімічних факторів, що реалізуються в процесі кріоконсервування (рН та осмолярність). Отримані дані орієнтують на можливість модифікації (оптимізації) умов еквілібрації КМ донорів із зазначеною патологією на етапі його попередньої підготовки до заморожування.

Ключові слова: кістковий мозок, аутоімунні захворювання, осмолярність, рН.

The structural and functional organisation of bone marrow (BM) cells of the intact rats and with the experimental allergic encephalomyelitis (EAE) after the influence of physical and chemical factors, realised in the process of cryopreservation (pH and osmolarity) was estimated. The data obtained orientate to the possibility for modifying (optimising) the equilibration conditions of donor's BM with the mentioned pathology at the stage of its preliminary preparing for freezing.

Key-words: bone marrow, autoimmune disease, osmolarity, pH.

В последнее время акцентируется внимание на том, что изменение фундаментальных систем обеспечения гомеостаза организма, а именно лимфо-гемопоэтических структур может быть фактором инициации и поддержания иммунной патологии. Например, не отвергается факт вероятного нарушения состояния кроветворных предшественников при развитии аутоиммунных заболеваний (АИЗ) [2,7]. Аутоиммунитет, в широком смысле этого слова, является физиологическим механизмом удаления из организма измененных антигенных компонентов. Однако в ряде случаев аутоиммунный процесс на фоне срыва механизмов обеспечения толерантности приобретает патологический характер, обуславливая развитие неуправляемых АИЗ. Одним из современных методов их лечения является реконструктивная терапия лимфогемопоэтической системы (ЛГПС), предусматривающая использование алло- и аутологичных гемопоэтических клеток, в частности, клеток КМ. В многоступенчатом процессе аппликации такой терапии существенное место

Адрес для корреспонденции: Козлова Ю.А. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-01-04, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Recently the attention is accented to the changing in fundal systems of an organism's homeostasis providing, namely the lymphohemopoietic structures as the factor of initiation and maintaining of immune pathology. For example, the fact of a probable disorder in the state of hemopoietic precursors at the autoimmune disease (AID) development [2,7] is not rejected. Autoimmunity in a wide meaning is a physiological mechanism of removal out of an organism of changed antigenic components. However in some cases an autoimmune process at the background of the failure of the mechanisms of tolerance providing gains a pathological character, by stipulating the development of an uncontrolled AID. One of the current methods of their treatment is the reconstructive therapy of lymphohemopoietic system (LHPS); the usage of allo- and autological cells, in particular, BM cells. In multi-step process of such therapy application a long-term storage of these cells with using the cryopreservation technologies takes an important place [9,12]. It is known that the resistance of hemopoietic cells to the influence of physical and chemical factors

Address for correspondence: Kozlova Yu. A., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7720104, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

занимает долгосрочное сохранение этих клеток с применением технологий криоконсервирования [9,12]. Известно, что устойчивость кроветворных клеток к действию физико-химических факторов низкотемпературного консервирования определяется их исходным структурно-функциональным состоянием [14]. Ведущими факторами, отрицательно влияющими на клетки в процессе их криоконсервирования, являются: солевые и температурные градиенты, изменение pH среды, механическое воздействие кристаллов льда и др. Известно, что при АИЗ существенно изменяется принцип лиганд-рецепторных взаимодействий между клетками ЛГПС [3,13], обусловленный изменением внутреннего состояния и характеристик мембранных структур клеток. Вполне логично предполагать, что устойчивость таких клеток к действию факторов криоконсервирования будет отличаться от устойчивости клеток интактного организма. Для обеспечения сохранности клеток КМ доноров с АИЗ необходимо разработать конкретные методы криоконсервирования. Одним из важных этапов этой многоэтапной работы является выяснение особенностей ответа миелокариоцитов на действие физико-химических факторов, реализуемых в процессе криоконсервирования.

Цель исследования – оценить *in vitro* особенности влияния изолированного действия растворов с различными значениями pH и осмолярности на клетки КМ животных с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом.

Материалы и методы

Исследования были выполнены на белых беспородных крысах-самцах 5-6-месячного возраста массой 160-180 г.

Объектом исследования был КМ животных с инициированным ЭАЭ, полученный в период клинической манифестации заболевания (21-е сутки). Контролем служил КМ здоровых животных. Факторами модификации состояния миелокариоцитов были выбраны среды с pH 5,0; 6,0; 8,0; 9,0 или растворы хлорида натрия с осмолярностью 100, 150, 200, 600, 1200, 2400 мОсм/кг. Концентрацию водородных ионов измеряли на ионометре ЗВ-74, осмотическое давление среды – на осмометре ОМКА-Щ-01. Костный мозг вымывали из бедренных костей крыс средой 199 с добавлением сыворотки и 2%-го раствора цитрата натрия. Однородную суспензию клеток получали путем 3-кратного пропускания через иглы с уменьшающимися диаметрами. Суспензию КМ с концентрацией 5×10^6 кл/мл центрифугировали в течение 7-8 мин при 1000 об/мин, супернатант удаляли и к осадку добавляли указанные выше

of low-temperature preservation is determined by their initial structural and functional state [14]. The leading factors negatively affecting cells in the process of their cryopreservation are saline and temperature gradients, changing of pH medium, the mechanical effect of ice crystals, etc. It is known that at AID the principle of ligand-receptor interactions between LHPS [3,13] changes in a considerable extent, stipulated by the changing of internal state and characteristics of membrane cell structure. It is quite logic to suppose that the resistance of such cells to the effect of cryopreservation factors will be different from the one of cells of an intact organism. For providing the integrity of donors BM cells with AID it is necessary to work out the specific cryopreservation methods. One of the main stages of this multi-step work is the elucidation of the peculiarities of myelocaryocytes response to the effect of physical and chemical factors realised during cryopreservation.

The aim of investigation is to estimate *in vitro* the peculiarities of the influence of isolated action of solutions with different pH values and osmolarity on the BM cells of animals with an experimental allergic encephalomyelitis.

Materials and methods

The investigations were performed in white mongrel male rats aged 5-6 months of 160-180 g.

The object of investigations was BM of the animals with initiated EAE obtained in the period of the disease clinical manifestation (21 days). BM of healthy animals served as a control. As the factors of modification of myelocaryocyte state there were selected the media with pH 5.0; 6.0; 8.0; 9.0 or sodium chloride solutions with osmolarity of 100, 150, 200, 600, 1200, 2400 mOsm/kg. The concentration of hydrogenous ions was measured with the ЗВ-74 ionometer, the osmotic pressure of the medium with the ОМКА-УК-01 osmometer. Bone marrow was washed out of the rat's femur bones with the medium 199 by adding serum and 2% sodium citrate solution. Homogenous suspension of cells was obtained via 3 times passing through the needles with reducing diameters. BM suspension with concentration of 5×10^6 cells/ml was centrifuged for 7-8 min at 1000rpm, the supernatant was removed and the mentioned above solutions were added to the sediment. After 5-minutes exposure in non-physiological (damaging) media, the BM cells, precipitated by centrifugation were removed into a solution with physiological osmolarity (300 mOsm/kg) or pH 7.2 and after 10-minutes exposure their integrity (staining with 0.2% trypane blue solution), adhesive and phagocytic potential were defound. Adhesive peculiarities of myelocaryocytes were determined by incubating cell suspensions in plastic dishes at 37°C during one hour with a further separation of non-adhered cells [5]. For

растворы. После 5-минутного экспонирования в нефизиологических (повреждающих) средах клетки КМ, осажденные центрифугированием, переносили в раствор с физиологической осмолярностью (300 мОсм/кг) или рН 7,2 и после 10-минутного экспонирования определяли их сохранность (окрашивание 0,2%-м раствором трипанового синего). Адгезивные свойства миелокарицитов устанавливали инкубированием суспензий клеток в пластиковых чашках при температуре 37°C на протяжении часа с дальнейшим отделением неприсоединенных клеток [5]. Для оценки фагоцитарной активности клетки КМ инкубировали с культурой *Staphylococcus aureus* (1 млрд на 1 мл) в течение часа при 37°C в пенициллиновых флаконах со стеклом [5]. Процент фагоцитировавших клеток – фагоцитарный индекс (ФИ) и число захваченных одной клеткой микроорганизмов – фагоцитарное число (ФЧ) определяли при микроскопическом исследовании препаратов, окрашенных по Романовскому-Гимза. Абсолютный показатель фагоцитарной активности миелокарицитов (АПФАМ) представлял собой абсолютное число поглощенных миелокарицитами кокков и определялся по формуле:

$$\text{АПФАМ} = \text{ФИ} \times \text{ФЧ} \times (\text{абсолютное число миелокарицитов} / 1 \text{ мкл суспензии})$$

Полученные экспериментальные данные статистически обрабатывались в электронных таблицах “Microsoft Excel 2000”.

Результаты и обсуждение

Установлено, что клетки КМ животных с АИЗ имели повышенную исходную (при рН 7,2) проницаемость для суправитального красителя (рис.1,а), что подтверждается достоверно меньшим уровнем их сохранности (78±2,68%) по сравнению с показателем клеток здоровых животных (95±2,07%). Необходимо отметить, что при всех выбранных рН сохранность миелокарицитов животных с патологией была достоверно ниже контрольных величин.

Известно, что сдвиги рН буферных растворов обусловлены эвтектическим осаждением кислых или щелочных солевых компонентов раствора при вымораживании воды, причем максимальный сдвиг рН составляет 2,2 [6]. В наших исследованиях при изменении рН в кислую сторону степень изменения сохранности клеток была различной: снижение уровня у больных животных было в пределах 6-8 %, а у интактных – 16-18%. При повышении значения рН до 9,0 количество сохраненных клеток КМ существенно не изменялось в сравнении с рН(7,2) как у интактных животных, так и с ЭАЭ. Снижение сохранности миелокарицитов от разных доноров при изменении ос-

evaluation of phagocyte activity the BM cells were incubated with *Staphylococcus aureus* culture (1 bln per 1ml) during one hour at 37°C in penicillin bottles with glass [5]. The percent age of phagocytosed cells – phagocytic index (PhI), and the number of captured by one cell microorganisms, phagocytic number (PhN) were determined by microscopic investigation of preparations stained by Romanovsky-Giemsa. The absolute index of phagocytic activity of myelocaryocytes (AIPhAM) represented an absolute number of absorbed by myelocaryocytes cocci and was determined by the formula:

$$\text{AIPhAM} = \text{PhI} \times \text{PhN} \times (\text{absolute number of myelocaryocytes} / 1 \mu\text{l of suspension})$$
. The obtained experimental data were statistically processed in “Microsoft Excel 2000” electronic tables.

Results and discussion

It was established that BM cells of the animals with AID had an increased initial (at pH 7.2) permeability for supravital dye (Fig. 1, a) that was confirmed by lower level of their integrity (78±2.68%) in comparison with the indices of cells in healthy animals (95±2.07%). It is necessary to note that at all chosen pH the myelocaryocyte integrity of animals with the pathology was statistically and significantly lower than the control values.

It is known that pH shifts of buffer solutions are stipulated by eutectic precipitation of acid or alkaline saline components of the solution at the water freezing-out, besides, the maximum shift of pH is 2.2 [6]. In our investigations at pH changing towards an acid side the extent of changing in cell integrity was different: the reduction of the level in ill animals was within the limits of 6-8%, and in the intact animals it was 16-18%. At pH increasing upto 9.0 the number of preserved cells of BM were not considerably changed in comparison with pH 7.21 of both intact animals and those with EAE. The reduction of myelocaryocyte integrity from various donors during changing the medium osmolarity (Fig. 1, b) from 300 to 100 mOsm/kg was 10 and 5 % in intact organism with AID, correspondingly. However under cell equilibration in hyperosmolar media the integrity of myelocaryocytes reduced by 14-16% in healthy animals at 600 mOsm/ kg, being kept the same level at 1200 and 2400 mOsm/kg. At the same time, more sharp decrease in the integrity was observed in the animals with EAE: 30% at 2400 mOsm/kg. The BM cells of animals with this pathology are obviously more sensitive to the effect of hyperosmolar solutions in comparison with BM cells of intact animals. It is known that under osmotic influence the cell shape and size change, and at the membrane system level its area shrinks or increases [6]. During cell shrinking the spicule and invaginations of a membrane are formed, where the receptor and ion-transporting macro-

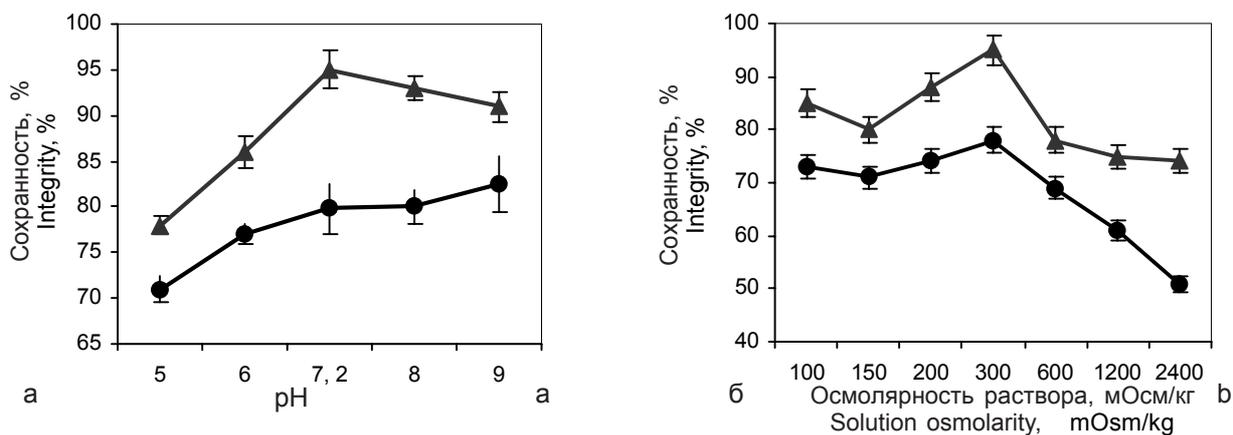


Рис. 1. Уровень сохранности миелокариоцитов крыс после экспонирования в растворах с различными pH (а) и различной осмолярностью (б): ▲ – контроль; ● – ЭАЭ.

Fig. 1. The level of rat's myelocaryocyte integrity after exposure in the solutions with different pH (a) and different osmolarity (b): ▲ – control; ● – EAE.

молярности среды (рис.1,б) от 300 до 100 мОсм/кг составило 10 и 5% в интактном организме и с АИЗ соответственно. Однако при эквilibрации клеток в гиперосмолярных средах сохранность миелокариоцитов снижалась на 14-16% у здоровых животных при 600 мОсм/кг, оставаясь на том же уровне при 1200 и 2400 мОсм/кг. В то же время у животных с ЭАЭ наблюдалось более резкое снижение сохранности – 30% при 2400 мОсм/кг. Очевидно, клетки КМ животных с данной патологией более чувствительны к действию гиперосмолярных растворов по сравнению с клетками КМ интактных животных. Известно, что при осмотическом воздействии изменяются форма и размеры клетки, а на уровне мембранных систем ее площадь сжимается или увеличивается [6]. При сжатии клеток формируются спиккулы и инвагинации мембраны, в которых локализованы рецепторные и ионтранспортирующие макромолекулярные комплексы. В связи с этим функция белков, погруженных внутрь свернутой мембраны, блокируется, что вызывает изменение внутриклеточных органелл и цитоскелета. Потеря клеткой воды может привести к дегидратации клеточных структур, возникновению напряжений на клеточной мембране и к нарушению ее полупроницаемости. При сжатии клеток также возможна потеря мембранных липидов, после чего при регидратации они могут увеличиваться сверх нормального объема и лизироваться.

Детальный анализ состояния организма при АИЗ позволяет говорить о возможных изменениях структурной организации многих его органотканевых структур, в том числе и миелокариоцитов [3, 7, 10]. Выбранные нами методы оценки адгезивной и фагоцитарной активности клеток КМ подтвердили данный факт и позволили охарактеризовать особенности таких изменений. При

molecular complexes are localized. In this connection the function of proteins immersed into invaginated membrane are blocked that causes the changes of intracellular organelles and cytoskeleton. The water loss by a cell can result in the dehydration of cellular structures, appearance of tensions on cell membrane, and in the impairment of semipermeability of cell membrane. At the cell shrinkage the loss of membrane lipids is possible as well as at rehydration their volume can enhance over normal volume and lyse. A detailed analysis of the state of an organism at AID allows to speak about the possible changes in structural organisation of its many organ and tissue structures and myelocaryocytes [3, 7, 10] as well. The chosen by us methods for estimating the adhesive and phagocytic activity of BM cells confirmed this fact and allowed to characterise the peculiarities of this changes. At EAE a relative content of adhesive cells (AC) in a total population of myelocaryocytes was in two times lower in comparison with their content in intact animals (Fig.2, a, b). The expression of adhesion molecules on LHPS cells is under control of cytokin profile of an organism [11] and its every change may result in the transformation of both degree of such expression and the AC number, i.e. our data indirectly confirm the noted in many works fact of cytokin profile changing at AID [4, 11]. Evaluation of adhesion after myelocaryocyte exposure in the solutions with different pH and osmolarity testifies to the increase of adhesive potential of BM cells of intact animals and those with EAE.

The differences (about 10-15%) of AC content in the suspension of donors myelocaryocytes in the compared groups remained at pH shift towards both acid and alkaline side. At the same time it is necessary to note that in both cases an adhesive ability of myelocaryocytes increased in comparison with physiological pH, however at the medium acidification

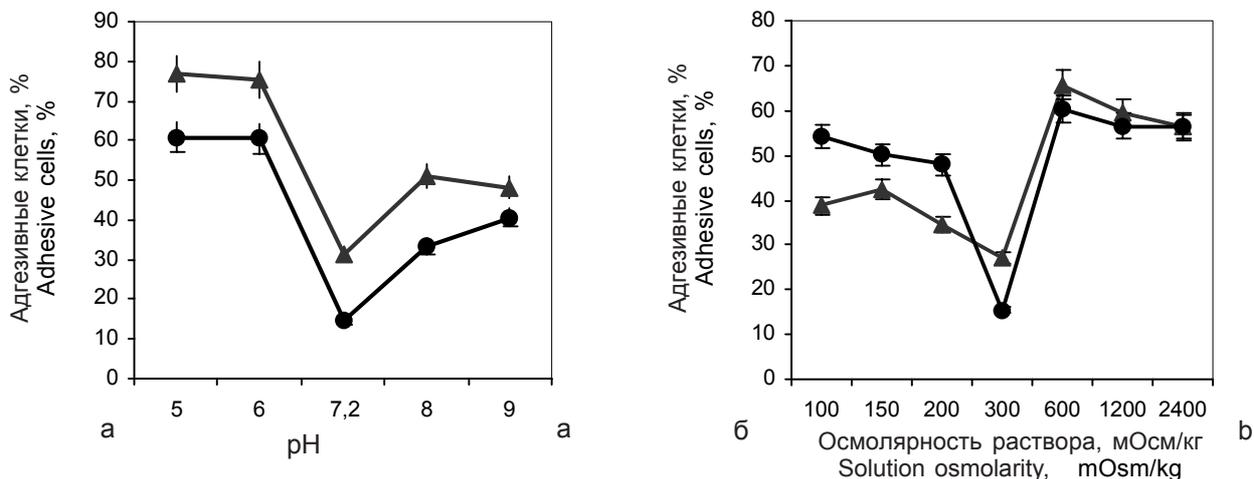


Рис. 2. Содержание АК в суспензии миелокариоцитов здоровых животных и с ЭАЭ после экспонирования в средах с различными значениями pH (а) и осмолярности (б): ▲ – контроль; ● – ЭАЭ.

Fig. 2. AC content in myelocaryocyte suspension of healthy animals and those with EAE after exposure in media with different pH values (a) and osmolarity (b): ▲ – control; ● – EAE.

ЭАЭ относительно содержание адгезивных клеток (АК) в общей популяции миелокариоцитов было в 2 раза меньше по сравнению с их содержанием у интактных животных (рис.2,а,б). Экспрессия молекул адгезии на клетках ЛГПС находится под контролем цитокинового профиля организма [11] и любое его изменение может приводить к трансформации как степени такой экспрессии, так и количества АК, т.е. наши данные косвенно подтверждают отмеченный во многих работах факт изменения цитокинового профиля при АИЗ [4,11]. Оценка адгезии после экспонирования миелокариоцитов в растворах с различными pH и осмолярностью свидетельствует об увеличении адгезивного потенциала клеток КМ интактных животных и с ЭАЭ.

Различия (примерно в 10-15%) содержания АК в суспензии миелокариоцитов доноров сравниваемых групп сохранялись при сдвиге pH как в кислую, так и в щелочную сторону. При этом необходимо отметить, что в обоих случаях адгезивная способность миелокариоцитов повышалась по сравнению с физиологическим pH, однако при закислении среды в 1,5-2,0 раза сильнее. Известно, что инкубация клеток при кислых значениях pH может приводить к изменению трансмембранных потенциалов клеток, нарушению плотности упаковки липидов, формированию поперечных сшивок трансмембранных белков при окислении их SH- групп и уменьшению микровязкости внутриклеточных белков [6]. Таким образом, данные изменения могут быть причиной модификации конформационной организации мембраны с экспансией “скрытых” молекул адгезии и приобретением клетками новых адгезивных свойств. В общем это не противоречит и тому, что вкладывается в понятие „стресс-

it was in 1.5-2.0 higher. It is known that the cell incubation at the acidic pH values can result in the changes of transmembrane potentials of cells, impairment of density of lipid packing, the formation of cross-linking of transemembrane proteins at oxidation of their SH-groups and reduction of microviscosity of intracellular proteins [6]. Thus, these changes may be the cause of modification of conformational membrane organization with the expansion of adhesion molecules and gaining by cells of new adhesive characteristics. Generally it does not contradict to that is meant as the “stress-induced expansion of adhesion molecules” notion [1], taking into account that the cell exposure in non-physiological media is the stress factor for them. The results of myelocaryocyte treatment by the solutions with a different tonicity confirm this as well. Under physiological conditions the percentage of myelocaryocyte AC of the animals with a pathology was lower by 13% in comparison with the control. At the exposure of animal BM cells of both groups in hyperconcentrated solutions there was observed a sharp increase of AC percentage, starting from 600 mOsm/kg. At the same time when varying the osmolarity towards hypotonic side there were observed the statistical and true differences of changing in this index between the compared groups, although the orientation of changes was kept. The maximum of AC content in myelocaryocytes of intact animals was recorded at their exposure in the solution with 150 and at the pathology with 100mOsm/kg. According to this test for myelocaryocytes from healthy donors and those AID in a greater extent the hyperosmolar media and those with acidic pH are the “stressor “ones.

When estimating the morphological composition of AC fraction of bone marrow of the animals with EAE (Fig.3) it was shown that both at acidation and

синдуцированная экспансия молекул адгезии“[1], учитывая, что экспонирование клеток в нефизиологических средах является для них стрессорным фактором. Подтверждают это и результаты обработки миелокариоцитов растворами с различной тоничностью. В физиологических условиях процент АК миелокариоцитов животных с патологией был ниже на 13% по сравнению с контролем. При экспозиции клеток КМ животных обеих групп в гиперконцентрированных растворах наблюдалось резкое повышение процента АК, начиная с 600 мОсм/кг. В то же время при варьировании осмолярностью в сторону гипотонии отмечались достоверные различия изменения данного показателя между сравниваемыми группами, хотя направленность изменений сохранялась. Максимум содержания АК в миелокариоцитах интактных животных был зафиксирован при их экспонировании в растворе со 150, а при патологии – со 100 мОсм/кг. Судя по данному тесту, для миелокариоцитов от здоровых доноров и с АИЗ в большей степени “стрессорными” являются гиперосмолярные среды и с кислыми рН.

При оценке морфологического состава фракции АК костного мозга животных с ЭАЭ (рис.3) показано, что как при закислении, так и защелачивании среды содержание лимфоцитов увеличивается, а гранулоцитов и бластов уменьшается. Данное перераспределение субпопуляционного

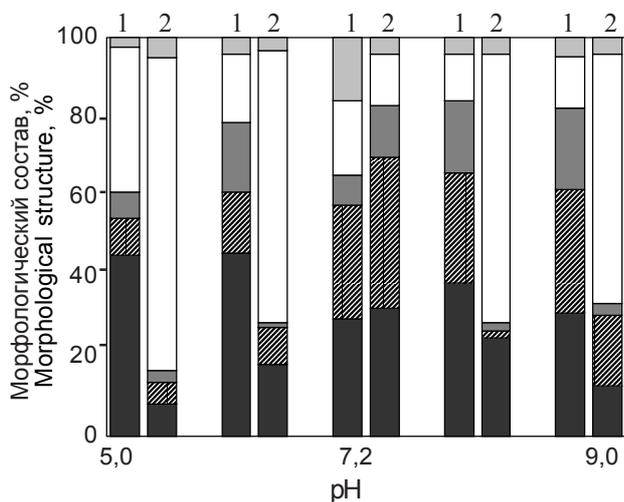


Рис. 3. Морфологический состав адгезивных клеток КМ интактных животных (1) и с ЭАЭ (2) после экспонирования в средах с различным рН: ■ – бласты; ▨ – гранулоциты; ▩ – моноциты; □ – лимфоциты; ▧ – макрофаги.

Fig.3. Morphological composition of BM adhesive cells of intact animals (1) and with AEA (2) after exposure in media with different pH: ■ – blasts; ▨ – granulocytes; ▩ – monocytes; □ – lymphocytes; ▧ – macrophages.

alkalization of the medium the content of lymphocytes increased but it decreased for granulocytes and blasts. This redistribution of the AC subpopulation composition occurs at the background of stable quantitative content of myelokaryocytes and consequently there is an increase or decrease of absolute content of the indicated cells. After BM exposure of the animals with EAE in hyperosmolar solutions (Fig.4) there were kept at a high level the adhesive properties of lymphocytes and in hypoosmolar solutions there was an increase in adhesive capability of blasts, macrophages.

When affecting the cells by the solutions with pH equal to 8 and 9; as well as by the solutions with osmolarity of 200 and 600 mOsm/kg, no structural changes (vacuolisation of nuclei, cytoplasm) were observed. The most distinct damages of myelokaryocytes after equilibration in hyperosmolar and acid media were manifested as morphological abnormalities in adhering cells in the form of fragmentation and pyknosis of nuclei, basophilic punctuation and vacuolisation of cytoplasm, cytosol release out of a cell with following condensation on a membrane of conglomerates with different size.

The functional potential of phagocytic cells depends on the series of parameters, including the presence of adhesion molecules on their membrane [8]. Thus, no wonder is the established by us the fact that when determining the phagocytic capability of BM cells of animals with AEA, the PhI and PhN changed in a considerable extent. (Table 1 and 2). So PhI decreased

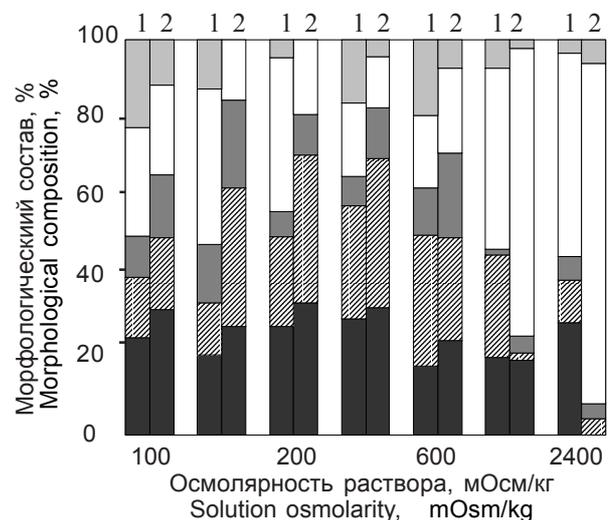


Рис. 4. Морфологический состав клеток КМ интактных животных (1) и с ЭАЭ (2) после экспозиции в растворе хлорида натрия различной концентрации: ■ – бласты; ▨ – гранулоциты; ▩ – моноциты; □ – лимфоциты; ▧ – макрофаги.

Fig. 4. Morphological composition of BM cells of intact animals (1) and with EAE (2) after exposure in sodium chloride solution of different concentration: ■ – blasts; ▨ – granulocytes; ▩ – monocytes; □ – lymphocytes; ▧ – macrophages.

состава АК происходит на фоне стабильного количественного содержания миелокариоцитов и, следовательно, имеет место увеличение или уменьшение абсолютного содержания указанных клеток. После экспонирования КМ животных с ЭАЭ в гипертонических растворах (рис.4) сохранялись на высоком уровне адгезивные свойства лимфоцитов, а в гипотонических растворах повышалась адгезивная способность бластов, макрофагов.

При воздействии на клетки растворов с рН, равной 8 и 9, а также растворов осмолярностью 200 и 600 мОсм/кг структурных изменений (вакуализации ядер, цитоплазмы) не наблюдалось. Наиболее отчетливо повреждение миелокариоцитов после эквilibрации в гипертонических и кислых средах проявлялись в морфологических аномалиях адгезирующих клеток в виде фрагментации и пикноза ядер, базофильной пунктуации и вакуолизации цитоплазмы, выхода цитозоля из клетки с последующей конденсацией на мембране конгломератов разной величины.

Функциональный потенциал фагоцитирующих клеток зависит от ряда параметров, включая наличие молекул адгезии на их мембране [8]. Поэтому неудивительным является установленный нами факт, что при определении фагоцитарной способности клеток КМ животных с ЭАЭ существенно изменялись ФИ и ФЧ (табл. 1 и 2). Так, ФИ снижался на 40%, а поглощающая активность каждой клетки (ФЧ) – на 5% по сравнению с контролем, что может свидетельствовать как о присутствии в КМ больных

by 40%, and an absorbing activity of each cell (PhN)- by 5% in comparison with the control that can testify both to the presence in BM of ill animals of immature forms of phagocytes and to the change in their functional potential under conditions of damaged cytokine profile of an organism at AID [4] as well. When varying pH and osmolarity of medium the PhI of the animals with AEA, being lower than the

Таблица 1. Фагоцитарная активность клеток КМ интактных животных и животных с АИЗ после экспонирования в растворах с различным рН

Table 1. Phagocytic activity of BM cells of intact animals and with AID after exposure in solutions with different pH

рН раствора PH of solution	Контроль Control			ЭАЭ EAE		
	ФИ PhI	ФЧ PhN	АПАМ, 10 ⁷ AIPhAM, 10 ⁷	ФИ PhI	ФЧ PhN	АПАМ, 10 ⁷ AIPhAM, 10 ⁷
5,0	57,81±3,27	10,12±0,32 ²	37,44±0,32 ²	19,84±2,28 ^{1,2}	12,02±0,41 ²	10,02±0,45 ^{1,2}
6,0	55,43±2,71	9,23±0,44	32,52±0,16	20,51±3,66 ^{1,2}	8,50±0,27 ²	7,32±0,36 ^{1,2}
7,2	52,52±2,81	9,16±0,56	30,31±0,25	12,75±1,37 ¹	4,21±0,30 ¹	2,31±0,10 ¹
8,0	48,75±3,03	8,31±0,38	25,92±0,20 ²	18,00±2,53 ^{1,2}	7,64±0,32 ²	5,77±0,36 ^{1,2}
9,0	46,25±2,42	8,27±0,29	24,47±0,13 ²	19,35±2,87 ^{1,2}	7,07±0,35 ²	5,74±0,28 ^{1,2}

Примечания: 1 – различия статистически достоверны (p<0,05) по сравнению с интактом; 2 – различия статистически достоверны (p<0,05) по сравнению с физиологическими условиями.

Notes: 1 – the differences are statistically true (p < 0.05) in comparison with the intact; 2 – the differences are true (p < 0.05) in comparison with physiological conditions.

Таблица 2. Фагоцитарная активность клеток КМ интактных животных и животных с АИЗ после экспонирования в растворах NaCl различной осмолярности

Table 2. Phagocytic activity of BM cells of intact animals and with AID after exposure in NaCl solutions of different osmolarity

Осмолярность раствора, мОсм/кг Osmolarity of solution mOsm/kg	Контроль Control			ЭАЭ EAE		
	ФИ PhI	ФЧ PhN	АПАМ, 10 ⁷ AIPhAM, 10 ⁷	ФИ PhI	ФЧ PhN	АПАМ, 10 ⁷ AIPhAM, 10 ⁷
100	59,00±3,95	7,14±0,53 ²	26,96±0,87 ²	15,43±1,81 ^{1,2}	2,14±0,29 ^{1,2}	1,42±0,09 ^{1,2}
150	50,42±3,78	7,52±0,53 ²	24,26±0,45 ²	13,78±1,681	3,07±0,31 ¹	1,81±0,06 ¹
200	52,54±3,45	6,20±0,62 ²	20,17±0,20 ²	17,33±2,04 ^{1,2}	3,52±0,08 ¹	2,62±0,12 ¹
300	52,52±2,81	9,16±0,56	30,31±0,25	12,75±1,37 ¹	4,21±0,30 ¹	2,31±0,10 ¹
600	50,82±2,98	7,02±0,36 ²	22,83±0,07 ²	15,07±1,96 ¹	2,44±0,16 ^{1,2}	1,58±0,07 ¹
1200	50,58±3,67	5,16±0,36 ²	16,70±0,12 ²	15,63±1,63 ¹	2,32±0,24 ^{1,2}	1,56±0,02 ^{1,2}
2400	46,18±2,76	5,02±0,35 ²	14,84±0,23 ²	12,96±1,72 ¹	3,12±0,19 ¹	1,34±0,03 ^{1,2}

Примечания: 1 – различия статистически достоверны (p<0,05) по сравнению с интактом; 2 – различия статистически достоверны (p<0,05) по сравнению с физиологическими условиями.

Notes: 1 – the differences are statistically true (p<0.05) in comparison with the intact; 2 – the differences are statistically true (p<0.05) in comparison with physiological conditions.

животных незрелых форм фагоцитов, так и изменении их функционального потенциала в условиях нарушенного цитокинового профиля организма при АИЗ [4]. При варьировании рН и осмолярностью среды ФИ животных с ЭАЭ, будучи ниже контроля, достоверно не изменялся. Уменьшение ФЧ у животных с патологией наблюдалось при осмолярностях 100, 200, 1200, 2400 мОсм/кг. При защелачивании и закислении среды ФЧ миелокариоцитов больных животных увеличивалось по сравнению с физиологическими условиями, но при этом оставалось ниже контроля.

Анализ динамики изменения АПФАМ у интактных животных показывает, что он имеет тенденцию к уменьшению при эквilibрации клеток как в гипоосмолярных, так и гиперосмолярных растворах в 1,2 и 2 раза соответственно. Для клеток животных с патологией характерно уменьшение АПФАМ при эквilibрации их с гиперосмолярными растворами в 1,7 раза, а с гипоосмолярными – увеличение в 1,3 раза. При воздействии сред с различным рН АПФАМ клеток КМ животных с ЭАЭ существенно возрос при сдвиге рН как в кислую, так и щелочную сторону, очевидно, за счет возрастания фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа.

Выводы

Оцененная в условиях физиологических рН и осмолярности по ряду параметров структурно-функциональная организация миелокариоцитов животных с ЭАЭ отличается от таковой интактных животных.

Установлены принципиальные различия изменения структурно-функциональной организации миелокариоцитов интактных животных и с АИЗ после действия физико-химических факторов, реализуемых в процессе криоконсервирования (рН и осмолярности)

Полученные данные ориентируют на возможность модификации (оптимизации) условий эквilibрации КМ доноров с указанной патологией на этапе его предварительной подготовки к криоконсервированию.

Литература

1. Богдашин И.В., Дыгай А.М., Шерстобоев Е.Ю. и др. Роль тимуса в регуляции синтеза цитокинов клетками костного мозга при стрессе // Иммунология.– 1991.– №5.– С. 30-32.
2. Гольцев А.Н. Возможные причины развития аутоиммунной патологии и поиск путей ее лечения // Сучасні проблеми медицини та освіти.– 1999.– №1.– С. 46-52.
3. Гольцев А.Н., Козлова Ю.А., Останков М.В. Аутоиммунная патология как предрасполагающий фактор

control did not statistically and significantly change. The decrease in PhN of the animals with a pathology was observed at the osmolarity as follows: 100, 200, 1200, 2400 mOsm/kg. During the medium alkalinisation and acidation the myelokaryocytes PhN of ill animals increased in comparison with the physiological conditions, but at the same time it remained lower than the control.

The analysis of the dynamics of AIPhAM change in intact animals shows that it has the tendency to a decrease at the cell equilibration both in hypo- and hyperosmolar solutions in 1.2 and 2 times correspondingly. For the cells of animals with a pathology the AIPhAM decrease is typical at their equilibration with hyperosmolar solutions in 1.7 times and for hypoosmolar ones, this is an increase in 1.3 times. Under the media effect with different pH, AIPhAM of BM cells of animals with EAE considerably increased at pH shift both towards acidic and alkaline side obviously due to an increase in phagocytic index and phagocytic number.

Conclusions

The estimated under conditions of physiological pH and osmolarity with the series of parameters, the structural and functional organisation of myelokaryocytes of animals with EAE differs from that of intact animals.

There were established the fundamental differences of a change in structural and functional organisation of myelokaryocytes of intact animals and those with AID after the effect of physical and chemical factors, realised during cryopreservation process (pH and osmolarity).

The data obtained point to the possibility of modifying (optimising) the equilibration conditions of BM of the donors with indicated pathology at the stage of its preliminary preparing for freezing.

References

1. Bogdashin I.V., Dygaj A.M., Sherstoboev E.Yu. et al. The role of thymus in regulation of cytokine synthesis by bone marrow cells at stress // Immunologia.– 1991.– №5.– P. 30-32.
2. Goltsev A.N. Possible causes of the development of autoimmune pathology and search for ways of its treatment // Suchasni problemy medytyny ta osvity.– 1999.– №1.– P.46-52.
3. Goltsev A.N., Kozlova Yu.A. Autoimmune Pathology as Predisposing Factor of the Change in Cryosensitivity of Lymphohemopoietic Complex Cells // Problems of Cryobiology.– 2003.– №3.– P. 62-70.
4. Demina T.L., Gusev E.I. Boiko A.N. Cytokines in immunopathogenesis of multiple sclerosis // Journal of neuropathology and the psychiatry.– 1997.– Vol. 97, №5.– P. 68-73.
5. *Lymphocytes: Methods.* Translated from English. / Edited by G. Klaus.– Moscow: Mir,– 1990.– 396 p.

- изменения криочувствительности клеток лимфо-гемопоэтической системы // Пробл. криобиологии.– 2003.– №3.– С. 62-70.
4. Демина Т.Л., Гусев Е.И., Бойко А.Н. Цитокины в иммунопатогенезе рассеянного склероза // Журн. невропатол. и психиатрии.– 1997.– Т. 97.– №5.– С. 68-73.
 5. Лимфоциты: Методы. Пер. с англ./ Под ред. Дж. Клауса.– М.: Мир.– 1990.– 396 с.
 6. Луговой В.И. Механизмы повреждающего действия замораживания на растворимые и мембраносвязанные ферменты: Автореф. дис... докт. биол. наук.– Харьков, 1985.– 38 с.
 7. Минеев В.Н., Иванова В.В., Нестерович И.И. Костный мозг и эффекторные клетки воспаления при аллергии// Аллергология.– 2000.– №2.– С. 13-15.
 8. Нестерова И.В., Колесникова Н.В. Цитокиновая регуляция и функционирующая система нейтрофильных гранулоцитов // Гематология и трансфузиология.– 1999.– Т.44.– №2.– С. 43-47.
 9. Attarian H., Feng Z., Buckner C.D. Long-term cryopreservation of bone marrow for autologous transplantation // Bone Marrow Transplant.– 1996.– Vol.17.– №3.– P. 425-430.
 10. Burt R.K., Fassas A., Snowden J.A., et al. Collection of hematopoietic cells from patients with autoimmune diseases// Bone Marrow Transplant.– 2001.– Vol. 28, № 1.– P. 1-12.
 11. Cannella B, Raine C. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions// Ann Neurol.– 1995.– Vol. 37, №4.– P. 424-435.
 12. Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Ostankova L.V. et al. Usage of different cryopreservation regimens as a proof of the role of cells of monocytic-phagocytic system in modulation of myelotransplant's GVHR-activity. Society for Cryobiology. 38th Annual Meeting. Program and Abstract, 2001.– P. 158.
 13. Kawamura M., Hisha H., Lia Y., Fukuhara S., Ikehara S. Distinct Qualitative Differences between Normal and Abnormal Hemopoietic Stem Cells *In Vivo* and *In Vitro* // Stem cells.– 1997.– Vol. 15, №1.– P. 56-62.
 14. Zaheer H.A., Gibson F.M., Bagnara M. Differential sensitivity to cryopreservation of clonogenic progenitor cells and stromal precursors from leukemic and normal bone marrow // Stem Cells.– 1994.– Vol. 12, № 2.– P. 180-186.
 6. Lugovoj V.I. Mechanisms of damaging effect of freezing on soluble and membrane-bound enzymes: Author's abstract of thesis for obtaining of doctor's degree of biological sciences// Kharkov, 1985. – 38p.
 7. Mineev V.N., Ivanova V.V., Nesterovich I.I. Bone marrow and effector cells of inflammation at allergy // Allergologiya.– 2000.– №2.– P. 13-15.
 8. Nesterova I.V., Kolesnikova N.V. Cytokine regulation and functioning system of neutrophilic granulocytes // Gematol. i transf.–1999.– Vol. 44.– №2.– P. 43-47.
 9. Attarian H, Feng Z, Buckner C.D. Long-term cryopreservation of bone marrow for autologous transplantation // Bone Marrow Transplant.– 1996.– Vol.17, №3.– P. 425-430
 10. Burt R.K., Fassas A., Snowden J.A. et al. Collection of hematopoietic cells from patients with autoimmune diseases// Bone Marrow Transplantation.– 2001.– Vol. 28.– №1.– P. 1-12.
 11. Cannella B., Raine C. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions //Ann Neurol.– 1995.– Vol.37, №4.– P. 424-435.
 12. Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Ostankova L.V. et al. Usage of different cryopreservation regimens as a proof of the role of cells of monocytic-phagocytic system in modulation of myelotransplant's GVHR-activity. Society for Cryobiology // 38th Annual Meeting. Program and Abstract, 2001.– P. 158.
 13. Kawamura M., Hisha H., Lia Y. Et al. Distinct Qualitative Differences between Normal and Abnormal Hemopoietic Stem Cells *In Vivo* and *In Vitro* // Stem cells.– 1997.– Vol.15, №1.– P. 56-62.
 14. Zaheer H.A., Gibson F.M., Bagnara M. Differential sensitivity to cryopreservation of clonogenic progenitor cells and stromal precursors from leukemic and normal bone marrow // Stem Cells.– 1994.– Vol. 12, №2.– P. 180-186.

Accepted in 21.10.2003.

Поступила 21.10.2003