

standard chemotherapy. The expression of CD117+/CD34+ was seen in 25 cases (53%), CD117+/CD34- – in 14 cases (30%), CD117-/CD34+ – in 4 cases (8.5%), CD117-/CD34- – in 4 cases (8.5%) too. The most malignant course of the disease was seen in patients with CD117+/CD34+ coexpression. Reliable correlation of CD117/CD34 coexpression with FAB-variants of AML has not been revealed.

Conclusions. CD117+/CD34+ coexpression can be used as an additional marker of a myeloid phenotype of acute leukemia. CD117+expression is indicative of an adverse course of AML and poor response to standard therapy. Lethality rate is proved to be higher in AML patients with C-kit expression in tumoral cells. Currently, allogeneic transplantation of haematopoietic stem cells (THSC) or target therapy for inhibition of c-kit can be effective treatment for AML with CD117 expression.

Key words: acute myeloid leukemia, CD117, prognosis, treatment, targetny therapy.

Відомості про автора:

Горяїнова Надія Валеріївна - заступник директора з наукової роботи. Адреса: Київ, вул. Берлінського, 12, тел.: (044) 440-30-88.

Гордієнко Алла Іванівна - зав. лабораторії онкогематології. Адреса: Київ, вул. Берлінського, 12.

Третяк Наталія Миколаївна - зав. відділення захворювань системи крові. Адреса: Київ, вул. Берлінського, 12, тел.: (044) 440-12-20.

Кубарова Валентина Олександрівна - науковий співробітник. Адреса: Київ, вул. Берлінського, 12.

УДК 616.15;615.38

© КОЛЕКТИВ АВТОРІВ, 2014

***Т.О. Калиниченко, М.Ю. Аношина, Г.Т. Глухенька,
М.К. Алгазінова***

**ЕРИТРОЦИТИ ПУПОВИННОЇ КРОВІ ЯК ОБ'ЄКТ
ДОВГОСТРОКОВОГО ЗБЕРІГАННЯ ПРИ
НАДНИЗЬКІЙ ТЕМПЕРАТУРІ
ДУ «Інститут гематології та трансфузіології
НАМН України»**

Вступ. Пошук лікувальних засобів, альтернативних периферичній крові донора, є вкрай актуальним, особливо щодо заміни еритроцитарних компонентів крові дорослого донора у практиці педіатрії раннього дитячого віку. У якості останніх може розглядатись еритроцитарне трансфузійне середовище, отримане з пуповинної крові (ПК). Єдиним способом накопичення запасів еритроцитарної маси ПК є її кріоконсервування.

Мета. Визначити вплив кріопротекторів різного механізму дії на збереженість кріоконсервованих еритроцитів ПК.

Методи. Низькотемпературне зберігання еритроцитів ПК здійснювали під захистом кріопротекторів полівінілпіролідон (ПВП), гліцерин, диметилсульфоксид (ДМСО). Використані морфологічні, біохімічні, статистичні методи дослідження.

Результати. Вміст еритроцитів у деконсервованих зразках еритроконцентрату, що зберігався під захистом таких кріопротекторних розчинів як 9 % ПВП, 20 % гліцерину, 5 і 10 % ДМСО, складав відповідно $(0,95 \pm 0,16) \cdot 10^9/\text{мл}$, $(1,35 \pm 0,18) \cdot 10^9/\text{мл}$, $(0,82 \pm 0,16) \cdot 10^9/\text{мл}$, $(1,97 \pm 0,15) \cdot 10^9/\text{мл}$. При цьому показники збереженості клітин під захистом 10 % ДМСО і 20 % гліцерину значно ($p < 0,001$) перевищували результати кріоконсервування інших груп.

Висновки. Найкращі кріозахисні якості щодо збереженості еритроцитів ПК при температурі мінус 196°C мають ендоцелюлярні кріопротектори - ДМСО (кінцева концентрація - 10 %) і гліцерин (кінцева концентрація - 20 %). Показники активності перекисного окислення ліпідів можуть використовуватись в якості тесту оцінки адаптаційних можливостей еритроцитів до стресу кріоконсервування.

Ключові слова: кріоконсервування, еритроцити, пуповинна кров, перекисне окислення ліпідів.

ВСТУП

На сьогоднішній день є вкрай актуальним пошук лікувальних засобів, альтернативних периферичній крові донора [1]. Відомо, що основною тактикою терапії новонароджених з вираженими формами анемії геморагічної та гіпо-регенераторної етіології до останнього часу були трансфузії еритроцитарної маси [2]. На жаль, застосування компонентів крові дорослого донора (КДД) в неонатології призводить до розвитку імуносупресії, пригнічення еритропоезу [2, 3]. Потужна антигенна стимуляція викликає алоїмунізацію, що може стати причиною виникнення серйозних проблем протягом всього життя. Серед таких - ускладнення при терапії компонентами крові, у жінок – під час вагітності [4]. Тому, у якості альтернативи застосуванню еритроцитарних КДД у педіатрії раннього дитячого віку може розглядатись еритроцитарне трансфузійне середовище, отримане з пуповинної крові (ПК) як алогенного, так і аутологічного походження. До того ж, вибір такого продукту для гемотрансфузії різко знижує, а у випадку автотрансфузії унеможливорює ризик інфікування маленького пацієнта гемотрансмисивними інфекціями.

Єдиним способом довготривалого зберігання еритроцитарного концентрату, у тому числі і з ПК, є його кріоконсервування.

Мета - визначити вплив кріопротекторів різного механізму дії на збереженість кріоконсервованих еритроцитів ПК.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Об'єкт досліджень - еритроконцентрат пуповинної крові.

Для заготівлі зразків ПК використано „замкнену” систему пластикових мішків для заготівлі крові та її компонентів. Вилучення матеріалу проводилося за умови отримання інформованої згоди при фізіологічних пологах після народження дитини та відділення її від посліду.

Еритроконцентрат (ЕК) отримували з використанням методики прискореної седиментації еритроцитів [5].

До ЕК додавали один із кріопротекторних розчинів: 40 % розчин гліцерину (кріоконсервант ЦНІІГПК115-М), 18 % розчин ПВП (кріоконсервант КІПК), 10 і

20 % розчин диметилсульфоксиду (ДМСО) у плазмозаміннику «Реополіглюкін», що є 10 % розчином декстрану (молекулярна маса 30000 – 45000). Дотримання співвідношення ЕК і криозахисного розчину як 1:1 знижувало робочу концентрацію криопротектора удвічі. Підготовлену до низькотемпературного зберігання завись еритроцитів (ЗЕ) розливали у криопробірки ємністю 4,5 мл і заморожували до температури мінус 196 °С швидким зануренням у рідкий азот. Розморожування проводили на водяній бані при температурі $(40 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Видалення внутрішньоклітинних криопротекторів гліцерину і ДМСО проводили методом серійного (триразового) центрифугування з використанням сольових гіпертонічних розчинів. У якості відмиваючого розчину для зразків ЗЕ, що заморожувались під захистом ПВП, використовували ізотонічний сольовий розчин. Відмиті еритроцити розводили у зважувальному розчині (0,9 % NaCl). У отриманій завись розморожених відмитих еритроцитів (РВЕ) визначали вміст вільного гемоглобіну, гематокрит, а також показники активності процесів перекисного окислення нейтральних ліпідів та фосфоліпідів.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою методів варіаційної статистики з використанням комп'ютерної програми Microsoft Excel XP.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За всіма показниками, що були досліджені у суспензіях РВЕ - вмістом еритроцитів у 1 мл суспензії, загальною кількістю еритроцитів у пробі, гематокритом – найкращий результат криоконсервування було отримано при заморожуванні під захистом 10 % ДМСО і 20 % гліцерину (тут і надалі зазначені кінцеві робочі концентрації криопротекторних речовин) (табл.). При порівнянні якості РВЕ, що заморожували під захистом 9 % ПВП і 5 % ДМСО, виявили статистично вірогідно кращий результат у випадку застосування першої з речовин.

Таблиця

Характеристика зразків розмороженої еритроцитарної маси в залежності від застосованого криопротекторного розчину (Мвм, n = 15)

Показник	Криопротектор і його робоча концентрація			
	ПВП, 9 %	Гліцерин, 20 %	ДМСО, 5 %	ДМСО, 10 %
	I група	II група	III група	IV група
Вміст еритроцитів ($10^9/\text{мл}$)	$0,95 \pm 0,16$	$1,35 \pm 0,18$ ¹	$0,82 \pm 0,16$ ^{4,9}	$1,97 \pm 0,15$ ^{6,12,14}
Загальна кількість еритроцитів у пробі (10^9)	$1,57 \pm 0,52$	$4,25 \pm 0,64$ ²	$0,95 \pm 0,30$ ^{5,10}	$5,78 \pm 0,91$ ^{7,13,15}
Ht	$0,24 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,03$ ³	$0,23 \pm 0,04$ ¹¹	$0,41 \pm 0,03$ ^{8,16}

Примітка: 1, 2, 3 - $p < 0,001$ - вірогідна різниця між показниками I і II груп; 4, 5 - $p < 0,05$ - вірогідна різниця між показниками I і III груп; 6, 7, 8 - $p < 0,001$

- вірогідна різниця між показниками I і IV груп; 9, 10, 11 - $p < 0,001$ - вірогідна різниця між показниками II і III груп; 12 - $p < 0,001$ - вірогідна різниця між показниками II і IV груп; 13 - $p < 0,05$ - вірогідна різниця між показниками II і IV груп; 14, 15, 16 - $p < 0,001$ - вірогідна різниця між показниками III і IV груп.

Відмічено, що при додаванні до еритроконцентрату ПК кріопротекторних розчинів відбувається активація процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ). Так, при пероксидації нейтральних ліпідів відбувається збільшення вмісту субстратів ПОЛ - ізольованих подвійних зв'язків (ІПЗ) у 1,8-3,5 рази, проміжних продуктів - дієнових кон'югатів (ДК) - у 1,8-2,9 рази, триєнових (ТК) і оксодієнових кон'югатів (ОДК) - у 2,3-3,0 рази; кінцевих шифових основ (ШО) - у 1,9-5,5 рази. При перекисному окисленні фосфоліпідів рівень ІПЗ зростає від 1,1 до 12,6 разів, ДК - від 2,3 до 19,8 разів, ТК і ОДК - від 2,1 до 3,2 разів; ШО - від 1,3 до 2,5 разів. Інтенсивність зростання залежить від використаного кріопротектора. Встановлено, що найменше підвищення активності ПОЛ відбувалось у присутності 20 % розчину гліцерину. Але за різницею показників у зразках еритроцитарного компоненту ПК до заморожування та після розморожування більш низька активність процесів ПОЛ була виявлена при застосуванні ДМСО (кінцева концентрація - 10 %) у розчині декстрану. Найбільшу збереженість еритроцитів при кріоконсервуванні під захистом цього розчину підтверджує також значно нижчий рівень вільного гемоглобіну в розморожених зразках (рис.).

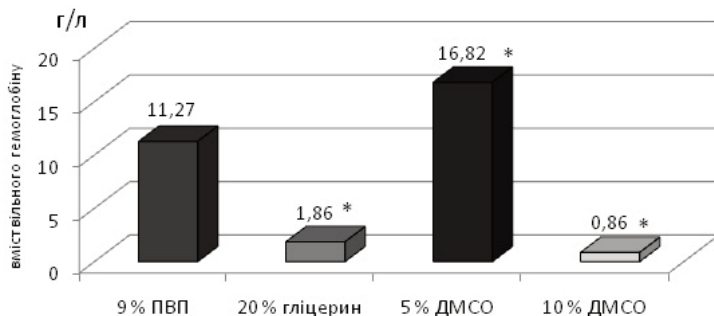


Рис. Вміст вільного гемоглобіну у зразках розморожених відмитих еритроцитів

Примітка: * - вірогідна різниця між показниками різних груп.

Таким чином, результати дослідження показників збереженості еритроцитів за їх вмістом, гематокритом еритроцитарного компоненту, а також концентрацією молекулярних продуктів ПОЛ, вільного гемоглобіну свідчать, що для кріоконсервування еритроцитарної маси ПК найбільш щадними є 20 % розчин ДМСО у 10 % розчині декстрану («Реополіглюкін») і 40 % розчин гліцерину (кріоконсервант ЦНІІГПК115-М).

Відомо, що максимальний ефект збереження клітин при кріоконсервуванні залежить, насамперед, від їх структурно-функціональних особливостей

як об'єкту кріоконсервування, а також від властивостей і концентрації кріопротекторної речовини [6, 7]. Наявність певних відмінних пристосувальних властивостей еритроцитів у перинатальному періоді, зокрема, особливостей їх мембрано-цитоскелетного комплексу та внутрішньоклітинних структур передбачають наявність відмінності характеристик їх кріочутливості. Необоротна втрата води при недостатній стабілізації її структури внутрішньоклітинними речовинами, гідратними оболонками білків призводить до руйнування еритроцитів при кріоконсервуванні. Так, було встановлено, що незважаючи на високу ефективність застосування кріопротекторного розчину непроникаючої дії ПВП для довготривалого зберігання еритроцитів периферичної крові дорослого донора, цей кріоконсервант не здатний забезпечити захист еритроцитів ПК. Зниження спроможності еритроцитарних мембран до деформації підтверджене активацією реакцій окислення через маркер інтенсифікації процесів ПОЛ. Зокрема, зростання показників перекисного окислення фосфоліпідів виступає індикатором порушення структурного комплексу еритроцитарної мембрани, регуляції транспорту речовин, детермінації активності пов'язаних з мембраною транспортних систем. Як наслідок, йонний дисбаланс еритроцитів призводить до порушення осмотичного балансу і зниженню їх життєздатності.

Комбінація проникаючого у клітину кріопротектора ДМСО з полімерною речовиною - декстраном, що має велику молекулярну масу і, як наслідок, не потрапляє у клітину, - сприяє позитивній корекції кріопротекторної ефективності внаслідок послаблення осмотичного стресу при заморожуванні [7].

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що найкращі кріозахисні якості щодо зберігання еритроцитів пуповинної крові при температурі мінус 196 °С мають еритроцити кріопротектори - ДМСО (кінцева концентрація - 10 %) і гліцерин (кінцева концентрація - 20 %).

2. Показники активності ПОЛ можна використовувати в якості тесту оцінки адаптаційних можливостей еритроцитів до стресу кріоконсервування.

Перспективи подальших досліджень. Розробки у напрямку кріоконсервування еритроцитів пуповинної крові сприятимуть оптимізації трансфузійної тактики у новонароджених.

Література

1. Орлик В.В. Основи трансфузійної медицини / Орлик В.В. - Львів: Видавництво «Квадрат», 2012. – 446 с.
2. Миронов П.И. Кровопотеря и ее восполнение у детей / П.И. Миронов // Детская медицина Северо-запада. – 2011. - № 1. – С. 35-40.
3. Сенкевич О.А. Оценка клеточного иммунитета новорожденных с очень низкой массой тела при рождении при выборе метода лечения ранней анемии недоношенных / О. А. Сенкевич, Е.А. Сметанина, Р.Ф. Езерский // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2012. - №4. – С. 34-36.
4. Скудицкий А.Е. Гемотрансфузии в раннем детском возрасте как причина антиэритроцитарной аллоиммунизации / А.Е. Скудицкий // Вестник службы крови России. - 2008. - №3. – С. 15-16.

5. Пат. №74165 UA МПК A01N 1/02 A 61K 35/14. Спосіб підготовки ядрових клітин пуповинної/плацентарної крові до криоконсервування / Перехрестенко П.М., Калиниченко Т.О., Аношина М.Ю., Глухенька Г.Т. (UA); заявник і патентовласник ДУ „ІГТ НАМН” (UA). - № у 201201695, заявл. 15.02.2012; опубл. 25.10.2012, Бюл. № 20.

6. Пахомова Ю.С. Криозащитные свойства растворов на основе непроницающего ОЭГп=25 в комбинации с проникающими криопротекторами при замораживании эритроцитов человека / Ю.С. Пахомова, В.В. Чеканова, А.М. Компаниец // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. - № 1. – С. 26-39.

7. Рамазанов В.В. Осмотические свойства эритроцитов, замороженных в средах с непроницаемыми и проникающими криопротекторами // Проблемы криобиологии. – 2010. - № 1. – С. 47-58.

Т.А. Калиниченко, М.Ю. Аношина, Г.Т. Глухенькая, М.К. Алгазінова
Эритроциты пуповинной крови как объект длительного хранения при сверхнизкой температуре

ГУ «Институт гематологи и трансфузиологии НАМН Украины»

Вступление. Поиск лечебных средств, альтернативных периферической крови донора, является крайне актуальным, особенно для замены эритроцитарных компонентов крови взрослого донора в практике педиатрии раннего детского возраста. В качестве последних может рассматриваться эритроцитарная трансфузионная среда, полученная из пуповинной крови (ПК). Единственным способом создания запасов эритроцитарной массы ПК является ее криоконсервирование.

Цель. Определить влияние криопротекторов разного механизма действия на сохранность криоконсервированных эритроцитов ПК.

Методы. Низкотемпературное хранение эритроцитов ПК осуществляли под защитой криопротекторов поливинилпирролидон (ПВП), глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО). Применены морфологические, биохимические, статистические методы исследования.

Результаты. Содержание эритроцитов в деконсервированных образцах эритроконцентрата, хранившегося под защитой таких криопротекторных растворов как 9 % ПВП, 20 % глицерин, 5 и 10 % ДМСО, составляло соответственно $(0,95 \pm 0,16) \cdot 10^9/\text{мл}$, $(1,35 \pm 0,18) \cdot 10^9/\text{мл}$, $(0,82 \pm 0,16) \cdot 10^9/\text{мл}$, $(1,97 \pm 0,15) \cdot 10^9/\text{мл}$. При этом показатели сохранности клеток под защитой 10 % ДМСО и 20 % глицерина значительно ($p < 0,001$) превышали результаты криоконсервирования других групп.

Выводы. Лучшие криозащитные качества относительно сохранности эритроцитов ПК при температуре минус 196°C проявляют эндоцеллюлярные криопротекторы - ДМСО (конечная концентрация - 10 %) и глицерин (конечная концентрация - 20 %). Показатели активности перекисного окисления липидов могут быть использованными в качестве теста оценки адаптационных возможностей эритроцитов к стрессу криоконсервирования.

Ключевые слова: криоконсервирование, эритроциты, пуповинная кровь, перекисное окисление липидов.

T.O. Kalynychenko, M. Yu. Anoshyna, H.T. Hlukhen'ka, M.K. Alhazinova
Umbilical cord blood red cells as an object for long-term storage at ultralow temperature

SI "Institute of Hematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine"

Introduction. The search for the therapeutic agents as an alternative to peripheral donor blood is extremely urgent especially for replacement of the erythrocyte blood components of the adult donor in the early childhood pediatric practice. The erythrocyte transfusion medium obtained from umbilical cord blood (UCB) can be considered as one of them. Cryopreservation is the only way to stock up umbilical cord blood red cell mass.

Aim. To determine impact of various cryoprotectants on preservation of umbilical cord blood red cells.

Methods. To store umbilical cord blood red cell there were used the cryoprotectants as follows: polyvinylpyrrolidone (PVP), glycerol and dimethyl sulfoxide (DMSO). Morphological, biochemical, statistical research methods were applied.

Results. Red blood cell count in the thawed samples stored under the protection of 9% PVP, 20% glycerol, 5% and 10% DMSO was $0.95 \pm 0.16 \cdot 10^9/\text{ml}$, $1.35 \pm 0.18 \cdot 10^9/\text{ml}$, $0.82 \pm 0.16 \cdot 10^9/\text{ml}$ and $1.97 \pm 0.15 \cdot 10^9/\text{ml}$, respectively. The cells' viability indicators under the protection of 10% DMSO and 20% glycerol exceeded significantly the cryopreservation results of other groups ($p < 0.001$).

Conclusions. Such endocellular cryoprotectants as DMSO (final concentration - 10%) and glycerol (final concentration - 20%) demonstrate better cryoprotective qualities pertaining to preservation of the umbilical cord blood red cells at -196°C . Values of lipid peroxidation activity can be used to estimate erythrocyte adaptive capabilities to the cryopreservation stress.

Key words: cryopreservation, erythrocytes (red blood cells), umbilical cord blood, lipid peroxide oxidation.

Відомості про авторів:

Калиниченко Тетяна Олексіївна – к.мед.н., с.н.с., зав. лабораторії криоконсервування гемопоетичних клітин ДУ «ІГТ НАМН». Адреса: Київ, вул. Берлінського, 12, тел.: (044) 440-31-55.

Аношина Мілітіана Юріївна – к.мед.н., с.н.с., пров.н.с. лабораторії криоконсервування гемопоетичних клітин ДУ «ІГТ НАМН». Адреса: Київ, вул. Берлінського, 12, тел.: (044) 440-78-57.

Глухенька Галина Тимофіївна – к.мед.н., с.н.с., пров.н.с. лабораторії криоконсервування гемопоетичних клітин ДУ «ІГТ НАМН». Адреса: Київ, вул. Берлінського, 12.

Алгзінова Маргарита Костянтинівна – лікар-трансфузіолог вищої категорії відділу гемофілії та інших коагулопатій ДУ «ІГТ НАМН». Адреса: Київ, вул. Берлінського, 12.