6. *Акиньшин, В. И.* Особенности физического развития школьников Белгородской области / В. И. Акиньшин, В. И. Мелехова, К. Д. Никитин // Здравоохр. Рос. Федерации. — 1998. — № 4. — С. 54.

7. *Суханова, Н. Н.* Физическое развитие школьников к концу XX века: анализ и прогноз / Н. Н. Суханова // Рос. педиатр. журн. — 1999. — № 2. — С. 36–41.

8. *Суханова, Н. Н.* Методика антропометрических исследований / Н. Н. Суханова. — М.: Изд-во МГУ, 1931. — 121 с.

9. *Бунак, В. В.* Опыт типологии пропорций тела и стандартизации главных антропометрических размеров / В. В. Бунак // Учен. записки МГУ. — 1937. — Вып. 10. — С. 7–102.

10. *Алексеев, В. П.* Краниология. Методика антропологических исследований / В. П. Алексеев, Г. Ф. Дебец. — М.: Медицина, 1964. — 368 с.

11. *Боровиков, В.* STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов / В. Боровиков. — СПб.: Питер., 2001. — 656 с.

12. *Сергиенко, В. И.* Математическая статистика в клинических исследованиях / В. И. Сергиенко, И. Б Бондарева. — М.: ГЭОТАР Медицина, 2000. — 256 с.

13. *Мельник, В. А*. Гармоничность физического развития городских и сельских детей в постчернобыльский период / В. А. Мельник, Э. М. Заика // X съезд Белорусского общества физиологов: Тез. докл. — Мн., 2001. — С. 106.

14. Современные тенденции динамики состояния здоровья подростков / А. Г. Ильин [и др.] // Гигиена и санитария. — 2000. — № 1. — С. 59–62.

Поступила 07.05.2007

УДК: 616.419-097.4:612.41

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (CD34+)

А. Н. Кондрачук, И. С. Стельмаченок, Е. В. Воропаев, В. И. Николаев

Гомельский государственный медицинский университет

В кратком обзоре рассмотрены особенности различных методов выделения и культивирования гемопоэтических стволовых клеток (CD34+), проведен их сравнительный анализ. Выделены основные направления развития клеточной терапии. Описаны преимущества метода иммуномагнитной сепарации перед другими методами. Представлены данные проведенных пилотных опытов по выделению стволовых клеток на базе ЦНИЛ Гомельского государственного медицинского университета.

Ключевые слова: стволовые клетки, иммуномагнитная сепарация, проточная цитометрия, клеточная терапия.

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF THE HEMATOPOIETIC STEM CELLS (CD34 +) EXTRACTION METHODS

A. N. Kondrachuk, I. S. Stelmachenok, E. V. Voropaev, V. I. Nikolaev

Gomel State Medical University

In the short review article considered peculiarity of the various extraction and culture methods of the hematopoietic stem cells CD34+, carried out their comparative analysis. The main directions of the cellular therapy development detailed. An advantages of immunomagnetic separations method as compared with other methods described. The results of pilot experiences of stem cells extraction in Central Research Laboratory of Gomel's state medical university represented.

Key words: stem cells, immunomagnetic separation, flow cytometry, cellular therapy.

Термин «стволовая клетка» применительно к кроветворной ткани впервые был предложен русским гистологом А. А. Максимовым в 1908 г. на съезде гематологического общества в Берлине. Родоначальниками отечественной школы биологии ство-

ловых клеток являются советские ученые И. Л. Чертков и А. С. Фриденштейн, которые в 1960-х годах при изучении клеточного состава костного мозга открыли в его строме мезенхимальные (стромальные) стволовые клетки. Это открытие положило начало интенсивному изучению стволовых клеток и развитию регенеративной медицины. В 1981 г. ученый из США М. Эванс впервые выделил плюрипотентные линии стволовых клеток из бластоцисты мыши, а в 1998 г. американскими исследователями Д. Томпсоном и Д. Герхартом были получены эмбриональные стволовые клетки из бластоцисты 4-дневного эмбриона человека [1]. Выделение эмбриональных стволовых клеток в 1999 году было признано авторитетным журналом «Science» третьим по значимости событием в биологии XX века после расшифровки двойной спирали ДНК и программы «Геном человека».

Стволовые клетки (СК) — это недифференцированные клетки, способные как к самоподдержанию, так и к дифференцировке в зрелые специализированные клетки. В основу классификации стволовых клеток положены источник их происхождения и потенциал дифференцировки [2].

В настоящее время наиболее распространенными являются два вида классификации СК:

1. По источнику их получения (локализации).

2. По числу различных типов специализированных клеток, начало которым может дать данная стволовая клетка.

Согласно первому виду классификации выделяют эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и стволовые клетки взрослого организма (ВСК).

ЭСК получают из внутренней клеточной массы (inner cell mass) бластоцисты — одной из самых ранних стадий развития эмбриона. В результате того, что генная информация, заключенная в ядре ЭСК, находится как бы в «нулевой точке», из них могут развиваться клетки любых типов [1, 3].

ВСК — как свидетельствует само название, рассеяны по тканям взрослого организма, а значит, их в свою очередь можно классифицировать по видам тканей, в которых они локализованы.

Фетальные СК получают из абортивного материала (фетусов на 6–12 неделе развития). Использование их требует определенной осторожности, в первую очередь из-за возможного заражения пациентов вирусом СПИДа, цитомегаловирусом, микоплазмой [4].

Стволовые клетки пуповинной крови. Создаваемые в настоящее время банки пуповинной крови позволят решить проблему аутологичной и родственной пересадки стволовой клетки в будущем и при необходимости спасти жизнь и самому донору, при рождении которого были помещены в банк его клетки, и его родственникам.

Стволовые клетки костного мозга человека. Костный мозг является традиционным и самым доступным источником стволовых клеток, концентрация которых там максимальна. В костном мозге выделяют сразу два вида стволовых клеток: первый — это кроветворные стволовые клетки, то есть те, из которых формируются все клетки крови; второй — это мезенхимальные (стромальные) стволовые клетки, которые регенерируют другие ткани человеческого организма [5].

Взрослые стволовые клетки (соматические) — это недифференцированные клетки, которые находятся между дифференцированными клетками в тканях и органах и могут дифференцироваться в основные специализированные типы клеток этой ткани или органа. В каждой ткани имеется очень незначительное количество СК. Считается, что СК находятся в определенной зоне каждой ткани и остаются в «спящем состоянии», не делясь на протяжении многих лет, пока они не будут активированы заболеванием или повреждением ткани. СК выявлены в головном мозгу, периферической крови, кровеносных сосудах, скелетных мышцах, коже и печени [6, 7].

СК не существуют в организме сами по себе, они находятся в определенном микроокружении, которое обычно обозначают термином «ниша». «Ниша» активно участвует в регуляции пролиферации и дифференцировки СК, она обеспечивает самоподдержание численности СК и длительное их пребывание в состояние покоя [2, 8].

Согласно второму виду классификации выделяют тоти-, плюри-, мульти- и унипотентные СК.

Тотипотентные стволовые клетки — первые клетки, образующиеся после деления оплодотворенной яйцеклетки. При пе-

ресадке тотипотентной клетки в материнский организм из нее может развиться новый полноценный зародыш.

Плюрипотентные стволовые клетки — клетки эмбриобласта бластоцисты. В процессе эмбрионального развития эти клетки дают начало всем типам соматических клеток человека.

Мультипотентные стволовые клетки — стволовые клетки с более низким, чем у плюрипотентных «дифференцировочным потенциалом» (т. е. они могут дать начало меньшему количеству разных типов специализированных клеток).

Унипотентные — стволовые клетки, которые могут дифференцироваться только в один тип специализированных клеток.

В процессе дифференциации тотипотентные клетки становятся плюрипотентными, плюрипотентные — переходят в мульти-, мультипотентные — в унипотентные, а унипотентные — переходят в класс коммитированных предшественников, которые не являются стволовыми клетками, т. к. значительно от них отличаются по способности к самоподдержанию и другим, характерным для СК признакам (рисунок 1) [6, 8].

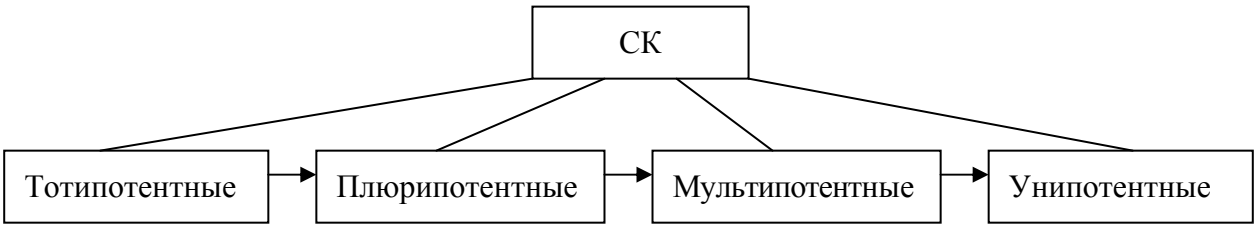

Рисунок 1 — Пролиферативный потенциал стволовых клеток

Методы выделения и культивирования стволовых клеток

Получение и культивирование эмбриональных стволовых клеток

Для лабораторных целей эмбриональные стволовые клетки человека получают обычно от эмбрионов 4–5-дневного возраста (бластоцист), полученных путем оплодотворения in vitro (вне организма матери) и затем пожертвованных для исследовательских целей проинформированными донорами. Бластоциста состоит из трех структур: наружного слоя клеток — трофобласта, бластоцели (полость внутри бластоцисты) и эмбриобласта — внутренней клеточной массы (около 30 клеток), расположенных на одном из полюсов бластоцисты. На 5–6 день после оплодотворения эмбрион человека состоит из 50–150 клеток. Внутренняя клеточная масса зародыша состоит из 20–40 клеток. Именно эти клетки используются исследователями для выделения и размножения. Оболочку бластоцисты разрушают методом ферментативной обработки, после чего специальным методом элиминируют клетки трофобласта. Затем клеточную массу помещают в пластиковую культуральную чашку, внутренняя поверхность которой покрыта слоем фибробластов мышиной кожи, утративших способность к делению после соответствующей обработки. Этот слой клеток получил название питающего (фидерного) слоя. Его клетки создают «липкую» поверхность, к которой прикрепляются эмбриональные стволовые клетки, а также выделяют вещества, необходимые для их роста и размножения. Они активируют митотическое деление клеток и препятствуют их дифференцировке. Длительное культивирование возможно в присутствии в культуральной среде особого фактора, получившего название фактор ингибирования лейкемии (leukemia inhibitory factor — LIF). В случае же его отсутствия плюрипотентность утрачивается, и ЭСК начинают дифференцировку. Деление культивируемых клеток длится несколько дней, после чего клеточную массу пересаживают в новые чашки. Процесс пересаживания (субкультивирование) повторяется многократно в течение многих месяцев. Через шесть и более месяцев изначальные 20–40 клеток внутренней клеточной массы производят миллионы ЭСК. Далее группы выделенных эмбриональных стволовых клеток могут быть использованы для дальнейших манипуляций [9–11].

Выделение и культивирование взрослых стволовых клеток

В качестве источников взрослых стволовых клеток используют:

1. Костный мозг: относительно богат стволовыми клетками, содержит гемопоэтические и мезенхимальные стволовые клетки. Однако взятие образцов костного мозга представляет собой чрезвычайно болезненную процедуру.

2. Слизистую оболочку носоглотки в районе обонятельных рецепторов: содержит частично детерминированные стволовые клетки, способные дифференцироваться в клетки нервной ткани. Одним из достоинств данного метода является то, что соскоб со слизистой оболочки может быть легко произведен под местным наркозом.

3. Жировую ткань: содержит мезенхимальные СК, способные дифференцироваться в клетки как жировой, так и хрящевой, костной и даже мышечной ткани. Жировая ткань с целью выделения СК может быть легко получена при липосакции.

4. Плацентарную и пуповинную кровь новорожденных: очень богата стволовыми клетками, ее сравнительно легко получить, идеально подходит для возможного дальнейшего применения ребенку [12–14].

На сегодняшний день существуют несколько способов выделения взрослых стволовых клеток. По данным литературы, наиболее распространенными являются два основных способа получения клеточных популяций с заданными параметрами: клеточная сортировка методами проточной цитометрии и иммуномагнитная сепарация [15].

Сортировка клеток — физическое разделение клеток на гетерогенные популяции по заданным параметрам. Проточные цитометры используют принцип электростатического отклонения заряженных капельсодержащих клеток с нужными параметрами. Клетки после инкубации с флуоресцентно меченными моноклональными антителами аппаратно отбираются из образца и впрыскиваются друг за другом через иглу и сопло в поток жидкости (обычно фосфатно-солевой буфер или другая ионизированная жидкость). Поток неустойчив во времени и распадается на капли. Стабилизировать момент распада потока на капли удается с помощью стационарной волны колебания с известной частотой и амплитудой. Когда клетка пересекается с лучом лазера, генерируются электронные сигналы параметров светорассеивания и флюоресценции. Специальная электронная логическая плата прибора принимает решение о сортировке (в зависимости от заданных исследователем параметров). Расстояние между пересечением с лазером и точкой распада на капли называется капельной задержкой. Клетка, отвечающая интересующим параметрам сортировки, детектируется, цитометр ожидает, когда поток пройдет точку образования капель, и затем придает электрический заряд каждой капле.

Таким образом, если капля содержит клетку с интересующими параметрами, электронная плата присвоит ей положительный или отрицательный заряд. Далее заряженный поток капель попадает на вибрирующие металлические пластины с высоким напряжением и капли притягиваются к противоположно полярным пластинам, которые отклоняют поток и направляют его в микротрубки. На выходе получают две и более (в зависимости от количества пластин) популяций клеток [16].

Клеточная сортировка методами проточной цитометрии применяется при сортировке популяций для дальнейшего ПЦР анализа, при накоплении популяций клеток, когда только малая часть клеток экспрессирует определенные антигены, при сортировке опухолевых клеток для морфологического анализа и т. д. Однако у этого метода существует ряд недостатков. В процессе сортировки клетки подвергаются действию высокого давления и излучения лазера. Проблематичным является также последующее «снятие» моноклональных антител, содержащих метку с отсортированных клеток. Конъюгаты антител, как правило, содержат в качестве консерванта высокотоксичный азид натрия. Все эти факторы негативно сказываются на жизнеспособности клеток и ограничивают их дальнейшее аналитическое применение. Одним из существенных ограничений также является высокая стоимость оборудования (проточные цитофлюориметры-сортировщики).

Магнитная сепарация клеток становится стандартным и широко используемым методом, дающим надежные и воспроизводимые результаты. Научные публикации в различных областях все чаще ссылаются именно на этот метод [15, 17, 18].

Иммуномагнитная сепарация является быстрым и надежным методом разделения клеток. Технология биомагнитного сепарирования основана на использовании парамагнитных полистирольных микрочастиц, покрытых моноклональными антителами к специфическим антигенам. Использование однородных по размеру и форме микросфер обеспечивает быстрое и эффективное связывание клеток, минимизирует неспецифическое связывание, позволяя достичь высокой воспроизводимости результатов. Неконъюгированные магнитосферы предназначены для прямого ковалентного связывания специфических антител и лигандов [18].

Иммуномагнитные частицы — это полистирольные частицы диаметром около 50 nm, композиция которых может быть разной, как вариант может входить и железо (магнетиты, магемиты). Материал частиц представляет собой ферримагнетик. В результате нескомпенсирования 2 субрешеток магнитная частица получает, соответственно, какой-то магнитный момент. В магнитном поле эта нескомпенсированность обратимо растет, что приводит к увеличению магнитного момента частицы, а значит, отклику на магнитное поле. Поведение макроскопического объема магнитной жидкости практически идентично поведению парамагнитных газов, только магнитная проницаемость у таких жидкостей на 4 порядка выше. Поэтому эти жидкости, а вслед за ними и частицы называют суперпарамагнитными. В однородном магнитном поле такие частицы, вращаясь, выстраивают свой момент вдоль поля. Они не перемещаются, т. е. в однородном магнитном поле сепарации нет. Сепарация появляется в неоднородном поле. Она тем больше, чем больше градиент и меньше вязкость среды. С физико-химической точки зрения иммуномагнитные частицы — это коллоиды. Соответственно, их устойчивость весьма условна. Сильное магнитное поле, создаваемое магнитным сепаратором и матрицей колонки, достаточно для удержания и разделения клеток [19].

Технология магнитной сепарации клеток нашла свое применение как в научно-исследовательских экспериментах, так и в клиническом использовании. Использование принципа магнитной сепарации позволяет осуществлять выделение интересующей популяции клеток из цельной крови, образцов костного мозга или мононуклеарной суспензии, что обеспечивает быстрый и прямой доступ к максимальному числу необходимых клеток [17, 20].

В настоящее время разработано более 200 реагентов для выделения различных фракций клеток из многочисленных источников (как животных, так и человека). На выходе получают не только фракции обычных клеток (например, Т-, В-лимфоциты, NK клетки или моноциты), но и такие редкие популяции как взрослые стволовые клетки (с маркером CD 34 и CD 133), Th2-клетки, а также субпопуляции дендритных клеток. Очистка составляет 90–99% и проходит без лишних потерь.

Частицы добавляются непосредственно к образцу биологической жидкости. После 10–20-минутной инкубации пробирка с образцом помещается в магнитный сепаратор, где клетки интересующей популяции, связанные с магнитными частицами, улавливаются, выстраиваясь вдоль стенок пробирки, а супернатант удаляется. Выделенные целевые клетки ресуспендируются в буфере и анализируются согласно протоколу исследования. При необходимости магнитные частицы впоследствии отделяются от целевых клеток. Второй вариант магнитной сепарации основан на использовании колонок, наполненных специальной, не токсичной для клеток, матрицей. Колонка помещается в постоянное магнитное поле сепаратора. Клетки, проинкубированные и связанные с магнитными частицами, задерживаются в колонке, а не связавшиеся удаляются простым промыванием колонки буфером. После изъятия колонки из магнитного поля точно так же элюируются клетки, связавшие магнитные частицы.

Существует два метода разделения: негативное и позитивное выделение клеток. При использовании негативного метода целевые клетки не связываются с антителами и частицами в течение процедуры выделения, при этом выход целевых клеток > 85%, а сохранение жизнеспособности выделенных клеток — 95%. Целевые клетки могут быть использованы для любых исследований. Негативное выделение клеток осуществляется при удалении всех нежелательных клеточных популяций из образца мононуклеарной суспензии.

При использовании позитивного метода осуществляется прямое улавливание целевых клеток из любого образца путем образования комплекса моноклональное антитело-антиген (клетка). При этом получают высокий уровень чистоты выделенной фракции (99%), высокий уровень выхода целевых клеток (> 95%) и возможность снятия частиц с выделенных клеток [17].

Таким образом, метод иммуномагнитного сепарирования дает практически неограниченные возможности по выделению любой интересующей клеточной популяции и является специфичным и недорогим способом выделения стволовых клеток, позволяющим получать искомые клеточные популяции в количествах, достаточных для проведения дальнейшего культивирования клеточной линии [19, 21].

Использование стволовых клеток в клинической практике

В настоящее время развитие клеточных технологий идет по следующим направлениям:

- технологии получения и очистки стволовых клеток;
- технологии культивирования стволовых клеток;
- создание банков стволовых клеток;
- клеточная трансплантология;
- терапевтическое клонирование;
- тканевая инженерия;
- регенеративная медицина [22, 23].

Многие исследователи связывают большие перспективы для клинической практики с использованием эмбриональных стволовых клеток. Уникальные характеристики эмбриональных СК используются в медицине по трем направлениям:

1. Заместительные клеточные трансплантации.
2. Фармакогеномика и биология развития.
3. Биология репродукции человека [3, 24].

Однако до настоящего времени имеются лишь отдельные достоверные сообщения об успешном применении эмбриональных стволовых клеток в эксперименте и клинике [25, 26]. Существуют серьезные аргументы против использования эмбриональных стволовых клеток в лечении:

1. Иммунологическая несовместимость клеток, пересаживаемых реципиенту. Несмотря на тщательный подбор донора и реципиента по антигенам главного комплекса гистосовместимости, а также успехи иммуносупрессивной терапии, вероятность иммунологического отторжения крайне велика.

2. Неполное соответствие условий клеточной дифференцировки in vivo и in vitro. Неясным остается вопрос об изменении свойств эмбриональных СК при их длительном культивировании.

3. Невозможность обнаружения генетических дефектов до пересадки эмбриональных стволовых клеток.

4. Отсутствие доказательств эффективности и безопасности применения эмбриональных стволовых клеток. Во многих случаях, по мнению экспертов, не публикуются данные об отрицательных последствиях трансплантаций эмбриональных СК (образование тератом или опухолей).

5. Этические проблемы.

Например, одним из источников эмбриональных СК являются бластоцисты, по тем или иным причинам не использованные при проведении экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). При использовании таких бластоцист выдвигается ряд международных этических правил. Необходимо свободное информированное согласие супругов или матери на использование лишней бластоцисты. Необходимо официальное утверждение исследовательского и клинического протокола ведомственным этическим комитетом или административным органом. К сожалению, зачастую, законодательная база по этим вопросам отсутствует либо инициация этих юридических процессов не под силу отдельным научно-исследовательским группам и требует вмешательства административного ресурса на уровне Министерства здравоохранения и других органов законодательной и исполнительной власти. Особо подчеркивается необходимость полного исключения каких-либо коммерческих манипуляций с бластоцистами, как-то: купля-продажа, платная псевдотерапия и т. п. Важными являются анонимность доноров СК, открытая и полная публикация полученных данных [27].

Для клеточных технологий, которые можно использовать в клинической практике, в первую очередь, представляют интерес СК костного мозга и соматические СК. Получение стволовых клеток из таких источников, как пуповинная кровь, кожа

или костный мозг не имеет каких-либо особых этических ограничений. Европейский Союз в 2003 г. определил 5 принципов, которыми необходимо следовать при испытании СК в клинике:

1) принцип уважения достоинства человека;

2) принцип индивидуальной автономии (информированное согласие, уважение частной жизни, конфиденциальность персональных данных);

3) принцип справедливости и пользы (в частности, улучшение и защита здоровья);

4) принцип свободы исследований;

5) принцип пропорциональности (применение минимального набора методов исследований, необходимых для достижения цели).

Кроме того, выделены 3 правила, соблюдение которых при клинических исследованиях обязательно:

1) свободное информированное согласие пациента;

2) объективная оценка соотношения риск/польза;

3) защита здоровья пациента, вовлеченного в клинические исследования [27].

Реальные успехи практического применения стволовых клеток уже достигнуты в следующих областях:

Лечение ожогов и ран — создание искусственной кожи, выращенной методами тканевой инженерии. При трансплантации культивированных аллофибробластов больным с обширными пограничными ожогами IIIA степени и длительно незаживающими остаточными ранами обеспечивается уменьшение общей площади раневой поверхности и, как следствие, быстрое заживление ран, существенно снижается опасность развития осложнений.

Лечение онкологических больных — ауто- и аллотрансплантация стволовых клеток костного мозга, что позволяет восстановить его кроветворную активность, которая частично утрачивается после применения интенсивной химио- и радиотерапии.

Терапия острого инфаркта миокарда — проводится с целью восстановления тканей сердца после инфаркта миокарда, что достигается за счет регенерации кардиомиоцитов и образования новых капилляров. По мнению многих исследователей, наилучшим потенциалом для восстановления функции сердца после инфаркта миокарда обладают СК костного мозга: их трансплантация индуцирует мио- и ангиогенез, улучшает гемодинамику [7, 28].

Представляется перспективным применение методов клеточной терапии в следующих областях медицины:

- неврология (лечение последствий травм головного и спинного мозга, инсульта, коматозных состояний, нейродегенеративных заболеваний, болезней Паркинсона, Альцгеймера и др.);
- эндокринология (лечение инсулинзависимого диабета);
- болезни опорно-двигательного аппарата (репарация костей, хрящей, костная пластика, лечение миопатий, последствий травм и т. д.);
- гепатология (лечение гепатитов, цирроза печени);
- офтальмология;
- клиническая иммунология (лечение аутоиммунных заболеваний: системной красной волчанки, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, болезни Крона);
- косметология (лечение косметических дефектов, стимуляция процессов жизнедеятельности клеток кожи, заполнение дефектов, разглаживание морщин) [29, 30].

Результаты исследования

На базе ЦНИЛ в рамках научной программы «Современные медицинские технологии в медицине» проводятся исследования по выделению, очистке и культивированию стволовых клеток. Материалом служил костный мозг, взятый у больных при тотальном протезировании тазобедренного сустава и пункции спинномозгового канала на базе травматологического отделения Гомельской городской клинической больницы № 1. В данном случае потеря содержимого губчатой кости для пациента является неизбежным элементом технологии хирургической операции.

Материалы и методы

Мононуклеары костного мозга выделяли путем градиентного центрифугирования на градиенте плотности Ficoll-Paque, Pharmacia LKB, Sweeden. Выделение гемопоэтических стволовых клеток (CD34+) проводили методом иммуномагнитной сепарации, используя коммерческие реагенты и оборудование фирмы Dynal Biotech, Norway.

В течение короткого инкубационного периода CD 34+ клетки связываются с частица-

ми «Dynabeads CD34», после чего образовавшиеся «розетки» выделяются с помощью специального магнитного устройства. Магнитные частицы снимаются с выделенных клеток с помощью реагента «Detachabeads». Клетки дважды отмываются раствором Хэнкса.

В результате проведенной работы были получены гемопоэтические стволовые клетки с фенотипом CD34+. Процент позитивных клеток подсчитывали на проточном цитометре, используя стандартную методику фенотипирования (моноклональные антитела анти-CD34 фирмы Caltag Laboratories, USA) (рисунок 2). Выделенная фракция клеток характеризуется высокой степенью чистоты. Сепарированные клетки готовы для дальнейшего культивирования, окрашивания и других манипуляций.

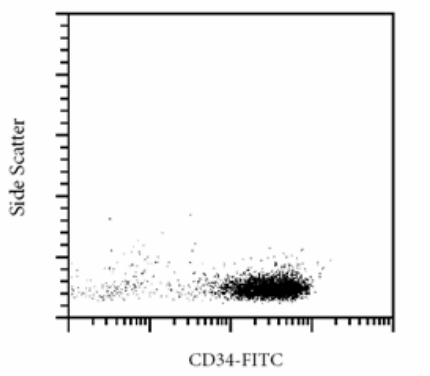

Рисунок 2 — Популяция CD34 + клеток, меченных анти-CD34-FITC антителами (Caltag Lab. Inc.)

Заключение

Отличительная особенность клеточных методов терапии по сравнению с методами фармакологии — более тонкие, сложные и многообразные механизмы действия, еще далеко не полностью изученные. Не до конца понятен механизм действия даже в тех случаях, когда клинический эффект доказан; не решено еще множество проблем; по мере их решения возникают новые. Однако перспективность самого метода представляется несомненной, хотя необходимы еще долгие и тщательные исследования на всех уровнях. На сегодняшний день лечение методами клеточной трансплантации остается достаточно дорогостоящим, но введение в широкую практику и отработка технологий выделения, очистки и культивирования стволовых клеток позволит сделать его более доступным.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts / J. A. Thomson [et al] // Science. — 1998. — Vol. 282. — P. 1145–1147.

2. *Watt, F. M.* Out of Eden: stem cells and their niches / F. M. Watt, B. L. M. Hogan // Science. — 2000. — Vol. 287. — P. 1427–1430.

3. *Wobus, A. M.* Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy / A. M. Wobus, K. R. Boheler // Physiol. Rev. — 2005. — Vol. 85. — P. 635–678.

4. Fetal bone marrow as a source of stem cells for in utero or postnatal transplantation / F. Golfier [et al.] // Br. J. Haematology. — 2000. — Vol. 109. — P. 173–181.

5. Molecular biology of hematopoietic stem cells / U. Steidl [et al.] // Vitam Horm. — 2003. — Vol. 66. — P. 1–28.

6. *Biancho, P.* Marrow stromal stem cells / P. Biancho, Robey P. Gehron // J. Clin. Invest. — 2000. — Vol. 105. — P. 1663–1668.

7. *Kassem, M.* Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications / M. Kassem // Cloning Stem Cells. — 2004. — № 6 (4). — P. 369–374.

8. *Martin-Rendon, E.* Exploitation of stem cell plasticity / E. Martin-Rendon, S. M. Watt // Transfus. Med. — 2003. — № 13 (6). — P. 325–349.

9. *Keller, G. M.* In vitro differentiation of embryonic stem cells / G. M. Keller //Curr.Opin. Cell Biol. — Vol. 995, № 7. — P. 862–869.

10. *Smith, A. G.* Culture and differentiation of embryonic stem cells / A. G. Smith // J. Tiss. Cult. Methods. — 1991. — № 13. — P. 89–94.

11. LIF factor dependent transcriptional activation of embryonic stem cells / H. Boeuf [et al.] // J. Cell Biol. — 1997. — Vol. 138. — P. 1207–1217.

12. Phenotypical, morphological and molecular analysis of fresh human bone marrow mesenchy-

mal/stromal stem cells (MSCs) enriched by four different methods / P. Jones [et al.] // ASH. Abstract. — 2004. — Vol. 29. — P. 2337.

13. *Stein, M. I.* Molecular pathways regulating the self-renewal of hematopoietic stem cells / M. I. Stein, J. Zhu, S. G. Emerson // Exp. Hematol. — 2004. — № 3. — P. 234–238.

14. Костный мозг как источник получения мезенхимальных клеток для восстановительной терапии поврежденных органов / В. И. Шумаков [и др.] // Вестн. трансплантологии и искусственных органов. — 2002. — № 4. — С. 19–29.

15. Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral blood and cord blood by flow cytometry / D. R. Sutherland [et al.] // Cytometry. — 2003. — № 5. — P. 67–72.

16. *Graeme, V. C.* Instrumentation for flow cytometry / V. C. Graeme //J. Imm. Methods. — 2000. — Vol. 243. — P. 3–12.

17. *Manyonda, I. T.* A critical evaluation of the magnetic cell sorter and its use in the positive and negative selection of CD45RO+ cells / I. T. Manyonda, A. J. Soltys, F. C. A Hay // J. Immunol. Meth. — 1992. — Vol. 149. — P. 1–10.

18.Theoretical Analysis of Cell Separation Based on Cell Surface Marker Density / J. J. Chalmers [et al.] // Biotechnology and Bioengineering. — 1998. — Vol. 59, № 1. — P. 10–20.

19. Zborowski M (eds.) Scientific and clinical applications of magnetic microcarriers: an overview / U. Hafeli [et al.]. — Plenum Press, New York, 1997.

20. *Абдулкадыров, К. М.* Получение и клиническое применение периферических гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови / К. М. Абдулкадыров, Н. А. Романенко, Н. Н. Старков // Вопросы онкологии. — 2000. — Т. 46, № 5. — С. 8–15.

21. *Pamphilon, D.* Stem-cell harvesting and manipulation / D. Pamphilon // Vox Sanguinis. — 2004. — Vol. 87, № 1. — P. 20–25.

22. *Musina, R. A.* Stem cells: properties and perspectives of therapeutic use / R. A. Musina, E. E. Egorov, A. V. Beliavskii // Mol. Biol. — 2004. — Vol. 38, № 4. — P. 563–577.

23. *Polak, J. M.* Stem Cells and Tissue Engineering: Past, Present, and Future / J. M. Polak, A. E. Bishop // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2006. — Vol. 1068. — P. 352–366.

24. *Bapat, S. A.* Stem cell pharmacogenomics. Curr.Top.Med Chem / S. A. Bapat, G. C. Mishra. — 2004. — № 4 (13). — P. 1371–1383.

25. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers / J. Itskovitz-Eldor [et al.] // Mol. Med. — 2000. — № 6 (2). — P. 88–95.

26. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation / S. Liu [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. US. — 2000. — Vol. 97. — P. 6126–6131.

27. *Лопухин, Ю. М.* Этические проблемы стволовых клеток / Ю. М. Лопухин, С. А. Гусев // Вестник РАМН. — 2004. — № 9. — С. 19–21.

28. Bone marrow cells regenerate infacrted myocardium / D. Orlic [et al.] // Nature. — 2001. — Vol. 410. — P. 701–704.

29. Differentiation of Embrionic Stem Cells to Insulin-Secreting Structures Similiar to Pancreatic Islets / N. Lumelsky [et al.] // Science. — 2001. — Vol. 292. — P. 38–45.

30. *Sauvageau, G.* In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells / G. Sauvageau, N. N. Iscove, R. K. Humphries // Oncogene. — 2004. — Vol 23, № 43. — P. 7223–7232.

Поступила 15.05.2007

УДК 612.014.464.:577.1

БИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОЗОНОТЕРАПИИ

Л. С. Ковальчук

Гомельский государственный медицинский университет

В данном обзоре раскрыты биологические и биохимические свойства озона, что предполагает качественно новое решение актуальных проблем современной медицинской науки. Это еще раз подтверждает, что озонотерапия в ближайшее время займет в Республике Беларусь достойное место среди немедикаментозных природных факторов в лечебном арсенале целого ряда заболеваний.

Ключевые слова: озон, озонотерапия, кислород, озониды, озонолиз, аминокислоты, глютатионовая система, эритроцит, фосфолипиды, перекисное окисление липидов, ферменты, жирные кислоты, метаболизм.