

УДК 616.5-003.8-089.844:611.013.395/.018.46]-037

©В. В. Гнатів<sup>1</sup>, О. М. Бабуленко<sup>2</sup>, Х. С. Демчак<sup>2</sup>ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського”<sup>1</sup>  
Київський національний університет імені Т. Г. Шевченка<sup>2</sup>

## ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН У ЛІКУВАННІ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН У ЛІКУВАННІ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ – В оглядовій статті висвітлено особливості клінічних проявів нейродегенеративних захворювань та невирішені проблеми їх лікування. Охарактеризовано мезенхімальні стовбурові клітини та перспективи їх застосування при терапії нейродегенеративних захворювань.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТОЛОВОУХ КЛЕТОК В ЛЕЧЕНИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ – В обзорной статье освещены особенности клинических проявлений нейродегенеративных заболеваний и нерешенные проблемы их лечения. Охарактеризованы мезенхимальные стволовые клетки и перспективы их применения при терапии нейродегенеративных заболеваний.

PROSPECTIVE USING OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN THE TREATMENT OF NEURODEGENERATIVE DISEASES – The review article adduces the peculiarities of clinical manifestations of neurodegenerative diseases and unsolved problems of their treatment. We characterized the mesenchymal stem cells and prospects of their use in the treatment of neurodegenerative diseases.

**Ключові слова:** нейродегенеративні захворювання, мезенхімальні стовбурові клітини.

**Ключевые слова:** нейродегенеративные заболевания, мезенхимальные стволовые клетки.

**Key words:** neurodegenerative diseases, mesenchymal stem cells.

**ВСТУП** Нейродегенеративні захворювання – загальне визначення, що використовується для широкого діапазону гострих і хронічних захворювань, етіологія яких невідома [1]. До найпоширеніших нейродегенеративних захворювань належать хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, деменція з тільцями Леві, аміотрофічний латеральний склероз, хвороба Хантінгтона, пріонні захворювання. Кожного року понад 10 млн людей страждає від нейродегенеративних захворювань. За наступне десятиліття очікується зростання цих хвороб на 20 %, зумовлене старінням населення.

Нейродегенеративні захворювання займають четверте місце серед основних причин смерті в сучасному світі, поступаючись хворобам серця, онкологічним захворюванням та інсультам. Початок хвороби може відбутися в будь-якому віці, однак ці захворювання більш притаманні людям похилого віку [2].

Ефективність лікування цих захворювань все ще дуже обмежена через різні фактори, зокрема наявність гематоенцефалічного бар'єра. Тому основною проблемою при лікуванні всіх нейродегенеративних захворювань є доставка лікарських засобів до клітин головного мозку.

У даний час актуальним напрямком наукових досліджень в біології і медицині є дослідження й вивчення мезенхімальних стовбурових клітин (МСК). МСК ідеально задовольняють потреби клітинної терапії через їх простоту виділення, маніпуляції і безпеку. Вони

можуть бути розмножені у великих кількостях. Ці клітини не є імуногенними, тому їх можна вводити в будь-яку біологічну тканину, зокрема ЦНС.

Метою роботи став аналіз наукової літератури щодо використання мезенхімальних стовбурових клітин для лікування нейродегенеративних захворювань.

Найуніверсальнішим типом стовбурових клітин для застосування у регенеративній медицині є ембріональні стовбурові клітини (ЕСК) [3]. Їм притаманні такі ключові властивості: необмежене самовідновлення і мультилінійний потенціал. Однак при використанні ЕСК у медицині існують певні проблеми, зокрема не вирішені питання диференціації цих клітин та попередження їх онкогенності. Ці проблеми виявилися в експериментальних роботах, що змусило дослідників використовувати у подальшому тільки дорослі стовбурові клітини [4].

Найбільш придатним джерелом отримання дорослих стовбурових клітин є кістковий мозок. Він містить гетерогенну популяцію клітин, що включає гемопоетичні стовбурові клітини, макрофаги, еритроцити, фібробласти, адипоцити й ендотеліальні клітини. Крім того, кістковий мозок також містить субпопуляцію негемопоетичних стовбурових клітин, що володіють мультилінійним потенціалом. Ці стовбурові клітини зазвичай називають стромальними стовбуровими клітинами кісткового мозку, або мезенхімальними стовбуровими клітинами – термін, який ввів Каплан у 1991 році.

МСК походять з мезодермального шару ембріона і здатні диференціюватися у клітини різних тканин [5]. Морфологічно МСК – це фібробластоподібні клітини, що знаходяться в фазі G<sub>0</sub> клітинного циклу і становлять собою регенеративний резерв кісткової тканини, що мобілізується в умовах фізіологічної діяльності та при посттравматичному відновленні [6].

Клітини крові походять від іншої популяції клітин, названих гемопоетичними стовбуровими клітинами. Це дозволяє МСК характеризувати як негемопоетичні мультипотентні стовбурові клітини, що здатні до диференціації в мезенхімальні клітини [7].

МСК становлять 0,01–0,001 % від загальної кількості клітин кісткового мозку. Незважаючи на незначну кількість, у дослідників вони викликають велику зацікавленість, оскільки їх можна легко ізолювати і розмножити в культурі в значній кількості через 40 популяційних подвоєнь (приблизно через 8–10 тижнів) [8].

МСК були вивчені в різних джерелах. Встановлено, що кожен тип відрізняється своїм проліферативним і мультилінійним потенціалом. Однак відсутність ідентифікуючого маркера на поверхні МСК перешкоджає їх широкому дослідженню [9].

При використанні МСК у лікуванні нейродегенеративних захворювань клітини поставляють в ЦНС спо-

собом інтрацеребральних ін'єкцій. Виявлено, що така трансплантація сприяє нейронному росту, зменшенню апоптозу, зниженню рівня вільних радикалів, утворенню синаптичних зв'язків між пошкодженими нейронами і чинить протизапальну дію. Таким чином, МСК сприяють функціональному відновленню мозку, виробляючи трофічні фактори, які викликають виживання і регенерацію нейронів. Генетично спроектовані МСК можуть слугувати транспортним засобом, щоб поставити до мозку нейротрофічний фактор BDNF або отриманий з глії нейротрофічний фактор GDNF, для відновлення пошкоджених нейронів.

Мезенхімальні стовбурові клітини людини секретують безліч цитокінів і факторів росту, в яких є і паракринна і аутокринна дії для пошкоджених тканин, включаючи мозок. Механізм дії МСК, отриманих з кісткового мозку або жирової тканини, заснований на природних функціях цих стовбурових клітин: введені клітини спрямовуються в зону пошкодження – до уражених гіпоксією, апоптозних або запальних ділянок мозку, де виділяють трофічні фактори, які прискорюють ендогенне відновлення. Біологічно активні речовини пригнічують місцеве запалення, збільшують ангіогенез, зменшують пул вільних радикалів, інгібують фіброз та апоптоз і стимулюють залучення, проліферацію і диференціювання резидентних стовбурових клітин певної тканини. Ці паракринні ефекти відмінні від класичної моделі прямого диференціювання стовбурових клітин у тканині, яка буде відновлена.

Для постачання в мозок отриманих церебральних нейротрофічних факторів або гліальних нейротрофічних чинників, що використовуються для підтримки пошкоджених нейронів, застосовують як засіб доставки генетично спроектовані МСК.

Як було продемонстровано у ряді досліджень, трансплантація стовбурових клітин кісткового мозку людини в мозок імунодефіцитних мишей збільшувала кількість ендогенних нервових стовбурових клітин [10]. Після ксенотрансплантації МСК людини в мозок щура спостерігали більш високі рівні мРНК для антизапальних молекул IL-6 і TGF- $\beta$ , ніж для прозапальних цитокінів IL-8 і IL-12. МСК здатні сприяти модифікації пошкодженого мікрооточення тканини, щоб збільшити ендогенну нервову регенерацію та захист.

МСК, пересажені в місця травми нерва, сприяли його функціональному відновленню, виробляючи трофічні фактори, які викликають виживання і регенерацію нейронів. Мультипотентні клітини – попередники МСК запобігають відмиранню аксонів і значно збільшують число нейронів [11].

Потенційний ризик введення МСК у спинний або головний мозок полягає в тому, що у них є потужна здатність до ангіогенезу і тропізму до гіпоксичних ділянок навколо пухлини. Можливі ризики включають розвиток цитогенетичних відхилень у культивованих клітинах або їх диференціювання в інші лінії клітин.

**Хвороба Хантінгтона** в даний час є невиліковним спадковим генетичним захворюванням. У пацієнтів з цим відхиленням спостерігають зниження рівня емоцій, зміну особистості, когнітивні й психічні розлади. Хворобу Хантінгтона викликає мінливе збільшення білка поліглутаміну, що закодований в гені Хантінгтон (НТТ) [12]. У даний час ідуть пошуки ефективної терапії цього

захворювання. Зокрема, є надія на призупинення прогресії за рахунок зменшення або усунення мутанта білка НТТ в патологічних клітинах. На рівень НТТ впливають мІРНК і призводять до ремісії симптомів хвороби, що було продемонстровано на моделях тварин [13]. Однак лікування хвороби Хантінгтона є проблемним. Не достатньо просто замінити чи врятувати пошкоджені вмираючі нейрони для того, щоб запобігти нервовим порушенням і зупинити розвиток рухових розладів, зменшення розумової і фізичної активності. Крім цього, повинні також бути зменшені рівні токсичного мутантного білка.

Імплантація МСК у смугасте тіло може потенційно затримати прогресуючу втрату нейронів при хворобі Хантінгтона. Це важливий чинник, який можна використовувати для збільшення відновлення нейронів смугастого тіла у таких пацієнтів. МСК, що імплантовані в сусідні сайти, повинні володіти здатністю до міграції в найпошкодженіші ділянки ЦНС при хворобі Хантінгтона [14]. Також проблема полягає у тому, щоб спонукати нові нейрони створювати функціональні синаптичні зв'язки. Котрансплантацію фетальних ембріональних стовбурових клітин, отриманих з пересаженої нервової тканини з МСК, використовують для посилення нейрогенезу.

Перешкодою в лікуванні хвороби Хантінгтона є те, що мікрооточення мозку буде безперервно пошкоджуватися внаслідок наявності мутанта НТТ білка, навіть якщо будуть імплантовані нові, здорові нейрони.

Трансплантація мезенхімальних стовбурових клітин може допомогти стабілізувати оточення смугастого тіла, тому що ці клітини здатні виробляти антизапальні цитокіни і нейротрофічні фактори, включаючи BDNF [15].

**Хвороба Паркінсона** – хронічне прогресуюче неврологічне захворювання, зазвичай притаманне людям похилого віку. Вважається, що приблизно один з десяти хворих є молодшим п'ятдесяти років. Зараз майже 1,2 млн людей страждає від хвороби Паркінсона в Європі й понад 1 млн у США.

Виникнення паркінсонізму пов'язане з втратою дофамінергічних нервових волокон в базальних гангліях головного мозку [16]. Нестача дофаміну на клітинному рівні сприяє формуванню тілець Леві в смугастому тілі. Тільця Леві – це цитоплазматичні включення, що складаються з фібрил, убіквітину й альфасинуклеїну. Наявність цих включень є діагностичною ознакою хвороби Паркінсона.

Метою клітинної терапії у лікуванні хвороби Паркінсона є заміна втрачених нейронів чорної субстанції здоровими дофамінергічними нейронами, або захист від подальших втрат нейронів. Потенційні джерела для заміни клітини включають фетальну вентральну тканину середнього мозку і різні типи стовбурових клітин, які можуть диференціюватися в дофамінергічні нейрони [17].

МСК секретують нейротрофічні фактори, такі як NGF і BDNF, які можуть регулювати експресію генів гідроксилази тирозину в клітині середнього мозку. Виявилось, що групи таких клітин, які були в кокультури з МСК, показали більш високу експресію і гідроксилази тирозину, і дофаміну, ніж ті, які не були в кокультури. Ці білки не були експресовані на МСК, що вказувало

на те, що у кокультури мала місце експресія генів нейрональних клітин.

Нейротрофічний фактор нейтурін, отриманий з глії, використовують для відновлення функції пошкоджених дофамінергічних нейронів. Головною проблемою для використання трансплантації МСК пацієнтам є їх транспортування до пошкоджених тканин. Інтрацеребральні ін'єкції виявилися неефективними, ймовірно, внаслідок нерівномірного розподілу клітин. Одним із варіантів доставки МСК до пошкодженої ділянки мозку може бути розробка ефективної доставки нейтуріну, оскільки клітини, використовуючи природний хемотаксис, будуть мігрувати до найпошкодженіших частин мозку і забезпечувати надходження трансгенного продукту протягом декількох місяців. Тому використання МСК є перспективними у лікуванні цих захворювань.

**Хвороба Альцгеймера** – найпоширеніша форма деменції, якою хворіють понад 18 млн осіб у світі. Ця хвороба характеризується прогресивною втратою пам'яті, погіршенням пізнавальних здібностей і змінами індивідуальності. Морфологічно основою патології є виродження різних типів нейронів і наявність патологічних нервових або амілоїдних бляшок. Амілоїдний β-пептид відіграє ключову роль у патогенезі хвороби Альцгеймера. В даний час жодне лікування не може запобігти некрозу нейронів [1].

**Хвороба Кребба** характеризується ураженням мієлінової оболонки, що викликається мутаціями в лізосомальному ферменті галактоцереброзидазі. Єдиною доступною терапією цього розладу нервової системи є клітинна трансплантація. Накопичення субстрату галактоцереброзидази, а саме галактосфінгозину (психозину) в бімолекулярному шарі мієліну викликає апоптоз олігодендроцитів і шванівських клітин та розпад мієлінових волокон периферичної і центральної нервових систем [18].

На сьогодні найефективнішим лікуванням пацієнтів з хворобою Кребба виявилась трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин, що доставляють відсутній фермент до нервової системи. Однак така терапія виявляє тільки тимчасовий позитивний вплив на периферичні нерви.

Було розглянуто терапевтичні переваги МСК щодо лікування цієї хвороби. Продемонстровано, що МСК має багаторівневий механізм дії на нейрони, шванівські клітини і макрофаги, що сприяли відновленню зруйнованого нерва після інтравенозної трансплантації, засвідчуючи те, що МСК можна використовувати в лікуванні патології нервової системи [1].

**ВИСНОВКИ і перспективи подальших досліджень** Мезенхімальні стовбурові клітини – резиденти стромы кісткового мозку тварин і людей, які здатні до проліферації *in vitro* і диференціації. Останні експериментальні дані свідчать про їх здатність диференціюватися в клітини немезенхімального походження, зокрема нервові клітини.

Передбачається, що функціональна компенсація при пересадженні мезенхімальних стовбурових клітин буде досягатись шляхом структурного відновлення тканини організму в результаті трансдиференціювання та інтеграції пересаджених мезенхімальних стовбурових клітин і експресії ними факторів росту та інших

продуктів експресії генів. Цей метод лікування є перспективним у клінічній неврологічній практиці.

Проте залишається безліч невирішених питань, пов'язаних із застосуванням мезенхімальних стовбурових клітин. Серед них: впровадження МСК у клініці та дослідження їх ефективності, способи отримання клітин у великих кількостях та дослідження їх імуно-модуляторних властивостей.

Важливою невирішеною проблемою є також ризик імунного відторгнення у випадку трансплантації алогенних стовбурових клітин, а також можливість малігнізації трансплантованих клітинних ліній. Крім того, потрібно відпрацювати умови культивування мезенхімальних стовбурових клітин зі збереженням їх недиференційованого стану, розкрити механізми і розробити методи направленої диференціації *in vitro*, а також розробити оптимальні способи транспортування МСК до пошкодженої тканини.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Adult bone marrow: which stem cells for cellular therapy protocols in neurodegenerative disorders / S. Wislet-Gendebien, E. Laudet, V. Neirinckx, B. Rogister // J. Biomed. Biotechnol. – 2011. – Vol. 2, № 3. – P. 578–590.
2. Spuch C. Liposomes for targeted delivery of active agents against neurodegenerative diseases (Alzheimer's disease and Parkinson's disease) / C. Spuch, C. Navarro // J. Drug Deliv. – 2011. – Vol. 12, № 1. – P. 13–25.
3. Репин В. С. Эмбриональные стволовые клетки / В. С. Репин, А. А. Ржанинова, Д. А. Шамянков // Фундаментальная биология и медицина. – 2002. – Т. 3. – С. 198–225.
4. Культивування мезенхімальних стовбурових клітин пуповинного канатика людини при знижених концентраціях кисню / Н. С. Шувалова, О. Г. Дерябіна, С. М. Жукова, М. П. Сорока // Журн. АМН України. – 2010. – Т. 16. – С. 191–202.
5. Chamberlain G. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing / G. Chamberlain, J. Fox, B. Ashton, J. Middleton // Stem Cells. – 2007. – Vol. 25, № 11. – P. 2739–2749.
6. Бумейстер В. І. Сучасний погляд на репаративний остеогенез / В. І. Бумейстер, М. В. Погорелов // Світ медицини та біології. – 2008. – № 4. – С. 104–110.
7. Ankrum J., Karp J.M. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back // Trends Mol. Med. – 2010. – Vol. 16, № 5. – P. 203–209.
8. Розробка способу експансії та оцінки стовбурових клітин-попередників гемопоєзу у довготривалих культурах *in vivo* і *in vitro* / Н. М. Білько, Р. В. Бойко, Д. І. Білько [та ін.] // Звіти з наукових досліджень. – 2011. – Т. 60. – С. 25–34.
9. Salem H. K. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status / H. K. Salem, Thiernemann C. // Stem Cells. – 2010. – Vol. 28, № 3. – P. 585–596.
10. Munoz J. R. Human stem-progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice / J. R. Munoz, B. R. Stoutenger, A. P. Robinson // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol. 102, №50. – P. 18171–18176.
11. Meyerrose T. E. Vogler Lentiviral-transduced human mesenchymal stem cells persistently express therapeutic levels of enzyme in a xenotransplantation model of human disease / T. E. Meyerrose, M. Roberts, K. K. Ohlemiller // Stem Cells. – 2008. – Vol. 26, № 7. – P. 1713–1722.
12. Ciliogenesis is regulated by a huntingtin-HAP1-PCM1 pathway and is altered in Huntington disease / Keryer, J. R. Pineda, G. Liot, J. Kim // J. Clin. Invest. – 2011. – Vol. 121, № 11. – P. 4372–4382.
13. DiFiglia M. Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and

- behavioral deficits / M. DiFiglia, M. Sena-Esteves, K. Chase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – Vol. 104, № 43. – P. 17204–17209.
14. Joyce N. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease / N. Joyce, G. Annett, L. Wirthlin // Regen. Med. – 2010. – Vol. 5, № 6. – P. 933–946.
15. Mesenchymal stem cells and cardiovascular disease: a bench to bedside roadmap / M. Mazo, M. Arana, B. Pelacho, F. Prosper // Stem Cells. – 2011. – Vol. 12, № 3. – P. 173–184.
16. Shaikh S. I. Parkinson's disease and anaesthesia / S. I. Shaikh, H. Verma // Indian J. Anaesth. – 2011. – Vol. 55, №3. – P. 228–234.
17. Gandhi S. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease / S. Gandhi, N. W. Wood // Human molecular genetic. – 2005. – Vol. 14, № 18. – P. 2749–2755.
18. Miranda C. O. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells diminishes neuropathology in a mouse model of Krabbe's disease / C. O. Miranda, C. A. Teixeira, M. A. Liz // Stem Cells. – 2011. – Vol. 29, № 11. – P. 1738–1751.

Отримано 27.11.12