



УДК 611.018.5.013.8.088.3:577.121.7

А. К. Гулевский, Ю. С. Ахатова

Стимулирующее влияние низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови на гликогенолиз в нейтрофилах лейкоконцентрата донорской крови человека

(Представлено академиком НАН Украины А. Н. Гольцевым)

Проведена полуквантитативна оцінка вмісту глікогену в нейтрофілах свіжовиділеного і криоконсервованого лейкоконцентрата, підданого інкубації в середі, що містить низькомолекулярну (до 5 кДа) фракцію кордової крові (0,15 мг/мл). Встановлено, що дання фракція сприяла процесу глікогенолізу в деконсервованих нейтрофілах, що виражалося в значимому зниженні середнього цитохімічного коефіцієнта. Показано, що ефект низькомолекулярної фракції кордової крові на глікогенолиз блокувався інгібітором гліколізу, йодоацетатом нітрия. Отримані дані розкривають один з механізмів стимулюючого дії низькомолекулярної фракції кордової крові на енергетичний обмін кліток лейкоконцентрата.

Ключевые слова: нейтрофилы, криоконсервирование, гликоген, кордовая кровь.

Ранее было установлено, что в лейкоцитах, криоконсервированных под защитой диметилацетамида, несмотря на высокую жизнеспособность по данным суправитального окрашивания, существенно нарушается фагоцитарная активность и соотношение адениловых нуклеотидов [1, 2]. Инкубация деконсервированных лейкоцитов в реабилитирующей среде с низкомолекулярной фракцией (до 5 кДа) из кордовой крови способствовала повышению фагоцитарной активности, содержания АТФ и общего аденилатного пула до контрольного уровня [1, 2]. Исследование механизма стимулирующего действия низкомолекулярной фракции кордовой крови на фагоцитарную активность и энергетический обмен лейкоцитов человека показало, что это происходит благодаря активации системы транспорта глюкозы и реакций гликолиза [1]. Предполагалось, что еще одним из возможных механизмов стимулирующего действия низкомолекулярной фракции кордовой крови является ее влияние на процесс гликогенолиза, вследствие чего увеличивается количество глюкозы в клетке, доступной для гликолитического пути образования АТФ. В связи с вышеизложенным цель исследования

© А. К. Гулевский, Ю. С. Ахатова, 2015

заключалась в изучении влияния низкомолекулярной фракции кордовой крови на процесс гликогенолиза в нативных и деконсервированных лейкоцитах донорской крови человека.

Материалы и методы. Объектом для исследования был концентрат лейкоцитов, полученный из донорской крови человека методом седиментации эритроцитов декстраном (препарат “Полиглюкин”, Биохим, РФ) [3]. Полученный лейкоконцентрат криоконсервировали под защитой диметилацетамида (ДМАц) в конечной концентрации 5% в режиме трехэтапного медленного охлаждения, после чего контейнеры с клетками ($2 \cdot 10^7$ клеток/мл) погружали в жидкий азот (-196 °C) [2]. Отогревали суспензию на водяной бане при 38 °C и отмывали посредством центрифугирования в растворе, не содержащем глюкозы.

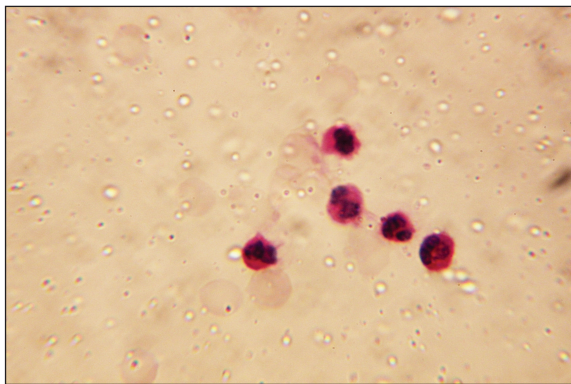
Низкомолекулярную фракцию (молекулярная масса компонентов не более 5 кДа) выделяли из цельной кордовой крови (ФКК) крупного рогатого скота методом ультрафильтрации [4] с использованием мембранного модуля фирмы “Sartorius” (Германия). После ультрафильтрации ФКК лиофилизировали [5] и затем хранили при -80 °C. В среду инкубации лейкоцитов ФКК вносили в количестве 0,15 мг/мл.

Гликоген в цитоплазме нейтрофилов лейкоконцентрата крови человека выявляли цитохимическим методом по принципу А.Л. Шабадша с применением реактива Шиффа (PAS-реакция) (“Merck”, Германия) [6, с. 115–117]. Количество гликогена определяли полуколичественным методом, с вычислением среднего цитохимического коэффициента (СЦК) [7]. СЦК рассчитывали по Карлов [6, с. 115–117]: $СЦК = (3A + 2B + C)/100$, где A — количество клеток с резко положительной окраской, B — количество клеток с окраской средней интенсивности, C — количество клеток со слабоположительной и/или отрицательной окраской. Для ингибирования гликолиза использовали йодоацетат натрия в конечной концентрации 1 мМ [8].

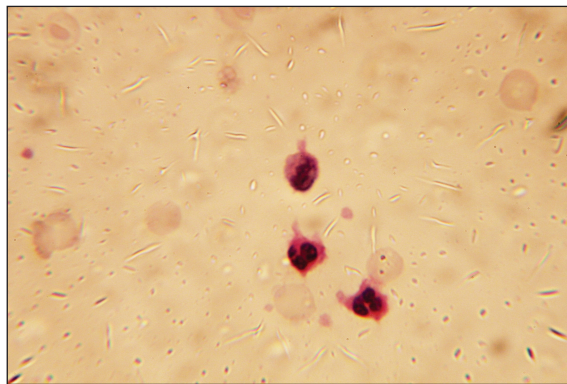
Результаты и обсуждение. Известно, что в энергетическом метаболизме клеток лейкоцитарного ряда важная роль принадлежит обмену гликогена, который используется клетками как энергетический субстрат, особенно это относится к фагоцитирующим типам лейкоцитов, которые выполняют свои функции в условиях острой гипоксии в тканях, поддерживая при этом высокий уровень метаболизма [9]. Потребность лейкоцитов в создании больших запасов гликогена связана прежде всего с тем, что в условиях стимуляции имеет место резкое увеличение энергетических трат клеток [10]. Согласно данным литературы, в случае нарушения способности этих клеток к созданию запасов и хранению гликогена возникают ограничения подвижности, нарушения хемотаксиса и мобилизации кальция, уменьшение интенсивности респираторного взрыва и фагоцитарной активности [11, 12].

Показано, что в мазках периферической крови гликоген локализуется преимущественно в цитоплазме нейтрофилов, незначительными его запасами располагают также моноциты и лимфоциты, и сравнительно мало PAS-положительного материала в базофилах и эозинофилах [6]. В связи с этим для исследования были выбраны именно нейтрофильные гранулоциты. Согласно полученным результатам, свежeweделенные клетки в большом количестве содержат PAS-положительный материал в виде гликогена, который равномерно или в виде блоков и гранул заполняет всю цитоплазму, что на рис. 1, *a* прослеживается как ярко выраженное вишнево-фиолетовое окрашивание. При этом СЦК составлял $2,139 \pm 0,01$ отн. ед. (рис. 2), что соответствует норме ($2,09$ – $2,99$ отн. ед. [13, с. 60–62]).

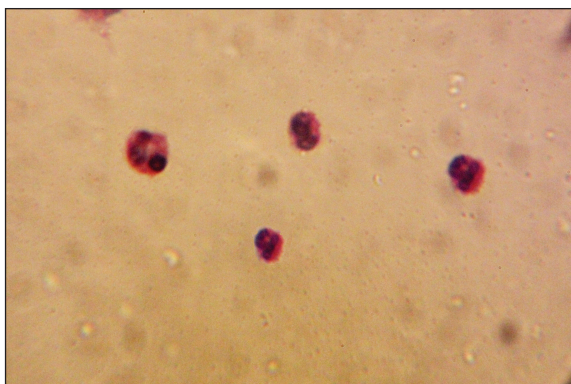
Дальнейшая инкубация клеток в течение 1 ч в безглюкозной среде не приводила к видимым изменениям количества гликогена в цитоплазме, соответственно, не отмечено и изменений СЦК, который в данном случае составлял $1,98 \pm 0,02$ отн. ед. Добавление ФКК в среду инкубации лейкоцитов, находящихся в состоянии покоя (без фагоцитоза), не влияло на



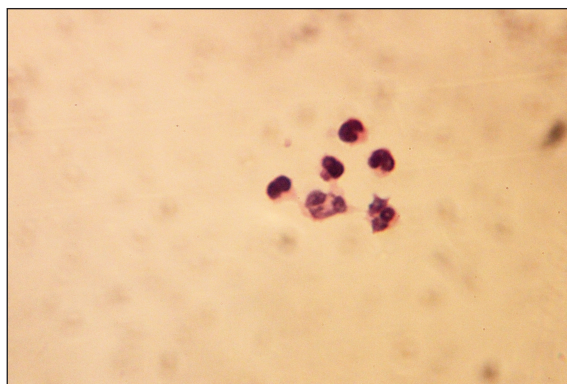
a



б



в



г

Рис. 1. Микрофотографии нейтрофилов в суспензии лейкоцитов до и после криоконсервирования: *a* — свежewedенные клетки; *б* — 1 ч инкубации свежewedенных клеток в условиях фагоцитоза с ФКК; *в* — нейтрофилы деконсервированной суспензии лейкоцитов; *г* — нейтрофилы деконсервированной суспензии лейкоцитов через 1 ч инкубации в условиях фагоцитоза с ФКК. Окрашивание по методу Шабдаша с применением реактива Шиффа. Ув.: об. 100; иммерсия

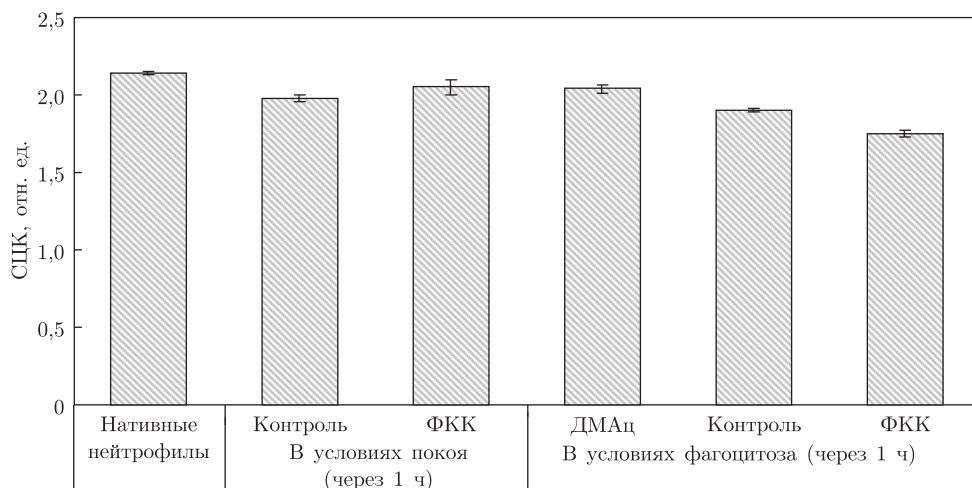


Рис. 2. Содержание гликогена в нейтрофилах лейкоконцентрата донорской крови человека до криоконсервирования в зависимости от состава среды инкубации

исследуемый показатель. Как свидетельствуют полученные данные (см. рис. 2), активация свежевыделенных клеток путем добавления суспензии *Staphylococcus aureus* в заданных условиях не способствовало гликогенолизу (СЦК = $1,9 \pm 0,02$ отн. ед.), внесение ФКК в данную систему также значимо не влияло на количество PAS-положительного материала (СЦК = $1,75 \pm 0,02$ отн. ед.) (см. рис. 1, б).

Анализируя результаты исследования можно сделать вывод о том, что свежевыделенные нейтрофилы не нуждаются в изъятии цитоплазматических запасов гликогена в заданных условиях, по крайней мере, на протяжении 1 ч инкубации. В то же время совершенно иная картина наблюдалась при исследовании содержания гликогена в нейтрофилах лейкоконцентрата, который был криоконсервирован под защитой 5%-го ДМАц (см. рис. 1, в, г и рис. 3). При этом прединкубация свежевыделенных лейкоцитов с криопротектором и дальнейшее его удаление посредством отмывки не оказывали влияния на исследуемый показатель нейтрофилов (см. рис. 2).

Количество гликогена в нейтрофилах деконсервированного лейкоконцентрата непосредственно после оттаивания также оставалось неизменным по сравнению со свежевыделенными клетками: СЦК составлял $1,93 \pm 0,018$ и $2,139 \pm 0,01$ отн. ед. соответственно (рис. 1, а, в и рис. 3), что согласуется с данными литературы [14]. Однако после 1 ч инкубации в условиях покоя мы наблюдали статистически значимое снижение СЦК ($1,73 \pm 0,01$ отн. ед.), что при исследовании окрашенных препаратов выражалось в уменьшении интенсивности окраски цитоплазмы (см. рис. 3). Внесение ФКК в среду инкубации клеток способствовало снижению СЦК до $1,61 \pm 0,017$ отн. ед. (см. рис. 3).

В условиях фагоцитоза нейтрофилы деконсервированного лейкоконцентрата, в отличие от свежевыделенных клеток, активно использовали запасы гликогена, о чем свидетельствует изменение интенсивности и характера окраски цитоплазмы, а также значимое уменьшение СЦК до $1,66 \pm 0,007$ отн. ед. (см. рис. 3).

Наибольшее снижение СЦК в рамках данного исследования (до $1,31 \pm 0,005$ отн. ед.) наблюдалось при добавлении ФКК к фагоцитирующим деконсервированным клеткам. Как видно из рис. 1, г, интенсивность окраски цитоплазмы уменьшилась, отсутствуют скопления гликогена в виде блоков, в препаратах регулярно встречаются нейтрофилы с полным

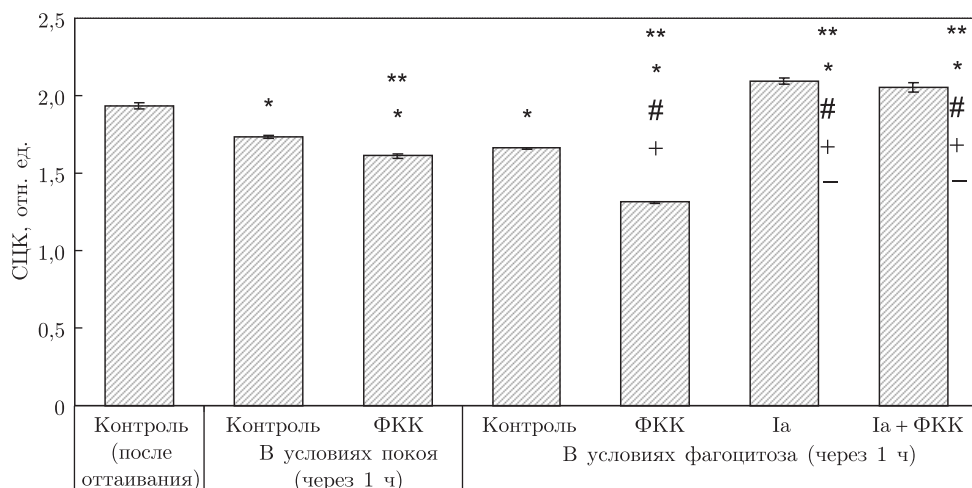


Рис. 3. Содержание гликогена в нейтрофилах лейкоконцентрата донорской крови человека после криоконсервирования в зависимости от состава среды инкубации.

Отличия показателей статистически значимы ($p < 0,05$): * — по сравнению с контролем после оттаивания; ** — по сравнению с контролем в условиях покоя; # — по сравнению с контролем в условиях фагоцитоза; + — по сравнению с вариантом с ФКК в условиях покоя; — — по сравнению с вариантом с ФКК в условиях фагоцитоза

отсутствием PAS-положительного материала в цитоплазме. Это свидетельствует о том, что ФКК в условиях активации фагоцитов, имеющих нарушения метаболизма вследствие криоконсервирования, способствует мобилизации цитоплазматических запасов гликогена, тем самым удовлетворяя потребность клеток в глюкозе, которая, по всей видимости, используется для продукции энергии в ходе реакций гликолиза. Для подтверждения данного предположения нами был использован ингибиторный анализ с применением йодоацетата натрия, блокирующего один из ключевых ферментов гликолиза [8]. Внесение йодоацетата натрия в среду инкубации активированных деконсервированных клеток способствовало сохранению запасов гликогена в их цитоплазме — интенсивность окрашивания соответствовала контролю, а СЦК составлял $2,09 \pm 0,02$ отн. ед. (см. рис. 3). В присутствии ФКК блокирующее влияние ингибитора сохранялось, интенсивность окраски цитоплазмы и СЦК ($2,05 \pm 0,029$ отн. ед.) не изменялись по сравнению с исходными показателями.

Таким образом, полученные результаты подтверждают, что внесение ФКК в среду инкубации способствует гликогенолизу в деконсервированных нейтрофилах. Глюкоза, высвободившаяся в процессе гликогенолиза, используется в реакциях гликолиза для дальнейшего образования АТФ.

Цитированная литература

1. Гулевский А. К., Ахатова Ю. С., Сысоев А. А., Сысоева И. В. Стимулирующее действие низкомолекулярной фракции кордовой крови на энергетический обмен в лейкоцитах // Допов. НАН України. — 2014. — № 7. — С. 152–157.
2. Гришина В. В., Тимохина Е. В., Андреева Л. Ю. Система сбора и фракционирования стволовых клеток пуповинной крови // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. — 2004. — 3, № 6. — С. 50–54.
3. Гулевский А. К., Ахатова Ю. С., Моисеева Н. Н., Горина О. Л., Чижевский В. В., Степанюк Л. В. Оценка фагоцитарной активности криоконсервированных с диметилацетамидом нейтрофилов лейкоконцентрата после реабилитации в среде, содержащей низкомолекулярную фракцию кордовой крови (до 5 кДа) // Проблемы криобиологии. — 2012. — 22, № 1. — С. 71–79.

4. Брок Т. Д. Мембранная фильтрация. – Москва: Мир, 1987. – 464 с.
5. Медичні імунобіологічні препарати: Методичні рекомендації щодо викладення технологічних регламентів на препарати крові [Настанова з якості 42–3002–011–2005]. – Київ: МОЗ України, 2005. – 144 с. – [Наказ МОЗ України № 376 від 26.07.2005].
6. Клиническая лабораторная аналитика. Т. 2. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории / Под ред. В. В. Меньшикова. – Москва: РАМЛД, 1999. – 352 с.
7. Почтарь М. Е., Луговская С. А., Морозова В. И. Цитохимическая диагностика в лабораторной гематологии: Метод. руководство. Атлас. – Ст.-Петербург: Триада, 2003. – 80 с.
8. Borregaard N., Herlin T. Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis // J. Clin. Invest. – 1982. – **70**, No 9. – P. 550–557.
9. Robinson J. M., Karnovsky M. L., Karnovsky M. J. Glycogen accumulation in polymorphonuclear leukocytes, and other intracellular alterations that occur during inflammation // J. Cell. Biol. – 1982. – **95**, No 3. – P. 933–942.
10. Afonso A., Macedo P. M., Ellis A. E., Silva M. T. Glycogen granules in resting and inflammatory rainbow trout phagocytes—an ultrastructural study // Dis. Aquat. Organ. – 2000. – **42**, No 2. – P. 101–110.
11. Chou J. Y., Jun H. S., Mansfield B. C. Neutropenia in type Ib glycogen storage disease // Curr. Opin. Hematol. – 2010. – **17**, No 1. – P. 36–42.
12. Jun H. S., Weinstein D. A., Lee Y. M., Mansfield B. C., Chou J. Y. Molecular mechanisms of neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type Ib // Blood. – 2014. – **123**, No 18. – P. 2843–2853.
13. Назаренко Г. И., Кижжун А. А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. – Москва: Медицина, 2007. – 543 с.
14. Утемов С. В. Низкотемпературное (–80 °С) консервирование лейкоцитных концентратов: Автореф. дис. . . . канд. мед. наук: Спец. 14.00.29 “Гематология и переливание крови”. – Ст.-Петербург, 2005. – 23 с.

References

1. Gulevsky O. K., Akhatova Yu. S., Sysoev A. A., Sysoeva I. V. Dopov. NAN Ukraine, 2014, No 7: 152–157 (in Ukrainian).
2. Grishina V. V., Timokhina Ye. V., Andreeva L. Yu. Voprosy Ginekologii, Akusherstva i Perinatologii, 2004, **3**, No 6: 50–54 (in Russian).
3. Gulevsky O. K., Akhatova Yu. S., Moiseeva N. N., Gorina O. L., Chizhevsky V. V., Stepanyuk L. V. Problems of Cryobiology, 2012, **22**, No 1: 71–79 (in Russian).
4. Brock T. D. Membrane filtration: a user’s guide and reference manual, Madison, WI: Science Tech., 1983.
5. Medical immunobiological preparations: Methodological recommendations on the standard operating procedures for blood products, Resolution on Quality 42–3002–011–2005, Kyiv: Ministry of Health of Ukraine, 2005. Directive No 376 of Ministry of Health of Ukraine dd 26.07.2005 (in Ukrainian).
6. Clinical laboratory analytics. Vol. 2. Some analytical techniques in the clinical laboratory, Ed. by V. V. Mentshikov, Moscow: RAMLD, 1999 (in Russian).
7. Pochtar M. E., Lugovskaya S. A., Morozova V. T. Cytochemical diagnostics in laboratory hematology: Methodological manual, Atlas, St.-Petersburg: Triada, 2003 (in Russian).
8. Borregaard N., Herlin T. J. Clin. Invest., 1982, **70**, No 9: 550–557.
9. Robinson J. M., Karnovsky M. L., Karnovsky M. J. J. Cell. Biol., 1982, **95**, No 3: 933–942.
10. Afonso A., Macedo P. M., Ellis A. E., Silva M. T. Dis. Aquat. Organ., 2000, **42**, No 2: 101–110.
11. Chou J. Y., Jun H. S., Mansfield B. C. Curr. Opin. Hematol., 2010, **17**, No 1: 36–42.
12. Jun H. S., Weinstein D. A., Lee Y. M., Mansfield B. C., Chou J. Y. Blood, 2014, **123**, No 18: 2843–2853.
13. Nazarenko G. I., Kiskun A. A. Clinical evaluation of laboratory results, Moscow: Meditsina, 2007 (in Russian).
14. Utemov S. V. Low temperature (–80 °C) preservation of leukocyte concentrates: Synopsis of thesis for the degree of Candidate of Medical Sciences, St.-Petersburg, 2005 (in Russian).

О. К. Гулевський, Ю. С. Ахатова

Стимулюючий вплив низькомолекулярної фракції (до 5 кДа) кордової крові на глікогеноліз у нейтрофілах лейкоконцентрату донорської крові людини

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

Проведено напівкількісну оцінку вмісту глікогену в нейтрофілах свіжовиділеного та кріоконсервованого лейкоконцентрату, підданого інкубації в середовищі, що містить низькомолекулярну (до 5 кДа) фракцію кордової крові (0,15 мг/мл). Встановлено, що дана фракція сприяла процесу глікогенолізу в деконсервованих нейтрофілах, що виявилось в значущому зменшенні середнього цитохімічного коефіцієнта. Показано, що ефект низькомолекулярної фракції кордової крові на глікогеноліз блокувався інгібітором гліколізу, йодоацетатом натрію. Отримані дані розкривають один з механізмів стимулюючої дії низькомолекулярної фракції кордової крові на енергетичний обмін клітин лейкоконцентрату.

Ключові слова: нейтрофіли, кріоконсервування, глікоген, кордова кров.

O. K. Gulevskyy, Yu. S. Akhatova

Stimulating effect of a low-molecular fraction (below 5 kDa) from cord blood on glycogenolysis in neutrophils of human donor blood leukoconcentrate

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv

A semiquantitative evaluation of the glycogen content in neutrophils of freshly isolated and cryopreserved leukoconcentrates subjected to the incubation in a medium containing a low-molecular fraction (below 5 kD) from cord blood (0.15 mg/ml) is performed. It is found that the fraction contributed to glycogenolysis in cryopreserved neutrophils, which is manifested as a significant reduction in the mean cytochemical coefficient. It is shown that the effect of the low-molecular fraction from cord blood on glycogenolysis is blocked by a glycolysis inhibitor, sodium iodoacetate. The obtained data reveal a mechanism of the stimulating effect of the low-molecular fraction from cord blood on the energy metabolism of leukoconcentrate cells.

Keywords: neutrophils, cryopreservation, glycogen, cord blood.