

**Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Российский научно-исследовательский институт  
гематологии и трансфузиологии  
Федерального медико-биологического агентства»**

# **ВЕСТНИК ГЕМАТОЛОГИИ**

## **THE BULLETIN OF HEMATOLOGY**

**Том XII № 3 2016**

Ежеквартальный научно-практический журнал  
Основан в сентябре 2004 года

### **Главный редактор**

Доктор медицинских наук  
профессор  
*С. С. Бессмельцев*

Санкт-Петербург  
2016

## **Редакционная коллегия:**

*С. С. Бессмельцев* (главный редактор)

*А. Н. Богданов; Л. Н. Бубнова; Т. В. Глазанова* (ответственный секретарь);

*С. А. Гусева; А. Ю. Зарицкий; Н. М. Калинина; Л. П. Папаян; В. Г. Радченко;*

*В. И. Ругаль; О. А. Рукавицын; В. Н. Чеботкевич, С. В. Грицаев.*

## **Редакционный совет:**

*Б. В. Афанасьев* (Санкт-Петербург); *В. В. Базарный* (Екатеринбург);

*М. Л. Гершанович* (Санкт-Петербург); *К. Г. Дуткевич* (Санкт-Петербург); *Г. А. Зайцева* (Киров);

*Ю. М. Захаров* (Челябинск); *Л. Г. Ковалева* (Москва); *А. В. Литвинов* (Смоленск);

*В. И. Мазуров* (Санкт-Петербург); *И. В. Поддубная* (Москва); *Т. Н. Поспелова* (Новосибирск);

*А. Г. Румянцев* (Москва); *В. Г. Савченко* (Москва); *Н. Н. Третьяк* (Киев); *Н. П. Шабалов* (Санкт-Петербург).

Зав. редакцией — *Е. Р. Шилова*, тел.: (812) 717-58-57

Ответственный секретарь — *Т. В. Глазанова*, тел.: (812) 717-08-90, факс: (812) 717-20-87

## **Адрес редакции:**

191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д. 16

E-mail: [bloodscience@mail.ru](mailto:bloodscience@mail.ru)

Сайт: [www.bloodscience.ru](http://www.bloodscience.ru)

За содержание рекламных объявлений редакция ответственности не несет.

При перепечатке материалов ссылка на журнал «Вестник гематологии» обязательна.

Мнение членов редакционной коллегии не всегда совпадает с мнением авторов статей.

Обложка и художественное оформление *О. С. Дмитриева*

Компьютерная верстка *О. С. Дмитриева*

---

Журнал зарегистрирован Северо-Западным окружным межрегиональным территориальным управлением по Санкт-Петербургу и Ленинградской области Министерства Российской Федерации по делам печати, телерадиовещания и средствам массовых коммуникаций.

Свидетельство о регистрации ПИ № 2-7271 от 28 мая 2004 г.

Подписано в печать 10.10.2016 г. Формат бумаги 60 × 90 1/8.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Тираж 500 экз. Заказ 306.

Издательство РосНИИГТ, 193024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д. 16.

Отпечатано в ООО «Агентство «ВиТ-принт»», Санкт-Петербург, наб. Обводного канала, д. 23.

**18+**

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<b>Пархоменко Т. В., Михайлова Н. Б., Афанасьев Б. В., Галибин О. В., Томсон В. В.</b> ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСПЛАНТАТА КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПО УРОВНЮ ЕГО ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА.....	4
<b>Шилова Е. Р., Балашова В. А., Кострома И. И., Литвинская Е. В., Потихонова Н. А., Ругаль В. И., Ряднова Г. М., Семенова Н. Ю., Хоршева И. В.</b> КОЛОНИЕОБРАЗУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ГЕМОПОЭЗА У БОЛЬНЫХ АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИЕЙ В ДИНАМИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ.....	14
<b>Исхаков Э. Д., Бахрамов С. М., Нигматова М. С., Султанова У. А., Латипова Н. Р., Кодирова И. Т.</b> ОСОБЕННОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗОВ У ЛИЦ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА .....	19
<b>Костяев А. А., Утёмов С. В., Андреев А. А., Полежаева Т. В., Мартусевич А. К., Исаева Н. В., Шерстнев Ф. С., Ветошкин К. А., Калинина Е. Н., Князев М. Г.</b> АННАЛЫ КРИОБИОЛОГИИ. КЛАССИФИКАЦИИ КРИОПРОТЕКТОРОВ И КРИОКОНСЕРВАНТОВ ДЛЯ КЛЕТОК КРОВИ И КОСТНОГО МОЗГА.....	23
<b>Костяев А. А., Утёмов С. В., Андреев А. А., Полежаева Т. В., Мартусевич А. К., Исаева Н. В.</b> <b>Шерстнев Ф. С., Ветошкин К. А., Калинина Е. Н., Князев М. Г.</b> ЧЕТЫРЕХКЛАСНАЯ СИСТЕМАТИЗАЦИЯ БИОКРИОКОНСЕРВАНТОВ. I класс холодоограждающих растворов — эндоцеллюлярные криоконсерванты.....	28
<b>Костяев А. А., Утёмов С. В., Андреев А. А., Полежаева Т. В., Мартусевич А. К., Исаева Н. В., Шерстнев Ф. С., Ветошкин К. А., Калинина Е. Н., Князев М. Г.</b> ЧЕТЫРЕХКЛАСНАЯ СИСТЕМАТИЗАЦИЯ БИОКРИОКОНСЕРВАНТОВ. II класс холодоограждающих растворов — экзоцеллюлярные криоконсерванты .....	36
Информация.....	40

### ORIGINAL ARTICLE

<b>Parkhomenko T. V., Mikhailova N. B., Afanasyev B. V., Galibin O. V., Tomson V. V.</b> CHARACTERIZATION OF THE TRANSPLANT OF THE BONE MARROW CELLS BY THE LEVEL OF ITS ENERGY POTENTIAL.....	4
<b>Shilova E., Balashova V., Kostroma I., Litvinskaya E. V., Potikhonova N., Rugal V., Ryadnova G., Semenova N., Khorshva I.</b> COLONYFORMING CAPACITY OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS IN PATIENTS WITH APLASTIC ANEMIA IN THE DYNAMICS OF THE DISEASE .....	14
<b>Iskhakov E. D., Bakhrarov S. M., Nigmatova M. S., Latipova N. R., Sultanova U. A., Kodirova I. T.</b> SPECIFIC FEATURES OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA TREATMENT IN OLD AGE PATIENTS.....	19
<b>Kostyaev A. A., Utyomov S. V., Andreev A. A., Polezhaeva T. V., Martusevich A. K., Isaeva N. V., Sherstnyov P. S., Vetoshkin K. A., Kalinina E. N., Knyazev M. G.</b> ANNALS OF CRYOBIOLOGY. CLASSIFICATIONS OF CRYOPROTECTANTS AND CRYOCONSERVANTS FOR BLOOD CELLS AND BONE MARROW .....	23
<b>Kostyaev A. A., Utyomov S. V., Andreev A. A., Polezhaeva T. V., Martusevich A. K., Isaeva N. V., Sherstnyov P. S., Vetoshkin K. A., Kalinina E. N., Knyazev M. G.</b> A FOUR CLASS SYSTEMATIZATION OF BIOCRYOCONSERVANTS. The first class of cold preserving solutions — endocellular cryoprotectants .....	28
<b>Kostyaev A. A., Utyomov S. V., Andreev A. A., Polezhaeva T. V., Martusevich A. K., Isaeva N. V., Sherstnyov P. S., Vetoshkin K. A., Kalinina E. N., Knyazev M. G.</b> A FOUR CLASS SYSTEMATIZATION OF BIOCRYOCONSERVANTS. The II class of cold preserving solutions — exocellular cryoprotectants.....	36
Information .....	40

**Пархоменко Т. В., Михайлова Н. Б., Афанасьев Б. В., Галибин О. В., Томсон В. В.**

ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И. П. Павлова» Минздрава РФ,  
 Научно-исследовательский центр, Санкт-Петербург  
 Институт детской гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой, Санкт-Петербург

**ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСПЛАНТАТА КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА  
 ПО УРОВНЮ ЕГО ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА**

***Parkhomenko T. V., Mikhailova N. B., Afanasyev B. V., Galibin O. V., Tomson V. V.***

State Budget Educational Institution of Higher Professional Education «First Saint-Petersburg State I. P. Pavlov Medical University» Ministry of Health Care of Russian Federation, Scientific research center, Saint-Petersburg  
 R. M. Gorbacheva Scientific Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantology, Saint-Petersburg

**CHARACTERIZATION OF THE TRANSPLANT OF THE BONE MARROW  
 CELLS BY THE LEVEL OF ITS ENERGY POTENTIAL**

**Резюме**

Целью выполненной работы была разработка метода оценки качества трансплантата клеток костного мозга (ККМ) по изменению их энергетического состояния с помощью витального флуоресцентного потенциал-чувствительного зонда иодида 2 [п-(диметиламино)стирил]-1-метилпиридиния (2-Di-1-ASP).

Экспериментальные исследования выполнены на образцах суспензии нативных ККМ 20 доноров в стандартном растворе стабилизатора, которые хранились при комнатной температуре. После перемешивания суспензии клеток из нее отбирали пробы: исходную и через 1, 2, 3, 4, 5, 24, 48, 72 часа хранения, окрашивали с помощью зонда 2-Di-1-ASP и исследовали на люминесцентном микроскопе. Регистрировали величину интенсивности флуоресценции каждой индивидуальной клетки. В каждом препарате измеряли флуоресценцию 70–100 клеток и рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции ККМ ( $\bar{F}$  усл. ед.); определяли количество ядродержащих клеток (NC, %). Для оценки количества клеток с неповрежденными цитоплазматическими мембранами использовали тест с трипановым синим. Наличие митозов в суспензии через 6 и 24 часа хранения показано в мазках ККМ, окрашенных по методу Романовского.

Статистический анализ динамики изменений  $\bar{F}$  и NC в каждом образце осуществляли при помощи дисперсионного анализа зависимых выборок ANOVA Repeated Measures. По всем образцам проведен кластерный анализ (метрика Эвклида, стратегия ближайшего среднего).

**Abstract**

The goal of this study was to develop a method for rapid and adequate assessment for assessing the quality of the graft bone marrow cells (BMC) on the change of their energy state using vital fluorescent potential-sensitive probe iodide 2 [p-(dimethylamino)styryl]-1-methylpyridinium (2-Di-1-ASP).

Experimental studies were performed on samples of native BMC suspension of 20 donors in a standard solution of the stabilizer that were kept at room temperature. After mixing the cell suspension were selected from it: the initial specimen and through 1, 2, 3, 4, 5, 24, 48, 72 — hours storage, stained with a probe 2-Di-1-ASP and examined for the fluorescent microscope. Each specimen was measured by fluorescence 70–100 single cells and mean fluorescence intensity of BMC ( $\bar{F}$ , arb. units) was calculated. In each specimen was determined by the number of nucleated cells (NC, %). Initially, the proportion of cells with intact cytoplasmic membranes in the specimens were 80–92 % (by trypan blue test). The presence of mitoses in the samples of the suspension after 5 and 24 hours storage is shown in smears of BMC, painted by the method Romanovsky. Statistical analysis of the dynamics of changes in  $\bar{F}$  and NC in each sample was performed using analysis of variance dependent selections ANOVA Repeated Measures. For all 20 donors was carried out by cluster analysis (Euclidean metric, strategy nearest middle).

In all specimens, the BMC after 3 hours of storage at room temperature recorded  $\bar{F}$  increase from baseline due to increase in the proportion of cells with fluorescence intensity higher than 100 arb. units ( $N_{F>100}$ ); the degree of this increase cor-

Во всех образцах ККМ через 3 часа хранения при комнатной температуре регистрировался рост  $\bar{F}$ , обусловленный увеличением количества клеток с интенсивностью флуоресценции выше 100 усл. ед. ( $N_{F>100}$ ) по сравнению с исходными значениями, при этом степень этого нарастания коррелировала с увеличением  $N_{F>100}$ . Показано, что чем выше  $N_{F>100}$  через 3 часа хранения, тем больше прирост концентрации ядродержащих клеток в суспензии, который начинался через 5 часов хранения. Этот факт может свидетельствовать о способности исследуемых клеток к делению. При возрастании  $N_{F>100}$  через 3 часа хранения ККМ менее чем в 1,66 раза по сравнению с исходной величиной, концентрация ядродержащих клеток практически не изменялась, что свидетельствовало об утрате способности клеток к делению в данных условиях.

Предложен метод оценки качества трансплантата ККМ с помощью витального флуоресцентного потенциал-чувствительного зонда 2-Di-1-ASP при комнатной температуре в растворе стандартного стабилизатора.

**Ключевые слова:** клетки костного мозга, энергетическая активность, качество трансплантата, витальный флуоресцентный потенциал-чувствительный зонд иодид 2-[п-диметиламино]стирил]-1-метилпиридиния, способность ККМ к делению.

**Введение.** В настоящее время известно, что для оценки пролиферативной активности трансплантата клеток костного мозга (ККМ) и времени их адаптации используется способ определения колониеобразующей способности ККМ, основанный на культивировании их в различных полувязких и полутвердых питательных средах (метилцеллюлоза, коллаген, агар) с обязательным добавлением экзогенных ростовых факторов [1]. Культуральные среды предназначены для поддержания оптимального режима жизнедеятельности изолированных клеток, фрагментов тканей и органов в искусственно создаваемых системах. Однако чаще всего используемые в качестве питательных сред агар и метилцеллюлоза влияют на пролиферацию и дифференцировку ККМ.

Модифицированный метод лимитирующих разведений (LDA) [2], основанный на выращивании гемопоэтических клеток-предшествен-

ников в жидкой среде, позволил исключить влияние агара и метилцеллюлозы на колониобразующую способность и исследовать воздействие фитогемагглютина, гидроспорина, колониестимулирующих факторов, рекомбинантных колониестимулирующих факторов [3], гидрокортизона, и различных цитокинов на гемопоэтические клетки-предшественники [4]. Метод лимитирующих разведений позволяет определять в костном мозге концентрацию полипотентных кроветворных предшественников, изучать их дифференцировку под влиянием гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в более зрелые кроветворные предшественники [5]. Общими недостатками приведённых способов являются: влияние ростовой среды на деление и дифференцировку клеток; методическая сложность и длительность (результаты получают через 7–14 дней).

relates with an increase in  $N_{F>100}$ . It is shown that the higher  $N_{F>100}$  3 hours after storage, the larger the increase in the concentration of nucleated cells in suspension, which started after 5 hours storage, being in accordance with revealed ability of cells to division. With increasing  $N_{F>100}$  through 3 hours storage BMC less than 1,66 times compared with the initial value, the concentration of nucleated cells remained almost unchanged, indicating that the inability of cells to division in these conditions.

Developed and proposed a method for assessing the quality of the graft BMC of using the vital fluorescent potential-sensitive probe 2-Di-1-ASP at room temperature in a solution of a standard stabilizer.

**Key words:** bone marrow cells, energetic activity, the quality of the graft, vital fluorescent potential-sensitive probe, 2-[p-(dimethylamino) styryl]-1-methylpyridinium iodide, the ability of BMC to division.

Популяция костного мозга (КМ) чрезвычайно гетерогенна и содержит большое количество форменных элементов крови и клеток-предшественников разной степени зрелости [6]. Среди клеток-предшественников выделяют стволовые и прогениторные клетки, которые дают начало зрелым клеткам крови — колониеобразующие единицы (КОЕ). Стромальные клетки костного мозга вырабатывают фактор стволовых клеток, который стимулирует пролиферацию и дифференцировку гемопоэтических клеток. Согласно существующей в настоящее время концепции, функциональное состояние живых клеток тесно связано с их энергосопреженными характеристиками (количеством активных митохондрий в цитоплазме, суммарным трансмембранным потенциалом на плазматических и митохондриальных мембранах), за изменениями которых можно следить с помощью потенциал-чувствительных флуоресцентных зондов [7, 8, 9]. Применение методов с использованием флуоресцентных потенциал-чувствительных зондов позволяет исследовать реакцию клеток после воздействия на них различных физико-химических факторов [10–15] и оценить состояние митохондриальных функций и редокс-потенциала клеток КМ [16].

**Целью работы** была разработка метода экспрессной и адекватной оценки качества трансплантата ККМ по изменению его энергетического состояния с помощью витального флуоресцентного потенциал-чувствительного зонда иодида 2[п-(диметиламино)стирил]-1-метилпиридиния (2-Di-1-ASP).

**Задачи:**

1. Разработать оптимальные условия для выявления закономерности между интенсивностью флуоресценции зонда 2-Di-1-ASP, определяющей энергетическую активность ККМ, и их способностью к пролиферации.
2. Исследовать в динамике корреляцию между энергетической и пролиферативной активностью ККМ в процессе хранения.
3. Определить оптимальные характеристики энергетики ККМ, позволяющие адекватно и быстро оценивать их спонтанную способность к делению.

**Материалы и методы**

Объектом исследования служил костный мозг здоровых доноров, взятый для аллоген-

ной трансплантации. Получение суспензии ККМ проводили по опубликованной методике [17]. Полученные клетки помещали в стандартный раствор стабилизатора («Terumo Corporation, Tokyo, Japan», содержащий в 100 мл дистиллированной воды: 2,63 г цитрата натрия; 0,327 г лимонной кислоты; 0,251 г дигидрофосфата натрия; 2,9 г декстрозы безводной; 0,0275 г аденина). Выбор стандартного раствора стабилизатора был обусловлен тем, что входящие в него ингредиенты не содержат ростовых и колониестимулирующих факторов, что позволяет оценить собственную спонтанную способность ККМ к делению. Количество ядросодержащих клеток определяли по известному методу [18], результаты выражали в процентах по отношению к количеству клеток в исходной пробе ( $NC = C / C_{исх} \times 100$ ). Для оценки количества клеток с неповрежденными цитоплазматическими мембранами использовали тест с трипановым синим [19]. Для подсчета числа митозов суспензию клеток хранили при комнатной температуре (контроль). В ряде опытов в параллельные пробы через 1 час после начала хранения добавляли колхицин (ACROS ORGANICS, Бельгия) в конечной концентрации 4,3 мкг/мл и инкубировали в термостате при 37°C. Из суспензии ККМ (контроль и опыт) делали мазки (исходный, через 5, 6, 24 часа хранения), обрабатывали фиксатором по Май-Грюнвальду (Диахим-Гемистейн Май-Грюнвальд, Россия), затем окрашивали азур-эозином по методу Романовского (Диахим-Гемистейн-Романовский, Россия). Микроскопический анализ проводили на световом микроскопе Leica DM 750 (Германия) при увеличении в 1000 раз. Фотосъемку выполняли, используя микроскоп Leica DM 750 и фотокамеру ICC50 (Leica, Германия).

В работе использовали флуоресцентный потенциал-чувствительный витальный зонд катионного типа иодид 2[п-(диметиламино)стирил]-1-метилпиридиния (2-Di-1-ASP). (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR., USA). Ранее авторами этой работы было установлено, что флуоресценция 2-Di-1-ASP чувствительна к изменению энергетического потенциала ККМ [20]. Для работы с зондом суспензию клеток с концентрацией  $(\sim 2-3) \times 10^7$  объемом 0,9–1,0 мл хранили в пробирках типа Эппендорф емкостью 1,5 мл при комнатной температуре в растворе стандартного стабилизатора. Сразу после помещения клеток в пробирку

суспензию перемешивали и отбирали из нее пробы объемом 30,0 мкл: исходную и через 1, 2, 3, 4, 5, 24, 48, 72 часа хранения, помещали их в пробирку типа Эппендорф емкостью 0,6 мл, добавляли раствор 2-Di-1-ASP в конечной концентрации 40,0 мкМ и инкубировали в течение 50–60 мин при 37°C. После инкубации ~3 мкл суспензии клеток исследовали на люминесцентном микроскопе Люмам-И2 (ЛОМО, Россия) при увеличении в 900 раз. Флуоресценцию зонда возбуждали ртутной лампой с длиной волны 405–436 нм. Для регистрации флуоресценции использовали фотометрическую насадку ФМЭЛ-1 и интерференционный фильтр с максимумом пропускания 585 нм. Длина волны возбуждения 470 нм, интенсивность флуоресценции определяли при длине волны 560 нм. Регистрировали величину интенсивности флуоресценции каждой индивидуальной клетки. В каждом препарате измеряли флуоресценцию 70–100 клеток и рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции ККМ ( $\bar{F}$  усл. ед.).

Всего было исследовано в 500 препаратах 9130 клеток. Изученные клетки в каждом препарате разделяли на 4 серии по величине средней интенсивности флуоресценции: I — от 10 до 30 усл. ед.; II — от 30 до 70 усл. ед.; III — от 70 до 100 усл. ед.; IV — от 100 усл. ед. и выше, рассчитывали долю клеток каждой серии. Фотосъемку препаратов клеток, окрашенных зондом 2-Di-1-ASP, выполняли, используя микроскоп Люмам-И2 (ЛОМО, Россия) и фотокамеру ТСА-5,0; программный пакет “Микро-Анализ View” (ООО “ЛОМО-Микросистемы”, Россия).

Статистический анализ динамики изменений  $\bar{F}$  и  $NC$  осуществляли при помощи дисперсионного анализа зависимых выборок ANOVA Repeated Measures [21]. Для всех 20 доноров (500 препаратов) был проведен кластерный анализ (метрика Эвклида, стратегия ближайшего среднего) [22]. Достоверность различий оценивали по критерию Вилкоксона — Манна — Уитни. Различия между группами считали значимыми при  $P < 0,05$ .

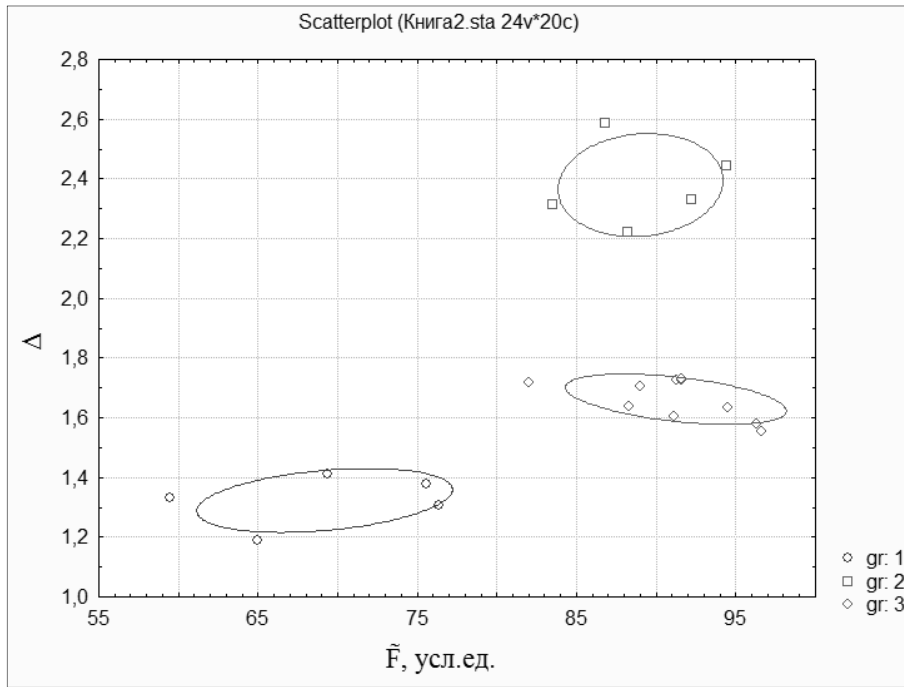
### Результаты и обсуждение

Экспериментальные исследования выполнены на образцах суспензии нативных

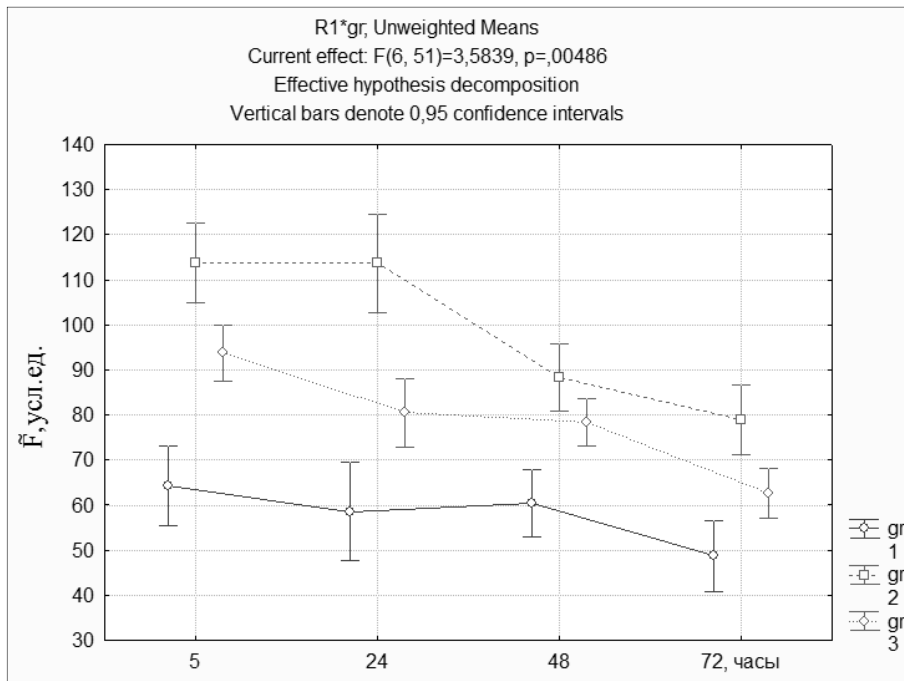
ККМ 20 доноров в стандартном растворе стабилизатора, которые хранились при комнатной температуре. Исходно доля клеток с неповрежденными цитоплазматическими мембранами в образцах составляла 80–92 %. В результате статистической обработки полученных данных было установлено, что через 3 часа хранения наблюдался рост  $\bar{F}$  по сравнению с исходными величинами, обусловленный увеличением доли клеток с интенсивностью флуоресценции выше 100 усл. ед. ( $N_{F>100}$ , %) (Табл. 1).

Было установлено, что отношение  $N_{F>100}$  3ч к  $N_{F>100}$  исх. (D) наиболее информативно отражает изменения, произошедшие с 0 момента до 3 часов, и позволяет предсказать возможные различия в дальнейшей динамике изменений  $\bar{F}$  и  $NC$  в течение исследуемых сроков хранения начиная с 5 часов и далее. Мы предположили, что D является основным параметром, определяющим свойства ККМ. Чтобы выделить однородные группы по D, был проведен кластерный анализ всех образцов ККМ и сформированы 3 группы, значимо различающиеся между собой по  $\Delta$  ( $P < 0,0001$ ), что иллюстрирует Рис. 1. В группе первого типа через 3 часа хранения регистрировались минимальные степени нарастания  $\bar{F}$  и  $N_{F>100}$  (Табл. 1, рис. 4). В группе второго типа — максимальные степени нарастания  $\bar{F}$  и  $N_{F>100}$ . В третьей группе оказались образцы, степени нарастания  $\bar{F}$  и  $N_{F>100}$  которых через 3 часа хранения были промежуточными между 1 и 3 типами.

После этого анализировалось состояние  $\bar{F}$  и  $NC$  в каждой группе, начиная с 5 часов хранения. Для исследования динамики изменений  $\bar{F}$  и  $NC$  использовался метод дисперсионного анализа ANOVA для повторных измерений, где в качестве главного эффекта рассматривался фактор группы. У всех 20 доноров обнаружена статистически значимая динамика  $\bar{F}$  ( $P = 0,0048$ ) и  $NC$  ( $P < 0,0001$ ) (Рис. 2, 3). Также существует значимая динамика различий между группами: для  $\bar{F}$   $P = 0,0048$ , для  $NC$   $P < 0,0001$ . Таким образом, результаты дисперсионного анализа подтвердили правомочность разделения всех исследованных образцов ККМ на 3 группы.

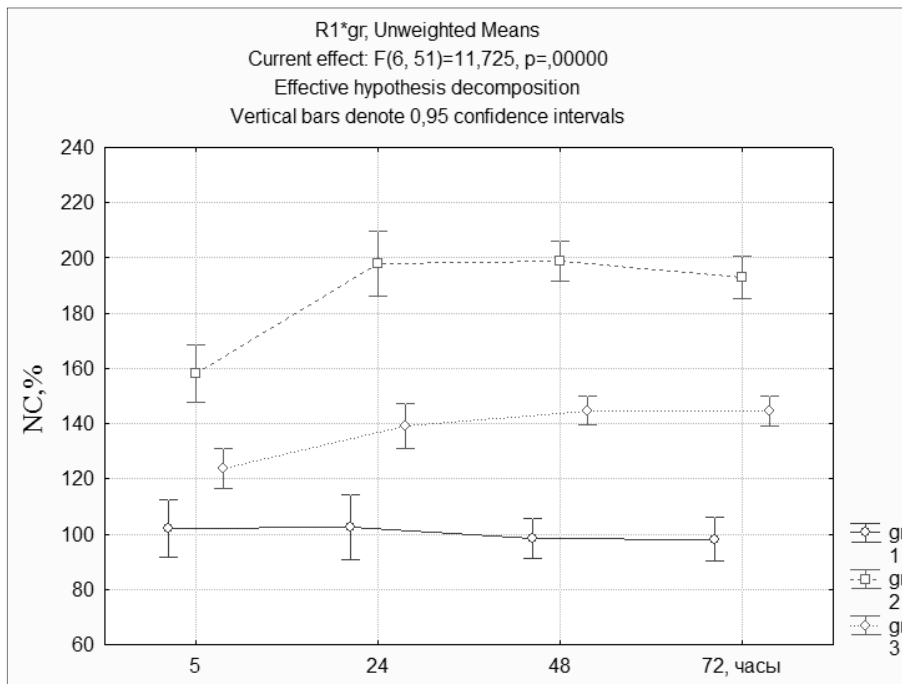


**Рис. 1.** Распределение по группам зависимости  $D$  от исходной интенсивности флуоресценции ( $\tilde{F}$  усл. ед. исх.) для 20 доноров. Примечание: по оси абсцисс отложены средние величины исходной флуоресценции ( $\tilde{F}$  усл. ед. исх.) каждого донора; по оси ординат —  $D$  (отношение  $N_{F>100}^{3ч}$  и  $N_{F>100}^{исх.}$ ). Группа 1 — минимальные степени нарастания  $\tilde{F}$  и  $N_{F>100}$  через 3 часа хранения; группа 2 — максимальные степени нарастания  $\tilde{F}$  и  $N_{F>100}$ ; группа 3 — промежуточные степени нарастания  $\tilde{F}$  и  $N_{F>100}$  между 1 и 3 типами.

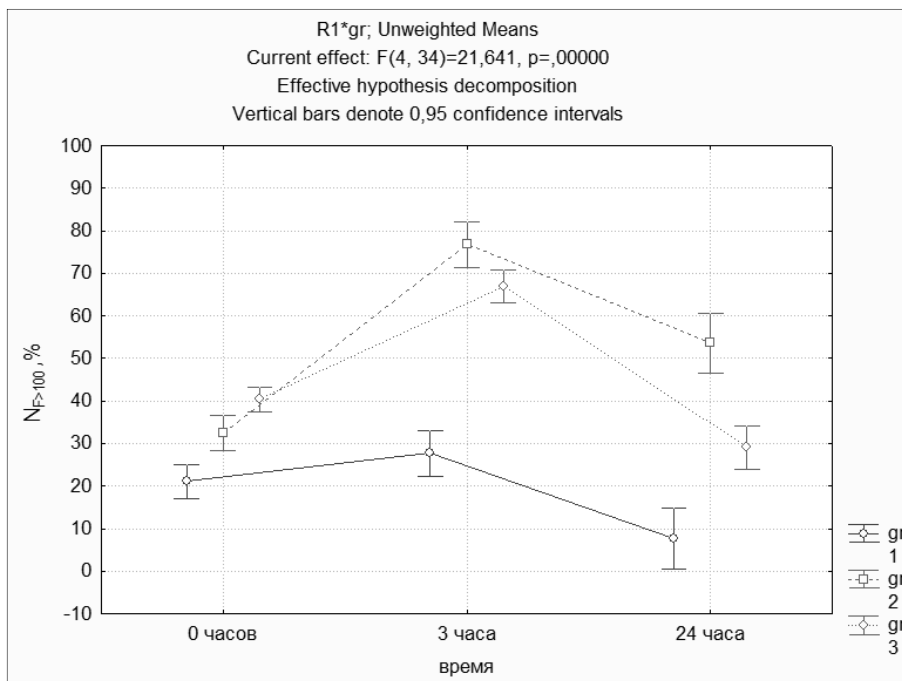


**Рис. 2.** Изменение интенсивности флуоресценции ( $\tilde{F}$  усл. ед.) ККМ в процессе хранения. Примечание: по оси абсцисс отложено время хранения в часах, по оси ординат — средние величины ( $\tilde{F}$  усл. ед.) флуоресценции для каждой временной точки по всем измеренным клеткам каждого донора. Группа 1- минимальные степени нарастания  $\tilde{F}$  и  $N_{F>100}$  через 3 часа хранения; группа 2 — максимальные степени нарастания  $\tilde{F}$  и  $N_{F>100}$ ; группа 3 — промежуточные степени нарастания  $\tilde{F}$  и  $N_{F>100}$  между 1 и 3 типами.





**Рис. 3.** Изменение количества ядросодержащих клеток (NC, %) ККМ в процессе хранения. Примечание: по оси абсцисс отложено время хранения в часах, по оси ординат — количество ядросодержащих клеток (NC, %) для каждой временной точки по всем измеренным клеткам каждого донора. Группа 1- минимальные степени нарастания  $\tilde{F}$  и  $N_{F>100}$  через 3 часа хранения; группа 2 — максимальные степени нарастания  $\tilde{F}$  и  $N_{F>100}$ ; группа 3 — промежуточные степени нарастания  $\tilde{F}$  и  $N_{F>100}$  между 1 и 3 типами.



**Рис. 4.** Изменение количества клеток с интенсивностью флуоресценции выше 100 усл. ед. ( $N_{F>100}$  %) в процессе хранения. Примечание: по оси абсцисс отложено время хранения в часах, по оси ординат-  $N_{F>100}$  %. Группа 1- минимальные степени нарастания  $\tilde{F}$  и  $N_{F>100}$  через 3 часа хранения; группа 2 — максимальные степени нарастания  $\tilde{F}$  и  $N_{F>100}$ ; группа 3 — промежуточные степени нарастания  $\tilde{F}$  и  $N_{F>100}$  между 1 и 3 типами.

Усредненные исследуемые показатели ККМ в исходных пробах и через 3 часа хранения для 3-х групп доноров.

Группа	параметр	Исх.	3 часа	p
1	$\bar{F}$ усл. ед	69,99 ± 2,63	79,61 ± 2,50	0,043
1	$N_{F>100}$ %	21,07 ± 2,17	27,7 ± 2,67	0,043 1,31
1	NC, %	100,00	100,18 ± 0,06	0,067
2	$\bar{F}$ усл. ед	89,04 ± 1,93	147,74 ± 8,71	0,043
2	$N_{F>100}$ %	32,44 ± 1,83	76,73 ± 2,51	0,043 2,36
2	NC, %	100,00	118,60 ± 2,29	0,043
3	$\bar{F}$ усл. ед	91,22 ± 1,40	122,27 ± 2,63	0,005
3	$N_{F>100}$ %	40,39 ± 1,31	66,97 ± 1,74	0,005 1,66
3	NC, %	100,00	102,5 ± 0,62	0,0076

**Примечание:**  $\bar{F}$  усл. ед. — средние величины флуоресценции в данных временных точках по всем измеренным клеткам доноров 1, 2 и 3 групп;  $N_{F>100}$  % — усредненные величины количества клеток с интенсивностью флуоресценции выше 100 усл. ед. по каждой группе доноров; NC, % — средние величины количества ядродержащих клеток в каждой группе доноров. Для каждой временной точки приведена величина среднего ( $M$ ) и ошибка среднего ( $m$ ).

Из таблицы 1 видно, что в группе 1 через 3 часа  $N_{F>100}$  возрастает в среднем в 1,31 раза, в группе 2 — в 2,36 раза, в группе 3 — в 1,66 раза по сравнению с исходными величинами. Нарастание NC наблюдалось в группах 2 и 3, где через 3 часа регистрировалось увеличение  $N_{F>100}$  не менее чем в 1,66 раз.

В результате проведенных исследований было установлено, что во всех образцах ККМ через 3 часа хранения при комнатной температуре регистрировался рост  $\bar{F}$ , обусловленный увеличением количества клеток с интенсивностью флуоресценции выше 100 усл. ед. ( $N_{F>100}$ ) по сравнению с исходными значениями, при этом степень этого нарастания коррелировала с увеличением  $N_{F>100}$ . Показано, что чем выше  $N_{F>100}$  через 3 часа хранения,

тем больше прирост концентрации ядродержащих клеток в суспензии. Этот факт может свидетельствовать о способности исследуемых клеток к делению. При возрастании  $N_{F>100}$  через 3 часа хранения ККМ менее чем в 1,66 раза по сравнению с исходной величиной, концентрация ядродержащих клеток практически не изменялась, что свидетельствовало об утрате способности клеток к делению в данных условиях.

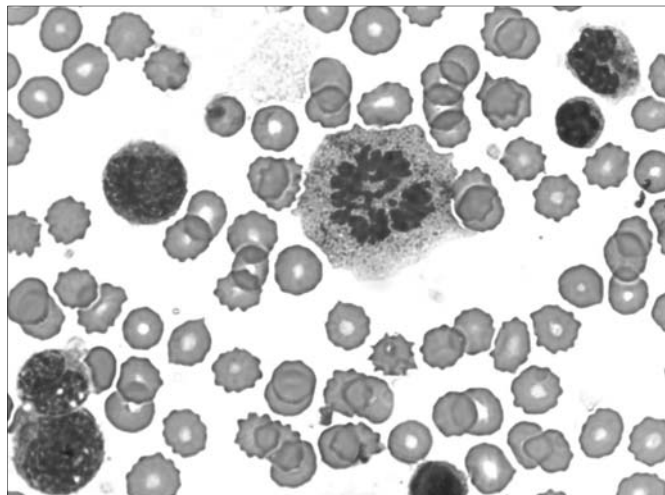
Сохранность клеток при выбранных условиях хранения продемонстрирована с помощью стандартных кариологических методов. В частности, в суспензиях КМ на протяжении нескольких часов хранения выявлялись делящиеся клетки, окрашенные зондом 2-Di-1-ASP (Рис. 5).



Рис. 5. ККМ донора в процессе хранения (5 час).

Интенсивность флуоресценции 110 усл. ед.; деление клеток. Окрашивание зондом 2-Di-1-ASP.

Обнаружено наличие митозов в образцах ККМ доноров в группах 2 и 3, окрашенных по методу Романовского (рис. 6). Число метафазных форм в исходных пробах:  $0,60 \pm 0,10$  %; в контроле через 5 часов хранения:  $1,4 \pm 0,1$  %; в опыте (инкубация с колхицином при  $37^\circ\text{C}$  через 6 часов хранения):  $1,8 \pm 0,1$  %.



**Рис. 6.** Митозы ККМ донора в процессе хранения через 5 часов (митоз в нейтрофильном гранулоцитарном ряду). Окрашивание по методу Романовского.

В публикации 2005г авторами (Lioznov M. V., et.al.) обсуждался вопрос стабильности трансплантатов ККМ и стволовых клеток, выделенных из периферической крови (ПСК) при различных температурных режимах. По данным этих авторов, ККМ и ПСК могут сохраняться в течение нескольких дней при  $+4^\circ\text{C}$  без значительного снижения способности к воспроизведению. В противоположность этому, при комнатной температуре в образцах ПСК трансплантата число грануло-макрофагальных КОЕ составляло через 48 часов менее 20 % от исходного, в то время как КОЕ в трансплантатах КМ оставалось неизменным в течение 72 часов. Наблюдаемые различия в стабильности стволовых клеток из различных источников могут быть вызваны несколькими причинами, например, присутствием в трансплантате

КМ поддерживающих стромальных клеток и/или увеличенной метаболической активностью подвижных клеток по сравнению с КМ клетками [23]. По нашим данным, в процессе хранения в 15 образцах КМ было отмечено увеличение числа кариоцитов через 5–24 часа и далее сохранялось практически неизменным до 72 часов при комнатной температуре. Можно предположить, что клетки КМ при комнатной температуре и в отсутствии питательных веществ в стабилизирующей среде сохраняли жизнеспособность. Остаточная энергетическая активность клеток КМ через 72 часа указывает на наличие в суспензии КМ жизнеспособных клеток. Более подробные данные о жизнеспособности ККМ при хранении в течение 48 и 72 часов мы предполагаем получить в результате дальнейшего исследования.

Использование предлагаемого метода с применением витального флуоресцентного потенциал-чувствительного зонда иодида 2[п-(диметиламино)стирил]-1-метилпиридиния (2-Di-1-ASP) позволило:

1. Установить факт энергетической активации суспензии ККМ по росту флуоресценции по сравнению с исходной во всех исследованных образцах через 3 часа хранения;
2. Исследовать в динамике и найти корреляцию между флуоресценцией ККМ и их способностью к пролиферации в процессе хранения;
3. Найти корреляцию между ростом флуоресценции и увеличением количества клеток с  $N_{F>100}$ , а также между количеством клеток с  $N_{F>100}$  и пролиферативной активностью ККМ;
4. Подтвердить в опытах с использованием колхицина наличие реализованной митотической активности в ККМ, приводящей к пролиферации клеток, энергетическая активность которых выявлена с помощью зонда 2-Di-1-ASP.

Выяснение механизма энергетической активации ККМ через 3 часа хранения и их стабильности в течение 72 часов при комнатной температуре требуют проведения дальнейших исследований.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. *C. Nissen-Druey, A. Tichelli, S. Meyer-Monard.* Human Hematopoietic Colonies in Health and Disease. // *Acta Haematologica* (ISSN0001-5792). 2005. Vol.113. № 1. P. 5-96.
2. *Takaue Y., Reading C.L., Roome A.J., Dicke K.A., Tindle S., Chandran, M., Devaraj B.* Limiting-Dilution Analysis of the Effects of Colony-Stimulating Factors, Phytohemagglutinin, and Hydrocortisone on Hematopoietic Progenitor Cell Growth // *Blood*. 1987. Vol. 70. № 5. P 1611-1618.
3. *Takaue Y., Reading C.L., Watanabe T. et.al.* Cell-mediated suppression of human hematopoiesis: evaluation by limiting-dilution analysis of hematopoietic progenitors // *American Journal of Hematology*. 1989. Vol. 32. № 3. P. 205-211.
4. *Ventura G.J., Hester J.P., Buescher E.S., Vadhan-Raj S., Durrett A., Reading C.L.* // Hematopoiesis in limiting dilution cultures: influence of cytokines on human hematopoietic progenitor cells. *Experimental Hematology*. 1990. Vol. 18. № 8. P. 878-882.
5. *Дыгай А. М., Скурихин Е. Г., Першина О. В., Андреева Т. В., Хмелевская Е. С., Минакова М. Ю.* // Роль кроветворных предшественников разных классов в механизмах действия гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на кроветворение при цитостатической миелосупрессии. 2010. Том. 149. С. 400-404.
6. *Воробьев А. И., Дризе Н. И., Чертков И. Л.* Схема кроветворения. Пробл. Гематологии. 1995. Том. 1. № 1. С. 7-14.
7. *Добрецов Г.Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М., Наука, 1989. 277 С.
8. *Vida T.A., Emr S.D.* A new vital stain visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *Journ. of Cell Biol.* 1995. Vol. 228. № .5. P. 779-792.
9. *Пархоменко Т.В., Михайлова Н.Б., Афанасьев Б.В., Галибин О.В., Томсон В.В.* RU № 2537141, опубл. 27.12.2014, Бюлл. № 36.
10. *Wandelt B., Mielniczak A., Turkewitsch P., Darling G.D., Stranix B.R.* Substituted 4-[4-(dimethylamino)styryl]pyridinium salt as a fluorescent probe for cell microviscosity // *Biosensors and Bioelectronics*. 2003. Vol. 18. P. 465-471.
11. *Parkhomenko T. V., Morozova G. I., Klytsenko O. A., Tomson V. V.* Evaluation of restoring Erythropoietin (EPO) effect on rat T-lymphocytes after their treatment with some inhibitors in vitro // *Annals of Hematology*. 2003. Vol. 82. № 6. S. 114.
12. *Parkhomenko T. V., Klytsenko O. A., Tomson V. V.* Erythropoietin stimulates aerobic and anaerobic processes in rat cardiomyocytes // *Focus uni-luebeck. Supplement*. 2012. P. 37
13. *Артюхов В. Г., Путинцева О. В., Брагина В. А., Пашков М. В., Василенко Д. В.* Флуоресцентные методы в исследовании УФ — индуцированных изменений структурно-функционального состояния лимфоцитов крови человека // *Бюлл. эксперим. биологии и медицины*. 2012. Том. 153. № 6. С. 891-895;
14. *Морозова Г.И., Пархоменко Т.В., Клыценко О.А., Томсон В.В.* Стимулирующее влияние эритропоетина на энергетику тимоцитов, выявляемое in vitro по флуоресценции потенциал-чувствительного зонда в митохондриях. *Биологические мембраны*. 2007, Т. 24, № 6, С. 472-478;
15. *Пархоменко Т.В., Михайлова Н. Б., Афанасьев Б. В., Галибин О. В., Томсон В. В.* Оценка состояния клеток костного мозга по изменению интенсивности свечения флуоресцентного потенциал-чувствительного зонда иодид 2-[п-(диметиламино)стирил]-1-метилпиридиния // *Клинико-лабораторный Консилиум*. 2014. Том. 48. № 1. С. 88-93].
16. *Kaur A, Jankowska K, Pilgrim C, Fraser ST, New EJ.* Studies of Hematopoietic Cell Differentiation with a Ratiometric and Reversible Sensor of Mitochondrial Reactive Oxygen Species // *Antioxid. Redox Signal*. 2016. Vol. 24. № 13. P. 667-679.
17. *Фрегатова Л. М., Зубаровская Л. С., Эстрина М. А., Головачёва А. А., Бабенко Е. В., Платонова Г. Г., Зуева Е. Е., Афанасьев Б. В.* Методы получения стволовых клеток у больных и доноров для их последующей трансплантации // *СПб, Изд. СПбГМУ, кафедра гематологии, трансфузиологии, трансплантологии ФПО*. 2004. 36 С.

## **ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ**

---

18. Клиническая лабораторная аналитика, том 2. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. Под общей редакцией *Меньшикова В. В.*, М., «Лабинформ», РАМЛД, 1999.
19. *Phelan M. C.* Basic techniques for mammalian cell tissue culture // *Current Protocols in Cell Biology*. 0:1.1.1–1.1.10. 1998.
20. *Пархоменко Т. В., Галибин О. В., Михайлова Н. Б., Бабенко Е. В., Томсон В. В.* RU № 2488826, опубл. 27.07.2013, Бюлл. № 21.
21. *Афифи А., Эйзен С.* Статистический анализ: подход с использованием ЭВМ. Под ред. Башарина Г. П. М.: Мир. 1982. 488 С.
22. *Алексеева Н. П.* Анализ медико-биологических систем. Реципрокность, эргодичность, синонимия. СПб: Изд-во С. — Петерб. Ун-та. 2012. 184 С.
23. *Lioznov M. V., Freiburger P., Kroger N., Zander A. R., Fehse B.* Aldehyde dehydrogenase activity as a marker for the quality of hematopoietic stem cell transplants // *Bone Marrow Transplantation*. 2005. Vol. 35. № 9. P. 909–914.

### **Благодарность:**

Авторы приносят искреннюю благодарность  
*Людмиле А. Беяковой* (ст. научн. сотр. Лаборатории биомедицинской статистики отдела Фармакоэпидемиологии и биомедицинской статистики Института Фармакологии им. А. В. Вальдмана. ГБОУ ВПО ПСПб ГМУ им. акад. И. П. Павлова Минздрава России) за проведение статистического анализа полученных результатов.

*Шилова Е. Р., Балашова В. А., Кострома И. И., Литвинская Е. В., Потихонова Н. А., Ругаль В. И., Ряднова Г. М., Семенова Н. Ю., Хоршева И. В.*

ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России», Санкт-Петербург

**КОЛОНИЕОБРАЗУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ГЕМОПОЭЗА У БОЛЬНЫХ АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИЕЙ В ДИНАМИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

*Shilova E., Balashova V., Kostroma I., Litvinskaya E. V., Potikhonova N., Rugal V., Ryadnova G., Semenova N., Khorsheva I.*

State Organization "Russian Scientific Research Institute of Hematology and Transfusiology FMBA of Russia", St. Petersburg

**COLONYFORMING CAPACITY OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS IN PATIENTS WITH APLASTIC ANEMIA IN THE DYNAMICS OF THE DISEASE**

**Ключевые слова:** апластическая анемия, колониобразующая способность, гемопоэтические стволовые клетки, иммуносупрессивная терапия

**Резюме.** Одним из патогенетических механизмов развития апластической анемии (АА) считается патология гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), характеризующаяся снижением их пролиферативного потенциала. Нами проанализированы результаты культуральных исследований ГСК костного мозга 41 больного АА: 29 с тяжёлой формой АА (ТАА) и 12 с нетяжёлой (НАА). Для оценки колониобразующей способности (КОС) клеток-предшественников гемопоэза больных АА, как показателя пролиферативного потенциала ГСК, применялся метод культивирования клеток костного мозга в полной среде MethoCult H4435 на основе метилцеллюлозы. Исследования проводились на различных стадиях заболевания, в том числе у 12 больных при первичном обследовании с последующими исследованиями на стадии ремиссии и в случае рецидива. На стадии частичной ремиссии (ЧР) обследовано 22 пациента, полной (ПР) — 12 больных.

**Результаты исследования** показали значительные колебания показателей КОС на всех стадиях. Для первичных больных характерным было значительное снижение КОС до полного отсутствия колоний в культуре, что отмечено у 10 пациентов (83%). Однако у 2 пациентов имелись показатели, соответствующие пределам нормальных колебаний. При положительных результатах иммуносупрессивной терапии (ИСТ) показатели КОС

**Key words:** aplastic anemia, colonyforming capacity, hematopoietic stem cells, immunosuppressive therapy

**Summary.** Data about colonyforming capacity (CFC) of hematopoietic stem cells in patients with aplastic anemia (AA) depending on stage of disease and results of immunosuppressive therapy have been shown. Total surveyed 41 patients with AA. Research showed lowering of CFC of hematopoietic stem cells or absence of colonies in the initial stage. After successful immunosuppressive therapy CFC usually improved. The results showed that recovery of CFC may be evidence of effective therapy. At the same time significantly reduced CFC in remission may indicate an increased risk of relapse.

увеличивались и приближались к нормальным значениям в ремиссии. При развитии рецидива закономерно наблюдалось повторное снижение показателей, хотя и менее выраженное, чем исходно. Относительная сохранность КОС в начальном периоде заболевания не всегда свидетельствовала о лучшем прогнозе в отношении ИСТ, что может быть связано с особенностями патогенеза заболевания, отличными от общей группы. Получен-

ные нами данные позволяют говорить о том, что восстановление исходно сниженной КОС при становлении ремиссии может быть свидетельством адекватности проводимой ИСТ.

**Введение.** Апластическая анемия — тяжёлое заболевание кроветворной системы, которое характеризуется панцитопенией в периферической крови и гипоклеточным костным мозгом. Основные положения современной концепции патогенеза АА, сформулированные ещё в 70-х годах прошлого века и дополненные данными последующих научных исследований, позволяют говорить о патогенезе АА, как о патологическом процессе, обусловленном нарушением иммунной регуляции кроветворения, что послужило основой для успешного использования средств иммуносупрессивной терапии (ИСТ) у данной категории больных [1, 2, 3, 4]. В то же время не исключается и важная роль нарушения состояния стромального микроокружения гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), а также патология самих ГСК со снижением их пролиферативного потенциала. Изучение особенностей состояния костномозговых клеток больных АА показало целый ряд нарушений. В частности, отмечено укорочение теломеразных участков, снижение экспрессии GATA-2 протеина, что может приводить к нарушению процессов пролиферации и преждевременной гибели костномозговых клеток [1, 2, 4, 5]. Имеются свидетельства сниженной чувствительности гемопоэтических клеток к регуляторным воздействиям [1, 2, 4, 6]. В результате таких нарушений и под воздействием неблагоприятных патогенетических факторов у большинства больных АА способность ГСК к образованию колоний в культуре, отражающая их функциональную активность, значительно снижена [1, 2, 6, 7, 8]. Показатели колониеобразующей способности (КОС) гемопоэтических клеток-предшественников могут служить определённым критерием, отражающим пролиферативный потенциал кроветворных клеток при АА.

Большинство исследователей отмечает гетерогенность группы пациентов с данной патологией и вероятность того, что у больных с неудовлетворительными результатами стандартной ИСТ механизмы развития заболевания отличаются от обычных, и ведущим фактором является иммунное повреждение кроветворения. Соответственно, для выбора адекватной терапии и прогнозирования

эффективности использования различных методов лечения важным является более глубокое понимание особенностей патогенеза АА, базирующееся на дальнейшем изучении особенностей нарушения кроветворения, динамики показателей в ходе терапии.

**Цель работы.** Оценить функциональную активность ГСК больных АА на различных стадиях заболевания путём культуральных исследований с определением КОС клеток-предшественников в динамике течения заболевания и под влиянием ИСТ.

**Материалы и методы.** Была исследована КОС костномозговых клеток 41 больного АА: с тяжёлой формой АА (ТАА) 29 больных, с нетяжёлой (НАА) — 12 больных. Степень тяжести заболевания определялась в соответствии с международной классификацией, с использованием так называемых модифицированных критериев Camitta [2, 4, 8].

Пациенты обследовались на различных стадиях заболевания, в том числе 12 больных на стадии установления диагноза с повторными исследованиями в динамике при проведении стандартной ИСТ, на стадии ремиссии и в случае рецидива. Обследование остальных 29 больных проведено уже в ходе начатой терапии или на стадии ремиссии с повторными исследованиями с интервалами от 3 до 9 месяцев. Всего на стадии ЧР обследовано 22 пациента, в состоянии ПР — 12 больных. При определении полной и частичной ремиссии (ПР и ЧР) использовались критерии Европейской группы экспертов [2, 9, 10].

Для оценки КОС клеток-предшественников гемопоэза больных АА, как показателя пролиферативного потенциала ГСК, применялся общепринятый метод культивирования клеток костного мозга в полной среде MethoCult H4435 на основе метилцеллюлозы [8].

**Результаты исследования** показали значительные колебания показателей на всех стадиях. Исследования в группе первичных больных показали значительное снижение показателей КОС у 10 пациентов (83 %): от полного отсутствия или единичных колоний до 6 агрегатов на  $1,5 \times 10^5$  клеток у 8 пациентов, у 2 больных ТАА показатели составили 39 и 49 колоний на  $1,5 \times 10^5$  клеток при средних показателях в группе здоровых лиц 174 на  $1,5 \times 10^5$  клеток (колебания в пределах 95–275) [8]. Обращали на себя внимание 2 пациентки с исходными показателями 220

и 273 на  $1,5 \times 10^5$ . Основные показатели гемограмм, миелограмм, трепанобиоптатов у данных пациентов существенно не отличались от показателей в основной группе и соответствовали критериям НАА. В результате проведенной ИСТ у обеих больных получены ремиссии, в том числе ПР у одной. Особенностью течения заболевания у данных пациентов были нестойкие результаты лечения, что потребовало проведения повторных курсов ИСТ. Одна больная обследована повторно в стадиях ремиссии и рецидива. Отмечено сохранение КОС в пределах нормальных колебаний (95–147 на  $1,5 \times 10^5$  клеток) во всех проведенных исследованиях.

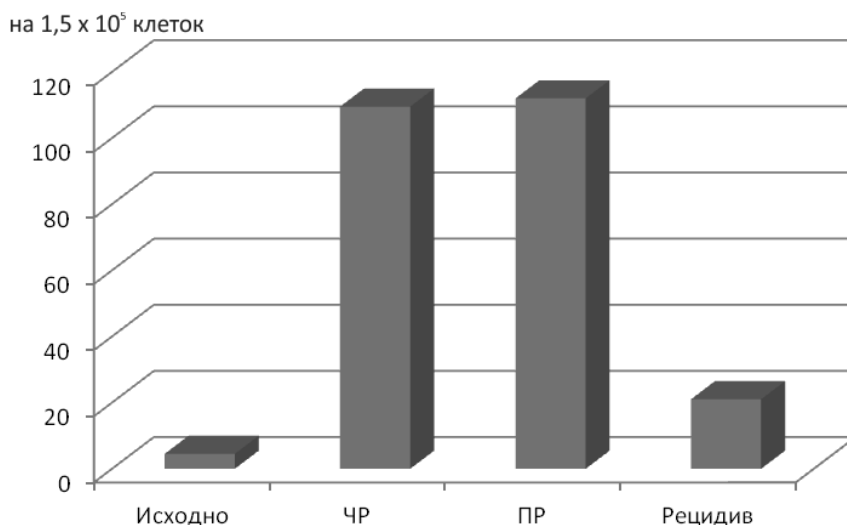
Имелись определённые различия в показателях первичных больных ТАА и НАА. Для больных ТАА, безусловно, характерно более значимое снижение показателей КОС. Так, медиана КОС для больных ТАА составила 3 на  $1,5 \times 10^5$  клеток, а для больных НАА — 113 на  $1,5 \times 10^5$  клеток. Однако малочисленность групп не даёт возможности достоверно оценить различия и сделать окончательные выводы.

Достоверными были различия между показателями КОС при первичном обследовании и на стадии ремиссии. При становлении ремиссии отмечено значительное улучшение показателей и приближение их к нормальным цифрам у абсолютного большинства обследованных.

Колебания показателей КОС, как в группе больных с ТАА, так и НАА в стадии ремиссии были крайне разнородными и составили от 9 до 404 на  $1,5 \times 10^5$  клеток: от 1 до 265 агрегатов у больных с ЧР. Медиана показателей при ЧР составила 109,5 на  $1,5 \times 10^5$  клеток, а при ПР — 114 на  $1,5 \times 10^5$  клеток. Данные различия статистически достоверными не были.

При развитии рецидива закономерно наблюдалось повторное снижение показателей, хотя и менее выраженное, чем исходное снижение. Медиана КОС в группе больных с рецидивом составила 21 на  $1,5 \times 10^5$  клеток.

Данные по КОС обследованных больных АА в зависимости от стадии заболевания представлены на рисунке 1.



**Рисунок 1.** Колониеобразующая способность клеток-предшественников гемопоэза у больных апластической анемией в зависимости от стадии заболевания.

Оценить прогностическую значимость показателей КОС ГСК больных АА в отношении результатов ИСТ по данным первичного обследования не имелось возможности. Сложности оценки связаны с определённой селекцией группы первично обследованных больных из-за невозможности проведения исследования у части пациентов в силу низ-

кой клеточности костномозгового пунктата, а также с учётом недостаточно большого числа исследований при становлении ремиссии и в связи с широким диапазоном колебаний полученных данных. Тем не менее, анализ показателей КОС больных, которым исследования проведены в динамике заболевания (14 больных), позволил выявить определён-

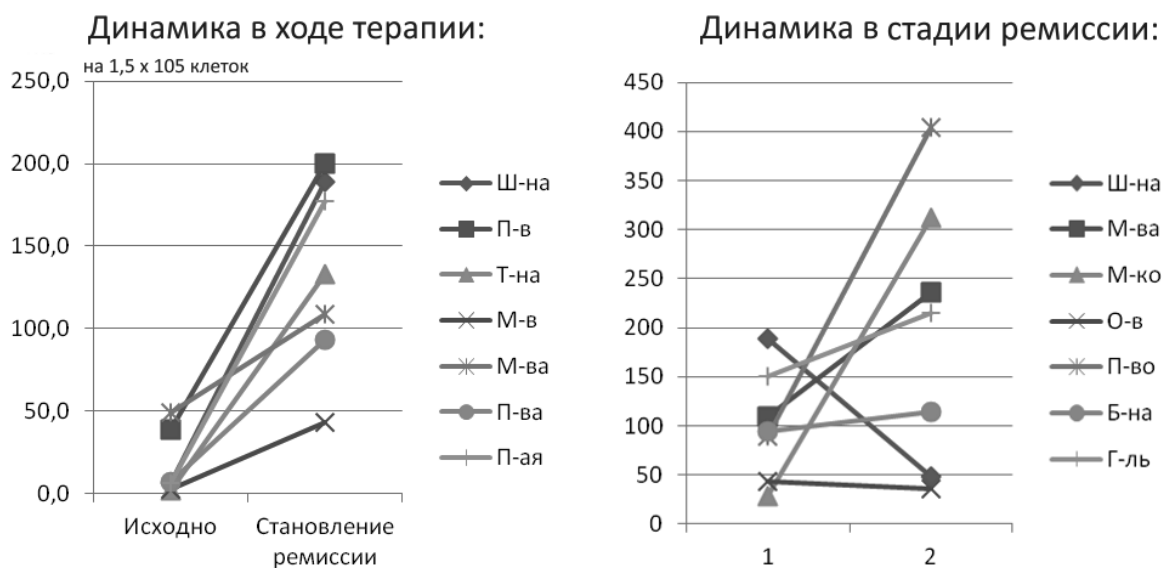


ные закономерности изменений и их связь с результативностью ИСТ.

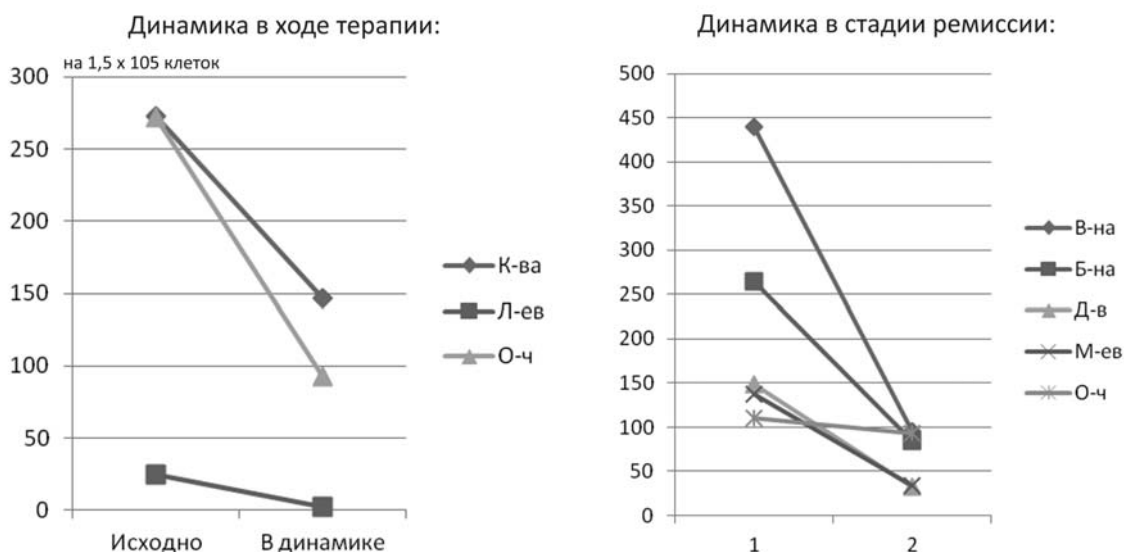
Так, для больных с хорошими результатами терапии в виде стойких частичных ремиссий с переходом в полные, было характерно поэтапное нарастание показателей КОС с сохранением тенденции по достижении ЧР. В то же время у больных с неудовлетворительными результатами ИСТ с неполными и нестойкими ремиссиями была типична тенденция к снижению КОС. Эта тенденция проявлялась у пациентов с исходно близкими к норме по-

казателями на начальных этапах терапии и у части пациентов с ремиссиями при проведении обследований в динамике. Причём у ряда больных с полученной клинико-гематологической ремиссией снижение КОС было предвестником ухудшения гематологических показателей и наступления рецидивов.

Сравнительные данные по изменению показателей КОС клеток-предшественников гемопоэза в группе больных с хорошим и недостаточным эффектом ИСТ представлены на рисунках 2 и 3.



**Рисунок 2.** Динамика показателей КОС у больных со стойкими ремиссиями.



**Рисунок 3.** Динамика показателей КОС у больных с недостаточным эффектом ИСТ.

**Выводы.** Разнородность показателей, немногочисленность групп и сложность сравнения данных в зависимости от других патогенетических факторов не дают возможности сделать окончательные выводы в отношении изменений пролиферативного потенциала ГСК при АА. Тем не менее, отмечены определённые тенденции, отражающие изменение способности ГСК к колониеобразованию в данной группе больных. Патология ГСК проявляется характерным для данной категории больных снижением КОС клеток предшественников гемопоэза. Результаты представленных исследований показали резкое снижение КОС в начале заболевания у абсолютного большинства больных АА. В динамике заболевания под воздействием ИСТ показатели КОС клеток эритроидного и гранулоцитарного ростка увеличивались и приближались к нормальным показателям в ремиссии. В то же время, полученные результаты подтверждают биологическую неоднородность больных АА. Причём от-

носительная сохранность КОС в начальном периоде заболевания не всегда свидетельствует о лучшем прогнозе в отношении ИСТ. По-видимому, пациентам с такими вариантами АА необходимо более глубокое обследование, включая молекулярно-генетические исследования, поскольку данные особенности течения заболевания могут быть связаны с патогенетическими механизмами АА, отличными от обычной группы больных.

Исходя из анализа полученных нами данных, имеется возможность использования методики определения КОС, как дополнительного прогностического фактора при проведении этапных обследований в ходе ИСТ. Так, восстановление исходно сниженной КОС при становлении ремиссии может быть свидетельством адекватности проводимой ИСТ. Сохранение же значительно сниженных показателей может служить дополнительным показанием к проведению более интенсивной иммуносупрессии или же к рассмотрению вопроса о трансплантации ГСК.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Абдулкадыров К.М., Бессмельцев С. С.* Апластическая анемия. — СПб.: Изд-во «Наука»; «Издательство КН», 1995. — 232 с.
2. *Кулагин А. Д., Лисуков И. А., Козлов В. А.* Апластическая анемия: иммунопатогенез, клиника, диагностика, лечение — Новосибирск: Наука, 2008. — 236 с.
3. *Guinan E. C.* Diagnosis and management of aplastic anemia: ASH Education Book. — 2011. — P. 76–81.
4. *Young N. S.* Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia: ASH Education Book. — 2013. — № 1. — P. 76–81.
5. Association of telomere length of peripheral blood leukocytes with hematopoietic relapse, malignant transformation, and survival in severe aplastic anemia/P. Scheinberg, J. N. Cooper, E. M. Sloand et al.//JAMA. — 2010. — Vol. 304. — P. 1358–1364.
6. *Балашова В. А., Бессмельцев С. С., Шилова Е. Р., Абдулкадыров К. М.* //Колониеобразующая способность клеток-предшественниц грануломоноцитопоэза в условиях аплазии костного мозга. Морфология. — 1994. — № 7–12. — С. 14–22.
7. *Yong N. S., Maciejewski J.* The Pathophysiology of Acquired Aplastic Anemia// N. Engl. J. Med. — 1997. — Vol. 336. — P. 1365–1372.
8. *Nissen-Druey C., Tichelli A., Meyer-Monard S.* Human hematopoietic colonies in health and disease// Acta Haematol. — 2005. — Vol. 113, № 1. — P. 5–96.
9. *Marsh J. C., Ball S. E., Cavenagh J.* et al. Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia //Br. J. Haematology. — 2009. — Vol. 147. — P. 43–70.
10. Комплексная программа диагностики апластической анемии с определением прогностически значимых патогенетических особенностей заболевания: Метод. рек. — СПб., Агентство «ВиТ-принт», 2015. — 32 с.

*Исхаков Э. Д., Бахрамов С. М., Нигматова М. С., Султанова У. А.,  
Латипова Н. Р., Кодирова И. Т.*

*Научно-исследовательский институт Гематологии и переливания крови МЗ Республики Узбекистан.*

**ОСОБЕННОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗОВ  
У ЛИЦ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА**

*Iskhakov E. D., Bakhramov S. M., Nigmatova M. S., Latipova N. R.,  
Sultanova U. A., Kodirova I. T.*

**SPECIFIC FEATURES OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA TREATMENT  
IN OLD AGE PATIENTS**

**Резюме.** В статье представлен пятилетний опыт лечения 26 пациентов пожилого возраста с острыми миелоидными лейкозами в Научно-исследовательском институте гематологии и переливания крови Республики Узбекистан. Показано, что из 6 пациентов в возрасте 60–69 лет, получавших терапию по протоколу «5 + 2», 4 (66.6 %) достигли полной ремиссии. Медиана безрецидивной выживаемости составила  $25 \pm 13$  месяцев. В подгруппе из 9 пациентов в возрасте 60–69 лет с отягощенным коморбидным статусом, получавших малые дозы цитарабина (10 мг/м<sup>2</sup> два раза в день в течение 28 дней), 4 (44.4 %) человека достигли полной ремиссии. Медиана безрецидивной выживаемости составила  $60 \pm 48$  месяцев. У 6 (54.5 %) из 11 пациентов старше 70 лет, получавших малые дозы цитарабина (28 дней), была достигнута полная ремиссия. Медиана безрецидивной выживаемости составила  $13 \pm 7.5$  месяцев. Лечение пациентов пожилого и старшего возраста с одной стороны, представляло затруднения вследствие тяжелого соматического статуса, множества сопутствующих заболеваний, высокой частоты развития первичной резистентности к терапии, а с другой стороны, у части пациентов могла быть достигнута длительная безрецидивная выживаемость. Пожилой возраст пациента не должен являться причиной отказа в назначении цитостатической терапии.

**Ключевые слова.** Острый миелоидный лейкоз, лица пожилого возраста.

**Abstract.** The article describes a five-year experience of the Research institute of Hematology and Blood transfusion of the Republic of Uzbekistan on treatment in 26 old age patients with acute myeloid leukemia. In this investigation was shown that from 6 patients at the age of 60–69 years who received therapy according to protocol “5 + 2”, 4 (66.6 %) patients has been achieved complete remission. Median disease-free survival was  $25 \pm 13$  month. In the subgroup of 9 patients with hard comorbid status of the age 60–69 who received small doses of cytarabine (10mg/m<sup>2</sup> twice per day 28 days), in 4 (44.4 %) patients there was achieved complete remission. Median disease-free survival was  $60 \pm 48$  month. In 6 (54.5 %) of 11 patients of 70 years and older who treated with small doses of cytarabine (28 days) the remission was achieved. Median disease-free survival was  $13 \pm 7.5$  month. Treatment of the patients of aged and senile age, on one hand, appeared to be a difficult task due to severe somatic status, multiple accompanying diseases, high frequency of primary resistance to treatment, and on the other hand, in the part of patients there may be achieved long-term overall and relapse-free survival. The old age of the patient should not be reason for refusal from performance of cytostatic therapy.

**Key words.** Acute myeloid leukemia, old age patients.

**Введение.** К последним достижениям гематологии неоспоримо относятся большие успехи в лечении острых лейкозов у детей и молодых взрослых. Результаты же лечения их у лиц пожилого и старческого возраста остаются пока весьма скромными. Как показывает мировой опыт, пятилетняя безрецидивная выживаемость пациентов с острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ) старше 60 лет составляет не более 10–13 % [1]. Причиной этого, по мнению многих авторов, является большая частота встречаемости у таких больных неблагоприятных в прогностическом плане цитогенетических и молекулярно-генетических перестроек, частая встречаемость гена полилекарственной резистентности (MDR-gene, multi-drug resistance gene) [2]. Кроме этого, в пожилом возрасте возрастает серьезный коморбидный фон (сахарный диабет, кардиальная патология и др.), не дающий возможность проводить более агрессивные методы цитостатического воздействия на опухолевый клон. На сегодняшний день отсутствуют оптимальные рекомендации и унифицированные протоколы лечения острых лейкозов у пожилых больных. Вопрос, как лечить пациентов старше 80 лет, остается открытым и спорным.

При отдельных рандомизированных многоцентровых исследованиях получены неоднозначные результаты в зависимости от агрессивности лечения ОМЛ у лиц пожилого возраста. Так, по данным ГНЦ РАМН (Троицкая В. В. и соавт. 2012 г.) [3] при проведении 3-х курсов «7 + 3» (Цитарабин 100 мг/м<sup>2</sup> × 2 р/сут. 1–7 дни, Даунорубицин 45 мг/м<sup>2</sup> 1–3 дни) с дальнейшим проведением поддерживающего лечения у больных в возрасте 60–69 лет, частота достижения ремиссии составила 50 %, индукционная летальность — 25 %, первичная резистентность — 25 %. Пациентам старше 70 лет проводилась терапия малыми дозами цитарабина (Цитарабин 10 мг/м<sup>2</sup> × 2 р/сут. подкожно 21–28 дней). При этом частота достижения первичной ремиссии составила 12.5 %, ранняя летальность — 12.5 %, первичная резистентность была констатирована у 75 % больных. Общая 3-х летняя выживаемость больных в возрасте 60–69 лет и старше 70 лет составила 11 и 8 % соответственно.

Несмотря на столь малооптимистическое положение в лечении пожилых пациентов с ОМЛ, нами проанализированы результаты

лечения острых миелоидных лейкозов пожилых пациентов, получавших лечение в клиниках НИИ гематологии и переливания крови МЗ Республики Узбекистана.

**Цель исследования** — изучение частоты достижения первичной ремиссии, анализ длительности общей и безрецидивной выживаемости, отработка тактики лечения пациентов старше 60 лет с различными нозологическими подформами острых миелоидных лейкозов.

**Материалы и методы.** Анализ клинико-лабораторных данных проведен у 26 пациентов с острыми миелоидными лейкозами старше 60 лет (16 женщин и 10 мужчин), проходивших лечение в период с 2010 по 2015 гг. в клиниках НИИ гематологии и переливания крови. Медиана возраста составила 68 лет (60–78 лет), 57.7 % больных (n = 15) были в возрасте 60–69 лет и 42.3 % (n = 11) — в возрасте 70 и старше. По нозологическим подформам ОМЛ, вариант М1–2 (по FAB-классификации) был выявлен у 38.4 % (n = 10) больных, М3-вариант — 11.5 % (n = 3), М4 и М5-вариант у 42.3 % (n = 11), и М7-вариант — у 7.6 % (n = 2).

Четверым из 15 пациентов в возрасте 60–69 лет без тяжелого коморбидного фона проводилось 4 курса по протоколу «5 + 2» (цитарабин 200 мг/м<sup>2</sup> в виде круглосуточного введения 1–5 дни, даунорубицин в редуцированной дозе 30 мг/м<sup>2</sup>, 1,2 дни). Двоим из них, конкретно, пациентам с острым промиелоцитарным лейкозом (М3-вариант ОМЛ), параллельно с протоколом «5 + 2» проводилась пероральная терапия третиноином («Vesanoid») в дозе 45 мг/м<sup>2</sup> в течение 30 суток.

Остальным 20 пациентам в возрасте 60–69 лет с тяжелыми сопутствующими заболеваниями (гипертоническая болезнь, коронарная недостаточность, сахарный диабет и др.), а также пациентам в возрасте 70 и более лет проводились курсы монокимиотерапии малыми дозами цитарабина (МДЦ) в дозе 10 мг/м<sup>2</sup> × 2 раза в сутки подкожно, 21–28 дней с перерывом 21 и 28 дней соответственно. Следует отметить, что при проведении монотерапии малыми дозами цитарабина, в случае развития лейкопении без инфекционных осложнений, химиотерапия не прерывалась и доводилась до конца протокола. В зависимости от наличия тех или иных сопутствующих хронических заболеваний, параллельно с противоопухолевой химиотерапией, прово-

дилась кардио-, нефро-, гепатопротективная терапия, антиангинальная, гипотензивная, сахароснижающая терапия.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Результаты лечения представлены в таблице 1.

Таблица 1.

**Результаты эффективности дифференцированного лечения пациентов с различными формами ОМЛ старше 60 лет. (2010–2015 гг.) (n=26).**

	60–69 лет (n=15)		
	«5+2» (n=6) (Без отягощенной коморбидности)	МДЦ (n=9) (С отягощенной коморбидностью)	70 лет и старше (n=11) МДЦ
Достижение ремиссии	n = 4 (66.6%) (из них 2 с М3-вариантом)	n = 4 (44.4%)	n = 6 (54.5%)
Индукционная летальность	n = 1 (16.6%)	n = 1 (11.1%)	n = 2 (18.1%)
Смерть в ремиссии	n = 1 (16.6%)	-	n = 1 (9.0%)
Первичная резистентность	n = 1 (16.6%)	n = 4 (44.4%)	n = 3 (27.2%)

Как видно из представленных в таблице данных, в подгруппе из 6 пациентов в возрасте 60–69 лет, получавших терапию по протоколу «5+2», у 4-х удалось достичь ремиссии заболевания. К сожалению, 1 пациентка с М3- вариантом ОМЛ скончалась в период ремиссии (через 12 мес. после ее достижения) от геморрагического инсульта. У остальных 3-х пациентов ремиссия длилась 18, 26, и 38 месяцев соответственно, медиана  $25 \pm 13$  мес. Один пациент скончался в период индукции ремиссии, у 1 пациентки (М5-вариант ОМЛ) было констатировано резистентное течение заболевания.

В подгруппе из 9 пациентов в возрасте 60–69 лет, получавших малые дозы цитарабина, у 4-х пациентов была достигнута ремиссия заболевания. Длительность ремиссии составила 12, 36, 60 и 108 мес. соответственно, медиана  $60 \pm 48$  мес. У 1 пациентки в период индукции ремиссии развился септический шок, приведший к смерти больной. У 4-х (с М4 и М5 вариантом ОМЛ) пациентов констатирована первичная резистентность заболевания.

Из 11 пациентов в возрасте 70 лет и старше у 6-ти (все без инициального лейкоцитоза, с М1 и М2 вариантом ОМЛ) на фоне терапии малыми дозами цитарабина (28 дней) удалось достичь ремиссии заболевания. Один из них умер в период полной ремиссии от острого инфаркта миокарда. У остальных 5 пациентов длительность ремиссии составила 6, 9, 14, 16 и 21 мес. соответственно, медиана

$13 \pm 7.5$  мес. Двое скончались в период достижения ремиссии от септических осложнений. У 3-х (все с М4 и М5 вариантом ОМЛ, с инициальным лейкоцитозом) лечение оказалось неэффективным.

В большинстве случаев индукционное и последующее лечение осложнялось развитием цитопенического синдрома, требовавшего проведения полноценной сопроводительной терапии — гемокомпонентной терапии, поэтапной антибактериальной терапии. Длительность аплазии кроветворения при проведении индукционной терапии по протоколу «5+2» варьировала от 11 до 21 дней, в среднем составляя 14 дней, период консолидации — в среднем 11 дней. При проведении химиотерапии малыми дозами цитарабина в период индукции длительность миелотоксической аплазии кроветворения варьировала от 9 до 18 дней, в среднем 12 дней.

**Заключение.** Таким образом, лечение пациентов пожилого и старческого возраста, с одной стороны является трудной задачей, из-за тяжелого соматического статуса, многочисленных сопутствующих заболеваний, высокой частоты первичной резистентности к лечению, а с другой стороны, у части больных может быть достигнута как длительная безрецидивная, так и общая выживаемость. Пожилой возраст пациента не должен быть поводом в отказе в проведении цитостатической терапии.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. *Goldstone A. H., Burnett A. K. et al.* Attempts to improve outcomes in acute myeloid leukemia (AML) in older patients: the results of the United Kingdom Medical Research Council AML 11 trial. *Blood* 2001;98:1302–1311.
2. *Buchner T, Hiddeman W, Shoch C. et al.* Acute myeloid leukemia (AML): treatment of the older patients. *Best Pract Res Clin Hematol* 2001;14:139–151.
3. *Troitskaya V, Parovichnikova E, Isaev V. et al.* Age may be a treatment stratification criteria in the elderly acute myeloid leukemia patients. // *Acute leucemias XIII: Biology and treatment strategies*. Munich, Germany, 2011. *Ann Hematol* 2011; 90 (Suppl 1): 18.

**Посвящается памяти Е. П. Сведенцова (1932–2012 гг.) — доктора медицинских наук, профессора, заслуженного врача РФ, заслуженного деятеля науки и образования, академика Академии Естествознания РФ, основателя научной школы по криофизиологии крови и трансфузионной криобиологии, автора Руководств по общей, производственной и клинической трансфузионной медицине.**

**Костяев А. А.<sup>1</sup>, Утёмов С. В.<sup>1</sup>, Андреев А. А.<sup>1</sup>, Полежаева Т. В.<sup>2</sup>, Мартусевич А. К.<sup>3</sup>,  
Исаева Н. В.<sup>1</sup>, Шерстнев Ф. С.<sup>1</sup>, Ветошкин К. А.<sup>1</sup>, Калинина Е. Н.<sup>1</sup>, Князев М. Г.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Сыктывкар

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кировская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Киров

## **АННАЛЫ КРИОБИОЛОГИИ. КЛАССИФИКАЦИИ КРИОПРОТЕКТОРОВ И КРИОКОНСЕРВАНТОВ ДЛЯ КЛЕТОК КРОВИ И КОСТНОГО МОЗГА**

**Kostyaev A. A.<sup>1</sup>, Utyomov S. V.<sup>1</sup>, Andreev A. A.<sup>1</sup>, Polezhaeva T. V.<sup>2</sup>, Martusevich A. K.<sup>3</sup>,  
Isaeva N. V.<sup>1</sup>, Sherstnyov P. S.<sup>1</sup>, Vetoshkin K. A.<sup>1</sup>, Kalinina E. N.<sup>1</sup>, Knyazev M. G.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Federal State Budget institution of Science «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency», Kirov

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Institute of Physiology of the Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar

<sup>3</sup> Federal State Budgetary Institution of Higher Professional Education «Kirov State Medical Academy» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Kirov

## **ANNALS OF CRYOBIOLOGY. CLASSIFICATIONS OF CRYOPROTECTANTS AND CRYOCONSERVANTS FOR BLOOD CELLS AND BONE MARROW**

**Резюме.** Рассмотрены физико-химические, биологические, токсико-фармакологические и криозащитные свойства известных и новых в криобиологии криопротекторов и гемоконсервантов на их основе для клеток крови и костного мозга. Освещены некоторые аспекты механизма их действия на клетки и предъявляемые к антифризам требования. Описано применение криоконсервантов в практике низкотемпературного консервирования различных биологических объектов.

**Ключевые слова:** анналы, криобиология, криопротекторы, криоконсерванты, классификации.

**Summary.** The physicochemical, biological, toxicological, pharmacological and cryoprotective properties of known and new in cryobiology cryoprotectants and gemoconservants are examined. Some aspects of their mechanism of action on cells are shown. The use of cryoconservants in the experiment and the low temperature preservation of different biological objects is described.

**Key words:** annals, cryobiology, cryoprotectants, cryoconservants, classifications.

**Введение.** В ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства» с 1976 г. активно разрабатываются методы экспериментальной и клинической трансфузионной криобиологии. Под руководством Е. П. Сведенцова учениками его научной школы были разработаны новые криопротекторы и криоконсерванты на их основе для живых клеток, достигнуты серьезные успехи в длительном сохранении в замороженном виде в биологически полноценном состоянии клеточных суспензий компонентов крови и костного мозга. Из-

учены результаты применения трансфузий размороженных эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитных концентратов, а также трансплантаций аутологичных и аллогенных гемопоэтических стволовых клеток при лечении гемобластозов, сепсиса, некоторых солидных опухолей и других патологий. Подтверждены выводы отечественных и зарубежных исследователей, о том, что, наряду с положительными защитными свойствами, используемые в клинике криоконсерванты проявляют побочное токсическое действие на клеточном и организменном уровне [1–3]. Поэтому одним из нерешенных вопросов в трансфузи-

онной криобиологии является создание, изучение и использование новых нетоксичных или малотоксичных клеточных антифризов. Важная роль в научном поиске оптимального метода криоконсервации компонентов крови и костного мозга отводится систематизации накопленных в мировой криобиологии теоретических сведений о криопротекторах и криоконсервантах.

**Целью настоящей работы** явилось ознакомление специалистов биологических и медицинских учреждений с историческими вехами развития науки о криопротекторах и криоконсервантах на их основе для длительного сохранения компонентов крови и костного мозга, применяемых с лечебной целью.

**Материалы и методы.** Проанализирована отечественная и зарубежная литература по различным аспектам криоконсервирования клеток крови и костного мозга.

Проблема сохранения в замороженном состоянии эритроцитарной массы (ЭМ), эритроцитарной взвеси (ЭВ), лейкоконцентрата (КЛ), тромбоконцентрата (КТ), гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и ядерных клеток костного мозга (ЯККМ) является одной из актуальных задач современной трансфузионной криобиологии. Основоположителем криобиологии и учения о криопротекторах — защитных веществах, способных предотвращать развитие терминальных криоповреждений в живых биосистемах на этапах их низкотемпературного консервирования, является Н. А. Максимов. Ученому принадлежит приоритет в выявлении криозащитного свойства в отношении живых клеток у многоатомного спирта глицерина [4]. Первая трансфузия размороженных клеток крови с лечебной целью была осуществлена Моллисоном и Словитером в 1951 г. [5].

В многостороннем глубоком изучении вопросов адаптации клеточных суспензий растительного и животного мира к гипотермии преуспели ученые Харьковского Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, в котором активно сотрудничают теоретики-экспериментаторы, химики, криофизиологи, криобиологи, криоинженеры, токсикологи, фармакологи, трансфузиологи и другие специалисты. В работах ученых ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России, выполненных на высоком международном уровне совместно с Харьковскими кри-

обиологами, показано, что криопротекторы и криоконсерванты на их основе уменьшают интенсивность адаптационного процесса, снижают уровень клеточного метаболизма, делают клетки менее восприимчивыми к криоповреждениям [6]. Основная масса поврежденных клеточных структур на этапах холодной адаптации-замораживания-отогревания КДК и ЯККМ связана с обезвоживанием, образованием вне- и внутриклеточных кристаллов льда, а также токсичностью криопротекторов.

К настоящему времени в качестве перспективных криопротекторов апробировано больше 120 веществ, принадлежащих к разным классам химических соединений. Это **спирты** (метанол, этанол, этиленгликоль, пропиленгликоль, диэтиленгликоль, глицерин, манит, сорбит и др.), **альдегиды, амины, аминокислоты и их амиды** (диметилацетамид, мочевины и др.), **оксиды** (диметилсульфоксид и др.), **углеводы** (глюкоза, лактоза, сахароза и др.), **искусственные полимеры** (поливинилпирролидон, оксиэтилированный крахмал, полиэтиленоксид и др.), **неорганические соли** (натрий хлористый, калий хлористый, кальций хлористый, натрий фосфорнокислый одно-, двух- и трехзамещенный, динатриевая соль ЭДТА и др. [3, 4].

В изучении известных и синтезе новых криопротекторов и криоконсервантов на их основе очень важен выбор рабочей классификации разрабатываемых химических соединений. В историческом плане следует отметить работу J. Lovelock [7], который одним из первых предложил различать криопротекторы по способности проникать через плазматическую мембрану клетки. Автор выделил эндоцеллюлярные криопротекторы, проникающие в клетки (КПК), и экзоцеллюлярные криопротекторы, не проникающие в клетки (КНК).

Н. С. Пушкарь и соавт. [8] добавили к двум названным третью группу — криопротекторы смешанного действия (КСД), проявляющие одновременно эффекты КПК и КНК.

Н. Магуман [9] уточнил, что эффектом КПК из низкомолекулярных обладают глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО), диметилацетамид (ДМАЦ), α-пропиленгликоль (1,2-ПД), этиленгликоль (ЭГ) и др., у которых молекулярная масса (м. м.) до 101. Активными КНК являются вещества с м. м. выше 101: поливинилпирролидон (ПВП), гидроксипропилоккрахмал



(ГЭК), полиэтиленгликоль (ПЭГ) и углеводы.

Эффективные КСД имеют м. м. 400 и выше. Это полиэтиленоксид (ПЭО с м. м. 400), гексаметиленгидроксиэтилмочевина (ГМБТОЭМ с м. м. 378), оксиэтилированный глицерин с м. м. до 1400. ПЭО-400 имеет в составе мономерные фракции как эндо-, так и экзоцеллюлярного действия. Причем, основная масса полимера не проникает через плазматическую мембрану внутрь клетки [4, 8]. В работах подчеркнута зависимость сохранности клеток от скорости проникновения криопротектора внутрь биообъекта, молекулярной массы (чаще понижается с увеличением м. м.) и видовой принадлежности клеток [10].

Для систематизации имеющихся многокомпонентных хладоограждающих растворов, а также создающихся новых криофилактиков с реставрирующими добавками Е. П. Сведенцов предложил оригинальную классификацию гемоконсервантов, разделенную на четыре класса [3], в которых учитываются устоявшиеся названия криопротекторов и их свойства, описанные и обоснованные J. Lovelock [7], Н. С. Пушкарем и соавт. [8], Н. Meryman [9] и другими исследователями. Обращают внимание отличия от известных классификаций криоконсервантов по характеру состава, количеству и, особенно, по классу комбинированных криоконсервантов, выделенных в IV класс:

I класс криоконсервантов включает эндоцеллюлярные криоконсерванты; по числу криопротекторов в составе криоконсерванта: монокриоконсерванты — содержат по одному эндоцеллюлярному криопротектору и бикриоконсерванты — содержат по два эндоцеллюлярных криопротектора;

II класс криоконсервантов образуют экзоцеллюлярные криоконсерванты; монокриоконсерванты — содержат по одному экзоцеллюлярному криопротектору; бикриоконсерванты — содержат по два экзоцеллюлярных криопротектора;

III класс криоконсервантов образован криоконсервантами смешанного действия; монокриоконсерванты — содержат по одному криопротектору смешанного действия; бикриоконсерванты — содержат по два криопротектора смешанного действия;

IV класс криоконсервантов включает комбинированные криоконсерванты, в т. ч.: бикомбинированные криоконсерванты эндо- и экзоцеллюлярного действия — содержат

два криопротектора I и II классов; бикомбинированные криоконсерванты эндоцеллюлярного и смешанного действия — содержат два криопротектора I и III классов.

Во всех классах криоконсервантов могут быть использованы одна-две и больше «улучшающих» добавок.

Обращает на себя внимание то, что криопротекторы разной химической природы не имеют определенных границ по молекулярной массе и уровню токсичности (табл. 1) [3, 4]. Как показали исследования, высокая хладоограждающая активность обнаруживается как у низкомолекулярных (этиленгликоля с м. м. 62; ДМСО с м. м. 78, 13; глицерина с м. м. 92,1), так и у высокомолекулярных химических веществ (ГЭК с м. м. 250 000–500 000, ПЭГ с м. м. 1500).

Токсичность криопротекторов характеризуется показателями их общей токсичности — токсичности на организменном уровне, и цитотоксичности — токсичности на клеточном уровне. Токсичность веществ оценивается среднеталетальной дозой ( $LD_{50}$ , г/кг), при введении которой погибает 50 % подопытных животных [3, 4]. Значительной токсичностью обладают «сильные» эндоцеллюлярные криопротекторы (КПК). В несколько раз меньше токсичность у КСД. Очень слабую токсичность проявляют КНК. Практика показывает, что методические приемы определения общей и цитотоксичности требуют совершенствования. В криобиологии принято сравнивать токсичность криопротекторов по выявленной  $LD_{50}$  у белых лабораторных мышей. В то же время, токсичность КПК уменьшается с увеличением их молекулярной массы [3, 4]. Далее, теряя свойства КПК, химические соединения переходят в класс КНК. Так, например, происходит с производными глицерина монометилглицерином и диметилглицерином. А. А. Цуцаева и соавт. [4], а также другие исследователи [3, 6, 10] считают, что все криопротекторы, за исключением ПЭО-400–500 и ГМБТОЭМ-380, в зависимости от условий экспозиции в клеточной суспензии способны оказывать токсическое действие на организм и требуют удаления из клеточной суспензии перед введением ее в организм субъекта. Данная технология затратна, а также снижает морфологическую и биологическую полноценность трансфузионной среды.

Новым направлением в совершенствовании методов криоконсервирования КДК

и ЯККМ стали исследования по созданию многокомпонентных сред, в рецепты которых, наряду с криопротекторами, вводятся «реставрирующие» добавки: углеводы, белки плазмы, биологически активные соединения, соли и другие вещества с целью поддержания

энергетического обмена в размороженных клетках, уменьшения токсичности, других побочных воздействий, а также содействия репаративным процессам в клеточной суспензии после замораживания-отогревания [3, 4].

Таблица 1.

**Свойства криопротекторов  
с выраженным хладоограждающим действием на КДК и ЯККМ**

Криопротектор	М. м.	ЛД <sub>50</sub> , г/кг	Авторы	Компонент крови или ЯККМ
Этиленгликоль (КПК)	62	Низкая на клеточном и выраженная на организменном уровне	P.Bautron at al. [1979]	КЭ
Пропиленгликоль или 1,2-ПД (КПК)	76,1	13,1	В. М. Гучок [1981]	КЭ
Глицерин (КПК)	92,1	4,57±0,14	К. С. Anderson at al. [1950]	КЭ, ГСК
ДМСО (КПК)	78,13	3,8±0,1	М. J. Ashwood-Smith [1961]	КТ, КЛ, ГСК
ДМАЦ (КПК)	87	4,2 (2,5–3,9)	А. А. Цуцаева и соавт. [1983]	КТ, КЛ, ГСК
Декстраны	40–60 тыс.	Не исследовано	А. М. Белоус и соавт. [1979]	КЭ и др.
Гидроксиэтилкрахмал (ГЭК)	60–120 тыс.	Не исследовано	А. М. Белоус и соавт. [1979]	КЭ, КЛ, ГСК
ПЭО-400 (КСД) ПЭО-1500	400	12,5	В. М. Гучок [1977, 1980, 1981]	ГСК, КЭ
Поливинилпирроли-дон (ПВП) Гемодез (КНК)	12–25 тыс 12 тыс.	Не исследовано Не исследовано	М. D. Persidsky [1966] Г. Т. Черненко [1999] С. С. Лаврик [1964–1975], П. М. Перехристенко и соавт. [1998]	КЭ, ГСК
ГМБТОЭМ (КСД)	378	15,5±0,6	Е. П. Сведенцов [1987, 2010]	ГСК, КТ, КЛ

Благодаря успехам, достигнутым в исследовании механизмов криозащиты КДК и ЯККМ, получили развитие трансфузии размороженных аутологичных, сингенных и аллогенных ГСК, КЭ и КТ с лечебной целью [1, 2, 3]. Наряду с положительными результатами трансфузий криоконсервированных КДК и ЯККМ, описаны случаи токсичного воздействия такого вида гемотерапии на организм реципиентов [10]. Накопленный научный и практический опыт по криоконсервированию КДК и ГСК показывает, что до настоящего времени остается открытым вопрос о поиске нетоксичного хладоограждающего вещества, не дающего опасных для здоровья реципиентов побочных эффектов [3, 6].

Вопрос о том, какими свойствами должен обладать эффективный криопротектор, до сих пор не имеет исчерпывающей оценки,

хотя некоторые из этих свойств известны [3]. В том числе:

- обладать способностью предупреждать развитие летальных криоповреждений форменных элементов, обеспечивать их сохранность в жизнеспособном состоянии после замораживания-отогревания и биологическую полноценность;
- быть нетоксичным, не требующим отмывания от размороженных клеток;
- хорошо растворяться в воде и стабилизировать молекулы воды;
- эффективно снижать количество вымораживаемой воды, способствовать образованию мелких кристаллов и стеклованию вне- и внутриклеточной воды;
- не откладываться (накапливаться) в клетках, тканях и органах макроорганизма;

- |  |  |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>— быстро выводиться из организма;</li><li>— не вызывать разрушения клеточных мембран и органелл;</li><li>— не приводить к развитию побочных эффектов: сенсibilизации, аллергии, гипертермии, не изменять функцию эндокринной системы и репродуктивных органов;</li><li>— не должны иметь неприятного запаха, не вызывать рвоту, не приводить к диарее;</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>— участвовать в метаболических процессах жизнеспособных клеток макроорганизма.</li></ul> <p>Вещество, обладающее перечисленными свойствами, предстоит искать либо среди уже существующих криопротекторов, либо синтезировать вновь, зная физико-химические особенности известных веществ [4]. Успех в целевых исследованиях может быть связан с представленным в данной работе материалом.</p> |
|--|--|

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Руководство по общей, производственной и клинической трансфузионной медицине. Изд. 2-е, изм. и дополн. [Под ред. Е. П. Сведенцова]. — М.: Медицинская книга, 2012. — 618 с.
2. Руководство по трансфузионной медицине [Под ред. Е. П. Сведенцова]. — Киров, 1999. — 716 с.
3. Е. П. Сведенцов. Криоконсерванты для живых клеток. — Сыктывкар, 2010. — 80 с.
4. А. А. Цуцаева, В. А. Аграненко, Л. И. Федорова и др. Криоконсервирование клеточных суспензий [Под ред. А. А. Цуцаевой]. Киев: Наукова думка. — 1983. — 240 с.
5. H. A. Sloviter. Recoveri of human red blood-cells after freezing // *Lancet*. — 1951. — V. 1. — P. 823–824.
6. А. А. Костяев. Низкотемпературное консервирование гемопоэтических стволовых клеток в режиме быстрого двухступенчатого замораживания (экспериментальное исследование). Дисс. докт мед. наук. — СПб, 2003. — 228 с.
7. F. Lovelock, M. W. Bishop. Prevention of freezing damage to living ceels by DMSO. — *Nature*, 1959. — V.183, № 4666. — P. 1394–1395.
8. Н. С. Пушкарь, М. Н. Шраго, А. М. Белоус и др. Криопротекторы. Киев: Наукова думка, 1978. — 204 с.
9. Н. Т. Maryman Cryoprotective agents: A review // *Cryobiology*. — 1971. — V. 3, № 2. — P. 173–183.
10. Е. А. Гордиенко, Н. С. Пушкарь. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. — Киев, «Наукова думка», 1994. — 143 с.

**Костяев А. А.<sup>1</sup>, Утёмов С. В.<sup>1</sup>, Андреев А. А.<sup>1</sup>, Полежаева Т. В.<sup>2</sup>, Мартусевич А. К.<sup>3</sup>,  
Исаева Н. В.<sup>1</sup>, Шерстнев Ф. С.<sup>1</sup>, Ветошкин К. А.<sup>1</sup>, Калинина Е. Н.<sup>1</sup>, Князев М. Г.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Сыктывкар

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кировская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Киров

## ЧЕТЫРЕХКЛАСНАЯ СИСТЕМАТИЗАЦИЯ БИОКРИОКОНСЕРВАНТОВ.

**I класс холодоограждающих растворов — эндоцеллюлярные криоконсерванты**

**Kostyaev A. A.<sup>1</sup>, Utyomov S. V.<sup>1</sup>, Andreev A. A.<sup>1</sup>, Polezhaeva T. V.<sup>2</sup>, Martusevich A. K.<sup>3</sup>, Isaeva N. V.<sup>1</sup>,  
Sherstnyov P. S.<sup>1</sup>, Vetoshkin K. A.<sup>1</sup>, Kalinina E. N.<sup>1</sup>, Knyazev M. G.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Federal State Budget institution of Science «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency», Kirov

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Institute of Physiology of the Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar

<sup>3</sup> Federal State Budgetary Institution of Higher Professional Education «Kirov State Medical Academy» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Kirov

## A FOUR CLASS SYSTEMATIZATION OF BIOCRYOCONSERVANTS.

**The first class of cold preserving solutions — endocellular cryoprotectants**

**Резюме.** Рассмотрены биокриоконсерванты I класса, рецептура которых базируется на моно- (одном) или би- (двух) эндоцеллюлярных криопротекторах. Охарактеризованы физико-химические, биологические, токсико-фармакологические и криозащитные свойства сильных эндокриоконсервантов для клеток крови и костного мозга. Освещены некоторые аспекты механизма их действия на клетки. Описано применение криопротекторов в практике низкотемпературного консервирования биологических объектов.

**Ключевые слова:** эндоцеллюлярные криопротекторы, биокриоконсерванты I класса.

**Summary.** Biocryoconservants of the first class, the formulation of which is based on mono- (single) or bi- (two) endocellular cryoprotectors are examined. Physical and chemical, biological, toxicological and pharmacological properties of strong endocryoconservants for blood cells and bone marrow are picked out. Some aspects of their mechanism of action on cells are lighted. The application of cryoprotectants in the practice of low-temperature preservation of various biological objects is described.

**Key words:** endocellular cryoprotectants, biokryoconservants, classifications.

**Введение.** Трансфузионная криобиология — сравнительно молодая, динамично развивающаяся наука, но уже широко используемая специалистами экономически развитых стран. Арсенал ее методов и средств неуклонно совершенствуется и обновляется. Отмеченное выше относится к труду проф. Е. П. Сведенцова «Криоконсерванты для живых клеток» [1]. Автор впервые систематизировал известные сложные холодоограждающие растворы, а также еще создающиеся новые композиции биокриоконсервантов

по свойствам и числу входящих в их состав криопротекторов с «реставрирующими» добавками в единую четырехклассную систему. Труд известного Российского ученого оказался весьма актуальным и, судя по поступающим просьбам повторить тираж его издания, необходимым для научных работников и практических врачей в области криобиологии и криомедицины.

**Целью настоящей работы** является попытка ознакомить широкий круг научных сотрудников и практических врачей, выпол-

няющих исследования в области экспериментальной и клинической трансфузионной криобиологии, с современной четырехклассной систематизацией биокриоконсервантов для замораживания клеток крови и костного мозга.

### **1. Первый класс хладоограждающих растворов.**

Включает сильные биоэндокриоконсерванты (проникающие через плазматическую мембрану в клетки животных и человека) на основе глицерина, диметилацетамида (ДМАЦ), диметилсульфоксида (ДМСО) и их сочетаний.

**Глицерин** —  $C_3H_8O_3$  — трехатомный спирт, м. м. 92,10. Благодаря наличию ОН-групп, образует водородные связи с молекулами воды, растворяется в ней в любых пропорциях. Глицерин растворяет соли и щелочи, мочевину, сахарозу и газы, а также растворяется в метиловом, этиловом и пропиловом спиртах. Он тропен к клеткам и тканям организма животных. Участвует в энергетическом обмене. Глицерин — вещество с выраженной токсичностью. Его  $LD_{50}$  составляет  $4,57 \pm 0,14$  г/кг [2].

В составе криоконсерванта используется глицерин (Glycerol) высшей степени (в/с) очистки или высшего сорта (ГОСТ 6259-75) с относительной плотностью 1,248. Утвержден Фармакологическим комитетом Минздрава и социального развития РФ для консервирования компонентов донорской крови (КДК) и ядерных клеток костного мозга (ЯККМ) и пуповинной крови (ПК) при температурах  $-10^\circ\text{C}$ – $-196^\circ\text{C}$ . Криопротекторная активность глицерина высока на различных биологических объектах [3].

#### **1.1. Моноэндоцеллюлярные криоконсерванты на основе глицерина для быстрого замораживания эритроцитов при $-196^\circ\text{C}$ .**

До настоящего времени криоконсерванты этого класса остаются лучшими для замораживания эритроцитной взвеси (ЭВ) [1]. Для быстрого замораживания ЭВ при  $-196^\circ\text{C}$  в жидком азоте разработан **криоконсервант ЦНИИГПК 11<sub>4</sub>**, в котором концентрация глицерина составляет 30%: Глицерин в/с, 300 мл; Маннит, 40 г; NaCl, 7 г или ЭДТА  $Na_2$ , 3 г;

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ , 0,3 г; Вода бидистиллированная — до 1000 мл; pH 5,6–6,2.

Криоконсервант добавляют к эритроцитной массе (ЭМ), помешивая в течение 5–8 мин в соотношении 1:1, приготовленную ЭВ оставляют при комнатной температуре на 15–20 мин для глицеринизации, затем переводят в криоконтейнер, герметизируют и погружают в жидкий азот на 2 мин [1, 4]. В жидком азоте эритроциты хранят до 10 лет. Оттаивание замороженных эритроцитов в криоконтейнере производят в водяной ванне при  $+45^\circ\text{C}$  в течение 26 сек при ритмичном покачивании криоконтейнера в режиме 200 качаний в минуту. Последующее отмывание глицерина от эритроцитов производят растворами хлорида натрия, маннита или сахарозы до нормотонической концентрации этих растворов. Затем ЭВ центрифугируют, осадок эритроцитов ресуспендируют в плазмозамещающем растворе ЦОЛИПК № 8-в, переводят в полимерные контейнеры «Гемакон 300» или «Компопласт 300», герметизируют, паспортизируют и транспортируют в клинику.

Разработан метод консервирования эритроцитов при  $-25^\circ\text{C}$ ,  $-38^\circ\text{C}$  со сниженной концентрацией глицерина: разработаны **растворы ЦНИИГПК 11<sub>5-м</sub> и ЦНИИГПК 5-с**. Концентрация глицерина в них составляет 40%.

**Состав криоконсерванта ЦНИИГПК 11<sub>5-м</sub>:** Глицерин в/с, 400 мл; Маннит, 40 г; NaCl, 7 г;  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ , 0,3 г; Вода бидистиллированная — до 1000 мл.

**Состав криоконсерванта ЦНИИГПК 11<sub>5-с</sub>:** Глицерин в/с, 400 мл; Сахароза, 50 г; NaCl, 7 г;  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ , 0,3 г; Вода бидистиллированная — до 1000 мл.

Криоконсерванты медленно добавляют к ЭМ в соотношении 1:1 при постоянном помешивании ЭВ, затем центрифугируют при 1100 g 20 мин при  $+4^\circ\text{C}$ , удаляют надосадочную жидкость, осадок эритроцитов перемешивают, ЭВ переводят в криоконтейнер, герметизируют и замораживают в жидком азоте в течение 2–2,5 мин. Срок максимального хранения эритроцитов в замороженном виде составляет 10 лет, после чего эритроциты размораживают, отмывают от криопротектора, взвешивают в растворе ЦОЛИПК № 8-в по стандартной технологии, переводят в полимерные контейнеры «Гемакон 300» или «Компопласт 300», герметизируют, паспортизируют и транспортируют в клинику.

## 1.2. Моноэндоцеллюлярные криоконсерванты на основе глицерина для замораживания эритроцитов по методам Американской ассоциации банков крови (ааВВ).

Американской ассоциацией банков крови (ааВВ) для консервирования эритроцитов замораживанием применяется глицерин в низкой (около 20 %) или высокой (около 40 %) конечной концентрации [1]. Технология с низкой концентрацией глицерина позволяет использовать биохранилища с жидким азотом ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), а с высокой конечной концентрацией криопротектора — электроморозильники на  $-80^{\circ}\text{C}$ . Эритроциты, консервированные с растворами AS-1(CPD) и AS-3(CP2D), могут успешно замораживаться даже после 42 дней хранения в указанных консервантах. Отмечен опыт успешного переливания размороженных эритроцитов, хранившихся 21 год при  $-196^{\circ}\text{C}$  [6].

**Состав AS-1:** Глюкоза, 11,1 г; Аденин, 0,21 г; Манитол, 4,1 г; Натрия хлорид, 15,4 г; Объем до 100 мл.

**Состав AS-3:** Глюкоза, 5,5 г; Аденин, 0,22 г; Натрия хлорид, 7,0 г;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,9 г;  $\text{Na}_3$  цитрат, 1,9; Лимонная кислота, 0,2. Объем до 100 мл.

### 1.2.1. Моноэндоцеллюлярный криоконсервант для медленного замораживания эритроцитов с глицерином в воздушной камере электроморозильников от $-60^{\circ}\text{C}$ до $-80^{\circ}\text{C}$ .

Разработан Г. С. Воробьевой и Ф. Р. Виноград-Финкель [1]. **В состав криоконсерванта входят:** Глицерин в/с, 570 мл; Маннит, 20 г; Натрия хлорид, 4 г;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,8 г; Вода для инъекций — до 1000 мл.

Конечная концентрация глицерина в суспензии эритроцитов составляет 40 %. Вся технология криоконсервирования и деглицеринизации эритроцитов растворами с трехкратно понижающейся осмолярностью проводится в одном контейнере «Гемакон 500». КДК хранят полноценными при  $-80^{\circ}\text{C}$  до 4 лет.

Высокая концентрация глицерина предусматривает глицеринизацию эритроцитов в течение 4 часов. Медленное замораживание клеток в электроморозильнике до  $-80^{\circ}\text{C}$  допускает их длительное хранение при  $-65^{\circ}\text{C}$  и последующее отмывание от протектора.

### 1.2.2. Моноэндоцеллюлярный криоконсервант для замораживания эритроцитов при $-25^{\circ}\text{C}$ ÷ $-38^{\circ}\text{C}$ со сниженной концентрацией глицерина.

Метод предложен В. Н. Мельниковой и соавт. [1]. Применяется известный криоконсервировант ЦНИИГПК 11<sub>5-м</sub> или ЦНИИГПК 11<sub>5-с'</sub>, которые смешивают с ЭМ в соотношении 1:1. Конечная концентрация глицерина в ЭВ составляет 20 %.

**Пропись раствора ЦНИИГПК 11<sub>5-М</sub>:** Глицерин, 400 мл; Манит, 40,0 г; Натрия хлорид, 7,0 г; Натрия фосфат двузамещенный, 0,3 г; Вода для инъекций до 1000 мл; pH раствора 6,1–6,3. Разливают по 125 мл и 250 мл в стеклянные флаконы вместимостью 250 мл.

Для замораживания используют электроморозильники на  $-25^{\circ}\text{C}$  и  $-38^{\circ}\text{C}$ , которые обеспечивают сохранность КДК, соответственно, от 5 до 12 мес. Перед трансфузией размороженные эритроциты отмывают в 3 растворах хлорида натрия в убывающей концентрации 3,2; 2,0 и 0,9 %.

### 1.3. Моноэндоцеллюлярный криоконсервант для медленного замораживания и хранения эритроцитов с глицерином в электрическом морозильнике при $-30^{\circ}\text{C}$

Метод разработан Ю. С. Суханолвым и соавт. (1987). Для замораживания и хранения ЭВ с глицерином в электрическом морозильнике при  $-30^{\circ}\text{C}$  применяют криоконсерванты ЦНИИГПК 11<sub>5-55</sub> и ЦНИИГПК 11<sub>5-с</sub> [1].

**Состав ЦНИИГПК 11<sub>5-55</sub>:** Глицерин в/с, 550 мл; Маннит, 40 г или Сахароза, 50 мл; Натрия хлорид, 7 г; Натрия фосфат двузамещенный, 0,3 г; Вода для инъекций — до 1000 мл; pH раствора 5,8–6,3 (с сахарозой).

**Состав ЦНИИГПК 11<sub>5-с</sub>:** Глицерин в/с, 400 мл; Маннит, 40 г или Сахароза, 50 мл; Натрия хлорид, 7 г; Натрия фосфат двузамещенный, 0,3 г; Вода для инъекций — до 1000 мл; pH раствора 6,0–6,75 (с Маннитом).

Отмеченные криоконсерванты смешивают в течение 10 мин с ЭМ в контейнере из поливинилхлорида (ПХВ) в соотношении 1:1 или 1,6:1. К каждому 125 мл ЭМ добавляют 200 мл раствора и выдерживают при комнатной температуре в течение 15–20 мин. Конечная концентрация глицерина в ЭВ составляет 24,6 % и 27 %, соответственно. Замораживают в водяной ванне при темпера-

туре +38°÷ +40°С в течение 10 мин. Деглицеринизацию осуществляют при трехкратном серийном центрифугировании ЭВ с применением понижающихся концентраций солевых растворов до нормотонии. Отмытые эритроциты взвешивают в ЦОЛИПК № 8-в.

К настоящему времени созданы высокоэффективные «закрытые» автоматические технологии глицеринизации и деглицеринизации эритроцитов, позволяющие сохранять в жизнеспособном состоянии до 99 % красных кровяных телец.

#### **1.4. Моноэндоцеллюлярный криоконсервант на основе глицерина для замораживания гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) костного мозга при -70°С.**

Метод разработан А. Г. Федотенковым и соавт. [6, 7]. Аспирируемую костно-мозговую взвесь стабилизируют консервирующим **раствором ЦНИИГПК № 3**, состоящем из смеси № 1 и смеси № 2. Его состав:

**Смесь № 1:** Сахароза, 4,3 г; Глюкоза, 0,4 г; ЭДТА Na<sub>2</sub>, 0,1 г; Вода бидистиллированная до 50 мл; рН смеси 7,0–7,2.

**Смесь № 2:** Натрий лимоннокислый трехзамещенный, 1 г; 10 % раствор желатина, 25 мл; Вода бидистиллированная до 50 мл; рН смеси 7,0–7,2.

Смеси № 1 и № 2 расфасовывают по 100 мл в стеклянные флаконы на 250 мл и стерилизуют отдельно (для избежания карамелизации глюкозы) в течение 30 мин при 1,2 атм. Затем хранят в двойных бязевых мешках при +4°С в течение 2-х недель.

Перед применением их сливают асептично закрытым способом в один флакон на 500 мл.

Флаконы с заготовленной на растворе ЦНИИГПК № 3 костно-мозговой взвесью ставят на 30 мин под углом 45°С при комнатной температуре.

При криоконсервировании костного мозга в растворе ЦОЛИПК-1 с добавлением 20 % раствора глицерина и катионной сыворотки сохраняется до 85 % жизнеспособных клеток. Авторы сообщают о высокой лечебной эффективности миелоидной ткани, консервированной с 15 % раствором глицерина у смертельно облученных собак.

Глицерин, обладая высокой осмолярностью и низкой скоростью диффузии через цитоплазматическую мембрану, способен вызывать осмотический гемолиз клеток в момент

введения их в сосудистое русло реципиента. Поэтому перед трансфузией требуется предварительно удалять криопротектор из костномозговой суспензии [8]. Такая вынужденная процедура приводит к снижению жизнеспособности и потере значительного количества ядерных клеток.

А. Г. Федотенков и соавт. [7] для **замораживания ЯККМ (ГСК)** предложили **криоконсервант на основе 15 % глицерина**. Его состав: Глицерин в/с, 30 мл; Надосадочная жидкость, 50 мл; Сыворотка АВ (IV) группы крови, 20 мл.

Миелоэксфузат стабилизируют на консервирующем растворе ЦОЛИПК № 3 с 10 % раствором желатина в соотношении 1:3–1:4 (с учетом свертываемости биосреды). Под влиянием желатина в течение 30 мин происходит четкое разделение биосреды на два слоя. Надосадочный слой, обогащенный ЯККМ и ГСК, переводят в отдельный флакон, центрифугируют 15 мин со скоростью 1200 об/мин при +5°С. Затем отделяют надосадок, обедненный ЯККМ и ГСК, для ретрансфузии донору. Оставшиеся во флаконе 100 мл биосреды, обогащенной ЯККМ и ГСК, тщательно ресуспендируют, после чего к ней медленно добавляют криоконсервант в соотношении 1:1. Приготовленную миеловзвесь с 15 % глицерином выдерживают при комнатной температуре 30 мин (для глицеринизации ЯККМ), затем разливают в пластиковые криопакеты, герметизируют и помещают в электроморозильник на -20°С на 25 мин до момента кристаллизации (-9°С). Затем биоконтейнер переносят в электроморозильник на -70°С. Срок хранения ЯККМ и ГСК в этих условиях ограничен 2 мес. После размораживания суспензии в водяной ванне при +39°÷ +40°С насчитывается 76–92 % эозинорезистентных ядерных клеток. Перед переливанием реципиенту клетки отмывают от глицерина растворами с понижающимися концентрациями глюкозы или сахарозы. Конечная концентрация глицерина в суспензии ЯККМ составляет 3,3 %. Морфологическая сохранность и пролиферативная активность ГСК наиболее высоки через 10–15 мин после отогревания и деглицеринизации клеточной суспензии.

**1.5. Моноэндоцеллюлярный криоконсервант «Пропандиосахароль» на основе пропиленгликоля (1,2 ПД) для замораживания эритроцитов при -196°C.**

Пропиленгликоль —  $C_3H_8O_2$  — двухатомный спирт алифатического ряда, м. м. 76,1, смешивается с водой в любых пропорциях, его эндоосмос в эритроциты проходит быстрее, чем у глицерина. Функциональные группы — «ОН» и «СН».  $LD_{50}$  пропиленгликоля для кроликов составляет 13,1 г/кг, для крыс — 6 г/кг. 1,2 ПД вызывает изменения на цитоплазматическом уровне [8]. Обладает протекторными свойствами

в отношении различных клеток животных на более высоком уровне, чем глицерин и диметилсульфоксид [9].

**Состав криоконсерванта «Пропандиосахароль»:** Пропиленгликоль (1,2-ПД), 370 мл; Сахароза, 32 г; Натрия хлорид, 6 г; Вода для инъекций — до 1000 мл; рН 5,5–7,5.

ЭМ смешивают с «Пропандиосахаролем» в соотношении 1:1, центрифугируют, удаляют надосадочную жидкость, осадок — ЭМ помещают в криопакет, замораживают со скоростью 12–14°C/мин до температуры хранения -196°C. После размораживания гемолиз клеток не превышает 2–3%. Пропиленгликоль от эритроцитов однократно отмывают 3% раствором сахарозы. Его остаточное количество в среде составляет 0,3–0,5%. Размороженные эритроциты хранят перед трансфузией в ресуспендирующем растворе ЦОЛИПК № 8-в не более 24 ч. Апробация клинического применения эритроцитов, криоконсервированных с «Пропандиосахаролем», в Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России и Харьковской ОСПК выявила высокую физиологическую полноценность трансфузионной среды и эффективность избранной криотехнологии.

**1.6. Моноэндоцеллюлярный криоконсервант для замораживания тромбоцитов на основе диметилацетамида (ДМАЦ).**

N, N-диметилацетамид (ДМАЦ). Химическая формула  $CH_3C(O)N(CH_3)_2$ , м. м. — 73,10. Разрешен для клинического применения.  $LD_{50}$  для мышей составляет 4,2 г/кг (по другим данным 2,58–3,90 г/кг), для крыс — 3,56 г/кг [3]. Обладает высокой криозащитной

активностью в отношении тромбоцитов, лейкоцитов и других клеток [3]. На основе ДМАЦ разработан гемоконсервант «Тромбокриодмац» (ТКД) для

замораживания тромбоцитов и метод длительного хранения тромбоцитных концентратов (КТ) при -196°C [4,10].

**Состав «Тромбокриодмац»:** N, N-диметилацетамид, 50 мл; Глюкоза, 50 г; Вода для инъекций — до 1000 мл; рН 4,0–5,5.

Приготовленный гемоконсервант стерилизуют при 1,2 атм 30 мин. Хранят при комнатной температуре в закрытом от света месте в течение 2 лет. Замораживание КТ по линейной программе проводят со скоростью 3°C/мин до -60°C, далее КТ переносят в жидкий азот (-196°C). После отогревания при +38°C по тестам *in vitro* сохраняется более 80% кровяных пластинок, из которых 50% имеют биологическую полноценность.

В 2006 г. К. В. Кузнецовым и соавт. [11] в эксперименте разработан метод криоконсервирования КТ с раствором «Тромбокриодмац» при низких (-80°C) температурах в пластикатных контейнерах «Гемакон 300» или «Компопласт 300» в режиме быстрого двухступенчатого замораживания с использованием электрических морозильников на -30°C и -80°C. Первоначально контейнеры с КТ помещают в морозильную камеру с этиловым спиртом, охлажденным до -30°C. На втором этапе, после достижения КТ температуры -29°÷30°C, биообъект переносят в хранилище на -80°C. Срок хранения КТ 12 мес.

**1.7. Моноэндоцеллюлярный криоконсервант на основе ДМАЦ для замораживания лейкоцитов при -196°C**

В ГНЦ РАМН в 1985 году разработан криоконсервант на основе ДМАЦ для замораживания лейкоконцентратов — «Лейкокриодмац» [5,12].

**Состав гемоконсерванта «Лейкокриодмац»:** N, N-диметилацетамид (ДМАЦ), 200 мл; Глюкоза, 20 г; Динатриевая соль ЭДТА, 4 г; Вода для инъекций — до 1000 мл; рН 4,5–5,5.

Стерилизуют автоклавированием при 1,2 атм 30 мин. Хранят в течение 2 лет. Смешивают с суспензией гранулоцитов 1:3, переводят в 100 мл пластикатные криоконтейнеры, замораживают со скоростью 3°C/мин до -196°C. Срок хранения в жидком азоте не более 2 лет. Размораживают в водяной ванне при +39°C



до температуры биопродукта  $0^{\circ}\div +2^{\circ}\text{C}$ . В нем сохраняются жизнеспособными до 78 % ядерных клеток.

### **1.8. Моноэндоцеллюлярный криоконсервант на основе ДМАЦ для замораживания ГСК костного мозга при $-196^{\circ}\text{C}$ .**

В ВМА им. С. М. Кирова Р. В. Тюриним [13] на основе ДМАЦ разработан криоконсервант для замораживания ЯККМ (ГСК) при  $-196^{\circ}\text{C}$  следующего состава: N, N -диметилацетамид (ДМАЦ), 24 мл; Глюкоза, 40 г; Трилон Б, 0,4 г; Вода для инъекций — до 1000 мл.

Перед началом криоконсервирования концентрат ЯККМ с ГСК разводят аутоплазмой 1:3. При использовании аллогенного костного мозга консервант разводят 1:3 сывороткой АВ(IV) группы. Затем его смешивают 1:1 с концентратом ЯККМ. Конечная концентрация ДМАЦ составляет 3 %. Время экспозиции — не более 15 мин. ГСК замораживают по программе: на первом этапе —  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до начала кристаллизации, на втором —  $5^{\circ}\text{--}10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $-150^{\circ}\text{C}$ , затем переносят в хранилище с жидким азотом ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) на срок до 1,5 мес. В размороженных ЯККМ сохраняется до 90 % колониеобразующих единиц грануломоноцитопоза (КОЕ-ГМ). ДМАЦ химически стоек, малотоксичен и лишен свойственного ДМСО неприятного запаха.

### **1.9. Моноэндоцеллюлярные криоконсерванты на основе диметилсульфоксида (ДМСО).**

Диметилсульфоксид (ДМСО) —  $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$  является органическим веществом, относится к классу оксидов, его м. м. — 78,13. ДМСО хорошо проникает в клетки, реорганизует структуру образующегося льда — происходит его мелкаячестая кристаллизация, близкая по своей природе к аморфной [3, 14]. Силы взаимодействия между молекулами ДМСО и воды в 1,5 раза больше, чем между молекулами воды [14]. Установлено [18], что в системах, содержащих ДМСО, в отличие от систем с криопротекторами из класса полиолов, происходит кристаллизация эвтектических составов. Это явление, наряду с девитрификацией, представляет собой дополнительный криоповреждающий фактор. Благодаря наличию кислорода, ДМСО обладает высокой способностью вступать в реакции с солями

и оксидами фосфата, серы, формировать связи с глицерином, сахарозой, мочевиной, стеариновой кислотой и другими органическими соединениями. Известны противоишемическое и антиоксидантное свойства ДМСО [15].

Впервые ДМСО в качестве протекторного средства предложили J. Lovelock и M. Bishop [19]. ДМСО был успешно испытан в клинике при криоконсервировании ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) эритроцитов С. Е. Huggins и лейкоцитов А. Rowe и Е. Cohen [1].

ДМСО является токсичным веществом и обуславливает необходимость его отмывания после размораживания клеточной суспензии, что существенно усложняет процедуру получения качественных деконсервированных клеток и приводит к потере части клеток в процессе отмывания [1, 2, 16]. По данным Е. Е. Rosenbaum [1], токсичность ДМСО на организменном уровне имеет видовую зависимость.  $\text{LD}_{50}$  при внутривенном введении для кроликов, обезьян, лабораторных мышей и собак составляет соответственно: 19,2; 11,0; 3,8 и 2,5 г/кг веса. В последнее время для уменьшения токсичности ДМСО применяют более совершенные методы очистки вещества, а также используют в рецептах гемоконсервантов широкий спектр улучшающих «реставрирующих» добавок. Из последних методов стали использовать растворы декстрозы, полиглюкина, гидроксипропилкрахмала (ГЭК) или гексаметиленбистетрагидроксипропилкрахмала (ГМБТОЭМ).

### **1.10. Моноэндоцеллюлярный криоконсервант на основе ДМСО для замораживания тромбоцитов при $-80^{\circ}\text{C}$ и $-196^{\circ}\text{C}$ и лейкоцитов при $-196^{\circ}\text{C}$ .**

Для консервирования КТ при  $-196^{\circ}\text{C}$  ДМСО применяют в концентрации 5–11 % [3, 14, 15]. При этом сохранность клеток составляет 30–80 %. Несмотря на то, что для снижения токсичности в раствор ДМСО вводилась гомологичная сыворотка, после замораживания-отогревания КТ находили снижение адгезивных свойств клеток, а у части кровяных пластинок — разрушения лизосом [1]. При переливании размороженных КТ, подвергнутых двукратному отмыванию, у 33 % реципиентов наблюдали озноб и лихорадку. Неприятным свойством ДМСО является нестойкость этого соединения при хранении. ДМСО достаточно быстро распадается при

комнатной температуре с образованием токсического вещества с резким неприятным запахом диметилсульфида  $(\text{CH}_2)_2\text{S}$  [3].

Для консервирования лейкоконцентрата при  $-196^\circ\text{C}$  ДМСО применяется в концентрации 6–15 %, при этом лимфоциты переносят замораживание вполне удовлетворительно, а в ядрах и мембранах гранулоцитов обнаруживаются выраженные повреждения [1, 3]. Применяется ДМСО и для криоконсервирования ЯККМ, ГСК периферической и кордовой крови [1, 3]. В обзоре работ отмечено, что растворы ДМСО с применением разных составов гемоконсерванта в 5–20 % конечных концентрациях и разных программ замораживания-отогревания клеток обеспечивали сохранность до 80–90 % жизнеспособных миелокариоцитов [1].

### **1.11. Моноэндоцеллюлярный криоконсервант на основе ДМСО для замораживания ГСК костного мозга и периферической крови.**

Конец XX и начало XXI столетий ознаменовались активным совершенствованием методов получения и криоконсервирования выделенных ГСК. В 2003 г., согласно приказу Минздрава РФ № 325 «О развитии клеточных технологий», начали применять для клинических целей высокоочищенный ДМСО в криоконсерванте следующего состава: Высокоочищенный ДМСО 10 %, 30 мл; Полиглюкин (м. м. — 60 000), до 300 мл. рН 4,5–6,5.

Рабочий раствор ДМСО готовят непосредственно перед замораживанием ГСК. При соприкосновении с воздухом ДМСО окисляется и автоклавированию не подлежит: распадается на соединения, усиливающие токсичность химического вещества. Раствор ДМСО добавляют к полиглюкину (не наоборот!), доводя концентрацию ДМСО до 10 %, и ставят на хранение при  $+4^\circ\text{C}$ . Затем 10 % раствор ДМСО добавляют в клеточную взвесь 1:1 без образования пены, после чего переводят в криопакет, герметизируют и замораживают по двухэтапной программе: на первом этапе со скоростью  $1^\circ\text{C}/\text{мин}$  до  $-13^\circ\text{C}$ , на втором —  $10^\circ\text{C}/\text{мин}$  до  $-80^\circ\text{C}$  или  $-196^\circ\text{C}$ . Продолжительность хранения ГСК при  $-80^\circ\text{C}$  составляет 2 года, при  $-196^\circ\text{C}$  — до 5 лет. Замороженные ГСК с ДМСО требуют быстрого отогревания в водяной ванне при  $+39^\circ\text{C}$ – $+41^\circ\text{C}$  и последующего незамедлительного переливания паци-

енту. Такая методика обеспечивает сохранение биологических свойств более, чем у 80 % миелокариоцитов.

Отмывание ДМСО от размороженных клеточных суспензий ведет к потере их части и снижает жизнеспособность последних на 30–40 %. Поэтому многие специалисты критически относятся к отмыванию размороженных ядерных клеток от ДМСО. Однако исследования показали, что на каждые 70 трансфузий неотмытых от ДМСО клеточных суспензий развивается одно посттрансфузионное осложнение, связанное с токсичностью известного криоконсерванта. В их числе: генерализованные судороги, энцефалопатия, спазмы сосудов, рвота, дыхательная недостаточность, неприятный запах выдыхаемого воздуха у реципиента и редко — коматозное состояние [16].

### **2.0. Биэндоцеллюлярный криоконсервант на основе пропиленгликоля и диметилацетамида для замораживания эритроцитов при $-80^\circ\text{C}$ и $-140^\circ\text{C}$**

Авторами способа замораживания эритроцитов под защитой криоконсерванта на основе пропиленгликоля и диметилацетамида являются В. В. Вельяминов и Ш. М. Багаутдинов [1, 17]. Состав биокриоконсерванта включает:  $\alpha$ -Пропиленгликоль (ВФС-42-1594-86), 370 г; ДМАЦ (N, N-диметилацетамид) х.ч. (ТУ 6-09-537-73, ГОСТ 3885-73, 100 г; Сахароза, чда, (ГОСТ 8833-75), 32 г; Натрия хлорид, чда, (ГФХ, с. 428,442), 6 г; Вода для инъекций (ГФХ, с. 74) до 1000 мл.

ЭМ из крови 1–2 суточного хранения при  $+4^\circ\text{C}$  смешивают 1:1 с криоконсервантом в полимерном пакете «Гемакон 500» при  $+20^\circ\text{C}$ – $+25^\circ\text{C}$ . При этом конечная концентрация пропиленгликоля составляет 18,5 %, диметилацетамида — 5 %. Полученную ЭВ переводят в два контейнера «Компопласт 300», закладывают в металлические холдеры и помещают либо в электрический морозильник на  $-80^\circ\text{C}$ , либо в пары жидкого азота на 35–40 мин, после чего замороженные клетки переносят в электроморозильник-хранилище на  $-80^\circ\text{C}$ . Размораживание эритроцитов проводят в водяной ванне при  $+42^\circ\text{C}$ – $+45^\circ\text{C}$  в течение 2–3 мин, отмывают общепринятым способом с использованием стандартных растворов с пониженной концентрацией солевых растворов до нормото-

нии и ресуспендируют в растворе ЦНИИГПК № 8-в. После размораживания количество эритроцитов составляет  $(3,95 \pm 0,04) \cdot 10^{12}/л$ , уровень свободного гемоглобина —  $0,69 \pm 0,05$  г/л и соответствует ( $p > 0,05$ ) показателям эритроцитов, замороженных с глицерином до  $-196^\circ\text{C}$ .

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Сведенцов Е. П.* Криоконсерванты для живых клеток. — Сыктывкар, 2010. — 80 с.
2. *Anderson K. C., Harris R. W., Chen K. K.* Toxicological studies on synthetic glycerin // J. Amer. Assoc. Sci. 1950. Vol. 39, № 8. — P. 583–586.
3. Криоконсервирование клеточных суспензий / Цуцаева А. А., Аграненко В. А., Федорова Л. И. и др. [Под общ. ред. Цуцаевой А. А.]. Киев: Наук. думка, 1983. — 240 с.
4. *В. А. Аграненко.* Раствор «Тромбокриодмац» Временная фармакопейная статья 42–1586–85 от 16.12.1985.
5. *C. R. Valery, L. E. Pivacek, A. D. Gray et al.* The safety and therapeutic effectiveness of human red cells stored at  $-80^\circ\text{C}$  for as 21 years // Transfusion. — 1989. — V.29. — P. 429–437.
6. *А. Г. Федотенков, Л. И. Суханова, И. Д. Шишкина и др.* Консервирование костного мозга при низких температурах ( $-70^\circ\text{C}$ ) с применением 15 % глицерина для клинических целей // Методические рекомендации. — М., 1974. — 13 с.
7. *А. Г. Федотенков, И. Д. Шишкина, Л. А. Данилова и др.* Ограждающие растворы для криоконсервирования костного мозга // Гематология и трансфузиология. — 1972. — Т. 37, № 7–8. — С. 13–15.
8. *В. М. Гучок, Э. А. Зборовская.* О токсичности  $\alpha$ -пропиленгликоля. — Криобиология и криомедицина, 1981, вып. 8. — С. 46–49.
9. *А. М. Воротилин.* Криоконсервирование эритроцитов человека под защитой криопротекторов на основе низкомолекулярных диолов: Автореф.: дис. докт. биол. наук. — Харьков, 1987. — 32 с.
10. *В. А. Аграненко, С. М. Бахрамов, Л. А. Жеребцов.* Компонентная гемотерапия // Изд-во «Ибн-Сина», Ташкент, — 1995. — 279 с.
11. *К. В. Кузнецов.* Консервирование тромбоцитов замораживанием при  $-80^\circ\text{C}$  по экспоненциальной программе: Автореф.: дисс. канд. мед. наук. СПб, 2006. — 23 с.
12. Инструкция по криоконсервированию лейкоцитов с применением Лейкокриодмац ЦНИИ гематологии и переливания крови. — М., 1985. — 6с.
13. *Р. В. Тюрин.* Криоконсервирование костного мозга под защитой 3 % раствора диметилацетамида: Авторф.: дис. канд. мед. наук. — СПб., 1996. — 25 с.
14. *Н. С. Пушкарь, М. И. Шраго, А. М. Белоус и др.* Криопротекторы. Киев: Наукова думка, 1978. — 204 с.
15. *Чуйко В. Л.* Механизмы криозащитной эффективности и фармакологические свойства ДМСО // Криобиология. — 1989, № 1. — С. 3–10.
16. *Берсенев А. В.* Судороги и кома как осложнения, связанные с токсичностью криопротектора ДМСО при инфузии гемопоэтических клеток в клинике трансплантации костного мозга // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2006. — № 1. — С. 31–32.
17. *Вельяминов В. В.* Низкотемпературное консервирование эритроцитов под защитой комбинированного криопротектора на основе пропиленгликоля и диметилацетамида: Автореф.: дис. канд. Мед. наук. — СПб, 1997. — 21 с.
18. *Зинченко А. В., Боброва Е. Н., Щетинский М. И.* Влияние ДМСО на фазовые переходы и стеклование суспензии эритроцитов кордовой крови ниже  $0^\circ\text{C}$  // Проблемы криобиологии. — 2003, № 2. — С. 16–21.
19. *Lovelock F., Bishop M. W.* Prevention of freezing damage to living cells by DMSO. — // Nature, 1959. — V.183, № 4666. — P. 1394–1395.

**Костяев А. А.<sup>1</sup>, Утёмов С. В.<sup>1</sup>, Андреев А. А.<sup>1</sup>, Полежаева Т. В.<sup>2</sup>, Мартусевич А. К.<sup>3</sup>,  
Исаева Н. В.<sup>1</sup>, Шерстнев Ф. С.<sup>1</sup>, Ветошкин К. А.<sup>1</sup>, Калинина Е. Н.<sup>1</sup>, Князев М. Г.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Сыктывкар

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кировская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Киров

## ЧЕТЫРЕХКЛАСНАЯ СИСТЕМАТИЗАЦИЯ БИОКРИОКОНСЕРВАНТОВ.

### II класс хладоограждающих растворов — экзоцеллюлярные криоконсерванты

**Kostyaev A. A.<sup>1</sup>, Utyomov S. V.<sup>1</sup>, Andreev A. A.<sup>1</sup>, Polezhaeva T. V.<sup>2</sup>, Martusevich A. K.<sup>3</sup>, Isaeva N. V.<sup>1</sup>,  
Sherstnyov P. S.<sup>1</sup>, Vetoshkin K. A.<sup>1</sup>, Kalinina E. N.<sup>1</sup>, Knyazev M. G.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Federal State Budget institution of Science «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency», Kirov

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Institute of Physiology of the Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar

<sup>3</sup> Federal State Budgetary Institution of Higher Professional Education «Kirov State Medical Academy» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Kirov

## A FOUR CLASS SYSTEMATIZATION OF BIOCRYOCONSERVANTS.

### The II class of cold preserving solutions — exocellular cryoprotectants

**Резюме.** В работе продолжается изложение сведений о химических веществах, представляющих II класс биокриоконсервантов. Рецептура хладоагентов базируется на моно- (одном) или би- (двух) экзоцеллюлярных криопротекторах. Охарактеризованы физико-химические, биологические, токсико-фармакологические свойства и криозащитная эффективность криоконсервантов на основе поливинилпирролидона (ПВП) и гидроксипропилированного крахмала (ГЭК) в практике низкотемпературного консервирования клеток крови и костного мозга.

**Ключевые слова:** экзоцеллюлярные криопротекторы, биокриоконсерванты.

**Summary.** The paper continues the presentation of information about chemicals of class II biocryoconservants. Formulation of refrigerants is based on mono- (single) or bi- (two) exocellular cryoprotectors. Physico-chemical, biological, toxicological, and pharmacological properties of cryoprotecting cryoprotectant efficiency based on polyvinylpyrrolidone (PVP) and hydroxyethyl starch (HES) in the practice of low temperature preservation of blood and bone marrow cells are characterized.

**Key words:** exocellular cryoprotectants, biocryoconservants, classifications.

**Введение.** В предыдущем сообщении (Аннотации криобиологии. Классификации криопротекторов и криоконсервантов для клеток крови костного мозга) были использованы результаты научных исследований Е. П. Сведенцова [1] по обобщению теоретических сведений и практического опыта, накопленных в криобиологических центрах нашей страны и за рубежом.

Цель настоящей работы — ознакомление широкого круга ученых и практиков, посвятивших себя решению сложных проблем

трансфузионной криобиологии, со II классом хладоограждающих растворов.

**Материалы и методы.** II класс хладоограждающих растворов образован криоконсервантами, не проникающими в клетки [1]. Растворы не проникающих в клетки органических веществ, как правило, обладают слабыми хладозащитными свойствами и низкой токсичностью на клеточном и организменном уровне [1]. Содержат по одному (моно-) или два (би-) криоконсерванта экзоцеллюлярного действия. Трансфузиологический

интерес к экзоцеллюлярным криопротекторам не ослабевает, так как на их основе можно синтезировать биокриоконсерванты, не требующие удаления из отогретой клеточной взвеси. Из числа криопротекторов, входящих во II класс криоконсервантов, наиболее выраженными хладозащитными свойствами обладают искусственный полимер поливинилпирролидон и растворы на его основе, а также гидроксипропилкрахмал (ГЭК) и водные растворы на его основе.

Краткие сведения о поливинилпирролидоне (ПВП). ПВП — продукт полимеризации  $N_1$ -винилпирролидона и ацетилена. Брутто-формула  $(C_6H_9NO)_n$ . В СССР приоритет принадлежит С. Н. Ушакову с соавт. [3] и М. Ф. Шостаковскому с соавт. [4]. рН раствора около 7,0; не вызывает раздражения при подкожных, внутримышечных и внутривенных введениях.  $LD_{50}$  на мышах не установлена. При внутривенном введении 25 % раствора переносимая доза ПВП составила 8 г/кг массы тела, летальная — 12–15 г/кг. ПВП термостойчив, хорошо переносит стерилизацию в автоклаве. Стерилизация ПВП озоном в концентрации 5 мг/л и больше вызывает разрушение химического вещества [5]. Водные растворы ПВП м. м. 12 000–25 000 являются фармакопейными препаратами и применяются в трансфузиологии в качестве плазмозаменителей, обладающих дезинтоксикационным действием. Примером может служить отечественный препарат Гемодез — 6 % ПВП с м. м.  $12\ 000 \pm 2700$ .

Препараты ПВП с м. м. от 30 000 до 40 000 и больше могут содержать примеси альдегидов, которые способны индуцировать перекисные процессы в клетках и оказывать на них токсическое действие. Согласно данным ряда авторов [6, 7], отмечены деструктивные изменения ретикулоэндотелиальных клеток селезенки, а также длительная задержка ПВП в печени, селезенке, бронхах, костном мозге, почках, поджелудочной железе и других органах. Выведение растворов ПВП с м. м. 50 000 сопровождается образованием пристеночных тромбов и других осложнений.

**Моноэкзоцеллюлярные криоконсерванты на основе ПВП для замораживания ГСК костного мозга при  $-78^\circ\text{C}$ – $-196^\circ\text{C}$ .**

Криопротекторные свойства ПВП достаточно полно изучены С. С. Лаврик [7, 8]. В том числе разработаны методы замораживания

ЯККМ под защитой 2 лекарственных форм.

**Лекарственная форма № 1** включает: Поливинилпирролидон с м. м. 12 600, 17 г; Глюкоза, 10,2 г; Сыворотка крови группы АВ(IV), 10 мл; Гепарин, 2500 МЕ; Бидистиллированная вода — до 100 мл. Защитную среду готовят *ex tempore* перед консервированием ЯККМ. Утверждена МЗ УССР 22.07.1971 года.

Стерильный криоконсервант соединяют с концентратом ЯККМ 1:1. При этом конечная концентрация ПВП в полученной суспензии составляет 8,5 %. Суспензию клеток выдерживают при  $+2^\circ\text{C}$ – $+4^\circ\text{C}$  в течение 20–30 мин, затем замораживают по двухэтапной программе: на первом этапе со скоростью  $1^\circ\text{C}/\text{мин}$  до  $-20^\circ\text{C}$ , затем со скоростью  $10^\circ\text{C}/\text{мин}$  до  $-60^\circ\text{C}$ , после чего переносят в сосуд с твердой углекислотой при  $-78^\circ\text{C}$  на срок до 21 мес. Отогревание образцов ЯККМ производят в водяной ванне при  $+38^\circ\text{C}$  в течение 60–70 сек. При этом сохраняется  $86 \pm 3,8\%$  жизнеспособных клеток. В случае помещения суспензии в жидкий азот ( $-196^\circ\text{C}$ ) на срок от 21 мес. до 10 лет сохраняется, соответственно, до  $90 \pm 2,4\%$  и  $83,3 \pm 0,97\%$  эозинорезистентных клеток.

**Лекарственная форма № 2** имеет следующий состав: Поливинилпирролидон с м. м.  $12\ 600 \pm 2\ 700$ , 200 г; Глюкоза, 100 г; Аминокровин, 50 мл; Натриевая соль сахарной кислоты, 20 г; Натрий фосфат трехзамещенный, 17 г; Вода для инъекций — до 1000 мл. рН 3,8–4,0.

Стерилизуют через фильтры Millipore с диаметром пор 0,22 мкм и повторно автоклавированием при  $105^\circ\text{C}$  в течение 45 мин. Приготовленный раствор стерилен, непирогенен, нетоксичен. Хранят в сухом темном помещении при комнатной температуре до 2 лет. Смешивают с концентратом ЯККМ 1:1, эквilibрируют при комнатной температуре 30 мин, замораживают по 2 этапной программе: на первом этапе — со скоростью  $0,8^\circ\text{C}$ – $1,5^\circ\text{C}/\text{мин}$  до точки кристаллизации, на втором — со скоростью  $10^\circ\text{C}/\text{мин}$  до  $-70^\circ\text{C}$ , после чего переключают в электроморозильник на  $-85^\circ$  —  $-90^\circ\text{C}$  на срок до 5 мес. При указанной технологии сохраняется 63,5 % жизнеспособных ЯККМ.

**Метод консервирования ядерных клеток пуповинной крови при  $-80^\circ\text{C}$ – $-196^\circ\text{C}$  под защитой моноэкзоцеллюлярного криоконсерванта на основе ПВП.**

Разработан П. М. Перехристенко с соавт. [9]. Изъятую пуповинную кровь тестируют

по системам АВО, Резус, HLA, определяют иммунофенотип ГСК, подсчитывают число ядерных клеток и ГСК в 1 мкл взвеси, стабилизированной 4:1 на гемоконсерванте Глюгицир. **Состав гемоконсерванта Глюгицир:** Натрий гидроцитрат для инъекций (ГФХ, стр.432), 20 г; Глюкоза (ГФХ, стр. 311), 30 г; Вода для инъекций (ГФХ, стр.74) до 1000 мл.

Стабилизированная кровь сохраняется при  $+4\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 48 час. Ядерные клетки выделяют из крови путем ее центрифугирования со скоростью 1200 об/мин в течение 15 мин. Плазму отсасывают, замораживают при  $-20^\circ\text{C}$ – $-30^\circ\text{C}$  и сохраняют до размораживания ГСК и последующего ресуспендирования ГСК в ней.

Для криоконсервирования концентрата ядерных клеток с ГСК используют **криоконсервирующий раствор**, в который входят: Поливинилпирролидон низкомолекулярный медицинский (ФС 42–1194–78), 17- г; Глюкоза (ГФХ, стр. 311), 100 г; Лактоза (ГФХ, стр. 589), 40 г; Вода для инъекций (ГФХ, стр. 74) до 1000 мл.

Раствор разливают в стеклянные флаконы вместимостью 100 мл по 50 мл, автоклавируют при  $+120\pm 2^\circ\text{C}$  и давлении пара  $10,8\cdot 10^4$  Па ( $1,1$  кгс/см<sup>2</sup>) в течение 30 мин.

В асептических условиях к клеточной массе приливают криоконсервант в соотношении 1:1, перемешивают, разливают в криоконтейнеры объемом 75 или 160 мл. Холодовую адаптацию ГСК проводят при  $+4\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 30–40 мин. Биоконтейнеры с клеточной суспензией замораживают по двухэтапной программе: на первом этапе со скоростью  $1^\circ\text{C}/\text{мин}$  до  $-6^\circ\text{C}$ , на втором —  $10^\circ\text{C}/\text{мин}$  до  $-80^\circ\text{C}$ , после чего переносят в хранилище с жидким азотом ( $-196^\circ\text{C}$ ) для хранения на протяжении до 10 лет без снижения биологической полноценности ГСК. Размораживают в водяной ванне при  $+40\pm 5^\circ\text{C}$  в течение  $35\pm 5$  сек. В результате сохраняется не менее 80 % ядерных клеток.

Гидроксиэтилированный крахмал (ГЭК) — высокомолекулярное соединение, является продуктом реакций окиси этилена и амилопектина. Состоит из полимеризованных остатков глюкозы [10]. Оказалось, что концентрации 70 % ГЭК не подвергаются замораживанию. Изучение физиологического эффекта в эксперименте и клинике показало, что ГЭК является нетоксичным, биологически инертным с практически отсутствующей иммунологической активностью [6]. Этот полимер относится к числу экстрацеллюлярных криопротекторов и является в 14 % концентрации эффективным при криоконсервировании эритроцитов до  $-196^\circ\text{C}$  и быстром отогреве клеточной суспензии при  $48^\circ\text{C}$ . Замораживание 385 мл крови таким способом обеспечивает сохранность до 98 % эритроцитов. Растворы 15 % ГЭК при замораживании ядерных клеток костного мозга по определенной программе позволяют сохранить высокое число жизнеспособных клеток. При комбинированном замораживании 4 % ГЭК с 5 % ДМСО гранулоцитов человека до  $-80^\circ\text{C}$  со скоростью 2 град/мин и отогрева сохраняется  $95\pm 2\%$  форменных элементов. ГЭК по криопротективной активности близок к ДМСО. В 1969 г. было впервые сообщено о сохранности до 70 % тромбоцитов при использовании 6 % ГЭК [5].

В целом вопрос о широком применении растворов ПВП и ГЭК для замораживания клеток и тканей не может считаться окончательно решенным. До сих пор не определено место ГЭК в ряду известных веществ со свойствами криопротекторов. Так же не решены важные в клиническом плане проблемы с предупреждением многообразных аллергических и анафилактикоидных реакций различной степени тяжести у реципиентов после инфузий криоконсервантов на базе ГЭК. Это требует дальнейших исследований в направлении изучения механизма действия полимеров на физико-химические свойства замороженно-отогретых клеток.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Е. П. Сведенцов. Криоконсерванты для живых клеток. — Сыктывкар, 2010. — 80 с.
2. С. С. Лаврик. Консервирование костного мозга. — Киев: «Здоров'я», 1975. — 126 с.
3. С. Н. Ушаков, В. В. Давиденков, Л. Г. Богомолова и др. О синтезе поливинилпирролидона и его полимеров для плазмозамещающего раствора. — В кн: Актуальные вопросы переливания крови, 1954, в.3. — С. 107–111.
4. М. Ф. Шостаковский, П. С. Васильев, Ф. П. Сидельковская и др. Синтетический плазмозамещающий препарат поливинилпирролидон. — В кн.: Современные проблемы гематологии и переливания крови. — 1959, в.3. — 91–97.
5. А. А. Костяев. Низкотемпературное консервирование гемопоэтических стволовых клеток в режиме быстрого двухступенчатого замораживания (экспериментальное исследование). Дисс.: докт. мед. наук. — СПб, 2003. — 228 с.
6. А. М. Белоус, М. И. Шраго, Н. С. Пушкарь. Криоконсерванты. — Киев: Наук.думка, 1979. — 198 с.
7. С. С. Лаврик. Консервирование костного мозга. Киев: «Здоров'я», 1975. — 126 с.
8. С. С. Лаврик. Консервирование костного мозга глубоким замораживанием. Автореф: дис. докт. мед. наук. — Киев, 1966. — 48 с.
9. П. М. Перехристенко, Г. И. Когут, Г. Т. Глухенькая. Методические рекомендации: Заготовка криоконсервированных гемопоэтических клеток хордовой крови для клинического применения. Киев. — 1998. — 11 с.
10. С. С. Kesler, E. T. Hjermstad. Synthesis of hydroxyethyl starch. — In: Methods in carbohydrate chemistry / Ed. Royal Whistler. New York: Acad. Press, 1964. — P. 304–306.

Санкт-Петербург  
15 июля 2016 года

**КОНСУЛЬТАЦИОННЫЙ СОВЕТ  
ПО ВОПРОСАМ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЦИТАРНЫМ ЛЕЙКОЗОМ  
И СОПУТСТВУЮЩИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ**

**Резолюция**

**Участники экспертного совета:**

**Зарицкий Андрей Юрьевич** — доктор медицинских наук, профессор, директор Института гематологии ФГБУ ФЦСКЭ им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург

**Бессмельцев Станислав Семёнович** — доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России», Санкт-Петербург

**Стадник Елена Александровна** — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник НИЛ онкогематологии ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, доцент кафедры факультетской терапии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург

**Михайлова Наталия Борисовна** — кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией молекулярной гематологии и трансплантологии НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой Первого СПб ГМУ им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург

**Ильин Николай Васильевич** — доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения лучевой терапии системных заболеваний и лучевой патологии ФГУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий Министерства здравоохранения и социального развития РФ», Санкт-Петербург

**Булиева Наталья Борисовна** — доктор медицинских наук, доцент Балтийского федерального университета им. И. Канта — главный внештатный гематолог Калининградской области, Калининград

**Медведева Надежда Вадимовна** — кандидат медицинских наук, руководитель Санкт-Петербургского городского центра онкогематологии на базе ГКБ № 31 — заместитель главного врача по медицинской части, Санкт-Петербург

**Шнейдер Татьяна Владимировна** — заведующая отделением гематологии ЛОКБ — главный внештатный гематолог Ленинградской области, Санкт-Петербург

**Карягина Елена Викторовна** — заведующая отделением гематологии ГБ № 15, Санкт-Петербург

**Анчукова Людмила Викторовна** — БУЗ ВО «Вологодская областная больница № 1», заведующая гематологическим отделением — главный внештатный гематолог Вологодской области, Вологда

**Мейке Галина Александровна** — заведующая гематологическим отделением ГОБУЗ «МОКБ им. П. А. Баяндина» — главный внештатный специалист-гематолог Министерства здравоохранения по Мурманской области, Мурманск



**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТАКТИКИ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ХЛЛ  
И СОПУТСТВУЮЩИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ**

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) — самый частый вид лейкозов у взрослого населения. В Европе от ХЛЛ умирает около 10 000 человек ежегодно. ХЛЛ в настоящее время остается неизлечимым заболеванием, при этом большинство пациентов составляют пожилые люди старше 60 лет. Медиана возраста на момент установления диагноза в Европейских странах составляет 69 лет, а в России — 61 год. Это доказывает то, что основной контингент пациентов с ХЛЛ представлен активным, трудоспособным населением. По данным официальной статистики, в 2014 г. в Российской Федерации было диагностировано 3962 случая ХЛЛ.

Соматическое состояние пациентов на момент постановки диагноза зачастую отягощено сопутствующей патологией и/или физиологическим снижением функции органов. Значимая сопутствующая патология (наиболее распространённая — заболевания сердечно-сосудистой системы и сахарный диабет) встречается у 46 % пациентов с впервые диагностированным ХЛЛ. В этой связи возраст, число и тяжесть сопутствующих заболеваний в большей мере влияют на цели лечения ввиду меньшей ожидаемой продолжительности жизни. Сопутствующая патология также усугубляет осложнения, индуцированные агрессивной терапией.

Однако основные терапевтические режимы (FCR, BR) изучены в популяции пациентов с медианой возраста 57–65 лет без значимых сопутствующих заболеваний.

Выбор терапии у больных ХЛЛ основывается на трех группах факторов:

1. Клинические особенности заболевания: тяжесть клинических проявлений, наличие факторов неблагоприятного прогноза (делеция 17p, мутация TP53).
2. Состояние больного: возраст, соматический статус, сопутствующие заболевания, ожидаемая продолжительность жизни, не связанная с ХЛЛ.
3. Факторы, связанные с лечением: наличие противопоказаний к данному препарату, качество, продолжительность ответа и токсичность ранее проводившегося лечения.

Для оценки коморбидности у онкогематологических больных используются ряд шкал,

большинство из которых не валидированы для пациентов с ХЛЛ. Наиболее часто используется шкала CIRS (Cumulative Illness Rating Score). Показано, что наличие сопутствующих заболеваний ухудшает результаты терапии с использованием FCR.

Крайне неблагоприятно сказывается на БПВ и ОВ нарушение почечной функции, частота которой увеличивается с возрастом.

По данным регистра Российского общества онкогематологов, количество пациентов с ХЛЛ, имеющих 2 сопутствующих заболевания, составляет 21 %, а 3 и более — 29 %. Значительная часть пациентов из данной группы не может получить стандартную иммунохимиотерапию по схеме R-FC в связи с наличием сопутствующих заболеваний. У данного контингента больных часто используется хлорамбуцил или его комбинация с ритуксимабом, значительно уступающие по своей эффективности схеме FCR.

Эффективность обинутузумаба доказана в рамках клинического исследования III фазы — CLL11, единственного испытания терапии первой линии на столь прогностически неблагоприятной группе больных ХЛЛ — пожилых с наличием сопутствующих заболеваний, которые составляли 78 % от всех включённых пациентов. Обинутузумаб — первый лекарственный препарат, который доказал свое превосходство в комбинации с хлорамбуцилом (по сравнению с комбинацией хлорбутин и ритуксимаб) для лечения больных ХЛЛ с сопутствующей патологией, статистически значимо увеличив выживаемость без прогрессирования на 14 месяцев. Время же до следующей терапии у пациентов на комбинации обинутузумаб с хлорамбуцилом составило — 51,1 месяц.

Обнадёживающие результаты были получены в ходе исследования Green (NCT01905943) по эффективности комбинации лекарственных препаратов обинутузумаб и бендамустин у пациентов с хроническим лимфолейкозом, в том числе в ряде центров на территории Российской Федерации. Регистрация этого перспективного режима в РФ для терапии больных с ХЛЛ может решить ряд серьёзных проблем, связанных с токсичностью FCR в первой линии терапии.

Включение обинутузумаба (Газива®) в Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов и в Перечень лекарственных препаратов по дорогостоящим нозологиям позволит существенно улучшить результаты лечения и прогноз у данной категории пациентов.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. *Goede V, Fischer K, Busch R, et al.* Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med.* 2014;370:1101–10.
2. *Goede V. et al.* *Haematologica* June 2014 99:1095–1100
3. *Thurmes P, et al.* Comorbid conditions and survival in unselected, newly diagnosed patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2008;49(1):49–56.
4. *Никитин Е.А.* Особенности пациентов с хроническим лимфолейкозом в России — данные Российского регистра больных онкогематологическими заболеваниями. Доклад на XII Российской конференции с международным участием «Злокачественные лимфомы», 22–23 октября 2015.
5. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний. Под ред. И. В. Поддубной, В. Г. Савченко. М., 2014. 274 с.
6. *Стадник Е.А., Зарицкий А.Ю.* Клиническая Онкогематология, 2016;9(2):162–75.

**Утверждаю:**

**Председатель Консультационного Совета**

**Зарицкий А. Ю.**

**Санкт-Петербург  
15 июля 2016 года**

**КОНСУЛЬТАЦИОННЫЙ СОВЕТ  
ПО ВОПРОСАМ ЛЕЧЕНИЯ РЕФРАКТЕРНЫХ ФОРМ Фолликулярной Лимфомы**

**Резолюция**

**Участники экспертного совета:**

**Зарицкий Андрей Юрьевич** — доктор медицинских наук, профессор, директор Института гематологии ФГБУ ФЦСКЭ им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург

**Бессмельцев Станислав Семёнович** — доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России», Санкт-Петербург

**Стадник Елена Александровна** — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник НИЛ онкогематологии ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, доцент кафедры факультетской терапии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург

**Михайлова Наталия Борисовна** — кандидат медицинских наук, руководитель отдела клинической онкологии (химиотерапии) НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой Первого СПб ГМУ им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург

**Ильин Николай Васильевич** — доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения лучевой терапии системных заболеваний и лучевой патологии ФГУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий Министерства здравоохранения и социального развития РФ», Санкт-Петербург

**Булиева Наталья Борисовна** — доктор медицинских наук, доцент Балтийского федерального университета им. И. Канта — главный внештатный гематолог Калининградской области, Калининград

**Медведева Надежда Вадимовна** — кандидат медицинских наук, руководитель Санкт-Петербургского городского центра онкогематологии на базе ГКБ № 31 — заместитель главного врача по медицинской части, Санкт-Петербург

**Шнейдер Татьяна Владимировна** — заведующая отделением гематологии ЛОКБ — главный внештатный гематолог Ленинградской области, Санкт-Петербург

**Карягина Елена Викторовна** — заведующая отделением гематологии ГБ № 15, Санкт-Петербург

**Анчукова Людмила Викторовна** — БУЗ ВО «Вологодская областная больница № 1», заведующая гематологическим отделением — главный внештатный гематолог Вологодской области, Вологда

**Мейке Галина Александровна** — заведующая гематологическим отделением ГОБУЗ «МОКБ им. П. А. Баяндина» — главный внештатный специалист-гематолог Министерства здравоохранения по Мурманской области, Мурманск

## ЛЕЧЕНИЕ ПАЦИЕНТОВ С РЕФРАКТЕРНЫМИ ФОРМАМИ ФОЛЛИКУЛЯРНЫЙ ЛИМФОМЫ

Фолликулярной лимфоме (ФЛ) принадлежит второе место в мире по частоте среди неходжкинских лимфом, что составляет в среднем 20 % всех злокачественных лимфопротролиферативных заболеваний взрослых. Этот показатель существенно различается в зависимости от географического региона, этнической и расовой принадлежности больных. В европейских странах заболеваемость ФЛ составляет 5–7 случаев на 100 000 населения, в странах Азии частота ФЛ не превышает 9–10 %. Среди жителей Северо-Западного региона России частота ФЛ приближается к 11 %. Медиана возраста больных составляет 60 лет.

Иммунохимиотерапия за последние годы стала стандартом лечения первой линии большинства больных ФЛ. Результаты нескольких крупных рандомизированных исследований продемонстрировали, что добавление ритуксимаба к стандартной химиотерапии существенно улучшает как непосредственные, так и отдаленные результаты терапии, увеличивает выживаемость без прогрессирования и общую выживаемость больных.

Однако биологические особенности опухоли таковы, что развитие рецидивов при ФЛ неизбежно. Подбор терапии при каждом последующем рецидиве представляется все более сложным, каждая последующая ремиссия короче предыдущей. Повторное применение ритуксимаба в комбинации с химиотерапией целесообразно, если противоопухолевый эффект сохранялся хотя бы 6 мес после завершения иммунохимиотерапии. В противном случае речь идет о неблагоприятной по прогнозу рефрактерной к ритуксимабу группе больных. Согласно литературным данным, 10 % пациентов с ФЛ прогрессируют уже на первой линии ритуксимабсодержащей терапии,

а 22 % становятся рефрактерными ко второй линии. Соответственно, около 32 % пациентов приобретают рефрактерность к стандартной иммунохимиотерапии при проведении первой и второй линии терапии ФЛ.

По данным регистра Онкогематологического сообщества, количество первично-рефрактерных пациентов в России составляет 10 %, а у 27 % пациентов при лечении ФЛ удается достичь лишь стабилизации заболевания.

До настоящего момента отсутствовали данные рандомизированных исследований, демонстрирующих преимущество какого-либо режима лечения у данной группы пациентов. Ранее при использовании бендамустина в небольших несравнительных исследованиях медиана выживаемости без прогрессирования составляла всего 9,7 мес. Высокая эффективность обинутузумаба у пациентов с рефрактерной к ритуксимабу ФЛ была подтверждена в рамках рандомизированного клинического исследования III фазы GADOLIN. Результаты исследования продемонстрировали, что применение обинутузумаба в комбинации с бендамустином и последующая поддерживающая терапия обинутузумабом позволили более чем в 2 раза увеличить выживаемость без прогрессирования по сравнению с монотерапией бендамустином.

Таким образом, внедрение обинутузумаба в стандартную терапию у пациентов с рефрактерной к ритуксимабу ФЛ, а также включение **обинутузумаба (Газива®)** в Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов и в Перечень лекарственных препаратов по дорогостоящим нозологиям позволяют существенно улучшить результаты лечения и прогноз у этих пациентов.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. *Casulo C, Byrtek M, Dawson K. L. et al.* Early Relapse of Follicular Lymphoma After Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Defines Patients at High Risk for Death: An Analysis From the National LymphoCare Study. *J Clin Oncol.* 2015;33:2516–22.
2. *Sehn L. H., et al.* GADOLIN: Primary results from a phase III study of obinutuzumab plus bendamustine compared with bendamustine alone in patients with rituximab-refractory indolent non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol.* 2015;33(Suppl): abstr LBA8502.
3. Злокачественные новообразования в России в 2014 году (заболеваемость и смертность). Под ред. *А. Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой.* М.: МНИОИ им. П. А. Герцена, филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2016. 250 с.
4. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний. Под ред. *И. В. Поддубной, В. Г. Савченко.* М., 2014. 274 с.

**Утверждаю:**

**Председатель Консультационного Совета**

**Зарицкий А. Ю.**

## ПАМЯТИ

## Кудрата Мугутдиновича Абдулкадырова

30 июня 2016 г. после продолжительной болезни на 83-м году жизни скончался руководитель гематологической клиники Российского научно-исследовательского института гематологии и трансфузиологии, главный внештатный специалист-гематолог Комитета по здравоохранению Правительства г. Санкт-Петербурга, главный редактор журнала «Вестник гематологии», член редколлегии журнала «Трансфузиология», заслуженный деятель науки РФ, заслуженный врач РФ, профессор, доктор медицинских наук Кудрат Мугутдинович Абдулкадыров.

Кудрат Мугутдинович родился в 1933 г. в селе Ярагказмаляр Магарамкентского района Дагестанской АССР в многодетной семье школьного учителя. В 1957 г. с отличием окончил Дагестанский медицинский институт, работал врачом в районной больнице. С 1960 по 1962 гг. обучался в клинической ординатуре в Ленинградском НИИ переливания крови, с которым в последующем навсегда связал свою жизнь и профессиональную деятельность. Прошел путь от аспиранта до руководителя гематологической клиники. В 1966 г. защитил кандидатскую, а в 1973 г. — докторскую диссертацию. В 1978 г. ему было присвоено ученое звание профессора.

Кудрат Мугутдинович был одним из ведущих специалистов в области гематологии и внес огромный вклад в развитие этого направления. Его научные исследования были посвящены изучению причин и механизмов становления и развития различных заболеваний системы крови, разработке эффективных способов их диагностики и лечения.

Принципиальное значение имеют работы К. М. Абдулкадырова по изучению эффективности современных программ химиотерапии острых и хронических лейкозов, множественной миеломы, неходжкинских лимфом и лимфомы Ходжкина. Разработаны и апробированы методы стандартной и высокодозовой химиотерапии, аутологичной и аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, другие современные методы лечения заболеваний системы крови, которые широко используются в отечественном здравоохранении,

Одним из важных направлений научно-исследовательской деятельности К. М. Абдулкадырова являлась разработка способов гематологической и иммунологической реанимации гематологических больных, включающих заместительную гемокомпонентную терапию, коррекцию нарушений гемопоэза, реологических свойств крови, методов иммунологического воздействия на опухолевые клетки. К данному направлению примыкает также комплексная работа по разработке методов сопроводительной терапии. К. М. Абдулкадыров неоднократно обращал внимание на то, что лечение больных с онкогематологическими заболеваниями невозможно без терапии поддержки. Ряд методов инфузионно-детоксикационной терапии, такие как гемосорбция, плазмасорбция, лечебный плазмацитаферез, парентеральное питание, при заболеваниях системы крови были предложены и использованы в клинике впервые в стране. Пионерскими были работы по изучению влияния лазерного и СВЧ-излучений на гемопоэз и иммунную систему человека. Был апробирован и внедрен в лечебную практику метод ультрафиолетового облучения аутокрови у пациентов с заболеваниями системы крови, что существенно повысило эффективность терапии.

В центре внимания К. М. Абдулкадырова в последние 25 лет были вопросы цитогенетических и молекулярно-генетических исследований, способствующих выяснению механизмов развития злокачественных новообразований лимфоидной,

кроветворной и родственных им тканей, использованию при их лечении лекарственных средств с биологически обоснованным воздействием на опухолевые клетки.

При непосредственном участии К. М. Абдулкадырова был разработан и впервые внедрен метод прижизненного гистологического исследования костного мозга — трепанобиопсия. Использование этого объективного и высокоинформативного метода пункционной биопсии костного мозга в широкой клинической практике значительно расширило диагностические возможности врачей-гематологов.

Еще одним направлением научной деятельности К. М. Абдулкадырова была разработка дифференцированных показаний к гемокомпонентной терапии заболеваний системы крови, повышение ее эффективности, профилактика возникающих осложнений. Последние 2 десятилетия проводилась работа по использованию эритропоэзстимулирующих препаратов у больных хроническим лимфолейкозом, лимфомами, множественной миеломой и др.

В клинике, руководимой К. М. Абдулкадыровым, были разработаны способы заготовки гемопоэтических стволовых клеток, технологии их криоконсервирования, миело- и немиелоаблативные режимы подготовки пациентов к трансплантации. В конце 90-х годов XX в. впервые в России разработаны способы получения, заготовки, хранения и лабораторного тестирования пуповинной крови для создания банков и последующего ее клинического применения

В последние годы жизни К. М. Абдулкадыров сосредоточился на изучении механизмов действия лекарственных средств при заболеваниях системы крови, разработке способов преодоления лекарственной резистентности, активно работал над программами диагностики, мониторинга и эрадикации минимальной остаточной болезни у больных опухолевыми заболеваниями системы крови, обеспечивающими повышение продолжительности и качества жизни больных.

Кудрат Мугутдинович — не только известный ученый отечественной и мировой гематологии, создавший ведущую научную гематологическую школу, но и опытный клиницист, посвятивший более полувека лечению больных.

Являясь в течение многих лет главным специалистом Комитета здравоохранения Санкт-Петербурга, К. М. Абдулкадыров внес большой вклад в развитие научно-организационных основ гематологии, разработку основополагающих нормативных документов. Принимал активное участие при разработке стандартов медицинской помощи пациентам с заболеваниями системы крови, составлении требований к учреждениям, оказывающим высокотехнологичную медицинскую помощь по профилям «Гематология», «Онкология (онкогематология)» и «Трансплантация костного мозга».

Председатель Санкт-Петербургского научного общества гематологов и трансфузиологов, член правления Санкт-Петербургского общества терапевтов, президент Санкт-Петербургской гематологической Ассоциации, член Европейской группы трансплантации костного мозга (EBMT), член Европейской гематологической ассоциации (ЕНА), член Международного общества по переливанию крови (ISBT), член Международного регистра трансплантации костного мозга (IBMTR/ABMTR), член Европейского общества медицинских онкологов (ESMO).

За многолетнюю научную и практическую деятельность Кудрат Мугутдинович воспитал целую плеяду известных ученых. Под его руководством защищено более 50 кандидатских диссертаций, в том числе 8 — докторских. Автор более 650 статей в различных ведущих отечественных и зарубежных журналах, более 60 методических рекомендаций и пособий, 17 изобретений, 19 монографий и справочников,

в т. ч. «Множественная миелома», «Хронический миелолейкоз», «Гематология. Новейший справочник» и т. д.

Трудовой и творческий путь Кудрата Мугутдиновича отмечен государственными наградами: Медаль «За доблестный труд, 1970 г.; «Отличник Здравоохранения», 1976 г.; Медаль «Ветеран труда», 1984 г.; Медаль «За заслуги перед отечественным здравоохранением», Почетная грамота Республики Дагестан, 2000 г.; Почетный диплом Законодательного собрания Санкт-Петербурга, 2003 г.; Почетная грамота Комитета по Здравоохранению администрации Санкт-Петербурга, 2003 г.; орден Дружбы, 2015 г.

Кудрата Мугутдиновича отличали блестящий талант ученого и руководителя, богатая научная эрудиция, требовательность, принципиальность и одновременно скромность и чуткое отношение к сотрудникам, что позволило ему снискать глубокое уважение коллег.

**СВЕТЛАЯ ПАМЯТЬ  
О ПРОФЕССОРЕ КУДРАТЕ МУГУТДИНОВИЧЕ АБДУЛКАДЫРОВЕ  
НАВСЕГДА ОСТАНЕТСЯ В НАШИХ СЕРДЦАХ!**

