

МЕДИЧНІ НАУКИ

УДК 615.387:612.41(477)

DOI: 10.15587/2313-8416.2017.118384

ДОСЛІДЖЕННЯ КРІОЧУТЛИВОСТІ КЛІТИН ПУПОВИННОЇ КРОВІ: ЗВ'ЯЗОК З ОКРЕМИМИ АНТИГЕННИМИ ДЕТЕРМІНАНТАМИ ГРУП КРОВІ

©Т. О. Калиниченко, М. Ю. Аношина, Р. П. Павлюк, В. В. Балан

Стаття присвячена пошуку можливих зв'язків між окремими характеристиками фенотипу донора пуповинної крові (AB0 і резус – належністю) та збереженістю клітинного контенту при кріоконсервуванні. Виявлено існування таких зв'язків зі стійкістю еритроцитів та еритроїдних клітин-попередників гемопоезу. Прогнозування ризиків зниження якості при зберіганні дозволить попереджати розвиток негативних наслідків шляхом впровадження додаткових заходів кріозахисту

Ключові слова: пуповинна кров, кріоконсервування, AB0 -групова та резус-належність

1. Вступ

Одним з пріоритетних напрямків сучасної медицини, зокрема виробничої трансфузіології, є створення низькотемпературних банків кріоконсервованих компонентів крові та гемопоетичної тканини.

Клінічні результати застосування трансплантаційних та трансфузійних медичних технологій тісно пов'язані з якістю донорського матеріалу, що зберігається в умовах наднизьких температур. На жаль, як об'єкти кріоконсервування, клітинні системи крові та гемопоетичної тканини зазнають руйнівного впливу фізико-хімічних чинників під час технологічного процесу, що, не зважаючи на прогрес, все ще призводить до значних кількісно-якісних втрат [1, 2]. Часто це є результатом особливостей реакції клітин з різною гістологічною організацією та специфічністю їх протидії стрес-факторам процесу заморожування-відтаювання [3]. Тому, для розвитку та вдосконалення методів кріоконсервування клітинних суспензій необхідне деталізоване вивчення можливих зв'язків збереженості клітин в умовах кріоконсервування з їх окремими індивідуальними характеристиками, що і стало підґрунтям актуальності проведених досліджень.

2. Літературний огляд

Сьогодні, як і раніше, пошук нових методів кріоконсервації клітинних суспензій базується на вивченні механізмів кріопшкодження і кріозахисту у процесі заморожування та деконсервації [4]. Технології кріоконсервування гемопоетичної тканини (пуповинної крові, кісткового мозку, стовбурових клітин периферичної крові), що існують на сьогоднішній день й базуються на класичних підходах до кріозахисту, на жаль, мають обмежені можливості кількісного виходу життєздатних клітин після розморожування. Так, життєздатність ядромісних клітин з цих джерел, що зберігають під захистом 5–10 % диметилсульфоксиду, в середньому складає 75,3–84,3 % [5, 6]. Очевидно, що ступінь кріопшкодження та втрата

клітин безпосередньо залежать від їх природних адаптаційних властивостей.

У цьому зв'язку біологічна роль рецепторів груп крові може бути набагато більшою, ніж здається. Загалом, антигени груп крові є або вуглеводами, або білками. Вони приєднані до різних компонентів мембрани еритроцита. Вуглеводи, що є антигенами груп крові AB0, з'являються в результаті серії реакцій, у яких ензими каталізують трансфер вуглеводних одиниць. Навпаки, антигени групи Rh являють собою білки. Так, антиген D кодується геном RHD. Деякі люди мають версію цього гена, що не продукує антиген D, тому білок RhD відсутній на їх еритроцитах [7].

На сьогоднішній день, не дивлячись на знання щодо варіабельності структури вуглеводних антигенів системи AB0 та їх поліморфних рівнів експресії у тканинній та екзокринній секреціях, мало що відомо про їх біологічну важливість, функцію та потенціал застосування у медицині [8]. Вони мають тісні зв'язки з генним, тканинним рівнями, а також з ензиматичними, біохімічними, та імунними реакціями [9]. Так, AB0 система характеризується присутністю або відсутністю двох вуглеводних антигенів (A та B) на мембрані еритроцитів та регулярних антитіл (анти-A, анти-B, анти-A,B) у плазмі крові. Вуглеводні рецептори груп крові синтезовані з прекурсорів олігосахаридів типу 2, які є невід'ємною частиною мембрани еритроцитів та експресовані попередниками еритроцитів. Однак, ті, що синтезуються з прекурсорних олігосахаридів типу 1 є зовнішніми, у зв'язку з тим, що вони походять з печінки, підшлункової залози, нирок та тонкої кишки. Вони транспортуються з місця синтезу до плазми і потім адсорбуються у мембрану еритроцитів [8, 10].

Вуглеводна варіабельність цих групових систем є залученою у механізми, пов'язані з чутливістю до інфекцій, вродженими та набутими імунними відповідями, онкологічними захворюваннями, трансплантацією солідних органів, дефіцитом факторів згортання

крові, а також є важливими при здійсненні трансплантації органів та трансфузії компонентів крові [11]. Наприклад, люди з типом крові 0 (I) мають тенденцію до більш низьких рівнів факторів VIII та фон Віллебранда [12]. Також зазначені рецептори залучені у процес антитілоопосередкованого відторгнення при трансплантації солідних органів [13]. І, навпаки, модуляція імунної відповіді реципієнта в умовах АВО-несумісної трансплантації може мати позитивний ефект щодо ефективності приживлення [14]. Однак, ці механізми поки що лишаються не з'ясованими.

Системи груп крові містять антигени, що контролюються одним геном або декількома тісно пов'язаними локусами. Системи є генетично відокремленими. Однією з самих складних є система груп крові Rh [15], яка характеризується високим поліморфізмом генів, що кодують її. Багаточисельні генетичні перебудови двох тісно пов'язаних між собою генів RHD і RHCE продукували гібридні, що кодують міриади різних Rh-антигенів. У той час, коли більшість типів груп крові визначається антигенами еритроцитів, що відрізняються однією або двома амінокислотами, система Rh вміщує антиген D, що відрізняється від C/c та E/e антигенів 35 амінокислотами. З цієї причини Rh(D)-антиген є потужним стимулятором імунної відповіді у вигляді значних гемолітичних реакцій при трансфузіях та гемолітичній хворобі новонародженого [16]. При цьому резус-антигени, на сьогодні, все ще трактуються як білки з недостатньо вивченою функцією.

Одним з небагатьох досліджених моментів є транспортування амонію через мембрану еритроцита, а також підтримка її цілісності. Білки Rh знаходяться у тісному зв'язку з глікопротеїном мембрани еритроцита – RhAG. Функція комплексу Rh-RhAG може включати транспортування амонію або двоокису вуглецю. Структурно RhD і RhCE є трансмембранними мультипрохідними білками і невід'ємною частиною мембрани. Білок RhCE кодує C/c-антиген у другій зовнішньоклітинній петлі, а також E/e-антиген – у четвертій. Також він кодує багато інших Rh-антигенів, наприклад Sw, Sx. У свою чергу RhD-білок кодує D-антиген. Таким чином, Rh-антигени експресуються як частина білкового комплексу на мембрані еритроцита. Цей комплекс виражений тільки у клітинах еритроїдної лінії. Склад комплексу невідомий, але вважають, що він представляє з себе тетрамер з двох молекул Rh-асоційованого глікопротеїна (RhAG) та двох молекул Rh-білків [15]. RhAG повинен бути присутнім, щоб направляти Rh-антигени на мембрану еритроцита. У разі його відсутності ні один з Rh-антигенів не виражений. Він пов'язаний з білками Rh, займаючи біля 35 % їх первинної послідовності, і являє собою той же тип трансмембранного білка. Однак він не є поліморфним і не переносить самі Rh-антигени [17]. Білки Rh можуть бути RhD (такі, що несуть D-антиген) або RhCE (такі, що несуть C або c-антиген та E або e-антиген). Невідомо, чи можуть RhCE та RhD знаходитись в одному комплексі, але у D-негативних індивідуумів комплекс буде містити тільки RhCE [15].

З точки зору дослідження кріочутливості важливою є роль Rh-антигенів у підтримці цілісності ери-

троцитарної мембрани. Так, еритроцити, у яких відсутні Rh-антигени, мають особливу форму. При рідкісному фенотипі Rhnull, спричиненому ділецією RHAG, еритроцити не експресують ніякий з Rh –антигенів (вони не можуть бути направлені на мембрану еритроцитів). У цьому випадку відсутність комплексу Rh змінює форму еритроцита, збільшує його осмотичну хрупкість та скорочує тривалість життя клітини [15]. Отже, кожен з генів RHD та RHCE кодує трансмембранний протеїн довжиною понад 400 залишків, що проходить через мембрану еритроцита 12 разів. Тому, їх важливість для підтримки структури та цілісності мембрани клітини важко переоцінити. Окрім того, антигени системи резус є трансмембранними протеїнами, структура яких дозволяє передбачити наявність функції іонних каналів. Особливості трансмембранної транспортної функції у клітинах осіб з різною групою приналежності теоретично також можуть бути пов'язаними з адаптаційними резервами з точки зору ефективності здійснення механізмів кріозахисту.

Виходячи з того, що антигенні детермінанти груп крові виконують функцію транспортних молекул, каналів для води, аніонів, існує ймовірність того, що вони можуть відігравати ключову роль у механізмах кріозахисту, зокрема, при проникненні у клітину кріозахисних речовин, а також у взаємодії цих речовин з мембранними структурами клітини тощо. Деякі з них можуть мати вирішальне значення для стабільності структури мембрани в умовах дії факторів заморожування-відтаювання.

3. Мета та задачі дослідження

Мета дослідження – дослідити можливий зв'язок приналежності зразків ПК до основних двох систем груп крові АВО і Rhesus (з D-позитивними або D-негативними типами крові) з чутливістю клітин до факторів кріоконсервування.

Для досягнення мети були поставлені наступні задачі:

1. Оцінити показники якості клітинних компонентів пуповинної крові від донорів з різними АВО та Rh-фенотипами на етапах процесу кріоконсервування.
2. Проаналізувати наявність зв'язків між зазначеними фенотиповими характеристиками донора та індивідуальними показниками кріочутливості еритроцитів та комітованих еритроїдних клітин-попередників гемопоезу у фракції ядровмісних клітин пуповинної крові при її повільному заморожуванні під захистом диметилсульфоксиду.

4. Матеріали і методи дослідження

Об'єктом досліджень були клітинні компоненти пуповинної крові (ПК): еритроцитарний концентрат (ЕК), еритроцитарна маса (ЕМ), розморожена відмита еритроцитарна маса (РВЕМ), а також фракція ядровмісних клітин (ЯВК).

Заготівлю ПК проводили при фізіологічних умовах за умови завчасного отримання інформованої згоди вагітної. Еритроконцентрат (ЕК) отримували з цільної стабілізованої розчином ЦФДА-1 ПК з використанням методики прискореної седиментації еритроцитів [18]. Середовище для заморожування готували на 10 % плазмозамінюючому колоїдному роз-

чині декстрину 40 («Реополіглюкін», Юрія-Фарм, Україна). У якості криопротектора застосовували диметилсульфоксид (ДМСО, Sigma, США) у кінцевій концентрації 10 %. Після додавання криоконсервуючого розчину ЕМ розливали у криопробірки і заморожували до температури мінус 196 °С шляхом швидкого занурення у рідку фазу азоту. Матеріал зберігали у криопробірках об'ємом 14 мл (6–9 пробірок на 1 зразок) протягом від 1 до 5 місяців. Розморозували зразки на водяній бані при температурі 40±2 °С. Видалення ДМСО проводили загальноприйнятим методом триразового центрифугування з використанням сольових розчинів з поступовим зниженням концентрації від гіпертонічної до ізотонічної. Після ресуспендування еритроцитів у 0,9 % розчині NaCl отримували РВЕМ. Виходячи з принципів виробничої трансфузіології, оцінку якості здійснювали за вмістом вільного гемоглобіну (Hb_v), а також показниками: гематокриту (Ht), кількості еритроцитів, їх осмотичної резистентності (ОРЕ) у 0,45 % розчині натрію хлориду [19, 20].

У якості криопротектора для захисту ЯВК використовували ДМСО у кінцевій концентрації 5 % (за технологією ДУ «ІГТ НАМН») [21]. ДМСО розчиняли у колоїдному розчині (розчин «Реополіглюкін»). Заморожування ЯВК здійснювали зі швидкістю 1,0±0,5 °С/хв від температури 10 °С до –156 °С з наступним занурюванням у рідкий азот. Проби зберігали до 6 міс у рідкій фазі азоту при температурі –196 °С. Розморозування проводили на водяній бані при температурі 38±0,5 °С.

Життєздатність клітин визначали шляхом суправітального забарвлення клітин за допомогою експресних методів оцінки збереженості цитоплазматичних мембран (метод Шрека), а також за допомогою проточного цитофлуориметра FACSCan (BD, США) при застосуванні флуорохрому 7-амино актиноміцину D (7-AAd) за методикою BD [22]. Вміст МНК підраховували в мазках крові, забарвлених за Папенгеймом.

Оцінку проліферативної функції та вмісту еритроїдних клітин-попередників гемопоєзу визначали в культурі тканини, при постановці якої витримувались стандартні умови культивування у метилцелюлозі зі збалансованим коктейлем вітамінів, амінокислот, факторів росту. Густина посіву в стерильних чашках Петрі (d-35 мм) становила 1·10⁵ ЯВК на 1 мл. Культивування проводили при температурі 37 °С в умовах абсолютної вологості в присутності 5 % концентрації CO₂ протягом 14 діб. Підрахунок бурст-/ колонієутворюючих одиниць еритропоєзу (Б-/КУО-Е) здійснювали під малим збільшенням в інвертованому мікроскопі через 7 і 14 діб від початку культивування. БУО-Е рахували як великі (більше 16 кластерів) + + малі (3–8 кластерів, що можуть вміщувати 200–500 гемоглобінізованих еритроїдних клітин); КУО-Е рахували як агрегати, що містять 100–200 еритрокаріоцитів [23].

Концентрацію Hb_v у зразках РВЕМ визначали за методом [24] в авторській модифікації і виражали у перерахунку на вміст еритроцитів.

Проникність еритроцитарних мембран (ПЕМ) визначали методом сечовинного гемолізу, який базу-

ється на вимірюванні ступеня гемолізу за вмісту еритроцитів під дією ізотонічних розчинів сечовини та хлориду натрію у різному за об'ємом співвідношенні у п'яти точках (1 – співвідношення сечовини до хлориду натрію дорівнює 45:55, 2 – 50:50, 3 – 55:45, 4 – 60:40, 5 – 65:35). Ступінь гемолізу у % розраховували, виходячи з оптичної щільності при 100 % гемолізу з концентрацією сечовини в розчині 18 г/л [25].

Представництво еритроцитарних антигенів системи АВ0 і резус визначали за допомогою моноклональних антитіл (МКА) у гелевому тесті [26].

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням комп'ютерної програми Microsoft Excel XP. Оцінку значущості відмінностей середніх величин здійснювали за t-критерієм Ст'юдента для непов'язаних між собою варіаційних рядів, а також за парним t-критерієм Ст'юдента для оцінки значущості змін середніх величин при порівнянні пов'язаних сукупностей результатів, а також непараметричними критеріями (U-критерій Манна-Уїтні, критерій Вілкоксона). Оцінку зв'язків між кількісними ознаками здійснювали методом параметричного кореляційного аналізу за коефіцієнтом лінійної парної кореляції Пірсона [27].

5. Результати досліджень

Дослідження ступеня проникливості еритроцитарної мембрани методом сечовинного гемолізу свідчать про знижену стійкість мембран резус-негативних еритроцитів (n=11), як у нативних клітинах (ЕК), так і після експозиції з криопротектором ДМСО (ЕМ), а також у зразках після розморозування (РВЕМ) з такою у групі з Rh⁺ (n=68) (рис. 1, 2).

Встановлено достовірно менший вміст вільного гемоглобіну у зразках РВЕМ з Rh⁺: (0,273±±0,006)·10⁻¹¹ г проти (0,322±0,024)·10⁻¹¹ г у зразках з негативним резус-фактором (p<0,05). Тобто, зразки з фенотипом D⁻ проявляють схильність до гемолізу. Підтвердженням цьому слід вважати статистично значущу різницю між показниками Ht у групах РВЕМ з D⁻ та D⁺-фенотипами: відповідно (0,45±0,03 та 0,59±0,13, p<0,001).

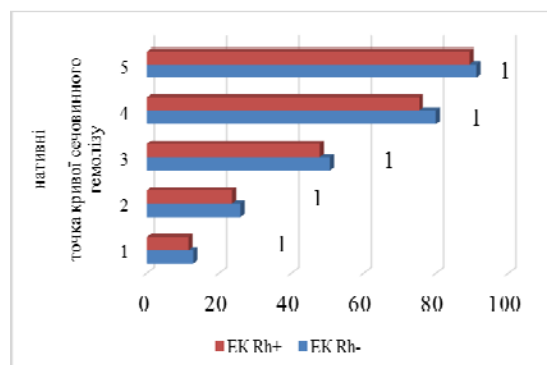
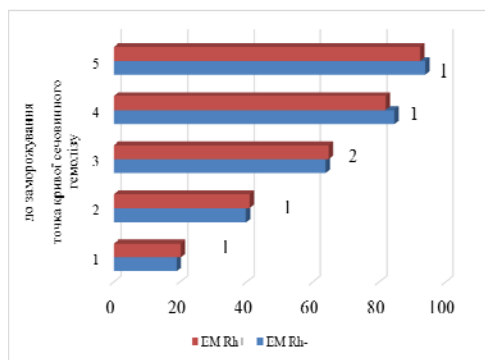
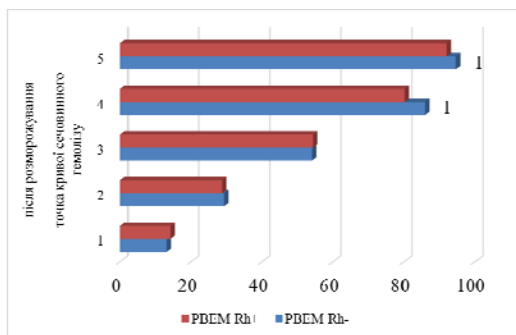


Рис. 1. Проникність мембрани нативних еритроцитів у ЕК резус-негативної і резус-позитивної ПК: 1 – p<0,001 – вірогідність відмінності між показниками у групах зразків з Rh⁺ і Rh⁻-приналежністю

Також суттєво відрізнялись за показниками ПЕМ групи зразків з різною АВ0-груповою належністю (рис. 3).



a



б

Рис. 2. Проникливість мембрани еритроцитів резус-негативної і резус-позитивної ПК: а – у ЕМ до заморожування; б – у РВЕМ після розморожування; 1 – $p < 0,001$; 2 – $p < 0,05$ – вірогідність відмінності між показниками у групах зразків з Rh^+ і Rh^- -приналежністю

Результати ПЕМ, отримані методом сечовинного гемолізу (рис. 3), свідчать, що еритроцити з фенотипом 0, які належать до 0 (I) групи крові мають відносно знижену резистентність порівняно з еритроцитами, що мають А та В детермінанти та

належать відповідно до А (II) та В (III) груп крові. Разом з тим, еритроцити В (III) групи проявляють підвищену стійкість відносно тих, що мають фенотип 0 та А.

Дані (табл. 1) свідчать про статистично значущу різницю між кількісними показниками зразків з різною групою приналежністю.

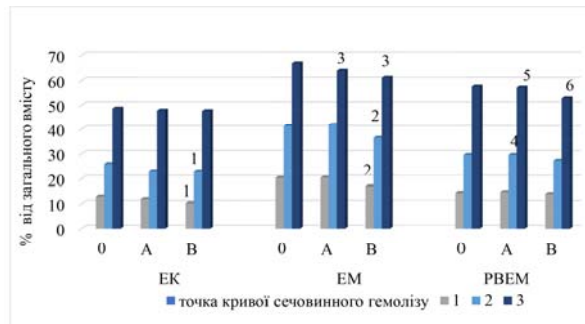


Рис. 3. Проникливість мембрани еритроцитів на етапах кріоконсервування в залежності від наявності антигенних детермінант А та В – специфічності:

1 – $p < 0,05$ – вірогідність різниці між показниками у групах зразків, що мають у фенотипі В та А детермінанти, а також В та 0 відповідно у ЕК (1, 2 точки кривої сечовинного гемолізу); 2 – $p < 0,001$ – між показниками у групах зразків, що мають В та А детермінанти, а також В та 0 відповідно у підготовленій до кріоконсервування ЕМ (1, 2 точки); 3 – $p < 0,001$ – між показниками у групах зразків, що мають фенотип 0 та А, а також 0 і В, А і В відповідно у підготовленій до кріоконсервування ЕМ (3 точка); 4, 5 – $p < 0,001$ – між показниками у групах зразків, що мають фенотип 0 та В, а також А і В відповідно у РВЕМ (2 точка); 6 – $p < 0,001$ – між показниками у групах зразків, що мають фенотип А і В відповідно у РВЕМ (3 точка)

Таблиця 1

Порівняння якості РВЕМ різної АВ0- групової належності

Показники	Група крові			
	0 (I) n=32	A (II) n=24	B (III) n=14	AB (IV) n=6
Вміст еритроцитів ($\cdot 10^9$ /мл)	2,84±0,26	2,57±0,28	2,25±0,24	3,44±0,61 ^{1,2}
Загальна кількість еритроцитів у пробі ($\cdot 10^9$)	23,66±4,21	16,65±2,80	17,37±3,67	22,87±8,83
Ht	0,44±0,02	0,46±0,03	0,45±0,02	0,49±0,03 ^{3,4}
Осмотична резистентність еритроцитів (%)	67,7±2,4	77,7±2,4 ⁵	69,3±4,9	76,5±6,3 ⁶

Примітка: 1, 2 – $p < 0,01$ – вірогідність відмінності між вмістом еритроцитів у зразках з А (II) і АВ (IV), а також з В (III) і АВ (IV) групами крові; 3 – $p < 0,01$ – між показниками Ht у зразках з А (II) і АВ (IV) групами крові; 4 – $p < 0,001$ – достовірна відмінність між показниками Ht у зразках з В (III) і АВ (IV) групами крові; 5 – $p < 0,01$ – між показниками ОРЕ у зразках з 0 (I) і А (II) групами крові; 6 – $p < 0,05$ – між показниками ОРЕ у зразках з 0 (I) і АВ (IV) групами крові

Так, вміст еритроцитів у зразках з АВ (IV) групою крові перевищував дані у РВЕМ з А (II) та В (III) групами крові. Такі кількісні переваги підтверджуються показниками вмісту еритроцитів у мл розмороженої суспензії, а також перевищенням показників гематокриту у зразках з АВ (IV) групою крові у порівнянні з зразками А (II) та В (III) групової приналежності. Такий показник як ОРЕ у зразках з А (II) та АВ (IV) значно перевищує дані у групі зразків з 0 (I) групою крові, що може свідчити про знижену стійкість мембрани еритроцитів з фенотипом 0 до впливу зовнішніх чинників. Також статистично значуще ($p < 0,001$) відрізняється і вміст Hb_v у цих зраз-

ках: $(0,301 \pm 0,008) \cdot 10^{-11}$ г проти $(0,182 \pm 0,002) \cdot 10^{-11}$ г у АВ (IV) групі, а також $(0,280 \pm 0,007) \cdot 10^{-11}$ г – у А (II) та $(0,274 \pm 0,002) \cdot 10^{-11}$ г – у В (III) групі крові. Тобто найменший рівень цього показника спостерігається у зразках з АВ (IV) групою крові, а найвищий – з 0 (I). Існують кореляційні зв'язки різної сили (від помірної до сильної) між ОРЕ та такими показниками як кількість еритроцитів у пробі ($r=0,401$; $p < 0,05$), Ht ($r=0,442$; $p < 0,01$), а також між вмістом Hb_v та такими показниками як ОРЕ ($r=-0,362$; $p < 0,05$), Ht ($r=-0,532$; $p < 0,01$) – для зразків з 0 (I) групою крові; між ОРЕ та кількістю еритроцитів ($r=0,503$; $p < 0,01$), вмістом Hb_v та вмістом еритроцитів у мл РВЕМ ($r=-0,547$;

$p < 0,01$), а також кількістю клітин у пробі ($r = -0,560$; $p < 0,001$) – для зразків з А (II) групою; ОРЕ та кількістю клітин у пробі ($r = 0,511$; $p < 0,05$), вмістом Hb_v та такими показниками як кількість еритроцитів ($r = -0,518$; $p < 0,05$), їх вмістом у мл РВЕМ ($r = -0,508$; $p < 0,05$), ОРЕ ($r = -0,739$; $p < 0,001$), Ht ($r = -0,525$; $p < 0,05$) – для зразків з В (III) групою крові; між ОРЕ та кількі-

стю еритроцитів ($r = 0,793$; $p < 0,01$), між Ht та кількістю еритроцитів у пробі ($r = 0,921$; $p < 0,001$) для зразків з АВ (IV) групою.

За отриманими даними, загалом, комітовані клітини-попередники гемопоезу еритроїдного ряду у складі зразків ПК проявляють відносну стійкість до факторів кріоконсервування (рис. 4).

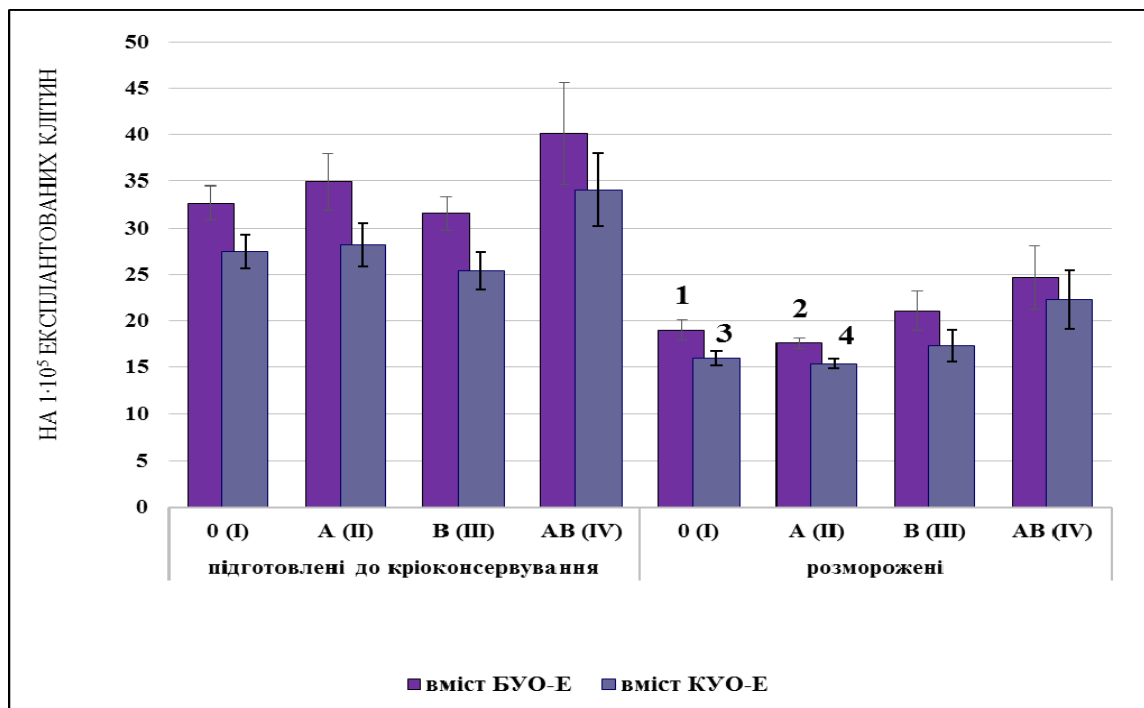


Рис. 4. Проліферативна активність клітин-попередників еритропоезу на етапах процесу заморожування-відтаювання: 1 – різниця між показником БУО-Е до та після заморожування у зразках з 0 (I)- групою приналежності ($p < 0,01$); 2, 4 – різниця між показниками БУО-Е та КУО-Е (малі агрегати) до та після заморожування у зразках з А (II)- групою приналежності ($p < 0,02$); 3 – різниця між показником КУО-Е (малі агрегати) до та після заморожування у зразках з 0 (I)-групою приналежності ($p < 0,001$)

Після розморожування зниження кількості як БУО-Е, так і КУО-Е у порівнянні з результатами, отриманими у підготовленій до кріоконсервування суспензії ЯВК, виявились статистично значущими тільки для груп з 0 (I) та А (II)-належністю. Тобто, субпопуляція клітин-попередників еритропоезу у зразках з В (III) групою виявила дещо вищі показники кріостійкості. У той же час зразки з 0 (I) та А (II) показали підвищену кріочутливість відносно таких з В (III) та АВ (IV) групами крові. При цьому життєздатність розморожених ЯВК ПК (за даними, отриманими методом протокової цитофлуориметрії з використанням барвника 7 AAd) була суттєво нижчою ($p < 0,05$) у групі зразків ПК з 0 фенотипом ((61,6±4,0) %, $n=9$) порівняно з А та В (відповідно – (90,9±1,7) %, $n=7$ та (76,7±4,3) %, $n=7$). Це може свідчити про відносно зменшену стійкість клітин з 0 фенотипом до впливу факторів кріоконсервування. Натомість, у разі порівняння двох груп зразків з різною резус-приналежністю різниці рівня ознаки статистично не значущою (попри наявність тенденції до зниження стійкості клітин у резус-негативній групі ((59,5±5,2) %, $n=6$ проти (73,2±3,1) %, $n=26$, $p > 0,05$).

Таким чином, комплексно оцінюючи результати проведених досліджень показників якості (вміст еритроцитів, Ht, вільний гемоглобін, ПЕМ, ОРЕ) в

еритроцитарних компонентах ПК, а також дані кореляційного аналізу можна зробити висновок про існування певних зв'язків між окремими індивідуальними характеристиками фенотипу донора (до яких відноситься резус- і АВ0-групова приналежність крові) та збереженістю мембран еритроцитів при екстремальних впливах. Дослідження зв'язків між показниками проліферативної активності комітованих клітин-попередників гемопоезу еритроїдного ряду у розморожених суспензіях ЯВК та АВ0-групою приналежності крові показало, що дана субпопуляція клітин у групі зразків з В (III)-належністю відзначилась дещо вищими показниками кріостійкості. У той же час, зразки з групами крові 0 (I) та А (II) проявили підвищену кріочутливість порівняно зі зразками з В (III) та АВ (IV).

Подальші дослідження дозволять встановити критерії ризику підвищеної кріочутливості зразків ПК, що спостерігається у окремих індивідуальних випадках, та узагальнити технологічні можливості збільшення кріостійкості у вигляді позицій щодо підвищення якості кріоконсервованих клітинних гемотрансфузійних засобів, а також трансплантатів гемопоетичної тканини.

Продовження досліджень у цьому напрямку розширить знання в галузі кріопатофізіології клітини.

Встановлення факторів ризику зниження стійкості клітин ПК дозволить попереджати негативні наслідки за рахунок застосування додаткових технологічних можливостей.

6. Висновки

1. АВ0-, Rh-фенотип донора може бути пов'язаний з природними адаптаційними властивостями клітин ПК у протидії зовнішнім впливам.

2. Наявність антигенів В та D у фенотипі донора асоціюється з відносною стійкістю клітинного контенту ПК до факторів криоконсервування.

3. Серед еритроцитарних компонентів ПК найменш чутливими до негативних чинників криоконсервування є зразки з АВ (IV) групою крові. У той же час еритроцити з 0 (I) та резус-негативним фенотипами демонструють порівняно знижену стійкість до факторів заморожування-відтаювання.

Література

- Nicoud, I. B. Cryopreservation of umbilical cord blood with a novel freezing solution that mimics intracellular ionic composition [Text] / I. B. Nicoud, D. M. Clarke, G. Taber, K. M. Stolowski, S. E. Roberge, M. K. Song, A. J. Mathew // *Transfusion*. – 2012. – Vol. 59, Issue 9. – P. 2055–2062. doi: 10.1111/j.1537-2995.2011.03547.x
- Chen, G. Comparison of the effects of different cryoprotectants on stem cells from umbilical cord blood [Text] / G. Chen, A. Yue, Zh. Ruan, Y. Yin, R. Wang, Y. Ren, Li Zhu // *Stem Cells International*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 1–7. doi: 10.1155/2016/1396783
- Гольцев, А. Н. Влияние криоконсервирования на функциональные свойства ядродержащих клеток лейкоконцентрации кордовой крови человека [Текст] / А. Н. Гольцев, В. В. Волина, Л. В. Сокол, М. В. Останков, К. А. Гольцев, С. С. Черноусова, О. Ю. Кожина // *Проблемы криобиологии*. – 2010. – Т. 20, № 3. – С. 303–308.
- Szaraz, L. Comprehensive study of hydrostatic pressure treated human umbilical cord blood cells via response surface method [Text] / L. Szaraz, D. Szenasi, T. Oldak, I. Balogh // *Cryobiology*. – 2014. – Vol. 69, Issue 2. – P. 266–272. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.07.016
- Kim, K. M. Quality comparison of umbilical cord blood cryopreserved with conventional versus automated systems [Text] / K. M. Kim, J. Y. Huh, J. J. Kim, M. S. Kang // *Cryobiology*. – 2014. – Vol. 78. – P. 65–69. doi: 10.1016/j.cryobiol.2017.07.001
- Fisher, V. Analysis of the recovery of cryopreserved and thawed CD34⁺ and CD3⁺ cells collected for hematopoietic transplantation [Text] / V. Fisher, H. Khuu, V. David-OCampo, K. Berne, St. Pavletic, M. Bishop, D. H. Fovler et. al. // *Transfusion*. – 2014. – Vol. 54, Issue 4. – P. 1088–1092. doi: 10.1111/trf.12428
- Dean, L. Blood Groups and Red Cell Antigens. Ch. 2, Blood group antigens are surface markers on the red blood cell membrane [Electronic resource] / L. Dean. – Bethesda, 2005. – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2264/>
- De Mattos, L. K. Structural diversity and biological importance of AB0, H, Lewis and secretor histo-blood group carbohydrates [Text] / L. K. de Mattos // *Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy*. – 2016. – Vol. 38, Issue 4. – P. 331–340. doi: 10.1016/j.bjhh.2016.07.005
- Clausen, H. ABH and related histoblood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution [Text] / H. Clausen, S. I. Hakomori // *Vox Sanguinis*. – 1989. – Vol. 56, Issue 1. – P. 1–20. doi: 10.1111/j.1423-0410.1989.tb03040.x
- Oriol, R. Genetics of AB0, H, Lewis, X and related antigens [Text] / R. Oriol, L. Le Pendu, R. Mollicone // *Vox Sanguinis*. – 1986. – Vol. 51, Issue 3. – P. 161–171. doi: 10.1111/j.1423-0410.1986.tb01946.x
- Dean, L. Blood Groups and Red Cell Antigens. Ch. 5, The AB0 blood group [Electronic resource] / L. Dean. – Bethesda, 2005. – Available at: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2267/
- O'Donnell, J. The relationship between ABO histo-blood group, factor VIII and von Willebrand factor [Text] / J. O'Donnell, M. A. Laffan // *Transfusion Medicine*. – 2001. – Vol. 11, Issue 4. – P. 343–351. doi: 10.1046/j.1365-3148.2001.00315.x
- Mangel, M. Phenotypes of antibody-mediated rejection in organ transplants [Text] / M. Mangel, S. Husain, L. Hidalgo, B. Sis // *Transplant International*. – 2012. – Vol. 25, Issue 6. – P. 611–622. doi: 10.1111/j.1432-2277.2012.01484.x
- Aikawa, A. Trends in AB0-incompatible kidney transplantation [Text] / A. Aikawa, K. Saito, K. Takahashi // *Experimental and Clinical Transplantation*. – 2015. – Vol. 13. – P. 18–22.
- Dean, L. Blood Groups and Red Cell Antigens. Ch. 7, The Rh blood group [Electronic resource] / L. Dean. – Bethesda, 2005. – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2269/>
- Westhoff, C. M. The Rh blood group system in review: a new face for the next decade [Text] / C. M. Westhoff // *Transfusion*. – 2004. – Vol. 44, Issue 11. – P. 1663–1673. doi: 10.1111/j.0041-1132.2004.04237.x
- Daniels, G. The molecular genetics of blood group polymorphism [Text] / G. Daniels // *Transplant Immunology*. – 2005. – Vol. 14, Issue 3-4. – P. 143–153. doi: 10.1016/j.trim.2005.03.003
- Калиниченко, Т. А. Преимущества криоконсервирования гемопоэтической ткани пуповинной крови с применением оптимизированного метода снижения объема образца [Текст] / Т. А. Калиниченко, М. Ю. Аношина, В. В. Балан // *Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа*. – 2017. – Т. 3, № 4. – С. 734–743.
- Цуцаева, А. А. Криоконсервирование клеточных суспензий [Текст] / А. А. Цуцаева, В. А. Аграненко, Л. И. Федорова и др.; ред. А. А. Цуцаева. – К.: Наукова думка, 1983. – 240 с.
- Калиниченко, Т. О. Еритроцити пуповинної крові як об'єкт довгострокового зберігання при наднизькій температурі [Текст] / Т. О. Калиниченко, М. Ю. Аношина, Г. Т. Глухенька, М. К. Алгазінова // *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика*. – 2014. – № 23 (2). – С. 515–521.
- Калиниченко, Т. О. Спрощений метод криоконсервування гемопоетичної тканини пуповинної крові [Текст] / Т. О. Калиниченко, М. Ю. Аношина, С. В. Шороп, Ж. М. Мінченко, В. В. Балан // *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика*. – 2017. – № 27. – С. 253–262.
- Schmid, I. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry [Text] / I. Schmid, W. J. Krall, C. H. Uttendogaat, J. Braun, J. V. Giorgi // *Cytometry*. – 1992. – Vol. 13, Issue 2. – P. 204–208. doi: 10.1002/cyto.990130216

23. Балашова, В. А. Клеточные культуры [Текст] / В. А. Балашова; ред. К. М. Абдулкадыров // Гематология: Новейший справочник. – М.: Изд-во Эксмо; СПб.: Изд-во Сова, 2004. – С. 100–122.
24. Савельев, О. Н. Определение свободного гемоглобина плазмы крови гемиглобинцианидным методом [Текст] / О. Н. Савельев, В. П. Сухоруков, А. В. Киселева, Г. А. Королева // Лабораторное дело. – 1990. – № 10. – С. 45–47.
25. Колмаков, В. Н. Значение определения проницаемости эритроцитарных мембран (ПЭМ) в диагностике хронических заболеваний печени [Текст] / В. Н. Колмаков, В. Г. Радченко // Терапевтический архив. – 1982. – № 2. – С. 59–62.
26. Lapierre, Y. The gel test; a new way to detect red cell antigen-antibody reaction [Text] / Y. Lapierre, D. Regal, J. Adam, D. Josef, F. Meyer, S. Greber, C. Drot // Transfusion. – 1990. – Vol. 30, Issue 2. – P. 109–113. doi: 10.1046/j.1537-2995.1990.30290162894.x
27. Петри, А. Наглядная медицинская статистика [Текст]: уч. пос. / А. Петри, К. Сэбин; ред. В. П. Леонова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 216 с.

*Рекомендовано до публікації д-р мед. наук, професор Лановенко І. І.
Дата надходження рукопису 23.10.2017*

Калиниченко Тетяна Олексіївна, кандидат медичних наук, старший науковий співробітник, завідувач лабораторії, Лабораторія кріоконсервування гемопоетичних клітин, Державна установа «Інститут гематології та трансфузіології Національної академії медичних наук України», вул. Максима Берлінського, 12, м. Київ, Україна, 04060
E-mail: kalynychenko_tetiana@ukr.net

Аношина Мілітіна Юріївна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, керівник групи, провідний науковий співробітник, Група біохімії, Державна установа «Інститут гематології та трансфузіології Національної академії медичних наук України», вул. Максима Берлінського, 12, м. Київ, Україна, 04060
E-mail: militina.anoshina@gmail.com

Павлюк Раїса Пантелеймонівна, кандидат медичних наук, старший науковий співробітник, керівник групи, провідний науковий співробітник, Група імуногематології, Державна установа «Інститут гематології та трансфузіології Національної академії медичних наук України», вул. Максима Берлінського, 12, м. Київ, Україна, 04060
E-mail: raisa.pvl@gmail.com

Балан Валентина Володимирівна, науковий співробітник, Лабораторія імуногенетики, Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України», вул. Мельникова, 53, м. Київ, Україна, 04050
E-mail: balanpaulgeorge@gmail.com