

пациентов с концентрацией в сыворотке крови тимидинкиназы ниже 20 ед/л и неотягощенным хроническими заболеваниями коморбидным статусом.

Вывод. На уровень трехлетней бессобытийной выживаемости взрослых больных ОМЛ наиболее значимое влияние имеют: ответ на индукционное лечение в первом остром периоде; уровень сывороточной тимидинкиназы в дебюте заболевания; коморбидный статус.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, прогноз, выживаемость, риск.

N.V. Goriainova

Event-free survival of patients with acute myeloid leukemia depending on prognostic factors

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

Introduction. Renewable event-free survival of patients with acute myeloid leukemia (AML) is significantly enhanced by the individualization of therapeutic approaches in view of prognostic factors.

Aim. To determine the effect of individual prognostic factors to three-year survival of patients with AML.

Methods. 97 patients with AML have been under observation. The age of patients with AML ranged from 17 to 73 years (meanage - $(42,8 \pm 14,3)$, 58 men and 39 women. AML variants were determined by FAB-classification criteria: patients with predominant M2, M4, M5 variants (23, 34, 29, respectively); M0, M6 were diagnosed in 3 cases, M1 was detected in 7 patients.

Results. As a result of the statistical analysis of the data there was revealed that the highest statistical significance is the impact of induction treatment in the first acute period ($p = 0.001$), the event-free three-year survival probability is higher in patients with remission after 1st or 2nd year of chemotherapy than in patients with absence of a positive response to treatment in decreed terms. Also significantly higher level of the three-year survival was observed in patients with serum concentration of thymidine kinase below 20 IU/L and without any chronic diseases.

Conclusion. The level of three year event-free survival of adult patients with AML is the most significantly influenced by: response to induction treatment in the first acute period; serum thymidine kinase in on set of the disease; comorbid status.

Key words: acute myeloid leukemia, prognosis, survival, risk.

Відомості про автора:

Горіянова Надія Валеріївна – заступник директора з наукової роботи. Адреса: Київ, вул. М. Берлінського, 12, тел.: +38 (044) 4405477.

УДК 615.387:611-018.51

© КОЛЕКТИВ АВТОРІВ, 2015

Т.О. Калиниченко, М.Ю. Аношина, М.К. Алгазінова

ВПЛИВ СКЛАДУ КРІОКОНСЕРВАНТУ НА ЯКІСТЬ РОЗМОРОЖЕНОГО ЕРИТРОЦИТАРНОГО КОМПОНЕНТУ ПУПОВИННОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України»

Вступ. Еритроцитарні компоненти пуповинної крові (ПК) мають перспективу клінічного застосування, зокрема, для корекції газотранспортної функції крові у ранньому дитячому віці.

Мета. Вивчити вплив кріоконсервантів на якість розмороженої еритроцитарної зависі з пуповинної крові при її глибокому заморожуванні до температури мінус 196°C.

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

Результати. Найбільша збереженість еритроцитів після розморожування встановлена при застосуванні комбінації 9% ПВП і 5% ДМСО (вміст еритроцитів - $(3,11 \pm 0,56) \times 10^9$ /мл, вільного гемоглобіну - $(0,20 \pm 0,02) \times 10^{-11}$ г), що значно ($p < 0,001$) відрізнялось від результатів кріоконсервування інших груп.

Висновки. Комбінація кріопротекторів різного механізму дії ПВП та ДМСО у низькій концентрації ефективно захищає еритроцити ПК при швидкому заморожуванні до наднизької температури.

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

Вступ. Одним з основних завдань сучасної виробничої трансфузіології є створення запасів компонентів крові за допомогою кріогенного обладнання, що дозволяє зберігати якість протягом тривалого часу. Основним компонентом консервованої крові є еритроцитарна маса. Її використовують як джерело гемоглобіну для корекції газотранспортної функції крові при травмах і багатьох захворюваннях. Окрім периферичної крові, перспективу застосування у ранньому дитячому віці має еритроцитарний компонент пуповинної крові (ПК), що залишається після народження дитини в судинах плаценти та пуповини [1-3]. На сьогодні основою розробки методів кріоконсервування еритроцитів лишаються дослідження дії кріопротекторів та їх комбінацій. Особливо активно ведуться дослідження в напрямку застосування сумішей кріозахисних речовин, що відрізняються за здатністю молекул проникати всередину клітини, тобто в силу своїх фізико-хімічних якостей відрізняються механізмами дії [4, 5].

Мета. Вивчити вплив складу кріоконсерванту на якість розмороженої еритроцитарної зависі, отриманої з пуповинної крові людини, та досягти найбільшої збереженості клітин за умови підбору найнижчої дієвої концентрації кріозахисних речовин.

Матеріали і методи. Об'єкт досліджень – еритроконцентрат (ЕК) ПК людини. Заготівлю ПК здійснювали в «замкненій» системі пластикових мішків за умови додержання етичних вимог. ЕК отримували методом прискореної седиментації еритроцитів. До готового ЕК додавали один із кріопротекторних розчинів: 40% гліцерин (кріоконсервант ЦНІІГПК115-М), 18% низькомолекулярний полівінілпіролідон (ПВП) (молекулярна маса 8000, кріоконсервант КІПК), 10 або 20% диметилсульфоксид (ДМСО) у плазмозаміннику «Реополіглюкін». Окрім того, використовували суміші кріопротекторів: 18% ПВП із 10% ДМСО або 18% ПВП із 20% гліцерину. У підготовленому до заморожування ЕК робоча концентрація кріопротекторів знижувалась вдвічі. Отриману завись еритроцитів (ЗЕ) розливали у кріопробірки ємністю 4,5 мл і заморожували до температури мінус 196°C шляхом швидкого занурення у рідкий азот. Розморожування проводили на водяній бані при температурі (39 ± 1) °C. Видалення внутрішньоклітинних кріопротекторів – гліцерину (у кінцевій концентрації 20%) і ДМСО (у кінцевій концентрації 10%) здійснювали методом серійного центрифугування з використанням сольових гіпертонічних розчинів. Для відмивання зразків ЗЕ, що заморожували під захистом ПВП, використовували ізотонічний сольовий

розчин. Відмиті еритроцити розводили у зважуючому 0,9% розчині NaCl. Оцінку якості розморожених відмитих еритроцитів (РВЕ) здійснювали за показниками: гематокриту (Ht), кількості еритроцитів, їх осмотичної резистентності, вільного гемоглобіну (Hbv) [6, 7], активності перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) - за модифікованим спектрофотометричним методом І.А. Волчегорського зі співавт. [8]. Визначали вміст ізольованих подвійних зв'язків (ІПЗ), дієнових, триєнових, оксодієнових кон'югатів (ДК, ТК, ОДК відповідно), кінцевих продуктів ПОЛ типу шифових основ (ШО). Статистичну обробку проводили методом варіаційної статистики з використанням комп'ютерної програми Microsoft Excel XP.

Результати та їх обговорення. Використані в дослідженні кріопротектори є речовинами, що мають різну кріопротекторну дію. Так, полімер ПВП є речовиною, що не проникає до клітини, а обволікає її, тоді як кріопротекторна дія ДМСО і гліцерину ґрунтується на їх здатності проникати всередину клітини. Результати заморожування з розчинами, що містять одну із зазначених речовин, використовували в якості базового контролю. При застосуванні «коктейлів» кріопротекторів покращення результату збереженості еритроцитів відбулось тільки у групі зразків, що заморожували при поєднанні ПВП і ДМСО. Так, вміст еритроцитів у 1 мл відмитої клітинної суспензії в цьому випадку суттєво ($p < 0,001$) перевищували результати кріоконсервування зразків інших груп (рис.). Вживання комбінації ПВП з гліцирином не продемонструвало ефективного захисту.

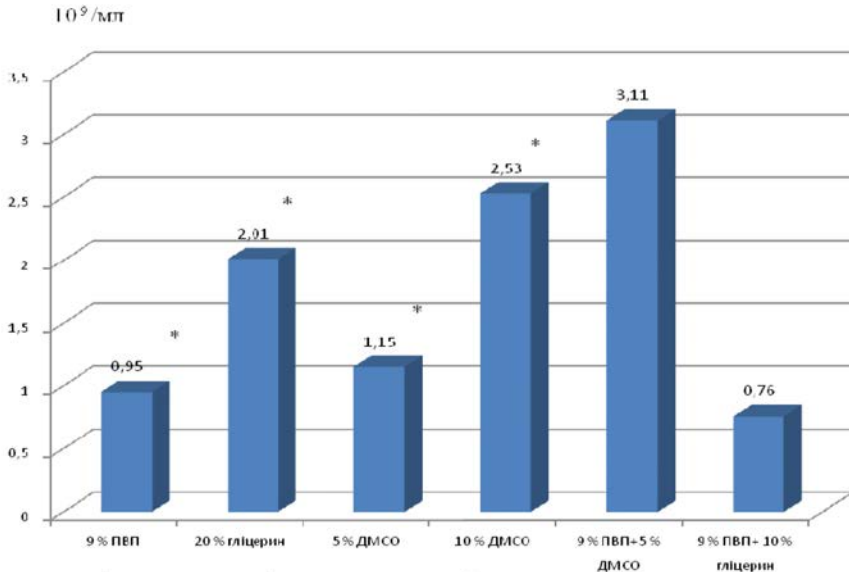


Рис. Вміст еритроцитів у 1 мл зразка після розморожування та відмивання

*Примітка: * - вірогідна різниця між показниками груп зразків, що заморожували з одним кріопротектором та групою зразків, що зберігались під захистом суміші кріопротекторів ПВП і ДМСО.*

Показники вмісту Hbv у зразках, що заморожували під захистом окремо гліцерину або ДМСО у кінцевих концентраціях відповідно 20% і 10% були нижчими відносно інших груп (відповідно $(0,78 \pm 0,13) \times 10^{-11}$ г та $(0,34 \pm 0,09) \times 10^{-11}$ г). Так, при використанні 9% ПВП та зниженні концентрації ДМСО до 5% вміст Hbv зростав відповідно до $(7,26 \pm 0,75) \times 10^{-11}$ і $(12,94 \pm 1,12) \times 10^{-11}$ г ($p < 0,001$). Змішування базового розчину ПВП низької концентрації з ендоцелюлярними ДМСО або гліцерином покращувало ($p < 0,001$) даний показник до $(0,20 \pm 0,02) \times 10^{-11}$ г та $(2,51 \pm 0,10) \times 10^{-11}$ г. Не встановлено достовірної різниці у показниках осмотичної резистентності РВЕ різних груп: $(68,9 \pm 2,7)\%$ – для групи під захистом суміші ПВП і ДМСО, $(70,0 \pm 5,4)\%$ – ПВП і гліцерину, $(64,3 \pm 5,6)\%$ – окремо гліцерину, $(74,0 \pm 2,0)\%$ – окремо 5% ДМСО. Показники Ht зразків після заморожування з 20% гліцерином, 10% ДМСО, а також із сумішшю ПВП і ДМСО (відповідно - $(0,41 \pm 0,01)$; $(0,42 \pm 0,02)$; $(0,46 \pm 0,05)$) були вищими ($p < 0,001$) відносно базових розчинів кріопротекторів ДМСО (кінцева концентрація 5%) і ПВП (відповідно – $(0,23 \pm 0,04)$; $(0,24 \pm 0,03)$). Гарну збереженість мембрани еритроцитів за показниками ПОЛ спостерігали у зразках, що заморожували з базовими розчинами гліцерину та 10% ДМСО. У групі зразків РВЕ, що зберігали під захистом комбінації ПВП та ДМСО, рівень ІПЗ, ДК, ТК і ОДК, а також різниця показників (Δ) до та після розморожування були вірогідно найнижчими (табл.).

Таким чином, у нашому дослідженні були використані в якості контрольних базові розчини 20% ДМСО і 40% гліцерину, що мають свої, пов'язані із застосуванням відносно високих концентрацій цих речовин недоліки: токсичність ДМСО, трудомісткість та тривалість процесу введення та видалення кріопротекторів з трансфузійного середовища. З іншого боку, недостатня ефективність захисної дії екстрацелюлярного ПВП спричинена надмірною дегідратацією клітин, інтенсивністю осмотичного стресу [4, 5]. Одним із шляхів уникнення перелічених моментів є використання комбінацій кріопротекторних речовин різного механізму дії у найнижчих дієвих концентраціях, що на сьогоднішній день широко застосовують при низькотемпературному зберіганні різних біологічних об'єктів, призначених для клінічного застосування [8]. Ефективність кріоконсервантів, що вміщують одночасно проникаючий кріопротектор і полімер, пояснюється доповненням та врівноваженням дії кожного з них, перш за все, послабленням осмотичного стресу при заморожуванні. Цей ефект веде до значного покращення кріозахисної ефективності у разі застосування запропонованої суміші ПВП і ДМСО у сумарній низькій концентрації 15%.

Слід зазначити, що наслідки кріоконсервування при змішуванні кріопротекторів різного механізму дії залежать від природи, а також властивостей компонентних речовин. Недостатня кріозахисна ефективність другого «коктейлю» спричинена, скоріш за все, конкурентною дією ПВП, що обволікає мембрану клітини, та гліцерину, що має «спорідненість» до ліпідів мембрани, взаємодіє з ліпідним бішаром, а також здатності його розчинів до високого осмотичного тиску [9]. Механізми кріозахисту комбінованих кріопротекторних розчинів потребують додаткових ґрунтовних досліджень.

Показники перекисного окислення ліпідів в еритроцитарній зависі ПК на етапах консервування з кріопротекторами різного механізму дії (M±m)

Групи	Показники пероксидації нейтральних ліпідів, од. на $1 \cdot 10^{-9}$					
		ІПЗ	ДК	ТК	ОДК	ШО
I	a	2,15±0,28	1,49±0,25	0,37±0,07	0,51±0,10	0,04±0,01
	b	8,64±2,01 ¹	5,25±1,26 ¹	1,41±0,35 ¹	1,66±0,41 ¹	0,13±0,02 ¹
II	a	2,24±0,31	1,36±0,22	0,36±0,07	0,42±0,08	0,04±0,01
	b	3,40±0,42 ³	2,10±0,24 ³	0,56±0,07 ³	0,66±0,08 ³	0,07±0,01 ³
III	a	2,99±0,53	1,90±0,40	0,48±0,11	0,59±0,15	0,03±0,01
	b	12,03±2,76 ²	6,16±1,48 ²	1,51±0,36 ²	1,91±0,49 ³	0,17±0,04 ¹
IV	a	3,64±0,41	1,97±0,28	0,47±0,08	0,56±0,09	0,03±0,01
	b	3,23±0,34	1,61±0,14	0,39±0,03	0,46±0,04	0,06±0,01 ²
V	a	2,66±0,24	1,19±0,24	0,29±0,07	0,34±0,08	0,02±0,01
	b	1,59±0,21 ¹	0,97±0,14 ³	0,24±0,04 ²	0,29±0,04 ³	0,02±0,01
VI	a	1,68±0,33	0,69±0,09	0,16±0,02	0,19±0,03	0,02±0,01
	b	4,33±0,44 ¹	2,55±0,27 ¹	0,66±0,08 ¹	0,81±0,09 ¹	0,15±0,03 ¹
Групи	Показники пероксидації фосфоліпідів, од. на $1 \cdot 10^{-9}$					
		ІПЗ	ДК	ТК	ОДК	ШО
I	a	8,79±1,02	2,52±0,51	1,63±0,16	1,04±0,11	0,15±0,01
	b	18,75±3,48 ¹	9,38±1,88 ¹	4,99±1,02 ¹	3,32±0,67 ¹	0,64±0,10 ¹
II	a	2,63±0,29	1,90±0,40	0,98±0,12	0,65±0,08	0,23±0,03
	b	3,67±0,33 ³	1,37±0,18	1,49±0,30	1,01±0,18	0,41±0,06 ²
III	a	8,76±0,97	3,51±0,54	1,45±0,18	1,00±0,13	0,17±0,03
	b	27,83±5,70 ¹	11,17±2,21 ¹	3,45±0,71 ²	2,41±0,49 ²	1,11±0,27 ¹
IV	a	9,93±0,99	7,13±0,61	1,40±0,21	0,95±0,14	0,18±0,01
	b	6,50±0,45 ²	4,47±0,51 ¹	0,79±0,10 ²	0,55±0,06 ²	0,22±0,01 ³
V	a	5,42±0,64	5,26±0,77	0,90±0,10	0,64±0,07	0,14±0,03
	b	2,69±1,51 ¹	0,73±0,15 ¹	0,31±0,05 ¹	0,24±0,04 ¹	0,15±0,03
VI	a	3,81±0,45	2,65±0,56	0,66±0,09	0,46±0,06	0,12±0,03
	b	14,73±3,65 ³	3,99±0,56 ³	1,48±0,29 ¹	1,12±0,21 ¹	1,02±0,19 ¹

Примітка: 1,2,3 – вірогідна різниця показників до (а) та після (b) розморожування (відповідно $p < 0,001$; $p < 0,01$; $p < 0,05$); I група – зразки, що кріоконсервували під захистом ПВП у кінцевій концентрації 9% ($n = 15$); II група – під захистом гліцерину у кінцевій концентрації 20% ($n = 35$); III група – під захистом ДМСО у кінцевій концентрації 5% ($n = 35$); IV група – під захистом ДМСО у кінцевій концентрації 10% ($n = 35$); V група – під захистом суміші ПВП із ДМСО у кінцевих концентраціях відповідно 10% і 5% ($n = 8$); VI група – під захистом суміші ПВП із гліцерином (обидва кріопротектори - у кінцевих концентраціях 10%) ($n = 8$).

Висновки. Комбінація оболікаючого низькомолекулярного ПВП і ендоцелюлярного ДМСО у сумарній кінцевій концентрації 15% демонструє високі параметри кріозахисту еритроцитів ПК. При цьому підвищення кількісно-якісних характеристик РВЕ ПК відбувається, в тому числі, і за рахунок мінімізації можливості токсичних впливів ДМСО на клітини при зниженні його дольового вмісту у суміші до 1/3. Слабка кріозахистна ефективність комбінації протекторів різного механізму дії – ПВП і гліцерину щодо зберігання еритроцитів ПК при ультранизкій температурі може пояснюватись їх конкурентним впливом на клітинну мембрану.

Література

1. Орлик В.В. Основи трансфузійної медицини / Орлик В.В. – Львів: Видавництво «Квадрат», 2012. – 446 с.
2. Опыт применения аутологичной эритроцитарной массы, полученной из пуповинной крови для терапии анемии у новорожденных / Федорова Т.А., Аппалуп М.В. [и др.] // Вестник службы крови России. -2007. – №1. – С. 24-26.
3. Сенкевач О.А. Влияние коррекции ранней анемии недоношенных препаратами аллогенной крови на состояние клеточного иммунитета детей с очень низкой массой тела при рождении / Сенкевач О.А., Сметанина Е.А., Дорофеев Е.Е. // Дальневосточный медицинский журнал. -2012. – №1. – С. 71-74.
4. Рамазанов В.В. Осмотические свойства эритроцитов, замороженных в средах с непроницающими и проникающими криопротекторами / Рамазанов В.В. // Проблемы криобиологии. – 2010. – № 1. – С. 47-58.
5. Пахомова Ю.С. Криозащитные свойства растворов на основе непроницающего ОЭГ $n=25$ 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.
6. Технология заготовки и создания запасов лейкофильтрованных карантинизированных эритроцитов для обеспечения иммунологической и инфекционной безопасности их трансфузий: Медицинская технология ФС №2011/177 от 06.2011 г.
7. Определение свободного гемоглобина плазмы крови гемиглобинцианидным методом / Савельев О.Н., Сухоруков В.П., Киселева А.В., Королева Г.А. // Лабораторное дело. – 1990. – №10. – С. 45-47.
8. Аношина М.Ю. Оцінка перекисного окислення ліпідів у зразках кріоконсервованої пуповинної крові / Аношина М.Ю., Калиниченко Т.О., Глухенька Г.Т. // Укр. журнал гематології та трансфузіології. – 2011. – №3. – С. 12-15.
9. Simplified method for cryopreservation of islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants / Maruyama M., Kenmochi T., Sakamoto K. [et al.] // Transplant. Proc. – 2004. – Vol. 36, № 4. – P. 1133-1134.

Т.А. Калиниченко, М.Ю. Аношина, М.К. Алгазінова

Влияние состава криоконсерванта на качество размороженного эритроцитарного компонента пуповинной крови человека

ГУ «Институт гематологии и трансфузиологии НАМН Украины»

Введение. Эритроцитарные компоненты пуповинной крови (ПК) имеют перспективу клинического применения, в частности, для коррекции газотранс-

портной функции крови в раннем детском возрасте.

Цель. Изучить влияние криоконсервантов на качество эритроцитарной массы пуповинной крови при ее замораживании до температуры минус 196°С.

Методы. Низкотемпературное хранение эритроцитов ПК осуществляли под защитой смесей внутриклеточных (диметилсульфоксид - ДМСО, глицерин) и экстракцеллярного (поливинилпирролидон - ПВП) криопротекторов. Исползованы морфологические, биохимические, статистические методы исследования.

Результаты. Наибольшая сохранность эритроцитов после размораживания установлена при применении комбинации 9% ПВП и 5% ДМСО (содержание эритроцитов - $(3,11 \pm 0,56) \times 10^9/\text{мл}$, свободного гемоглобина - $(0,20 \pm 0,02) \times 10^{-11}\text{г}$), что значительно ($p < 0,001$) отличалось от результатов криоконсервирования других групп.

Выводы. Комбинация криопротекторов с разными механизмами действия -ПВП и ДМСО при их низкой концентрации эффективно защищает эритроциты ПК в условиях быстрого замораживания до сверхнизкой температуры.

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

T.O. Kalynychenko, M. Yu. Anoshyna, M.K. Alginova

The impact of the cryoprotectant composition on the quality of the thawed human umbilical cord blood erythrocyte component

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

Introduction. The umbilical cord blood erythrocyte components are the perspective applications, in particular, for the correction of the gas transport function of the blood during the early childhood.

Aim. To study the impact of the cryoprotectant on the quality of the cord blood erythrocyte mass when frozen to the temperature of minus 196°С.

Methods. The low-temperature storage of the erythrocytes was carried out with the intracellular (dimethyl sulfoxide - DMSO, glycerol) and extracellular (polyvinylpyrrolidone - PVP) cryoprotectants. The morphological, biochemical, statistical research methods were used.

Results. The greatest safety of the erythrocytes was established at the freezing to the combination of 9 % PVP and 5 % DMSO (the contents of the erythrocytes - $(3.11 \pm 0.56) \cdot 10^9/\text{ml}$ and the free hemoglobin - $(0,20 \pm 0,02) \cdot 10^{-11} \text{g}$) was significantly different from the results of other groups cryopreservation.

Conclusion. The combination of the cryoprotectants with the different mechanisms of the action - PVP and DMSO protects the red blood cells of UCB effectively subject to the low concentrations of the cryoprotectants and the rapid freezing speeds up to the ultralow temperatures.

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

Відомості про авторів:

Калиниченко Тетяна Олексіївна - к. м. н., ст. наук. співроб., завідувач лабораторії криоконсервування гемопоетичних клітин ДУ «ІГТ НАМН». Адреса: Київ, вул. Максима Берлінського, 12, тел.: 044/440-31-55, 044/440-21-96; 050-447-86-46.

Аношина Мілітіна Юрїївна - к. б. н., ст. наук. співроб., провідний науковий співробітник, керівник групи біохімії ДУ «ІГТ НАМН». Адреса: Київ, вул. Максима Берлінського, 12, тел.: 044/440-21-18.

Алгасінова Маргарита Костянтинівна - лікар- трансфузіолог вищої категорії відділу гемофілії та інших коагулопатій ДУ «ІГТ НАМН». Адреса: Київ, вул. Максима Берлінського, 12, тел.: 044/440-31-55.

Зб. наук. праць співробіт. НМАПО
імені П.Л.Шупика 24 (3)/2015