

## Модификация структурно-функциональной организации стволовых кроветворных клеток костного мозга после действия факторов низкотемпературного консервирования

А.Н. ГОЛЬЦЕВ, Т.Г. ДУБРАВА, Н.Н. БАБЕНКО, Л.В. ОСТАНКОВА, И.Ю. МАЦЕВИТАЯ, О.М. ШАТНЕВА  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Давно известен тот факт, что после выхода из состояния глубокого холодового анабиоза сохраняемые стволовые кроветворные клетки (СКК) изменяют скорость пролиферации и направленность дифференцировки, что отражается на качественных характеристиках защитного потенциала гемопоэтической ткани [2, 3, 4]. Однако причины нарушений динамики восстановления гемопоэза у реципиентов криоконсервированного костного мозга (КМ) остаются до конца невыясненными. Снижение количественного содержания СКК в криоконсервированном миелотрансплантате за счет их гибели не может быть основной причиной таких изменений, так как повышение дозы вводимых миелокариоцитов с целью компенсации погибших кроветворных предшественников (КОЕс) лишь незначительно изменяло динамику этого процесса [6]. Вероятным является изменение структурно-функциональной организации СКК за счет нарушения течения внутриклеточных процессов под действием факторов криоконсервирования. Очевидно, например, что немаловажное значение в реализации терапевтического эффекта миелотрансплантата имеет своевременное расселение (хоминг) кроветворных предшественников, координируемое рецепторными структурами их клеточной мембраны, которые могут изменяться в процессе криоконсервирования в результате сегрегации, агрегации либо схождения (шеддинг) компонентов плазматической мембраны [9, 12]. В этой связи, своевременное восстановление способности криоконсервированных СКК взаимодействовать с микроокружением и воспринимать его регуляторные сигналы будет зависеть от активности течения метаболических процессов в клетках, обеспечивающих наработку вновь формируемых мембранных структур.

Цель исследования – провести сравнительную аттестацию состояния кроветворных предшественников КМ по некоторым структурным и функциональным характеристикам до и после криоконсервирования, на основании полученных результатов и теоретических предпосылок смоделировать возможные варианты изменения внутреннего состояния, а также феноменологии поведения СКК после действия факторов криоконсервирования.

*Адрес для корреспонденции:* Гольцев А.Н., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-57-89, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

### Материалы и методы

Эксперименты проведены на мышах СВА 8–10-недельного возраста, содержащихся в условиях вивария ИПКиК НАН Украины. Все манипуляции с животными выполнены согласно принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных (Страсбург, 1985 г.). Криоконсервирование КМ проводили под защитой криопротектора ДМСО в конечной концентрации 10% со скоростью замораживания 1 град/мин до  $-20^{\circ}\text{C}$  с последующим погружением в жидкий азот в полиэтиленовых криоконтейнерах (“Nunc”), объемом 1 мл на программном замораживателе “Cryoson” (Германия) по стандартной методике. Отогрев суспензии проводили на водяной бане при температуре  $38-40^{\circ}\text{C}$  в течение 40–50 с.

Определение содержания КОЕс в донорском КМ до и после криоконсервирования проводили на 8–14 сутки после трансплантации нативных или криоконсервированных сингенных миелокариоцитов летально облученным реципиентам по стандартной методике [13].

В качестве тестируемых характеристик были выбраны: “хоминг” и пролиферативный потенциал нативных и криоконсервированных СКК [4]. Кратко: первичным реципиентам, облученным в летальной дозе, трансплантировали  $5 \times 10^6$  ядерных клеток сингенного нативного или криоконсервированного КМ. Для определения абсолютного количества (динамики накопления) КОЕс в селезенке и КМ первичных реципиентов на различных этапах после трансплантации нативного или криоконсервированного КМ (от 2-х часов до 100 суток),  $1 \times 10^5$  клеток исследуемых органов вводили вторичным летально облученным реципиентам, в селезенке которых на 10 сутки после трансплантации определяли содержание колоний.

Проведена идентификация и оценка состояния Thy-1,2 антигена на КОЕс, формирующих колонии на 10 сутки. Для этих целей использовали пеннинг-метод для иммунологической селекции из костного мозга кроветворных предшественников моноклональными антителами (МАТ) к антигену Thy-1,2. В экспериментах был использован прямой пеннинг-метод [8], основанный на способности антител “прилипать” к пластику и затем сорбировать из суспензии клетки, несущие данный тип антигена.

С помощью метода модуляции антигена Thy-1,2 [5] определена также динамика синтеза Thy-

1,2 антигена на СКК по его экспрессии *de novo*. Принцип метода заключается в схождении антигена с мембраны СКК после формирования комплекса Thy-1,2 антиген + антимышинные МАТ к Thy-1,2 антигену + антимышинные иммуноглобулины. Антиген-модулированные (до криоконсервирования) нативные или криоконсервированные миелокарициты, то есть утратившие антиген Thy-1,2, вводили внутривенно летально облученным сингенным реципиентам в определенной дозе. Через 2–60 часов из селезенки первичных реципиентов готовили суспензию, которую обрабатывали антителами к антигену Thy-1,2 и комплементом (комплементзависимый цитотоксический тест), после чего определенное количество ядросодержащих клеток вводили вторичным облученным реципиентам, в селезенках которых на 10 сутки определяли гемопоэтические колонии. По разнице в их содержании в опыте и контроле (клетки, обработанные нормальной мышинной сывороткой) судили о процентном содержании КОЕс, экспрессирующих (наработавших) антиген Thy-1,2 после антигенной модуляции.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия Стьюдента.

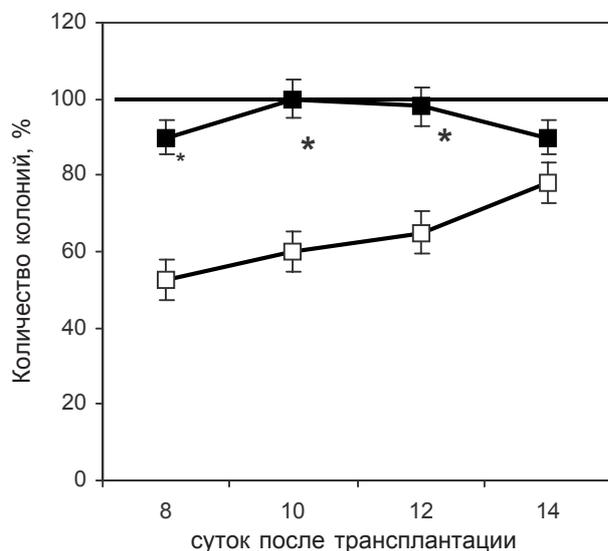
### Результаты и обсуждение

Одним из важных свойств СКК, от сохранности которого зависит эффективность миелотрансплантации при лечении гемо- и иммунодепрессий, яв-

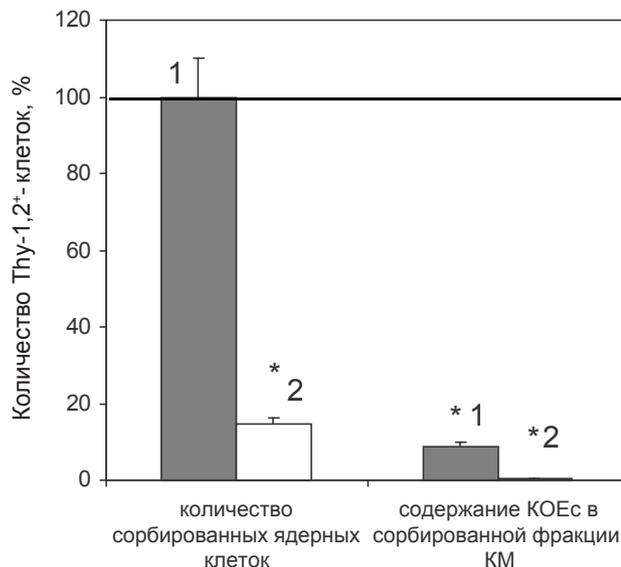
ляется способность распознавать и расселяться в родственном кроветворном микроокружении.

Установлено, что в процессе криоконсервирования КМ часть КОЕс (около 15-20%) погибает, при этом сохранившиеся кроветворные предшественники с “опозданием” формируют колонии, в результате чего их число с 8-е по 14-е сутки постепенно увеличивается (рис. 1). Отмечено также, что у части кроветворных клеток временно снижается способность распознавать кроветворное микроокружение и расселяться в нем, а уже расселившиеся СКК с опозданием вступают в пролиферацию.

Восстановление способности криоконсервированных кроветворных предшественников взаимодействовать с микроокружением и воспринимать его регуляторные сигналы будет зависеть от активности течения метаболических процессов в клетках, и следовательно, “наработки” вновь формируемых мембранных структур. На примере экспрессируемого на некоторых клетках КМ (включая СКК) антигена Thy-1,2 была проведена оценка “сохранности” рецепторного репертуара на мембране этих клеток после криоконсервирования КМ. Установлено, что около 85% Thy-1,2<sup>+</sup> клеток КМ после криоконсервирования теряли этот маркер, то есть концентрация их в КМ снижалась в 6-7 раз (рис. 2). При оценке колониеобразующей способности сорбированных на Thy-1,2 МАТ клеток оказалось, что в нативной фракции концентрация СКК составляла около 9%, а в криоконсервированной – всего 0,5%, то есть в 17 раз меньше. Из этого



**Рис. 1.** Динамика накопления гемопоэтических колоний (КОЕс) в селезенке летально облученных мышей после трансплантации нативного (■) и криоконсервированного (□) костного мозга  $1 \times 10^5$  клеток/мышь. За 100% принято максимальное количество колоний (18,3), сформированных нативными СКК на 10-е сутки; \* –  $P < 0,05$  по сравнению с группой с введением нативного материала.



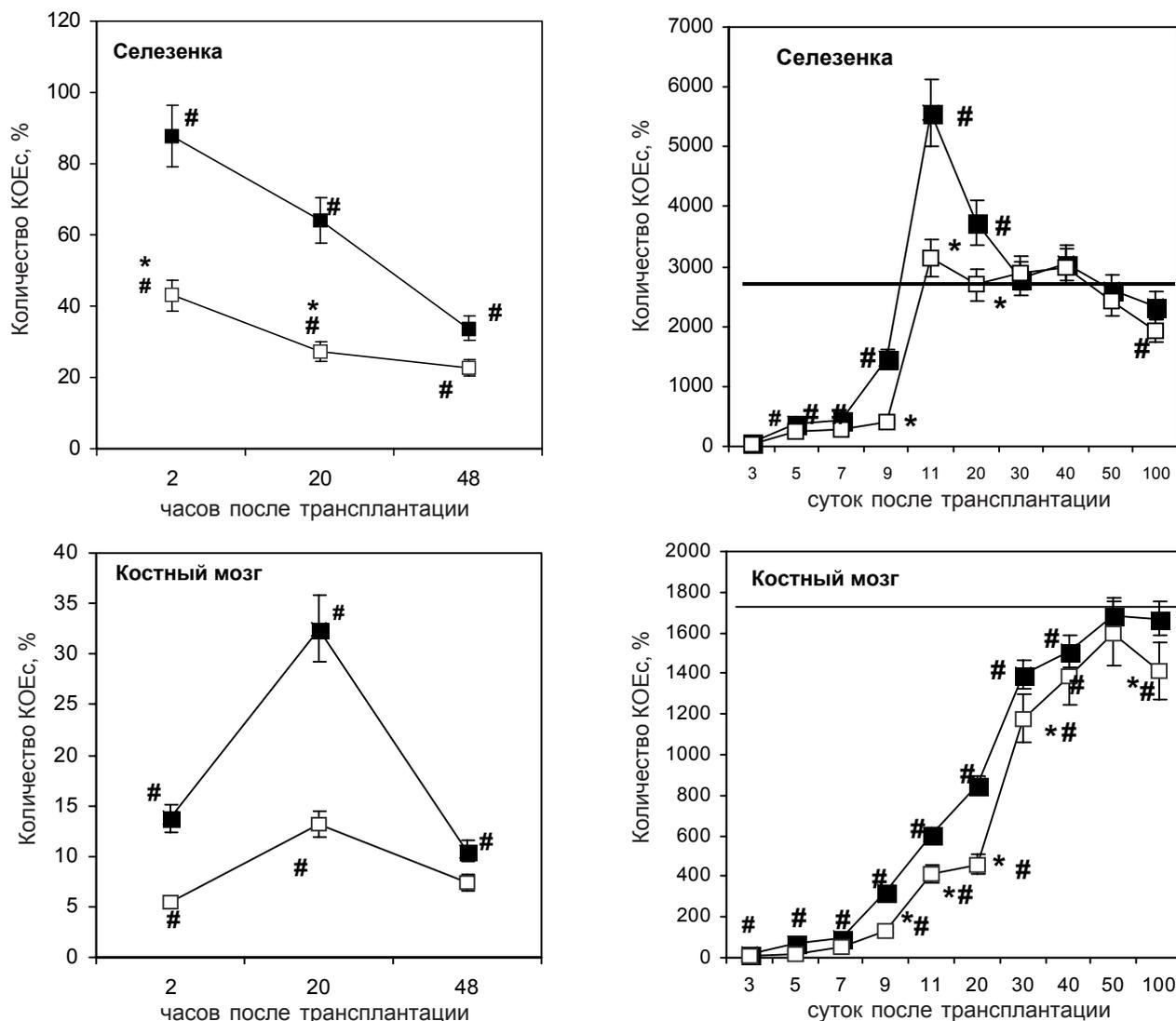
**Рис. 2.** Количество сорбированных пеннинг-методом ядерных клеток на моноклональных антителах (МАТ) к антигену Thy-1,2 и содержание КОЕс в нативном (1) и криоконсервированном (2) костном мозге. Количество сорбированных нативных ядросодержащих клеток составило  $1,5 \pm 0,1\%$  и было принято в дальнейшем за 100%.

следует, что, во-первых, действительно после криоконсервирования КМ определенная часть его Thy-1,2<sup>+</sup> клеток теряет этот антиген. Во-вторых, сопоставляя степень потери этой мембранной структуры на всей популяции Thy-1,2<sup>+</sup> клеток и на СКК, становится очевидным, что на СКК она выражена значительно сильнее (в 2,5 раза).

Учитывая значимость мембранных структур в проявлении функционального потенциала СКК была проведена оценка динамики синтеза Thy-1,2-антигена на этих клетках после его антигенной модуляции. Отмечено, что в криоконсервированных СКК имеет место запаздывание начала экспрессии (синтеза) Thy-1,2-антигена на их мембране как минимум на 24–30 часов.

Учитывая данную феноменологию поведения клеток после криоконсервирования, возникает

вопрос: будет ли изменяться их хоминг и пролиферативная активность после расселения в кровяном микроокружении? Полученные данные по сравнительному изучению динамики расселения нативных и криоконсервированных КОЕс в КМ и селезенке летально облученных сингенных реципиентов свидетельствуют о том, что темп расселения КОЕс в этих компартаментах существенно отличается в зависимости как от места расселения, так и вида трансплантата. Так, в ранний посттрансплантационный период (2–48 часов) в селезенке летально облученных реципиентов отмечено снижение количества расселившихся КОЕс, причем у мышей с криоконсервированным миело-трансплантатом расселялось в среднем в 2 раза меньше КОЕс, чем с нативным (рис. 3). В костном мозге отмечено накопление количества осевших



**Рис. 3.** Динамика накопления КОЕс в селезенке и костном мозге мышей-реципиентов после введения нативного (■) и криоконсервированного (□) материала. Количественное содержание КОЕс в селезенке животных контрольной группы составило  $2765 \pm 342$ ; количественное содержание КОЕс костном мозге (бедро) животных контрольной группы составило  $1735 \pm 206$  ( $n=7$ ). \* –  $P < 0,05$  по сравнению с группой с введением нативного материала; # –  $P < 0,05$  по сравнению с группой контрольных животных.

КОЕс с пиком к 20-му часу с последующим снижением к 48-му, причем количество КОЕс у реципиентов криоконсервированного материала было существенно ниже, чем нативного.

Такая специфика динамики формирования колоний криоконсервированным костным мозгом может быть связана с изменением состояния рецепторного репертуара СКК [7]. Кроме того, особенности расселения СКК в различных компартментах организма, по-видимому, объясняются характером микроокружения органов, особенностями путей проникновения в них КОЕс, а также временным изменением состояния популяции КОЕс в костном мозге в условиях повышенного выброса глюкокортикоидов при стрессе [1].

В дальнейшем период активного “насыщения” селезенки КОЕс был отмечен с 3 по 20 сутки, а костного мозга – с 5 по 50 сутки наблюдения. При этом, темп изменения содержания КОЕс в селезенке реципиентов с введением нативного миело-трансплантата имел волнообразный характер со снижением определяемого показателя к 7-м суткам, и максимальным увеличением к 11-м суткам. В этот период в селезенке наступала фаза “овершута”. При введении криоконсервированного материала начало интенсивного накопления содержания КОЕс сдвигалось к 9 суткам в отличие от нативного (7 сутки), достигая фазы “овершута” также к 11-м суткам. В дальнейшем темп накопления нативных и криоконсервированных КОЕс в селезенке снижался, приближаясь к норме к 30-м суткам, и оставался на таком уровне без достоверных изменений во все последующие сроки наблюдения.

В костном мозге отмечена иная картина: содержание КОЕс обеих исследуемых групп равномерно возрастало с 5-х и до 20-х суток наблюдения, причем во все сроки количество криоконсервированных КОЕс было достоверно ниже, чем нативных.

Отмеченные выше функциональные изменения СКК после криоконсервирования могут быть следствием модификации гликокаликса мембраны, что приводит к искажению сигнальной трансдукции. Кроме того, причинами неадекватного поведения криоконсервированных СКК возможно являются повреждения мембран, выход лизосомальных ферментов, образование супероксид-радикалов и т.д., вызванные действием таких физико-химических факторов криоконсервирования как изменение солевого градиента, pH среды, вязкости цитоплазмы. Нельзя забывать и о сугубо “механических” повреждениях, обусловленных кристаллообразованием. Кроме того, возможным механизмом изменения функциональной активности криоконсервированных СКК является существенная модуляция интенсивности проте-

кания процессов сигнализации, характеризующихся модификацией механизмов фосфорилирования, MAP-киназного, JAK-STAT, RAS/MAPK путей. В этих условиях в роли *locus minoris* могут оказаться ключевые транскрипционные факторы СКК, к которым относятся Gfi-1, GATA-2, ICAROS. Именно они оказывают влияние на функцию расселения, миграции и дальнейшей дифференцировки СКК посредством инициации транскрипции ранних генов, регулирующих запуск поздних [14]. При их непосредственном участии осуществляется наработка широкого спектра молекул-переносчиков, других транскрипционных факторов и, в итоге, полноценного рецепторного аппарата. Кроме того, опосредованно они участвуют в регуляции практически всех метаболических процессов клетки [11].

После криоконсервирования СКК могут происходить изменения и на этапе преобразования сигнала во внутриядерный. Например, нарушения в структуре ключевых транскрипционных факторов приводят к невозможности их взаимодействия со своей мишенью – ДНК. Кроме того, при формировании транскрипционного комплекса структурные нарушения одного из факторов могут привести к отсутствию достаточного количества комплементарных участков для взаимодействия с энхансером, что в свою очередь, снижает уровень транскрипции. В связи с этим стоит заметить, что Gfi-1, присутствующий во всех СКК, ингибирует клеточную пролиферацию в отсутствие необходимого микроокружения (или его восприятия), что является первым регуляторным звеном на стадии дифференцировки СКК [10]. То есть такого рода информация также дает нам основание предположить, что эффект запаздывания накопления СКК в определенные периоды (например, 2-3 и 5-9 сутки) может быть следствием того, что измененный рецепторный аппарат СКК не передает адекватных сигналов о наличии необходимого микроокружения. То есть в данном случае Gfi-1 не выполняет своей функции вследствие структурных изменений транскрипционного аппарата.

## Выводы

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных можно заключить, что криоконсервирование является фактором, оказывающим выраженное влияние на структурно-функциональное состояние СКК. Точкой приложения физико-химических факторов криоконсервирования являются разные этапы каскадного процесса реализации гемопоэтической функции этих клеток: от расселения в микроокружении до формирования колоний. При этом важно, что не все, а только определенная часть СКК подвергается

отрицательному влиянию криоконсервирования. Причем в одних и тех же СКК каждая из функций (расселение, пролиферация, наработка структур гликокаликса) изменяется по-разному в аналогичных условиях криоконсервирования. Данный факт говорит о том, что даже в пределах какого-то определенного компартмента СКК (например, КОЕс-10) имеются различия функционального, а, следовательно, исходного статуса клеток в целом.

То есть подтверждается тезис значимости исходного состояния биообъекта в определении его криолабильности и криостабильности. Другими словами, криоконсервирование в данном случае выступает в роли фактора, селективно действующего не только на разные клеточные структуры, но и на одни и те же, однако, находящиеся на разных этапах реализации своей функциональной активности.

### Литература

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П., Кириенкова Е.В. Об участии глюкокортикоидов в механизмах регуляции процессов пролиферации и дифференцировки различных типов гемопоэтических клеток-предшественников при стрессе // Гематол. и трансфузиол.– 1987.– Т. 32, №6.– С. 47-51.
2. Гольцев А.Н. Влияние факторов криоконсервирования на иммунологические свойства кроветворных клеток костного мозга : Автореф. дис. ... д-ра мед.наук.– Харьков, 1988.– 35 с.
3. Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Цуцаева А.А. Сравнительное изучение криоустойчивости КОЕс и КОЕк, находящихся в различном функциональном состоянии // Криобиология.– 1987, №1.– С. 11-17.
4. Цуцаева А.А., Гольцев А.Н. "Хоминг" и пролиферация кроветворных клеток (КОЕс) криоконсервированного костного мозга в селезенке и костном мозге реципиентов // Криобиология.– 1987.– №4.– С. 9-15.
5. Чертков И.Л., Гуревич О.А. Стволовая клетка и ее микроокружение.– М.: Медицина, 1977.– 270 с.
6. Appelbaum R., Herzing G., Graw R. et al. Study of cell dose and storage time on engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in a canine model // Transplantation.– 1978.– Vol. 26, N2.– P. 245-251.
7. Goltsev A.N., Babenko N.N., Dubrava T.G. et al. Modification of the state of bone marrow hemopoietic cells after cryopreservation // Int. J. Refrigeration (in Press).
8. Goltsev A.N., Lutsenko E.D., Dubrava, T.G. et al. The importance of myelotransplant component content in the manifestation of cryopreserved haemopoietic precursors functional activity. 2. Adequate methods for assessing. The role of adhesive cells // Cryo-Letters.– 1996.– Vol.17.– P. 195-200.
9. Hattori Y., Kato H., Nitta M., Takamoto S. Decrease of L-selectin expression on human CD34+ cells on freeze-thawing and rapid recovery with short-term incubation // Exp. Hematol.– 2001.– Vol. 29, N1.– P.114-122.
10. Hock, H., Hamblen, M.J., Rooke, H.M. et al. Intrinsic requirement for zinc-finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation // Immunity.– 2003.– Vol. 18.– P. 109-120.
11. Nichogiannopoulou A., Trevisan M., Neben S. et al. Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice // J. Exp. Med.– 1999.– Vol. 190, N9.– P. 1201-1214.
12. Takahashi T., Inada S., Pommier C.G. et al. Osmotic stress and the freeze-thaw cycle cause shedding of Fc and C3b receptors by human polymorphonuclear leukocytes // J. Immunol.– 1985.– Vol. 134, N6.– P. 4062-4068.
13. Till J.E., McCulloch E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells // Rad. Res.– 1961.– Vol. 14, N12.– P. 213-222.
14. Tsai F.Y., Keller G., Kuo F.C. et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2 // Nature.– 1994.– Vol. 371.– P. 221-226.