УДК 615.361:618.38+616-053.3

Лі Д.

Національний університет системи охорони здоров'я, Сінгапур

e-mail: Lee_jiun@nuhs.edu.sg

ЗАСТОСУВАННЯ АУТОЛОГІЧНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ У НОВОНАРОДЖЕНИХ З ГІПОКСИЧНО-ІШЕМІЧНОЮ ЕНЦЕФАЛОПАТІЄЮ

РЕЗЮМЕ

Численні клінічні дослідження останніх років продемонстрували високий терапевтичний потенціал стовбурових клітин пуповинної крові для лікування різноманітних захворювань у дітей. Представлено результати пілотного випробування трансплантації аутологічних клітин пуповинної крові у новонароджених з гіпоксично-ішемічним ураженням головного мозку. У першому випадку після клітинної терапії пацієнт продовжує нормально розвиватись у віці одного року. У другому випадку залишається значна затримка моторного розвитку дитини з деяким когнітивним дефіцитом. Для оцінки клінічної ефективності такого лікування необхідні подальші мультицентрові рандомізовані дослідження.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: пуповинна кров, гіпоксично-ішемічна енцефалопатія, трансплантація стовбурових клітин.

Гіпоксія-ішемія головного мозку є основною причиною перинатальних неврологічних пошкоджень. Незважаючи на сьогоднішній рівень медичної допомоги в акушерстві, неонатології та значні успіхи у профілактиці ускладнень пологів, помірна та важка гіпоксично-ішемічна енцефалопатія (ГІЕ) у новонароджених дітей, як і раніше, зустрічається з частотою 1-2 на 1000 народжених. До недавнього часу стратегія ведення таких пацієнтів полягала у підтримуючій терапії дисфункції багатьох органів. Протягом останніх трьох десятиліть активні дослідження на тваринах, а згодом і людях, переконливо продемонстрували, що індукована системна гіпотермія, при якій температура тіла дитини протягом 72 годин підтримується на рівні 33,5^{0}C, починаючи з 6-ї години після народження, ефективно покращує неврологічну картину у дітей з ГІЕ. Така терапія стала стандартом лікування з 2010 року [1, 2, 3]. На жаль, навіть після застосування індукованої гіпотермії значна частина немовлят з ГІЕ все ще мають неврологічні розлади різного ступеня важкості, що діагностуються протягом двох років життя [4]. Тому продовжуються пошуки інших підходів, які сприятимуть покращенню результатів лікування таких пацієнтів.

СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ ПРИ НЕВРОЛОГІЧНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ

Інтерес до замісної клітинної терапії при неврологічних захворюваннях має тривалу історію. Ще сорок років тому на тваринах було проведено багато досліджень з нейротрансплантації [5]. Інші, менш досліджені, стратегії нейрорегенерації передбачають стимуляцію ендогенних нейральних стовбурових клітин. Багатообіцяючими виявились результати двох подвійних сліпих рандомізованих контрольованих клінічних випробувань з трансплантації фетальних тканин при хворобі Паркінсона, хоча первинні цілі терапії не були досягнуті [6, 7]. Обнадійливим в цих дослідженнях є демонстрація того, що імплантовані клітини ембріонального походження успішно прижились та утворювали відростки. Незважаючи на це, залишаються ще значні проблеми в перенесенні результатів таких досягнень на рівень рутинної терапії.

Крім клінічної ефективності, іншим важливим моментом при використанні фетальних тканин є питання медичної етики. Альтернативні джерела стовбурових клітин могли б стати кандидатами на те, щоб обійти спірні політичні та юридичні перешкоди. Приклади такого

підходу включають ксеногенні фетальні клітини, імморталізовані клітинні лінії, мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку, стромальні стовбурові клітини з жирової тканини, стовбурові клітини плаценти, клітини пуповинної крові та індуковані плюрипотентні стовбурові клітини [8].

КЛІТИНИ ПУПОВИННОЇ КРОВІ

Пуповинна кров є джерелом, багатим на стовбурові клітини, включаючи мезенхімальні. Вперше, незважаючи на значний початковий скептицизм, трансплантація клітин пуповинної крові людини була виконана в 1988 році для успішного лікування дитини з анемією Фанконі. На сьогодні це є вже загальновизнаним варіантом лікування багатьох видів раку крові та генетичних гематологічних захворювань. За приблизними оцінками, до 2015 року щорічно у всьому світі буде проводитись 10000 трансплантацій пуповинної крові з використанням збережених раніше клітин. Є багато очевидних переваг використання пуповинної крові як джерела плюрипотентних стовбурових клітин. Зазвичай, вона знищується як біологічні відходи після народження дитини, в той час як може бути легко зібрана, а процедури забору та зберігання є безпечними для донора. Завдяки низькій імуногенності клітинні трансплантати з пуповинної крові більш толерантні щодо невідповідності за HLA і таким чином мають нижчий рівень реакцій «трансплантат проти хазяїна», в порівнянні з стовбуровими клітинами кісткового мозку. Важливою проблемою використання пуповинної крові є обмежена кількість клітин для трансплантації, доступна від одного донора, наприклад, при застосуванні для великих пацієнтів.

На моделях тварин з індукованим інсультом інфузії клітин пуповинної крові людини продемонстрували деякі важливі властивості: введені клітини мігрують до осередку пошкодження, зменшують розмір зони інфаркту, а також викликають функціональне покращення неврологічних функцій у тварин [9, 10, 11]. У людини також було продемонстровано, що внутрішньовенно введені клітини пуповинної крові у пацієнтів з хворобою Краббе перетнули гематоенцефалічний бар'єр і прижились в тканинах головного мозку реципієнтів [*Kurtzberg, особисте спілкування*].

МОЖЛИВІ МЕХАНІЗМИ ПОЗИТИВНИХ НЕВРОЛОГІЧНИХ ЕФЕКТІВ ВВЕДЕННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

Всупереч загальноприйнятій логіці, пересаджені клітини, ймовірно, реалізують позитивні ефекти, головним чином, не за рахунок свого розмноження, диференціювання та заміни втрачених внаслідок хвороби нейронів [12]. Одним з можливих механізмів є паракринний вплив через секрецію нейротрофічних факторів, які допомагають стимулювати розмноження ендогенних нейральних попередників [13, 14]. Клітини пуповинної крові здатні захистити кортикальні нейрони від глутамат-індукованого апоптозу за рахунок активації сигнального шляху протеїн-кінази В [15]. Це особливо актуально для терапії гіпоксично-ішемічної енцефалопатії, оскільки запобігання відстроченої загибелі клітин після гострого гіпоксично-ішемічного інсульту лежить в основі успішного лікування таких дітей. Клітини пуповинної крові також покращують виживання олігодендроцитів за рахунок зміни експресії генів [16]. На моделі травми спинного мозку у щурів трансплантовані мультипотентні стовбурові клітини покращували неврологічну функцію, можливо, продукуючи нейротрофічні, ангіогенні та протизапальні цитокіни, які зменшують вторинне пошкодження [17]. В експериментах in-vitro продемонстровано здатність мононуклеарних клітин пуповинної крові секретувати інтерлейкіни , фактори росту та білки хемотаксису [18].

ПІЛОТНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ КЛІТИН АУТОЛОГІЧНОЇ ПУПОВИННОЇ КРОВІ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ НОВОНАРОДЖЕНИХ З ГІПОКСИЧНО-ІШЕМІЧНИМ УШКОДЖЕННЯМ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Ідея ранньої клітинної терапії є досить привабливою, оскільки безпосередня доступність аутологічної кордової крові після народження дитини дозволяє провести інфузію стовбурових клітин якомога раніше після пошкодження головного мозку, особливо у фазу реперфузії. Крім того, не виникне жодних проблем несумісності за HLA, а життєздатність ядровмісних клітин свіжої пуповинної крові буде кращою, ніж кріоконсервованих одиниць. Подібні пілотні дослідження безпеки та можливостей клітинної терапії були проведені в Сінгапурі, у співпраці з *Cotten et al.* (Університет Дюка), як ініціаторами клінічного випробування аутологічних клітин пуповинної крові у новонароджених з ГІЕ [19, 20]. Протягом двох років діти з ГІЕ, які потребували терапевтичної гіпотермії, отримували можливість трансфузії аутологічної пуповинної крові. Для отримання фракції ядровмісних клітин зібрана одиниця пуповинної крові була зменшена в об'ємі та позбавлена еритроцитів. Фракція ядровмісних клітин не підлягала замороженню і була розділена на чотири зразки по 5 мл кожен. Кожен зразок вводили на 12-у, 24-у, 48-у і 72-у години життя дитини. Ми показали , що після обробки не кріоконсервованої фракції ядровмісних клітин пуповинної крові їх життєздатність через 96 години складала 91,3 % (фракція $CD34^+$ клітин – 93,3 %).

В дослідження залучено двох дітей з ГІЕ II-ї стадії (за *Sarnat*) та судомами. Аутологічна пуповинна кров була введена відповідно до схеми: 6 та 156 мільйонів клітин/кг маси для кожної дитини. Не було виявлено жодних побічних реакцій, пов'язаних з трансфузією. У обох новонароджених на магнітно-резонансних томограмах були початкові зміни в головному мозку, але при наступному дослідженні у віці 4-6 місяців життя вони біли відсутні. У першому випадку дитина нормально розвивається у віці одного року. У другому випадку залишається значна затримка моторного розвитку дитини з деяким когнітивним дефіцитом.

Для оцінки клінічної ефективності такого лікування необхідні подальші мультицентрові рандомізовані дослідження. Очікувані проблеми таких випробувань включають етичні питання залучення плацебо-контрольованих груп, а також можливі труднощі у зборі достатньої кількості пуповинної крові, особливо, якщо потрібна попередня інформована згода батьків. Також для отримання фракції клітин належної якості та своєчасного їх введення акредитовані публічні банки пуповинної крові мають бути в безпосередній близькості від пологових будинків.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Gunn A. et al.* Dramatic neuronal rescue with prolonged selective head cooling after ischemia in fetal lambs // J. Clin. Invest. – 1997. – **99**, № 2. – P. 248.
2. *Edwards A. et al.* Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data // BMJ: British Medical Journal. – 2010. – **340**. – P. 363
3. *Perlman J. et al.* Neonatal resuscitation: 2010 international consensus on cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care science with treatment recommendations // Pediatrics. – 2010. – **126**, № 5. – P. 1319-1344.
4. *Jacobs S. et al.* Whole-body hypothermia for term and near-term newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy: a randomized controlled trial // Arch. Pediat. Adol. Med. – 2011. – **165**, № 8. – P. 692.

5. *Das G., Altman J.* Transplanted precursors of nerve cells: their fate in the cerebellums of young rats // Science. – 1971. – **173**, № 3997. – P. 637-638.
6. *Freed C. et al.* Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease // New Engl. J. Med. – 2001. – **344**, № 10. – P. 710-719.
7. *Olanow C. et al.* A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease // Ann. Neurol. – 2003. – **54**, № 3. – P. 403-414.
8. *Trounson A. et al.* Clinical trials for stem cell therapies // BMC Med. – 2011. – 9, № 1. – P. 52.
9. *Chen J. et al.* Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats // Stroke. – 2001. – **32,** № 11. – P. 2682-2688.
10. *Meier C. et al.* Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells // Pediat. Res. – 2006. – **59**, № 2. – P. 244-249.
11. *Pimentel-Coelho P. et al.* Human cord blood transplantation in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage: functional outcome related to neuroprotection in the striatum // Stem Cells Dev. – 2010. – **19,** № 3. – P. 351-358.
12. *Snyder E. et al.* Multipotent neural precursors can differentiate toward replacement of neurons undergoing targeted apoptotic degeneration in adult mouse neocortex // Proc. Nat. Acad. Sci. – 1997. – 94, № 21. – P. 11663-11668.
13. *Ourednik J. et al.* Neural stem cells display an inherent mechanism for rescuing dysfunctional neurons // Nat. biotechnol. – 2002. – **20**, № 11. – P. 1103-1110.
14. *Ben-Shaanan T., Ben-Hur T., Yanai J.* Transplantation of neural progenitors enhances production of endogenous cells in the impaired brain // Mol. Psychiatr. – 2007. – **13**, № 2. – P. 222-231.
15. *Dasari V. et al.* Neuroprotection by cord blood stem cells against glutamate-induced apoptosis is mediated by Akt pathway // Neurobiology of disease. – 2008. – **32**, № 3. – P. 486-498.
16. *Rowe D. et al.* Cord blood administration induces oligodendrocyte survival through alterations in gene expression // Brain res. – 2010. – **1366**. – P. 172-188.
17. *Chua S. et al.* The effect of umbilical cord blood cells on outcomes after experimental traumatic spinal cord injury // Spine. – 2010. – **35**, № 16. – P. 1520-1526.
18. *Neuhoff S. et al.* Proliferation, differentiation, and cytokine secretion of human umbilical cord blood-derived mononuclear cells in vitro // Exp. Hematol. – 2007. – **35**, № 7. – P. 1119-1131.
19. *Liao Y. et al.* Rescuing the neonatal brain from hypoxic injury with autologous cord blood // Bone Marrow Transplantation. – 2013. – **48**, №7. – P. 890-900.
20. National University Hospital, Singapore. Autologous cord blood cells for brain injury in term newborns. In: ClinicalTrials.gov. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000 - NLM Identifier: NCT01649648 [cited 2013 Sep 03]. – Available from: http://clinicaltrials.gov/show/NCT01649648.