

УДК 615.361:618.38+616-053.3



Керролл Д.

Університет дослідження здоров'я Джорджії, Огаста, США

e-mail: jcarroll@gru.edu

ЗАСТОСУВАННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПРИ ГІПОКСИЧНО-ІШЕМІЧНОМУ УШКОДЖЕННІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ НОВОНАРОДЖЕНИХ

РЕЗЮМЕ

В експериментальних доклінічних дослідженнях на тваринах проведено оцінку ефективності багатьох типів дорослих стовбурових клітин для лікування гіпоксично-ішемічного ураження головного мозку новонароджених. З'явилися численні повідомлення про позитивні ефекти їх застосування, при цьому шлях доставки клітин не є критичним. Успіхи такої терапії пов'язують із якомога швидшим введенням клітин, і саме раннє їх застосування відразу після пошкодження є вирішальним. Механізм дії стовбурових клітин полягає в збереженні власних нейронів в місці пошкодження, а не в заміні їх введеними клітинами. Враховуючи успіхи в лікуванні гострого ураження головного мозку новонароджених в експерименті, мають бути розпочаті відповідні добре продумані клінічні дослідження.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гіпоксично-ішемічне пошкодження головного мозку, трансплантація стовбурових клітин, пуповинна кров.

Потенціал використання стовбурових клітин (СК) для лікування ушкоджень головного мозку у дітей є досить привабливим. Про це свідчать успіхи наукових лабораторій в дослідженнях нових типів клітин, а також повідомлення від батьків пролікованих дітей. В даному огляді зосереджено увагу на гострому гіпоксично-ішемічному ушкодженні (ГІУ) головного мозку новонароджених, яке виникає, зазвичай, в результаті припинення кровопостачання дитини під час пологів. Для оцінки можливих ефектів стовбурових клітин у більшості експериментальних моделей намагаються імітувати ушкодження при гіпоксії та ішемії на новонароджених тваринах. Головними завданнями таких досліджень є: вибір та встановлення переваг різних типів потенційно-доступних стовбурових клітин; вивчення процесів ендогенної регенерації, що відбуваються в мозку після пошкодження; визначення оптимальних строків лікування, що в комплексі лягає в основу клінічних випробувань [1].

ТИПИ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

Стовбурові клітини вирізняються здатністю до асиметричного поділу, забезпечуючи підтримання двох ліній клітин: подібних собі стовбурових та більш зрілих. Стовбурові клітини, як правило, поділяють на дорослі та ембріональні, але дослідження останніх років дещо нівелювали такий розподіл.

Так звані дорослі СК вже набули певного ступеня диференціації. Вони можуть бути виявлені в багатьох тканинах, та особливо багато їх в кістковому мозку. Такі СК мають здатність утворювати клітини з фенотипічними характеристиками, які не притаманні вихідній тканині. Серед дорослих СК кісткового мозку вирізняють гемопоетичні

попередники та мезенхімальні стовбурові клітини (МСК). МСК відділяють від гемопоетичних клітин за здатністю до адгезії на поверхні культурального посуду. Поверхневий фенотип МСК характеризується наявністю маркерів *CD73*, *CD90* і *CD105*, при цьому вони є негативними за маркерами *CD45* та *CD34*. На сьогодні запропоновано багато варіантів направленої диференціювання МСК в нейрональні клітини. В численних експериментах використовувалась добре охарактеризована популяція таких клітин, відома як мультипотентні дорослі прогенітори [2].

Іншим цікавим джерелом МСК, на додаток до кісткового мозку, може бути пульпа молочних зубів. *Yamagata et al.* повідомив, що дорослі стовбурові клітини, присутні в пульпі зубів, мають нейропротекторну дію при експериментальній травмі головного мозку у мишей [3]. Таким чином, очевидно, що багато типів тканин, в більшій чи меншій мірі, містять стовбурові клітини з певною різноманітністю.

Нейральні стовбурові клітини є дорослими СК, отриманими з головного мозку. Вони запропоновані в якості терапевтичного агента з високим відновлювальним потенціалом при неонатальній мозковій травмі [4]. Нейральні СК знаходяться в субгранулярній зоні зубчастої звивини та в субвентрикулярній зоні. Як правило, ці клітини отримують з мозку плодів, які померли ще до народження в результаті спонтанного або штучного переривання вагітності. Враховуючи можливість їх отримання лише після абортів, використання таких клітин є суттєвою етичною проблемою. Точно не відомо, як часто ці клітини використовуються в клінічних або експериментальних дослідженнях. Крім того, сучасні досягнення в області біології стовбурових клітин можуть звести до мінімуму потребу в них.

Як проміжна ланка між дорослими та ембріональними СК з соматичних клітин, зокрема фібробластів шкіри, були отримані індуковані плюрипотентні стовбурові клітини [5]. Вони володіють таким же потенціалом, як ембріональні СК. Біологічна перевага цих клітин полягає у високій мультипотентності щодо типів тканин, в які вони можуть диференціюватись.

Значні здобутки в галузі застосування стовбурових клітин, як і раніше, потребують фундаментальних досліджень. Ми маємо знати більше про біологію стовбурових клітин, потрібно отримати більше даних про довгостроковий туморогенний потенціал різних типів СК. На додаток до теоретичних знань в цій області практика є теж край необхідною для майбутніх широких клінічних досліджень.

ПОТЕНЦІАЛ ЕНДОГЕННОЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ ТКАНИНИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Головний мозок, справді, має певну здатність до регенерації після травми, проте ці можливості суттєво обмежені. Регенеративний потенціал головного мозку вивчений досить докладно та чітко встановлені ділянки нейрогенезу. При пошкодженні відбувається активація нейрогенезу в субвентрикулярній зоні з міграцією клітин в гіпокамп вздовж перивентрикулярної зони. На нашій моделі ушкодження у тварин ми знайшли нові нейрони в зубчастій звивині [6]. При цьому першими з'являються мікрогліальні або ендотеліальні клітини. Ділянками з найбільшою кількістю нових нейронів є субвентрикулярна зона, зубчаста звивина і зона CA1 гіпокампу.

Проте зв'язок між цим феноменом та клінічним покращенням, яке відбувається після травми, не відомий. Наш клінічний досвід підтверджує, що пошкодження головного мозку різного типу є перманентними. Безсумнівно, що нові клітини мають сприятливий вплив, але це недостатньо для відновлення. Посилення процесів ендогенної регенерації може бути можливим за рахунок секреторних факторів стовбурових клітин, які сприяють виживанню більшої кількості нейронів [7].

ДОКЛІНІЧНІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДАНІ

У табл. 1 представлено ряд доклінічних експериментів, що демонструють успіхи трансплантації різних типів стовбурових клітин при моделюванні гострого пошкодження головного мозку у новонароджених тварин.

Практично у всіх цих дослідженнях використовували стандартну модель гіпоксично-ішемічного ушкодження шляхом лігування однієї сонної артерії з наступним періодом гіпоксії [8]. У таблиці представлені не всі описані в літературі численні експерименти, однак тенден-

ції є загальними для таких повідомлень. Усі вищезазначені публікації стосуються гострого ушкодження з коротким проміжком між моделюванням та застосуванням різних варіантів МСК. Цікаво, що шлях введення, здається, не має значення: навіть при назальному введенні клітини можуть залишатись життєздатними [9, 18].

У неопублікованій роботі ми використовували індуковані плюрипотентні стовбурові клітини людського походження, трансформовані в нейрональні прогенітори, які вводили в гіпокамп новонароджених тварин через вісім днів після моделювання ГУ. Було продемонстровано покращення поведінкових реакцій та підвищення виживання нейронів.

Головний висновок цих доклінічних експериментів на тваринах полягає в тому, що лікування дорослими стовбуровими клітинами має позитивні ефекти у випадку введення клітин відразу після гострого пошкодження мозку. Крім того, клітини можуть бути введені різними способами, що теж сприятиме клінічному результату.

МЕХАНІЗМ ДІЇ ТРАНСПЛАНТОВАНИХ КЛІТИН

Основна ідея щодо перспектив терапії стовбуровими клітинами передбачає їх здатність замінити загиблі або пошкоджені нейрони [19]. Інша гіпотеза говорить про можливий нейропротективний ефект самих клітин або продукованих ними секретів, як спосіб захисту власних клітин реципієнта [20]. Заміна клітин, здавалося б, є ідеальним механізмом в даній ситуації. Тим не менше лише невелика кількість трансплантованих клітин виживає, а більшість з них не диференціюється в нейрони [15, 21]. Трансплантовані клітини, які вижили, зазвичай, не утворюють відростків нейронів, які необхідні для нормального функціонування [22].

Більш ймовірно, позитивні ефекти пов'язані з покращенням виживання власних нервових клітин. Концентрація деяких ростових факторів, таких як фактор росту нервів та нейротрофічний фактор головного мозку, підвищується після введення МСК. *Yamagata et al.* продемонстрували, що стовбурові клітини з молочних зубів пригнічували експресію прозапальних та стимулювали експресію протизапальних цитокінів, зменшували апоптоз, що в комплексі сприяло покращенню виживання ендогенних клітин [3]. Цей процес може бути опосередкований регулюванням експресії генів нейронів [23]. В іншому експерименті мікрочіповий аналіз підтвердив стимуляцію генів, що беруть участь в нейрогенезі та нейротрофічних процесах [24].

Деякі інші механізми, ймовірно, теж відіграють певну роль. Клітини пуповини людини можуть зменшити загибель клітин у пошкодженному мозку новонародженого шляхом ослаблення реактивного гліозу [25]. Раніше ми вже розглядали процес регенерації судин при гострому ушкодженні мозку [19]. Кілька груп



Таблиця 1. Доклінічні експерименти з клітинної терапії гіпоксично-ішемічного ушкодження головного мозку на новонароджених гризунах.

МОДЕЛЬ	ЧАС ПІСЛЯ ПОШКОДЖЕННЯ	ТИП КЛІТИН	ШЛЯХ ВВЕДЕННЯ	ЛІТ.
ГУ	3, 7, 10 діб	МСК	інтраназально	[9]
ГУ	3,7, 14 діб	нейральні СК	внутрішньоартеріально	[10]
ГУ		нейральні прогенітори, отримані з МСК	в тканину мозку	[11]
ГУ	3 доби	МСК	внутрішньосерцево	[12]
ГУ	1 доба	пуповинна кров	внутрішньовенно	[13]
Окклюзія середньої мозкової артерії	1 доба	МСК пуповинної крові	внутрішньошлуночково	[14]
ГУ	1 доба	МСК пуповинної крові	інтраперитонеально	[15]
ГУ	7 діб	мультипотентні дорослі прогенітори	в гіпокамп	[16]
ГУ	7 діб	мультипотентні дорослі прогенітори	внутрішньовенно	[17]

дослідників показали, що ін'єкції стовбурових клітин зменшують вивільнення прозапальних клітин з селезінки [26, 27]. Вважається, що саме ці клітини з селезінки відіграють провідну руйнівну роль в реалізації деструктивних процесів в пошкодженому мозку. Нарешті, було повідомлено, що МСК сприяють перебудові мереж кортикальних нейронів [28].

КЛІНІЧНІ ДАНІ

На сьогоднішній день в літературі є досить небагато даних, присвячених клінічному використанню стовбурових клітин при гострому ушкодженні головного мозку. Є повідомлення про шістьох дітей, пролікованих в Китаї. Одна дитина отруїлась чадним газом, у однієї була важка гіпоглікемія, а чотири інших перенесли важку неонатальну асфіксію. Дітям виконана трансплантація нейральних клітин-попередників в проміжку від 4 до 20 днів після пошкодження мозку. Клітини були отримані з 12-тижневого плоду після спонтанного абортів та введені в бокові шлуночки. Автори повідомляють про покращення стану всіх пацієнтів на другий день після трансплантації, а чотири пацієнти досягли нормального рівня розвитку. Про жодні ускладнення не повідомлялося [29].

В іншому повідомленні в Китаї дитині з важкою енцефалопатією, спричиненою ГІУ, в боковий шлуночок ввели такий же тип нейральних попередників. Пацієнт досяг нормального рівня розвитку через 28 днів після трансплантації [30].

Відомо лише про одне поточне дослідження в США в *Duke University*, спрямоване на визначення можливих перспектив лікуван-

ня стовбуровими клітинами гострого ушкодження головного мозку у новонародженого (клінічне випробування ID *NCT00593242*). В якості джерела стовбурових клітин виступає аутологічна пуповинна кров. Результатів даного випробування поки що не надходило. Відсутність клінічних даних, отриманих при сліпих контрольованих дослідженнях, дещо розчарує наші сподівання в цій області.

МАЙБУТНІ ПЕРСПЕКТИВИ

Враховуючи очевидний потенціал клітинної терапії при гострому ушкодженні головного мозку, подальшого об'єднання потребують два напрямки досліджень. По-перше, більше уваги має бути приділено питанням біології стовбурових клітин, як на фундаментальному, так і на доклінічному рівні. Хоча ми вже багато знаємо про різні типи стовбурових клітин, залишається невідомим, які з них мають найбільший терапевтичний потенціал. Для успішного виконання цього завдання мають бути проведені доклінічні дослідження з порівняння ефективності та безпеки стовбурових клітин різного походження на тваринних моделях. Має бути зроблений ретельний аналіз поведінкових та гістологічних результатів.

По-друге, мають бути проведені сліпі контрольовані клінічні дослідження в групах немовлят, які мають порівнянні клінічні прояви захворювання. Ці дослідження є досить складними, високоартісними та потребують додаткового залучення пацієнтів протягом тривалого періоду. Такий системний підхід часто розчарує і батьків, і дослідників. Але ці дослідження необхідні для підтвердження ефективності лікування з позицій доказової медицини.

ВИСНОВКИ

ТРАНСПЛАНТАЦІЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ВІДКРИВАЄ ВЕЛИКІ ПЕРСПЕКТИВИ В ЛІКУВАННІ ГОСТРИХ ПОШКОДЖЕНЬ ГОЛОВНОГО МОЗКУ У НОВОНАРОДЖЕНИХ, В ТОМУ ЧИСЛІ Й ГІПОКСИЧНО-ІШЕМІЧНИХ УРАЖЕНЬ. ЧИСЛЕННІ ДОКЛІНІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ МОДЕЛЯХ ВКАЗУЮТЬ НА УСПІХИ В ЦЬОМУ НАПРЯМКУ. МЕХАНІЗМ ПОЗИТИВНОЇ ДІЇ КЛІТИН ПОЛЯГАЄ, СКОРІШ ЗА ВСЕ, У НЕЙРОТРОФІЧНИХ І НЕЙРОПРОТЕКТОРНИХ ЕФЕКТАХ, А НЕ ЗАМІНІ НЕЙРОНІВ. ТОМУ ЗАЛИШАЄТЬСЯ ПОТРЕБА У ГЛИБОКИХ ФУНДАМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ В ОБЛАСТІ БІОЛОГІЇ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН.

ТАКОЖ НЕОБХІДНИМИ Є НАЛЕЖНИМ ЧИНОМ СПЛАНОВАНІ КЛІНІЧНІ ВИПРОБУВАННЯ. ОДИН З ОЧЕВИДНИХ ВАРІАНТІВ ВИБОРУ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН, ВРАХОВУЮЧИ ВИСОКИЙ РІВЕНЬ БЕЗПЕКИ, Є АУТОЛОГІЧНІ КЛІТИНИ ПУПОВИНОЇ КРОВІ. ВРАХОВУЮЧИ НЕОБХІДНІСТЬ ПРОВЕДЕННЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ КЛІТИН ЯКОМОГО ШВИДШЕ ПІСЛЯ ПОШКОДЖЕННЯ, ПОТРІБНО УСВІДОМЛЮВАТИ, ЩО ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ПРОВЕДЕННЯ ТАКИХ ДОСЛІДЖЕНЬ БУДУТЬ ДОСИТЬ СКЛАДНИМИ ТА ЗАТРАТНИМИ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Carroll J., Borlongan C. Adult Stem Cell Therapy for Acute Brain Injury in Children // *CNS & Neurological Disorders – Drug Targets*. – 2008. – 7. – P. 1-8.
2. Keene C., Ortiz-Gonzalez X., Jiang Y. et al. Neural differentiation and incorporation of bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells after single cell transplantation into blastocyst mouse embryos // *Cell Transplantation*. – 2003. – 12. – P. 201-213.
3. Yamagata M., Yamamoto A., Kako E. et al. Human dental pulp-derived stem cells protect against hypoxic-ischemic injury in neonatal mice // *Stroke*. – 2013. – 44. – P. 551-554.
4. Lee I., Jung K., Kim M. et al. Neural stem cells: properties and therapeutic potentials for hypoxic-ischemic brain injury in newborn infants // *Pediatrics International*. – 2010. – 52. – P. 855-855.
5. Takahashi K., Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology // *Development*. – 2013. – 140. – P. 2257-2267.
6. Bartley J., Soltan T., Wimbourne H. et al. BrdU-positive cells in the neonatal mouse hippocampus following hypoxic-ischemic brain injury // *BMC Neuroscience*. – 2005. – 6. – P. 63-74.
7. Donega V., van Velthoven CT, Nijboer CH, et al. The endogenous regenerative capacity of the damaged newborn brain: neurogenesis with mesenchymal stem cell treatment // *J. Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2013. – 33. – P. 625-634.
8. Rice J., Vannucci R., Brierley J. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat // *Ann Neurol*. – 1981. – 9. – P. 131-141.
9. Donega V., van Velthoven C., Nijboer C. et al. Intranasal mesenchymal stem cell treatment for neonatal brain damage: long-term cognitive and sensorimotor improvement // *PLoS ONE*. – 2013. – 8. – P. e51253.
10. Rosenblum S., Wang N., Smith T. et al. Timing of intra-arterial neural stem cell transplantation after hypoxia-ischemia influences cell engraftment, survival, and differentiation // *Stroke*. – 2012. – 43. – P. 1624-1631.
11. Park S., Koh SE, Maeng S, et al. Neural progenitors generated from mesenchymal stem cells of first-trimester human placenta matured in the hypoxic-ischemic rat brain and mediated restoration of locomotor activity // *Placenta*. – 2011. – 32. – P. 269-276.

12. Lee J., Kim B., Jo C., et al. Mesenchymal stem-cell transplantation for hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rat model // *Pediatric research*. – 2010. – **67**. – P. 42-46.
13. de Paula S., Greggio S., Marinowic D. et al. The dose-response effect of acute intravenous umbilical cord blood cells on brain damage and neonatal hypoxia-ischemia // *Neuroscience*. – 2012. – **210**. – P. 43-66.
14. Kim E., Ahn S., Im G. et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell transplantation attenuates severe brain injury by permanent middle cerebral artery occlusion in newborn rats // *Pediatric Research*. – 2012. – **72**. – P. 277-84.
15. Meier C., Middelanis J., Wasielewski B. et al. Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells // *Pediatric Research*. – 2006. – **59**. – P. 244-249.
16. Yasuhara T., Matsukawa N., Yu G. et al. Transplantation of cryopreserved human bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells of neonatal hypoxic-ischemic injury: targeting the hippocampus // *Reviews in the Neurosciences*. – 2006. – **17**. – P. 215-225.
17. Yasuhara T., Hara K., Maki M. et al. Intravenous grafts recapitulate the neurorestoration afforded by intracerebrally delivered multipotent adult progenitor cells in neonatal hypoxic-ischemic rats // *J. Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2008. – **28**. – P. 1804-1810.
18. van Velthoven C., Kavelaars A., van Bel F., Heijnen C. Nasal administration of stem cells: a promising novel route for ischemic brain damage // *Pediatric Research*. – 2010. – **68**. – P. 419-422.
19. Carroll J. Human cord blood for the hypoxic-ischemic neonate // *Pediatric Research*. – 2012. – **71**. – P. 459-63.
20. Van Velthoven C., Kavelaars A., Heijnen C. Mesenchymal stem cells as a treatment for neonatal ischemia // *Pediatric Research*. – 2012. – **71**. – P. 474-481.
21. Erices A., Conget P., Minguell J. Mesenchymal progenitor cell in human umbilical cord blood // *British Journal of Haematology*. – 2000. – **109**. – P. 235-242.
22. Zhao L., Duan W., Reyes M. et al. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats // *Experimental Neurology*. – 2002. – **174**. – P. 11-20.
23. van Velthoven C., Kavelaars A., van Bel F. et al. Mesenchymal stem cell transplantation changes the gene expression of the neonatal ischemic brain // *Brain, Behavior & Immunity*. – 2011. – **25**. – P. 1342-1348.
24. Daadi M., Davis A., Arac A. et al. Human neural stem cell grafts modify microglial response and enhance axonal sprouting in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. – *Stroke*. – 2010. – **41**. – P. 516-523.
25. Wasielewski B., Jensen A., Roth-Harer A. et al. Neuroglial activation and CX43 expression are reduced upon transplantation of human umbilical cord blood cells after perinatal hypoxic-ischemic injury // *Brain Research*. – 2012. – **1487**. – P. 39-53.
26. Borlongan C., Lind J., Dillon-Carter O. et al. Bone marrow grafts restore cerebral blood flow and blood brain barrier in stroke rats // *Brain Research*. – 2004. – **1010**. – P. 108-116.
27. Robinson S., Niu T., de Lima M. et al. Ex vivo expansion of umbilical cord blood // *Cytotherapy*. – 2005. – **7**. – P. 243-250.
28. van Velthoven C., van de Looij Y., Kavelaars A. et al. Mesenchymal stem cells restore cortical rewiring after neonatal // *Annals of Neurology*. – 2012. – **71**. – P. 785-796.
29. Luan Z., Liu W., Qu S. et al. Treatment of newborns with severe injured brain with transplantation of human neural precursor cells // *Zhonghua Erke Zazhi*. – 2011. – **49**. – P. 445-449.
30. Luan Z., Yin G., Hu X. et al. Treatment of an infant with severe neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy sequelae with transplantation of human neural stem cells into cerebral ventricle // *Zhonghua Erke Zazhi*. – 2005. – **43**. – P. 580-583.