

АНТИОКСИДАНТНИЙ ЗАХИСТ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ  
ГЕМОПОЕТИЧНОЇ ТКАНИНИ ПУПОВИННОЇ КРОВІДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України»,  
ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини  
НАМН України»

Вступ. Процедури, що забезпечують довгострокове зберігання резервних запасів пуповинної крові (ПК), потребують удосконалення.

Мета. Забезпечити високу збереженість ядровмісних клітин (ЯВК) розмороженої ПК.

Методи. Кріоконсервування ЯВК ПК проводили під захистом 5% диметилсульфоксиду із додаванням антиоксидантів-мембранопротекторів. Використані морфологічні, функціональні, біохімічні, статистичні методи дослідження.

Результати. Встановлено, що при проведенні антиоксидантної обробки на стадії підготовки матеріалу до кріоконсервування вірогідно покращується морфо-функціональна збереженість клітин. При використанні  $\alpha$ -ліпоевої кислоти окремо або у суміші з вітамінами групи «В» відповідно зростає життєздатність - до  $(93,6 \pm 0,7) \%$  і  $(94,8 \pm 0,2) \%$ , порівняно з контролем -  $(88,6 \pm 0,7) \%$ ,  $p < 0,05$ ; збільшується кількість розморожених гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників гемопоезу (КУО-ГМ) від  $(77,9 \pm 1,6)$  до  $(143,4 \pm 2,6)$  та  $(91,3 \pm 1,0)$  КУО-ГМ на  $1 \cdot 10^5$  ЯВК,  $p < 0,001$ ; зменшується втрата мононуклеарів - до  $(1,2 \pm 0,4) \%$  проти  $(3,0 \pm 0,6) \%$  - у контрольній групі,  $p < 0,01$ . Також у зразках при використанні антиоксидантів знижується активність процесів ліпопероксидації (за вмістом первинних, вторинних та кінцевих молекулярних продуктів - у 1,5 - 3,5 рази,  $p < 0,01$ ).

Висновки. Додавання до суспензії ЯВК ПК  $\alpha$ -ліпоевої кислоти окремо або у суміші з вітамінами групи «В» позитивно впливає на збереженість клітин, сприяє зниженню активності перекисного окислення ліпідів.

Ключові слова: кріоконсервування, пуповинна кров, ядровмісні клітини, колонієутворюючі одиниці гранулоцитарно-макрофагальних клітин - попередників гемопоезу (КУО-ГМ), перекисне окислення ліпідів.

## ВСТУП

Ефективність клінічного застосування пуповинної крові (ПК) як альтернативного джерела для трансплантації реципієнтам з мієлосупресіями на сьогодні є загальновізною [1]. Процедури, що забезпечують довгострокове зберігання резервних запасів цієї тканини у консервованому стані, потребують удосконалення у зв'язку з втратами клітин під час обробки та заморожування-відтаування [2].

Відомо, що одним із чинників, які впливають на структурно-функціональні зміни клітинної мембрани і призводять до загибелі клітини, є надмірне утворення активних форм кисню [3]. Попередні дослідження продемонстрували, що активізація процесів окислення (на прикладі перекисного окислення ліпідів) призводить до зниження якості зразків ПК у процесі їх кріоконсервування. Детальний аналіз розвитку зазначених процесів [4, 5, 6] став підставою для корекції технології [7].

Мета – забезпечити збереженість кількісно-якісного потенціалу фракції ядровмісних клітин (ЯВК) розмороженої ПК шляхом зниження активності процесів вільнорадикального окислення.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Об'єкт досліджень - суспензія ядровмісних клітин (ЯВК) ПК.

Зразки ПК отримували методом забору в „замкненій” системі мішків для заготівлі крові під час фізіологічних пологів. Кріоконсервування ПК проводили за технологією ДУ „ІГТНАМН” [7] під захистом кріоконсервуючого середовища з кріопротектором диметилсульфоксидом (ДМСО) в кінцевій концентрації 5 % без додавання (контрольна група) і з додаванням речовини (а -ліпоева кислота), що має мембранопротекторні та антиоксидантні властивості або комбінації таких речовин (комплекс вітамінів-антиоксидантів групи «В» та а-ліпоева кислота) (досліджувані групи) у різних концентраціях.

Заморожування здійснювали при контрольованій повільній швидкості (1,0±0,5) °С/хв від температури 0 до мінус 160 °С з наступним зануренням у рідкий азот.

Оцінка зразків ПК представлена на основі морфологічних (вміст ЯВК, мононуклеарних клітин - МНК, збереженість мембран), функціональних (короткотривала культура комітованих клітин-попередників гемопоезу - гранулоцитарно-макрофагальних колонієутворюючих одиниць (КУО-ГМ)) та біохімічних (показники перекисного окислення ліпідів (ПОЛ)) методів. Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою методів варіаційної статистики з використанням комп'ютерної програми Microsoft Excel XP.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Попередніми дослідженнями встановлено значну активацію процесів перекисного окислення ліпідів на всіх етапах кріоконсервування гемопоетичної тканини (ГТ) ПК, що супроводжувалось зниженням морфо-функціональних властивостей розмороженої тканини [4, 5, 6].

Проведення антиоксидантної обробки зразків ГТ ПК у різних режимах (варіанти доз та термінів експозиції) дозволили встановити оптимальні умови підготовки зразків до стадії заморожування. Так, при застосуванні а -ліпоевої кислоти у фізіологічній концентрації (8 мкл на 10 мл суспензії) та десятихвилинній експозиції підвищуються такі показники якості розморожених ЯВК, як збереженість клітинних мембран (зростання - від (88,6±0,7) % до (93,6±0,7) %,  $p < 0,05$ ,  $n=11$ ); функція колоніє- та кластероутворення субпопуляції розморожених ГМ-клітин-попередників гемопоезу (від (101,7±2,8) до (143,4±2,6) КУО-ГМ на  $1 \cdot 10^5$  експлантованих ЯВК,  $p < 0,001$ ,  $n=12$ ). При дворазовому підвищенні концентрації -ліпоевої кислоти (16 мкл на 10 мл суспензії) зберігається тенденція до посилення ефекту у порівнянні з контролем. При цьому показовим моментом покращення якості розмороженого трансплантату є зниження активності процесів ліпопероксидації. Так, у розморожених зразках при перекисному окисленні нейтральних ліпідів вірогідно ( $p < 0,001$ ), порівняно з контролем, зменшується вміст субстратів ПОЛ (за показником ізольованих подвійних зв'язків - ІПЗ) – у 2 рази; проміжних продуктів (дієнових - ДК, трієнових - ТК, оксодієнових кон'югатів - ОДК) – у 1,5 рази. Більше ніж у 3 рази знижується концентрація кінцевих продуктів ПОЛ типу основ Шифа (ШО). Аналогічна тенденція спостерігається при перекисному окисленні фосфоліпідів: рівень ІПЗ знижується у 3 рази, ДК – 2,7 рази; ТК, ОДК – 1,6 і 1,8 рази, відповідно; ШО – у 3,5 рази ( $p < 0,001$ ).

При використанні суміші комплексу вітамінів групи «В» і а-ліпоєвої кислоти (4 мкл і 2 мкл на 10 мл суспензії, відповідно) після розморожування суттєво, порівняно з контролем, зменшується втрата ЯВК - від  $(3,2 \pm 0,6)$  % до  $(1,1 \pm 0,4)$ %, МНК - від  $(3,0 \pm 0,6)$  % до  $(1,2 \pm 0,4)$  %,  $p < 0,01$ ,  $n=17$ ; зростає збереженість клітинних мембран (від  $(90,5 \pm 0,4)$  % до  $(94,8 \pm 0,2)$  %,  $p < 0,001$ ,  $n=17$ ). При цьому відбувається вірогідне ( $p < 0,05$ ) зростання життєздатності субпопуляції ГМ-клітин-попередників гемопоезу - від  $(77,9 \pm 1,6)$  до  $(91,3 \pm 1,0)$  КУО-ГМ на  $1 \cdot 10^5$  експлантованих ЯВК,  $n=9$ . При дворазовому підвищенні концентрацій цих антиоксидантів у суміші така тенденція зберігається.

У разі застосування суміші антиоксидантів відбувається суттєве зниження активності ПОЛ. Дані (на прикладі показників пероксидації нейтральних ліпідів) представлені в таблиці.

Таблиця

Вплив суміші антиоксидантів (АО) на показники перекисного окислення нейтральних ліпідів зразків ЯВК ПК

Показники пероксидації (Од. / $1 \cdot 10^6$ ЯВК у мл)	До заморожування		Після розморожування	
	без додавання суміші АО	з додаванням суміші АО	без додавання суміші АО	з додаванням суміші АО
ІПЗ	$0,890 \pm 0,104$	$0,404 \pm 0,072$ <sup>1</sup>	$1,095 \pm 0,109$	$0,367 \pm 0,053$ <sup>1</sup>
ДК	$0,222 \pm 0,029$	$0,115 \pm 0,027$ <sup>1</sup>	$0,397 \pm 0,056$	$0,110 \pm 0,020$ <sup>1</sup>
ТК	$0,043 \pm 0,006$	$0,025 \pm 0,007$ <sup>1</sup>	$0,095 \pm 0,015$	$0,026 \pm 0,005$ <sup>1</sup>
ОДК	$0,043 \pm 0,006$	$0,024 \pm 0,006$ <sup>1</sup>	$0,092 \pm 0,015$	$0,024 \pm 0,005$ <sup>1</sup>
ШО	$0,012 \pm 0,001$	$0,006 \pm 0,001$ <sup>1</sup>	$0,016 \pm 0,002$	$0,006 \pm 0,001$ <sup>1</sup>

Примітка: <sup>1</sup> -  $p < 0,001$  – вірогідна різниця між показниками у групах зразків без додавання та з додаванням суміші антиоксидантів.

Таким чином, представлені дані показують суттєве покращення якості розмороженої гемопоетичної тканини ПК при включенні на підготовчому до кріоконсервування етапі стадії антиоксидантної обробки ядровмісних клітин. Зниження концентрації молекулярних продуктів ПОЛ у суспензії ЯВК ПК пов'язане як з активацією механізму шифоутворення (утилізації жирнокислотних і ліпідних гідроперекисів), так і з відновленням та посиленням внутрішньоклітинної антиоксидантної системи. Це сприяє стабілізації клітинних мембран і підвищенню якості розморожених ЯВК ПК.

За результатами дослідження запропоновано удосконалену технологію кріоконсервування гемопоетичної тканини ПК, основу на використанні на етапах кріоконсервування препаратів з антиоксидантною та мембранопротекторною дією.

### ВИСНОВКИ

- Доведено, що використання на етапах кріоконсервування препаратів з антиоксидантною та мембранопротекторною дією для нейтралізації надлишку продуктів вільнорадикального окислення покращує якість розморожених зразків ЯВК ПК.

• Вперше показано, що додавання до суспензії ЯВК ПК аналога а-ліпоєвої кислоти з комплексною прямою та непрямою антиоксидантною дією у фізіологічній концентрації окремо або у суміші з вітамінами-антиоксидантами групи «В» позитивно впливає на морфологічні та функціональні характеристики розморожених клітин, сприяє зниженню активності ПОЛ.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження сприятимуть поглибленню знань у галузі кріопатофізіології клітини для теоретичного обґрунтування новітніх шляхів покращення кріозахисних технологій.

### Література

1. Wagner J.E., Gluckman E. Umbilical Cord Blood Transplantation: The First 20 Years. *Semin Hematol.* 2010, 47: 3-12.
2. Hunt C.J., Armitage S.E., Pegg D.E. Optimising cryopreservation protocols for haemopoietic progenitor cells: a methodological approach for umbilical cord blood. *Cryo Letters.* 2006, 27 (2): 73-86.
3. Колісник М.І., Колісник Г.В., Нідзюлка Є., Влізло В.В. Активні форми кисню та їх роль у метаболізмі клітин. *Біологія тварин.* 2009, 11 (1-2). Режим доступу: <http://www.inenbiol.com/bt/2009/1/5.pdf/>. Назва з екрану.
4. Аношина М.Ю., Калиниченко Т.О. Характеристика процесів перекисного окислення ліпідів в зразках пуповинної крові на етапах кріоконсервування. *Гематологія і переливання крові : міжвідомчий збірник.* 2010, 35: 139-147.
5. Перехрестенко П.М., Калиниченко Т.О., Аношина М.Ю., Глухенька Г.Т., Гащук Г.П., Скачкова Н.К., Шороп Є.В. Зв'язок показників окисно-відновлювального метаболізму та якості ядровмісних клітин пуповинної крові під час кріоконсервування. *Український журнал гематології та трансфузіології.* 2011, 4: 22-25.
6. Калиниченко Т.О., Аношина М.Ю., Балан В.В., Мінченко Ж.М., Глухенька Г.Т. Окисний гомеостаз та збереженість гемопоетичної тканини пуповинної крові на етапах процесу кріоконсервування трансплантаційного матеріалу. *Зб. наук. пр. співробітників НМАПО ім. П.Л. Шупика.* 2012, 21 (3): 111-117.
7. Пат. №74165 UA МПК А01N 1/02 А 61К 35/14. Спосіб підготовки ядровмісних клітин пуповинної/плацентарної крові до кріоконсервування. Перехрестенко П.М., Калиниченко Т.О., Аношина М.Ю., Глухенька Г.Т. (UA); заявник і патентовласник ДУ „ІГТ НАМН” (UA). - № u 201201695, заявл. 15.02.2012; опубл. 25.10.2012, Бюл. № 20.

Т.А. Калиниченко, М.Ю. Аношина, В.В. Балан,  
Ж.Н. Мінченко, Г.Т. Глухенька

### Антиоксидантная защита крѳоконсервированной гемопѳэтической ткани пуповинной крови

ГУ «Институт гематологии и трансфузиологии НАМН Украины»,  
ГУ «Национальный научный центр радиационной медицины НАМН  
Украины»

Вступление. Процедуры, обеспечивающие длительное хранение резервных запасов пуповинной крови (ПК), требуют усовершенствования.

Цель. Обеспечить высокую сохранность ядросодержащих клеток (ЯСК) размороженной ПК.

Методы. Криоконсервирование ЯСК ПК проводили под защитой 5% диметилсуль-фоксида с добавлением антиоксидантов-мембранопротекторов. Применены морфологические, функциональные, биохимические, статистические методы исследования.

Результаты. Установлено, что при проведении антиоксидантной обработки на стадии подготовки материала к криоконсервированию достоверно улучшается морфофункциональная сохранность клеток. При применении  $\alpha$ -липовой кислоты отдельно или в смеси с витаминами группы «В» соответственно повышается жизнеспособность - до  $(93,6 \pm 0,7)$  % и  $(94,8 \pm 0,2)$  %, по сравнению с контролем -  $(88,6 \pm 0,7)$  %,  $p < 0,05$ ; растет количество размороженных гранулоцитарно-макрофагальных клеток-предшественников гемопоэза (КОЕ-ГМ) от  $(77,9 \pm 1,6)$  до  $(143,4 \pm 2,6)$  и  $(91,3 \pm 1,0)$  КОЕ-ГМ на  $1 \cdot 10^5$  ЯСК,  $p < 0,001$ ; уменьшается потеря мононуклеаров - до  $(1,2 \pm 0,4)$  % против  $(3,0 \pm 0,6)$  % - в контрольной группе,  $p < 0,01$ . Также в образцах при применении антиоксидантов снижается активность процессов липопероксидации (по содержанию первичных, вторичных и конечных молекулярных продуктов - в 1,5 - 3,5 раза,  $p < 0,01$ ).

Выводы. Добавление к суспензии ЯСК ПК  $\alpha$ -липовой кислоты отдельно или в смеси с витаминами группы «В» оказывает позитивное воздействие на сохранность клеток, способствует снижению активности перекисного окисления липидов.

Ключевые слова: криоконсервирование, пуповинная кровь, ядродержащие клетки, колониеобразующие единицы гранулоцитарно-макрофагальных клеток - предшественников гемопоэза (КОЕ-ГМ), перекисное окисление липидов.

T. O. Kalynychenko, M. Yu. Anoshyna, V. V. Balan,  
Zh. M. Minchenko, H. T. Hlukhen'ka

### The antioxidant protection of the cryocontained umbilical hemopoietic tissue

SI «Institute of Hematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine»,  
SI «National Research Centre for Radiation Medicine  
of NAMS of Ukraine»

Introduction. The procedures that aimed at long-term storage of umbilical blood reserves are to be improved.

Aim. To preserve the nuclear-containing cells of unfrozen umbilical blood highly intact.

Methods. The cryopreservation of the nuclear-containing cells of unfrozen umbilical blood was performed with 5% Dimethyl sulfoxide including antioxidants-membrane protectors. The morphological, functional, biochemical, statistical research methods were applied.

Results. The cells' morphological and functional safety was found to be significantly improved in case of the antioxidant processing at the stage of the material preparation for cryopreservation. Due to the use of  $\alpha$ -lipoic acid alone or combined with vitamins of group "B" the viability increases up to  $(93.6 \pm 0.7)$ % and  $(94.8 \pm 0.2)$ %, respectively, as compared to the viability of the control group  $(88.6 \pm 0.7)$ %,  $p < 0.05$ ; the number of unfrozen granulocyte-macrophageal hematopoietic cells-progenitors increases from  $77.9 \pm 1.6$  to  $143.4 \pm 2.6$  and  $91.3 \pm 1.0$  of CFU-GM to  $1 \cdot 10^5$  of nuclear-containing cells ( $p < 0.001$ ); the loss of mononuclears decreases up to  $1.2 \pm 0.4$ % vs.  $(3.0 \pm 0.6)$ % in the control group ( $p < 0.01$ ). The lipid peroxidation activity decreases in the samples in case of using antioxidants ( the content of primary, secondary and final molecular products - by 1.5 - 3.5 times,  $p < 0.01$ ).

Conclusion. The addition of  $\alpha$ -lipoic acid alone or in combination with vitamins of group "B"

to the suspension of nuclear-containing cells of unfrozen umbilical blood has a positive impact on the safety of cells, reduces the activity of lipid peroxidation.

Key words: cryopreservation, umbilical blood, nuclear-containing cells, colony-forming units of granulocyte-macrophageal hemopoietic cells-progenitors, lipid peroxidation.

© КОЛЕКТИВ АВТОРІВ, 2013

А.Л. Косаковський, В.В. Сегал, В.О. Шатець, О.П. Мощич

## ВПЛИВ ЦИТОСТАТИКІВ НА СЛИЗОВУ ОБОЛОНКУ НОСА ПРИ ЛІКУВАННІ ОНКОГЕМАТОЛОГІЧНОЇ ПАТОЛОГІЇ У ДІТЕЙ

Національна медична академія післядипломної освіти  
імені П. Л. Шупика

Вступ. У дітей з онкогематологічними захворюваннями, інтактна слизова оболонка носа та біляносових пазух чутлива до дії цитостатиків і є схильною до розвитку мукозиту.

Мета. Визначення частоти мукозитів у хворих з онкогематологічними захворюваннями в дитячому віці та підвищення ефективності їх лікування.

Матеріал та методи. Під нашим спостереженням перебувало 45 пацієнтів онкогематологічного відділення у віці від 6 до 18 років, яким проводилась хіміотерапія. Назальні мукозити різного ступеня виявляються майже у 90% дітей.

Результати. Назальні мукозити різного ступеня вираженості виявлялися у 40(88,9%) дітей, що отримували цитостатичну терапію. З I ступенем назального мукозиту було 18 дітей, з II - 11, з III - 5, з IV - 6. Виникнення мукозиту частіше мало місце у дітей, що отримували тривалий курс хіміотерапії. Лікування назального мукозиту проводили у відповідності до ступеня важкості.

Висновки. За даними наших досліджень, назальний мукозит є частим (88,9%) ускладненням цитостатичної терапії у онкогематологічних хворих. В більшості випадків спостерігався назальний мукозит I (45%) та II (27,5%) ступеня, рідше III (12,5%) та IV (15%) ступеня тяжкості, але завжди існує загроза розвитку спонтанних носових кровотеч, інфекційних, внутрішньочерепних та внутрішньоорбітальних ускладнень. Стан слизової оболонки носа, наявність і важкість мукозиту відіграють важливу роль у виникненні та розвитку носових кровотеч під час проведення хіміотерапії у дітей.

Ключові слова: онкогематологічні захворювання, назальний мукозит, діти, лікування.

### ВСТУП

Здійснення системного медикаментозного лікування при онкогематологічних захворюваннях супроводжується не тільки очікуваним терапевтичним ефектом, а й розвитком небажаних ефектів з боку різних органів і систем. Пов'язано це з відсутністю специфічності дії цитостатиків, що блокують мітотичну активність клітин, однаковою мірою як пухлинних, так і здорових.

Одним з видів ускладнення є розвиток мукозиту - запальної реакції, яка виникає при лікуванні злоякісних пухлин внаслідок ушкодження проліферуючих епітеліальних клітин, найчастіше ротової порожнини та шлунково-кишкового тракту, що призводить до утворення виразок на слизових оболонках та розвитку інфекційних ускладнень [1].