

провела опрос по технике криоконсервации и подготовке аутотрансплантата перед инфузией. Данные, полученные из 97 центров, очень сильно отличались друг от друга как по используемой для криоконсервации концентрации ДМСО, так и по позиции «отмывки трансплантата» перед инфузией. Осложнения, связанные с токсичностью ДМСО, наблюдались с частотой 1 случай из 70 [4].

Основные выводы и рекомендации, основанные на сообщениях о технике криоконсервирования с использованием ДМСО, разморозки и инфузии гемопоэтических клеток, можно свести к следующим:

1. Большинство исследовательских групп склоняется к мнению, что снижение концентрации ДМСО до 5% (вместо стандартно используемой 10%), при заморозке трансплантата не влияет на его качество после разморозки [5–7].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Higman M.A., Port J.D., Beauchamp N.J. Jr, Chen A.R. Reversible leukoencephalopathy associated with re-infusion of DMSO preserved stem cells. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 26: 797–800.
2. Dhodapkar M., Goldberg S.L., Tefferi A., Gertz M.A. Reversible encephalopathy after cryopreserved peripheral stem cell infusion. *Am. J. Hematol.* 1994; 45: 187–8.
3. Benekli M., Anderson B., Wentling D. et al. Severe respiratory depression after dimethylsulphoxide-containing autologous stem cell infusion in a patient with AL amyloidosis. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 25(12): 1299–301.
4. Windrum P., Morris T.C., Drake M.B. et al. EBMT Chronic Leukaemia Working Party Complications Subcommittee. Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres. *Bone Marrow Transplant.* 2005; 36: 601–3.
5. Bakken A.M., Bruserud O., Abrahamsen J.F. No differences in colony formation of peripheral blood stem cells frozen with 5% or 10% dimethyl sulfoxide. *J. Hematother. Stem. Cell Res.* 2003; 12: 351–8.
6. Abrahamsen J.F., Rusten L., Bakken A.M., Bruserud O. Better preservation of early hematopoietic progenitor cells when human peripheral blood progenitor

2. Присутствие «нативной» концентрации ДМСО в трансплантате во время инфузии клеточной суспензии может привести к ряду серьезных осложнений [1–4].

3. Отмывка трансплантата гемопоэтических клеток от криопротектора не влияет на количество, жизнеспособность CD34⁺ клеток и скорость энграфтинга [8, 9].

Таким образом, необходимо создание стандартов по криоконсервации и подготовке трансплантата гемопоэтических клеток в онкогематологической клинике. Позиция большинства клинических групп – необходима отмывка криопротектора ДМСО перед инфузией клеток. Это не влияет на качество трансплантата и позволяет предупреждать развитие токсических осложнений. Тем более, что сама процедура «отмывки» занимает около 10–15 минут и может быть автоматизирована [10, 11].

cells are cryopreserved with 5 percent dimethylsulfoxide instead of 10 percent dimethylsulfoxide. *Transfusion* 2004; 44: 785–9.

7. Curcoy A.I., Alcorta I., Estella J. et al. Cryopreservation of HPCs with high cell concentration in 5-percent DMSO for transplantation to children. *Transfusion* 2002; 42: 962.

8. Syme R., Bewick M., Stewart D. et al. The role of depletion of dimethyl sulfoxide before autografting: on hematologic recovery, side effects, and toxicity. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2004; 10: 135–41.

9. Mazet S., Hecquet O., Espinousse D. et al. Washing out DMSO from thawed peripheral blood progenitor cell bags does not result in loss of CD34⁺ cells. *ISHAGE VII annual symposium* (Quebec, Canada, 2001 June 14–17) abstracts book, abst. # 80.

10. Calmels B., Houze P., Hengesse J.C. et al. Preclinical evaluation of an automated closed fluid management device: Cytomate, for washing out DMSO from hematopoietic stem cell grafts after thawing. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 31: 823–8.

11. Rodriguez L., Velasco B., Garcia J., Martin-Henao G.A. Evaluation of an automated cell processing device to reduce the dimethylsulfoxide from hematopoietic grafts after thawing. *Transfusion* 2005; 45: 1391–7.

Подготовил А.В. Берсенев

По материалам *Leuk. Lymphoma* 2005; 46: 1671–4

Метод эндоскопического получения биоптата головного мозга и выделения из него нейральных стволовых клеток для аутотрансплантации

Получение достаточного количества неиммуногенных нейральных клеток является актуальной проблемой клинической нейротрансплантации. Для замещения нефункционирующих нервных клеток или стимуляции нейрогенеза *in situ* в клинической нейротрансплантации нужны специализированные нервные клетки или прогениторы с потенциалом к росту и дифференцировке в нейрональном направлении. Наиболее распространёнными источниками такого клеточного материала в клинике является головной мозг абортированных эмбрионов (или плодов) человека [1, 3] и собственные нейрональные клетки пациента, выделенные из обонятельной зоны слизистой оболочки носа (olfactory ensheathing cells) [2]. В качестве альтернативного источника клеточного материала рассматриваются аллогенные нейрональные стволовые клетки (НСК) головного мозга трупов. НСК были выделены из различных отделов головного мозга (включая кору, субвентрикулярную зону, сетчатку, гиппокамп и обонятельную

зону) трупов в разное время после смерти до 140 часов и охарактеризованы [4–6]. Однако, использование этих источников НСК имеет те или иные ограничения или недостатки – малое количество клеток (фетальный мозг и аутогенный материал), проблема инфекционной безопасности (фетальный и трупный аллогенный материал), проблема онкогенной безопасности (эмбриональные стволовые клетки и их дериваты, ранние взрослые стволовые клетки) и иммунологический конфликт (аллогенный и ксеногенный материал). Таким образом, поиск оптимального источника клеточного материала для заместительной клинической нейротрансплантации остаётся актуальной задачей. Если бы проблема достаточного количества клеточного материала была решена, то «источником выбора» могли бы стать аутогенные НСК.

Исследователи из шведского Karolinska Institute предлагают новый метод выделения и экспансии аутогенных НСК

из биоптатов головного мозга неврологических пациентов. Методика была испытана на 13 больных, результаты опубликованы в недавнем номере журнала *Neurosurgery*. Метод выделения НСК из биоптатов головного мозга человека и получения из них нейронов был разработан группой 2 года назад [7]. Цели настоящего исследования – показать выполнимость, безопасность и низкую инвазивность процедуры на пациентах, а также возможность выделения и экспансии *ex vivo* достаточного количества НСК.

Микробиоптаты получали эндоскопически из боковых желудочков головного мозга во время рутинного нейрохирургического вмешательства по поводу гидроцефалии. Осложненной процедуры, включая «новый» неврологический дефицит, не наблюдали. Клеточная суспензия, выделенная из биоптатов механически-ферментативным методом, помещалась в дифференцировочную среду. Клетки всех биоптатов формировали нейросферы в течение нескольких дней и создавали новые нейросферы после диссоциации и пассирования в течение 3–7 недель. Стволовые клетки нейросфер клонировались (около 7% всех клеток нейросферы) и были способны дать новую нейросферу в 2 пассажах. То есть, если считать, что одна нейросфера содержит в среднем 300 клеток, и из одной клетки можно получить 1 нейросферу, то в двух пассажах можно выделить 90 000 клеток из одной исходной. В конце первой недели культивирования 78% клеток несли глиальные маркеры и 22% – нейрональные.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bjorklund A., Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat. Neurosci.* 2000; 3: 537–44.
2. Huang H., Chen L., Wang H. et al. Influence of patients' age on functional recovery after transplantation of olfactory ensheathing cells into injured spinal cord injury. *Chin. Med. J. (Engl)* 2003; 116: 1488–91.
3. Winkler C., Kirik D., Bjorklund A. Cell transplantation in Parkinson's disease: how can we make it work? *Trends Neurosci.* 2005; 28: 86.
4. Palmer T.D., Schwartz P.H., Taupin P. et al. Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature* 2001; 411: 42–3.

Функциональная зрелость нейронов, подтвержденная методом патч-кламп, наблюдалась через 3 недели культивирования.

Таким образом, исследователи предложили новый метод выделения ауто-НСК из головного мозга пациента, показали его безопасность и выполнимость. Важным моментом является возможность производить экспансию *in vitro* собственных нейрональных прогениторов с получением большого количества функционально зрелых нейронов. Для выращивания нейросфер использовали протокол Johansson [8], предложенный в 1999 году. Общее количество функциональных нейрональных клеток, которое позволяет получать метод, можно считать достаточным, поскольку ранее было показано, что, например, для замещения функции при болезни Паркинсона может быть достаточно всего лишь 80 000 полноценных нейронов [1]. Локализация НСК в субвентрикулярной зоне головного мозга человека позволяет безопасно забирать биоптат через стенку желудочка, поскольку рядом нет никаких функционально значимых структур, в отличие от другого сайта НСК – гиппокампа и зубчатой извилины.

Чёткая анатомическая локализация сайтов НСК в головном мозге взрослого человека, безопасность процедуры получения биоптата и возможность «наращивания» нейрональных клеток *ex vivo* позволят развивать этот метод в будущем и занять передовые позиции в клинической заместительной нейротрансплантологии.

5. Klassen H., Ziaeiian B., Kirov I. et al. Isolation of retinal progenitor cells from post-mortem human tissue and comparison with autologous brain progenitors. *J. Neurosci. Res.* 2004; 77: 334–43.
6. Schwartz P.H., Bryant P.J., Fuja T.J. et al. Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. *J. Neurosci. Res.* 2003; 74: 838–51.
7. Westerlund U., Moe M.C., Varghese M. et al. Stem cells from the adult human brain develop into functional neurons in culture. *Exp. Cell Res.* 2003; 289: 378–83.
8. Johansson C.B., Svensson M., Wallstedt L. et al. Neural stem cells in the adult human brain. *Exp. Cell Res.* 1999; 253:733–6.

Подготовил А.В. Берсенев
По материалам *Neurosurgery* 2005; 57: 779–84

Ауто трансплантация обкладочных клеток обонятельного анализатора для лечения травмы спинного мозга – австралийское исследование

В настоящее время в нескольких странах мира запущены сразу несколько клинических испытаний различных методов клеточной трансплантации для лечения травмы спинного мозга (ТСМ) [1–3]. Метод трансплантации обкладочных клеток обонятельного анализатора или обкладочных обонятельных клеток (ОЕК, olfactory ensheathing cells – ОЕС) при ТСМ, продемонстрировавший эффективность в нескольких десятках экспериментальных протоколов, в настоящее время проходит I–II фазы клинических испытаний в Китае [6], Португалии [5, 7], Австралии [4] и России [8]. По неофициальным данным, этой процедуре подверглись около 500 человек. Большая часть из них лечилась в Китае клетками, выделенными из обонятельной луковицы абортированных плодов человека [6]. Однако во всех этих исследованиях, группы пациентов значительно различались по возрасту, времени и локализации травмы, не были рандомизированы. Кроме

того, нет данных по фенотипической характеристике клеточного материала [6]. Результаты некоторых пилотных испытаний не публиковались и не обсуждались [7, 8]. Таким образом, до сих пор нельзя однозначно говорить о клинической эффективности данного метода.

ОЕС обонятельной луковицы или «нейроэпителия» обонятельной области слизистой оболочки носа имеют глиальную природу и способны пролиферировать в культуре. Многочисленные эксперименты показали, что эти клетки, подобно шванновским, через неясные механизмы способны стимулировать аксональную регенерацию и вызывать ремиелинизацию [4] в области повреждения спинного мозга.

В недавнем номере журнала *Brain* были опубликованы результаты I фазы слепого, контролируемого клинического испытания метода ауто трансплантации ОЕС пациентам с ТСМ, проходившего в Австралии. Перед началом клинических