

24 McCartney-Francis N.L., Wahl S.M. Transforming growth factor beta: a matter of life and death // *J Leukoc Biol*, 1994. Vol. 55. P. 401-409.

25 Micallef M.J. et.al. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production // *Eur J. Immunol*, 1996. Vol. 26. P. 1647-1651.

Тұжырым

Тоқ ішектегі ісікпен байланысты макрофагтардың бөлінуі мен морфологиялары зерттелді. Ісіктің ішіндегі макрофагтардың бөлінуі біркелкі еместігі және олардың морфологиясының бір-бірінен өзгешелігі дәлелденді. Ісікті қоршаған стромада макрофагтың ең көп болатындығы көрсетілді. Ісік пен ісік жанындағы макрофаг саны статистика көрсеткіштері бойынша біркелкі ($p=0,63$).

Summary

It has been studied the morphology and distribution of a tumour-associated macrophages in colorectal carcinomas. It is established, that macrophages in a tumour tissue are distributed unevenly and have difference in morphology. The highest density of macrophagal infiltration is marked in stroma which located around a tumour. In a tumour and boundary mucous distinctions in density of macrophagal infiltration are statistically insignificant ($p=0,63$).

УДК 611.08:612.112.94:611.018.5:611.013.8

Смагулова Г.К., Толмачев В.С., Кудрина Н.О.

ВЛИЯНИЕ МЕТОДОВ КРИОКОНЦЕРВАЦИИ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И СОХРАННОСТЬ РЕЦЕПТОРОВ CD 34, 45 НА МОНОУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ПУПОВИННОЙ КРОВИ

(Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии МЗ РК)

Исследование посвящено анализу влияния низких температур на жизнеспособность гемопоэтических стволовых клеток для долгосрочного криоконсервирования. Определены наиболее благоприятные условия замораживания гемопоэтических стволовых клеток.

Гемопоэтические стволовые клетки широко используется при лечении онкологических, гематологических, аутоиммунных и эндокринных заболеваний [1,2]. Источником гемопоэтических стволовых клеток служит как костный мозг, так и пуповинная кровь. Основной задачей при использовании гемопоэтических стволовых клеток является обеспечение жизнеспособности и сохранности стволовых клеток, как в количественном, так и в качественном отношении [3,4]. Наиболее ответственным этапом для сохранения жизнеспособности стволовых гемопоэтических клеток при их заготовке является этап замораживания. В настоящее время в мире существует несколько методик фракционирования и криоконсервирования пуповинной крови, однако не все позволяют получить качественный трансплантат после криохранения [4,5]. В связи с этим, проведено изучение эффективности методов замораживания мононуклеаров (МНК) при сочетании различных криопротекторных средств.

Цель исследования - изучить влияние криопротекторов на жизнеспособность и сохранность рецепторов CD 34, 45 на МНК и разработка температурного режима для долгосрочного криохранения МНК пуповинной крови.

Материалы и методы

Изучили 60 образцов МНК из пуповинной крови, полученной в РГП «НЦА,ГиП» при физиологических родах. Мононуклеарную фракцию выделяли на градиенте фикола р-1,077 г/л. В качестве криопротектора использовали 10%, 5 % раствор диметилсульфоксида (ДМСО) в сочетании с раствором реополиглобина, а также 10% раствор глицерина в сочетании с 5% раствором глюкозы и аутоывороткой крови. Для охлаждения использовали равное соотношение криопротектора и клеток. Замораживали ступенчато- +4°C; -20°C; -70°C и переносили в жидкую фазу азота -196°C. Размораживали по схеме: -196°C; -70°C; -20°C; водяная баня + 40С. Для анализа CD 34, 45 в МНК использовали коммерческий набор CD34(Anti-НРСА-2)PE BD Biosciences (USA), CD45 FITS BD Biosciences(USA). Анализировали на проточном цитофлуориметре FacsCalibur с 488 nm аргоновым лазером, против контролей с использованием двухпараметрических гейтированных гистограмм.

Результаты и их обсуждение

Каждый полученный образец суспензии анализировали на гематологическом анализаторе до

замораживания и после размораживания. Результаты сравнительного анализа влияния температуры замораживания на сохранность ЯСК, МНК в таблице 1.

Таблица 1 - Сравнительный анализ влияния температуры замораживания на сохранность ядросодержащих клеток и мононуклеаров

	Цельная	До заморозки	После разморозки		
			-20°C % потерь	-70°C % потерь	-196°C % потерь
ЯСК 10 ³ /мл	9,9 ± 1,4	15,5±1,5	$\frac{1,55 \pm 0,2}{85,6\%}$	$\frac{7,9 \pm 2,1^*}{26,6\%}$	$\frac{8,2 \pm 0,9^*}{23,8\%}$
МНК 10 ³ /мл	5,8 ± 0,6	6,8±1,6	$\frac{1,425 \pm 0,5}{79,4\%}$	$\frac{5,7 \pm 1,8}{16,1\%}$	$\frac{6,1 \pm 0,8^*}{6,4\%}$

Примечание: * - достоверность по отношению к контролю p<0,05

По результатам видно, что наибольший процент потерь ЯСК и МНК выявлен при замораживании при -20 С. Наименьший разрушительный эффект на содержание ЯСК и МНК в замораживаемой суспензии имеет криоконсервация в жидком азоте(при -196С). Каждый образец выделенной суспензии МНК проанализировали на проточном цитофлуориметре на наличие CD34+, CD45+ клеток до замораживания и после размораживания, результаты в таблице 2.

Таблица 2 - Результаты исследования CD 34+ , CD 45+ клеток до замораживания и после размораживания

	До заморозки	После разморозки		
		-20°C % потерь	-70°C % потерь	-196°C % потерь
CD 34	2,5±0,4	$\frac{0,65 \pm 0,8^{**}}{62}$	$\frac{1,1 \pm 0,6^{**}}{55}$	$\frac{1,98 \pm 0,2^*}{21}$
CD 45	67,7±1,7	$\frac{35,2 \pm 3,2^{**}}{48}$	$\frac{46,7 \pm 2,5^*}{31}$	$\frac{49,4 \pm 2,2^{**}}{28}$

Примечание: * достоверность по отношению к контролю p<0,02

** - достоверность по отношению к контролю p<0,05

В результате сравнения полученных данных обнаружено, что количество CD 34+ клеток было выше в пробах, хранившихся в жидком азоте , чем в пробах хранившихся при -20°C и -70°C. Процент потерь также ниже в пробах, хранившихся при -196°C, чем в пробах, хранившихся при -20°C. -70°C. На следующем этапе исследования провели анализ влияния различных криопротекторов на жизнеспособность CD 34, 45 МНК. Результаты исследования в таблице 3.

Таблица 3 - Влияние криопротекторов на жизнеспособность ГСК при криоконсервации

Образец с криопротекторами	CD34+	CD45+
Контроль (до заморозки)	2,5±0,4	67,7±1,7
5%ДМСО/реополиглюкин	1,98±0,2*	46,7±2,5*
10%ДМСО /реополиглюкин	1,8±0,4*	41,5±2,7**
10%ДМСО/ Аутоыворотка	0,67±0,8*	22,2±0,15*
10%глицерин/ глюкоза	0,39±0,8*	28,3±3,5*
Контроль (без криопротектора)	0,32±0,8*	18,3±3,7***

Примечание: * - достоверность по отношению к контролю p<0,05; ** достоверность по отношению к контролю p<0,01 *** достоверность по отношению к контролю p<0,02

Анализируя полученные данные мы пришли к выводу, что использование в качестве криопротектора 5%ДМСО/реополиглюкина соотношение криопротектор/суспензия МНК 1:1 более

благоприятно для сохранения как жизнедеятельности МНК, так и для сохранения гемопоэтических клеток. Таким образом выявлено, что:

- наименьший разрушительный эффект на содержание ЯСК и МНК в замораживаемой суспензии имеет криоконсервация в жидком азоте (при-196°С);

- более благоприятное влияние на сохранность рецепторов CD34, 45 на МНК ПК оказывает криохранение в жидком азоте (при-196°С) (CD34+ 1,98±0,2; CD45+ 46,7 ±2,5)

- установлен наиболее подходящий криопротектор для криохранения CD34+ МНК 5% ДМСО в сочетании с раствором реополиглобулина.

Литература

1 Зайцев А.Ю., Брюховецкий А.С. Нейрогенеторная терапия травматической болезни спинного мозга: роль и перспективы использования трансплантации стволовых клеток //Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2007. №1. С.36-44.

2 Шевченко Ю.Л. Медико-биологические и физиологические основы клеточных технологий в сердечно-сосудистой хирургии. Наука 2006.

3 Владимирская Е.Б., Замараева М.В., Волынец М.В. и др. Пуповинная кровь альтернативный источник стволовых кроветворных клеток для трансплантации//Педиатрия, 1997.-№4.С.9-12.

4 Гришина В.В. Разработка оптимальных методов криоконсервирования кроветворных клеток пуповинной крови человека для трансплантаций. Автореферат. М. 2006.

5 Румянцев А.Г., Масчан А.А. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей.- МИЯ.-М.2003.

Тўжырым

Бўл зерттеулер ўзак уақыт сактау ушін қолданылатын өте төмен температураланың гемопоэтикалық дін жасушысының тіршілік ету қабілетіне тигізетін әсерін анықтайды.

Summary

This research was based on analysis of low-temperature influence on hemopoetical stem cells' survival ability during the long run cryokeeping.

The most favourable of hemopoetical stem cells' froze condition was identified.