

Исследование эффекта клеточной терапии у детей с последствиями тяжелой черепно-мозговой травмы методом ¹H магнитно резонансной спектроскопии

Семенова Н. А., Сидорин С. В., Ахадов Т. А.*, Семенова Ж. Б., Петряйкин А. В., Фуфаева Е. В., Мельников И. А.

Научно–Исследовательский Институт Неотложной Детской Хирургии и Травматологии, Москва, Россия

Effects of umbilical cord blood cell therapy on metabolic levels in children's cerebral structures after chronic traumatic brain injury. ¹H magnetic resonance spectroscopy study

Semenova N. A., Sidorin S. V., Akhadov T. A.*, Semenova J. B., Petraikin A. V., Fufaeva E. V., Melnikov I. A.

Clinical and Research Institute of Emergency Children's Surgery and Trauma, Moscow, Russia

Реферат

Методом одновоксельной ¹H магнитно-резонансной спектроскопии исследовано влияние внутривенного введения клеток пуповинной крови человека на уровни N-ацетиласпартата, креатина и фосфокреатина, холинсодержащих соединений, глутамина и глутамата, миоинозитола в морфологически сохранных областях коры, белого вещества, гиппокампе мозга детей с последствиями тяжелой черепно-мозговой травмой. Показано, что клеточная терапия увеличивает уровень маркера функционально полноценных нейронов N-ацетиласпартата в белом веществе и коре теменной доли и снижает неврологический дефицит у пациентов.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, стволовые клетки, магнитно-резонансная спектроскопия.

Abstract

Changes in N-acetyl aspartate, creatine+phosphocreatine, cholin containing compounds, glutamine+glutamate, myoinositol levels were studied with single voxel proton magnetic resonance spectroscopy in normal appearing cerebral cortex, white matter and hippocampus of children's brain under chronic traumatic brain injury before intravenous injection of umbilical cord blood cells and during 5 months after treatment. The cell therapy was shown to increase level of neuronal integrity marker N-acetyl aspartate in parietal cortex and in parietal white matter. Simultaneously the decrease of neurological deficit was observed.

Keywords: spectroscopy, cell therapy, brain injury, magnetic resonance imaging.

*Ахадов Толиб Абдуллаевич, Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии, Москва, Россия, Б. Полянка, д. 22, доктор мед. наук, профессор, руководитель отдела лучевых методов исследования
tel. 633-58-03 akhadov@mail.ru

Исследование эффектов клеточной терапии при черепно-мозговой травме (ЧМТ) только начато. Большинство данных получено на экспериментальных животных, и, в основном, результаты положительны. Так, в модели острой ЧМТ введение крысам эмбриональных стволовых нейрональных клеток, клеток пуповинной крови, стромальных клеток костного мозга человека улучшает когнитивные функции, снижает локомоторную активность и неврологический дефицит животных [4,5, 6].

Показано, что трансплантированные клетки накапливаются преимущественно в ткани мозга, экспрессируют маркеры нейронов, астроцитов, и нейротрофические факторы [4,5,6]. По данным литературы стволовые клетки проникают в травмированный мозг через нарушенный гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и выделяют трофические факторы — BDNF, фактор роста нервов, эпидермальный фактор роста, инсулиноподобный фактор роста [2,9]. Улучшение функций центральной нервной системы в модели инсульта у крыс после внутривенного введения клеток пуповинной крови коррелирует с ростом содержания трофических факторов в мозге, хотя вводимые клетки в мозге не найдены [1]. Эти данные свидетельствуют о роли трофических факторов в положительном действии клеточной терапии на функции ЦНС. Установлено, что ГЭБ проницаем для нейротрофических факторов [8]. Следовательно, можно ожидать эффекта от введения клеток и в условиях восстановившегося или неповрежденного ГЭБ.

Имеющиеся в литературе гипотезы о механизмах действия выделяемых стволовыми клетками нейротрофических факторов на мозг — регенерация трав-

мированных нейронов в условиях изменения их микроокружения, замещение поврежденных нейронов вновь родившимися вследствие активации нейрогенеза — касаются влияния клеточной терапии на травмированную ткань [10,12]. Вместе с тем, важнейшим компенсаторным механизмом неврологических нарушений является создание замещающих нейронных связей, или пластичность мозга. Возможно, нейротрофические факторы влияют на создание новых связей в морфологически сохранных структурах мозга, что может повысить уровень функционально активных нейронов и улучшить функции ЦНС.

Метод магнитно-резонансной спектроскопии (МРС) дает уникальную возможность прижизненно и неинвазивно определять концентрации ряда ключевых метаболитов в локальных структурах мозга. В ^1H МР - спектрах мозга детектируется сигнал N-ацетиласпартата (NAA) — соединения, обнаруженного в измеряемых количествах исключительно в нейронах. Интенсивность сигнала NAA пропорциональна уровню функционально полноценных нейронов в исследуемой области мозга [7]. Цель настоящей работы — методом МРС выявить возможные изменения содержания функционально активных нейронов в морфологически сохранных структурах мозга детей с последствиями тяжелой ЧМТ под влиянием клеточной терапии.

Объекты и методы исследования

Исследовано 6 пациентов НИИНДХиТ (3 мальчика и 3 девочки) в возрасте 8-17 лет (средний возраст 12,7 лет) с грубым неврологическим дефицитом (3 группа по шкале исходов Глазго) в результате тяжелой ЧМТ, полученной за 6-23 меся-

ца до исследования. Пациентам дважды с интервалом 14 суток капельным путем внутривенно вводили суспензию ядро-содержащих клеток пуповинной/плацентарной крови, совместимой по группе крови и резус-фактору. Количество клеток, вводимых однократно, составляло 5-50 млн. на 1 кг массы тела. Суспензию клеток готовили из криоконсервированного концентрата мононуклеарной

фракции стволовых клеток пуповинной/плацентарной крови человека. Получение концентрата осуществлялось в соответствии с зарегистрированной в установленном порядке медицинской технологией.

Основные характеристики концентрата стволовых клеток пуповинной/плацентарной крови приведены в таблице 1.

Основные характеристики концентрата стволовых клеток пуповинной/плацентарной крови

Таблица 1.

№ п.п.	Показатель	Значение, среднее ± SD
1.	Число образцов, включенных в статистический анализ	500
2.	Объем материала без учета антикоагулянта, мл	69,8 ± 28,0
3.	Общие лейкоциты до выделения, x10 ⁹	1,05 ± 0,61
4.	Выход ядерных клеток после выделения, % от исходного	50,5 ± 12,2
5.	Уровень деплеции от эритроцитов, % по уровню гемоглобина	97,82 ± 0,19
6.	Жизнеспособность клеток после выделения, %	99,9
7.	Соотношение клеточных популяций в концентрате стволовых клеток (по данным проточной цитометрии), % лимфоциты моноциты гранулоциты	53,1 ± 10,9 13,8 ± 3,8 25,1 ± 11,0
8.	Гемопоэтические предшественники (CD34 ⁺ /CD45 ⁺ , протокол ISAHAGE), %	0,46 ± 0,26
9.	Жизнеспособность клеток после пробного замораживания/оттаивания, %	90,8 ± 10,1

Концентрат хранился при минус 196°С. Перед использованием концентрат в асептических условиях размораживали, отмывали от криопротектора стерильным физиологическим или плазмозамещающим раствором и оценивали жизнеспособность клеток в тесте с трипановым синим. Время от момента размораживания образца до введения субъекту исследования не превышало 4 часов.

Уровни протонсодержащих метаболитов в структурах мозга определяли

за 45 и 15 суток перед трансплантацией клеток, а также через 15, 45 и 150 суток после трансплантации методом одновоксельной МРС. Использовали медицинский томограф Phillips Achieva 3.0 T с напряженностью магнитного поля 3T и встроенным программным пакетом ViewForum. Сигнал спада свободной индукции детектировали на стандартной головной катушке томографа. Пациентам проводилось МРТ исследование с получением изображений: аксиального T2-взвешенного и T2-FLAIR,

сагитального T2-FLAIR и коронарного T1-FLAIR, а также нативного ангиографического изображения в 3-х проекциях, чтобы исключить попадание сосудов в объем интереса при МРС исследовании. Область интереса объемом 3 см³ выделяли импульсной последовательностью PRESS с временем эхо TE=35 мс и временем задержки между повторяющимися последовательностями импульсов TR=2000 мс. Подавление сигнала воды осуществлялось с помощью импульса преднасыщения. Спектроскопический воксель ориентировали последовательно на неповрежденные по данным МРТ области: белое вещество теменной доли, белое вещество лобной доли, кора теменной доли, гиппокамп. Для получения оптимального соотношения сигнал/шум при минимальном времени исследования использовалось количество накоплений сигнала равное 32.

Сигнал спада свободной индукции обрабатывали на встроенном программном пакете SpectroView. Сигналы метаболитов аппроксимировали гауссовыми линиями, рассчитывали их амплитуду и нормировали на амплитуду резонанса неподавленной воды. Содержание воды в неизменной по данным МРТ ткани постоянно и принято как внутренний концентрационный стандарт [3]. Статистическая обработка спектральных данных проводилась в программном пакете Statistica 6.0. Достоверность различий в средних величинах определялась с помощью t-критерия Стьюдента с уровнем статистической значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены 1НМР типичные спектры сохранных по данным диагностической МРТ областей: а – темен-

ная доля (кора), б – лобная доля (кора), в – белое вещество височной доли, г – гиппокамп, полученные за 45 сут до трансплантации клеток. На рис. 2 представлены аксиальные и сагитальные томограммы в T1 и T2 взвешенных изображениях у пациента с ЧМТ, полученной в результате падения с высоты. На рис. 3 представлен 1НМР спектр, полученный из области уха справа.

Помимо NAA в спектрах детектируется сигнал липидов, не обнаруживающийся в спектрах нормы, суммарный сигнал креатина и фосфокреатина (Cr), участвующих в энергетическом обмене, сигнал промежуточных продуктов липидного обмена, холинсодержащих соединений (Cho), резонанс маркера астроцитов миоинозитола (mI), суперпозиция резонансов участников глутаматэргической системы глутамина и глутамата (Glx) [11].

Результаты статистического анализа спектральных данных, полученных до трансплантации и в динамике после трансплантации клеток, представлены на рис. 2. Из них следуют два важных вывода: 1 – до введения клеток метаболический статус всех изученных областей мозга стабилен, содержание каждого метаболита остается постоянным до начала клеточной терапии; 2 – стволовые клетки влияют на уровень NAA в теменной доле, уровень NAA не меняется в лобной доле и гиппокампе. Временная зависимость уровня NAA в коре и белом веществе теменной доли в периоде исследования (рис. 4) показывает, что этот параметр в коре достоверно повышается через 45 суток и остается выше исходного уровня через 150 суток после введения клеток. На этот же срок в белом веществе также отмечается достоверное увеличение NAA. Рост NAA составляет

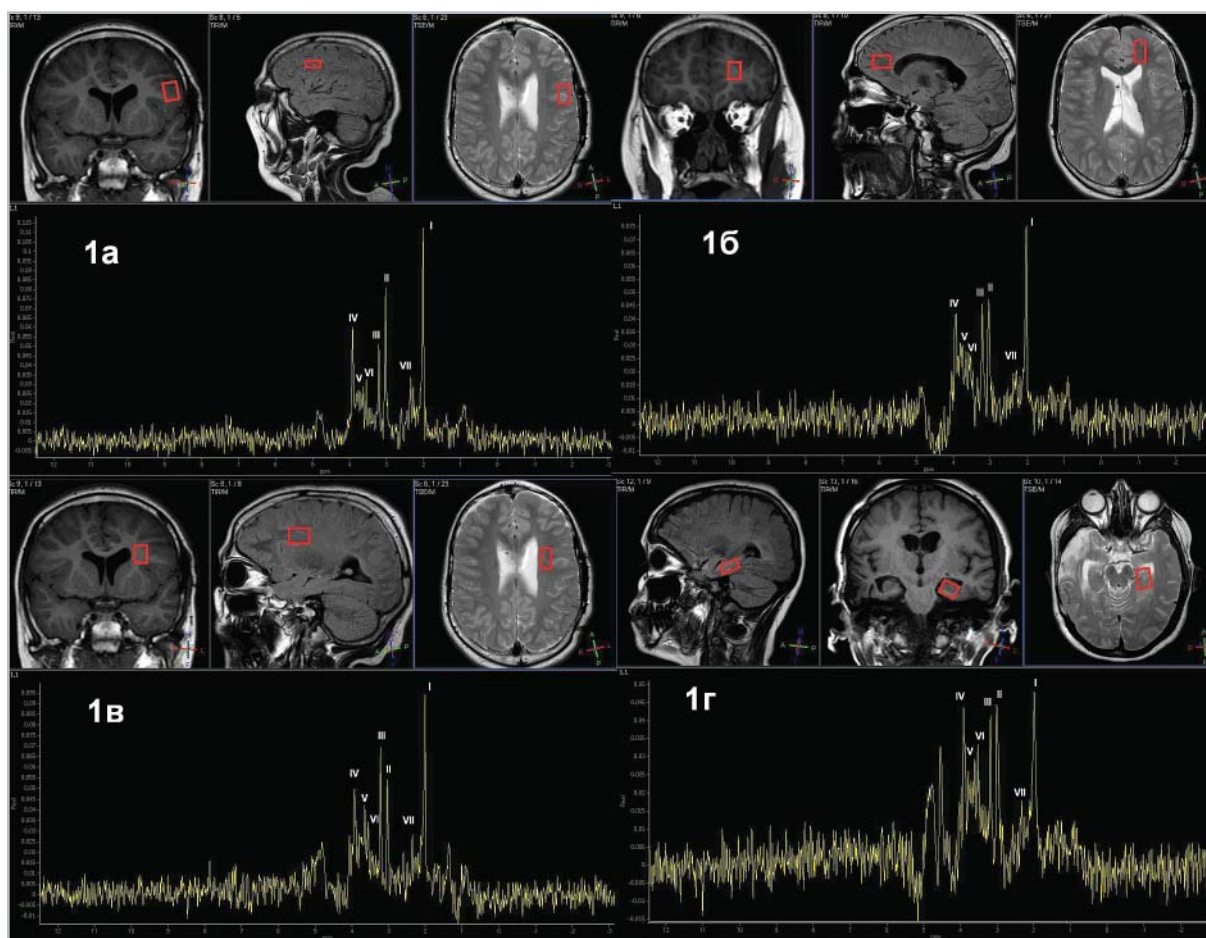


Рис. 1. ¹H МР спектры морфологически нормальных по данным МРТ областей мозга детей с последствиями черепно-мозговой травмы: а – теменная доля (кора), б – лобная доля (кора), в – белое вещество теменной доли, г – гиппокамп.

Отмечены основные метаболиты: I – NAA (N-ацетиласпартат), V, VII - Glx1 и Glx2 сигналы глутамата/глутамина, II, IV - Cr1 и Cr2 – сигналы креатина + фосфокреатина, III - Cho – суммарный сигнал холинсодержащих соединений, VI - mI – сигнал миоинозитола.

22 % и 31 % в коре и белом веществе, соответственно. Динамики в содержании других метаболитов не выявлено.

Рост NAA, обнаруженный после введения клеток пуповинной крови, свидетельствует о том, что клеточная терапия

приводит к росту уровня функционально полноценных нейронов в морфологически сохранной коре и белом веществе теменной доли. Поскольку мы исследовали хроническое состояние с непроницаемым для стволовых клеток ГЭБ, на-

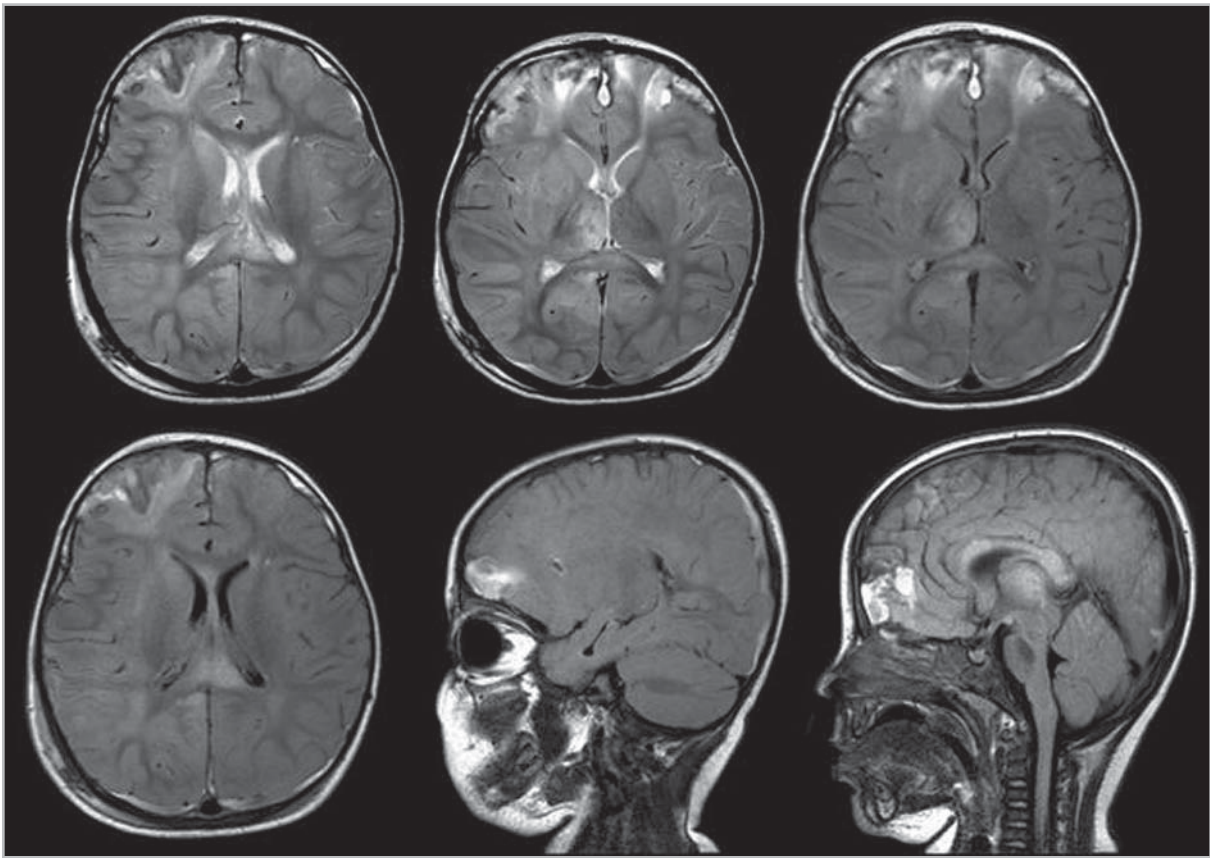


Рис. 2. T1 и T2 взвешенные изображения в аксиальной и сагиттальной проекциях пациента с ЧМТ, полученной в результате падения с высоты. Геморрагический ушиб правой лобной доли.

блюдаемый рост уровня функционально полноценных нейронов можно отнести к действию нейротрофических факторов, выделяемых клетками и проникающих через ГЭБ.

На основании полученных в нашем исследовании данных невозможно предложить механизм, по которому эти факторы увеличивают содержание функционально активных нейронов в морфологически нормальных структурах. Вероятно, наблюдаемый эффект отражает пластичность мозга, поскольку в

исследованных нами морфологически сохранных структурах влияние нейрогенеза должно быть минимальным.

Можно ожидать, что рост уровня функционально активных нейронов приводит к улучшению функций ЦНС. Действительно, после введения клеток пуповинной крови у пациентов прослеживается положительная динамика в восстановлении когнитивных нарушений, что иллюстрирует рис. 5, на котором представлены усредненные по группе пациентов оценки нейропсихо-

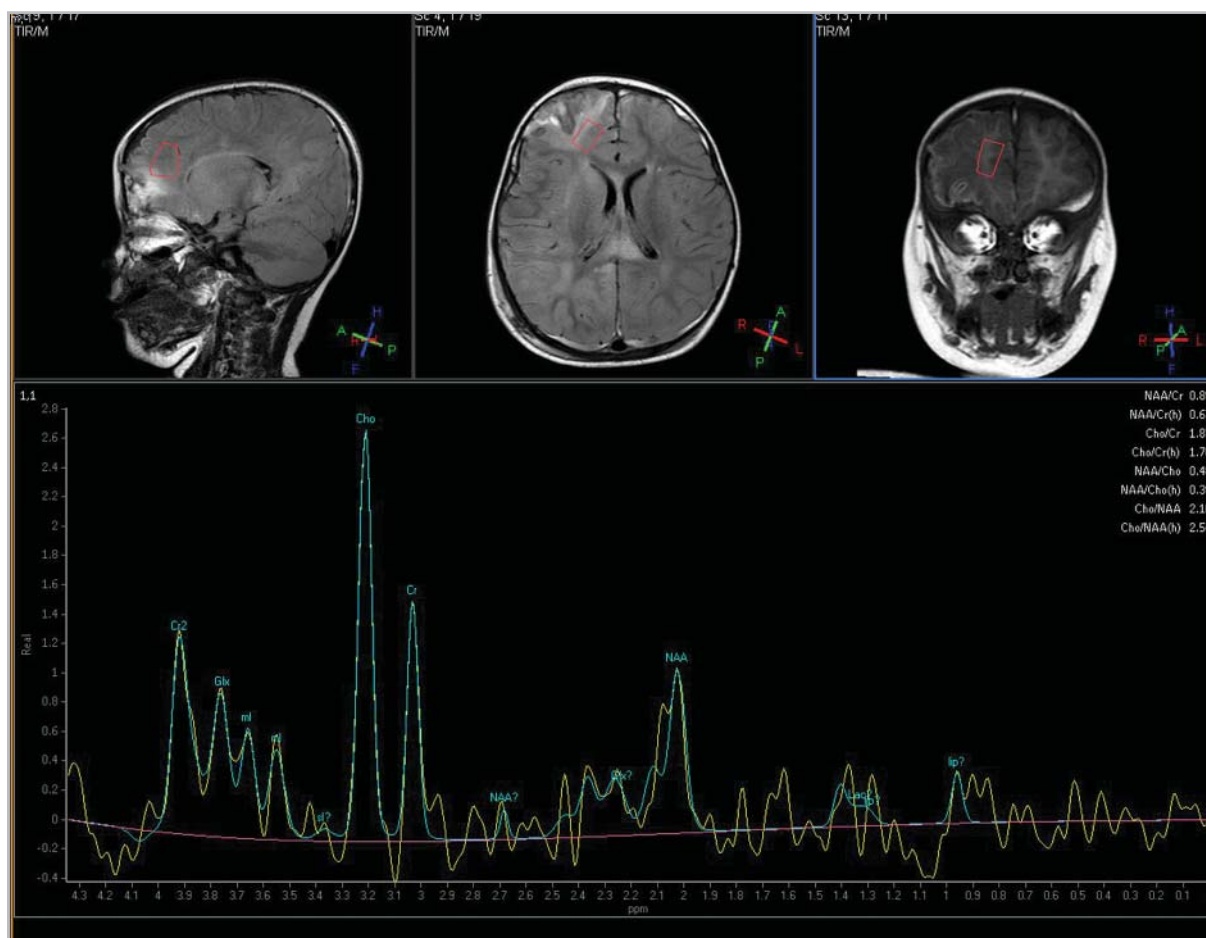


Рис. 3. ¹H МР спектр, полученный у пациента с ЧМТ в результате падения с высоты в области ухаиба. Пик NAA снижен, что свидетельствует о гибели нейронов в данной области.

логического статуса. Вместе с тем, следует отметить, что качественный скачек в улучшении функционального состояния ЦНС – переход из группы 3 в группу 2 по ШИГ (Шкала Исходов Глазко) – отмечен лишь у одного пациента.

Литература

1. Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, Sanberg PR. // Stroke. 2004. V. 35. № 10. P. 2385-2389.

2. Chen X, Katakowski M, Li Y, et al. // J. Neurosci Res . 2002. V. 69. P. 687–691.
3. Diehl P, Fluck E., Gunther H., et al. NMR. Basic principles and progress 28. In vivo Magnetic resonance spectroscopy III: In vivo Magnetic resonance spectroscopy III: potential and limitations. Berlin – Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1992, p. 190.

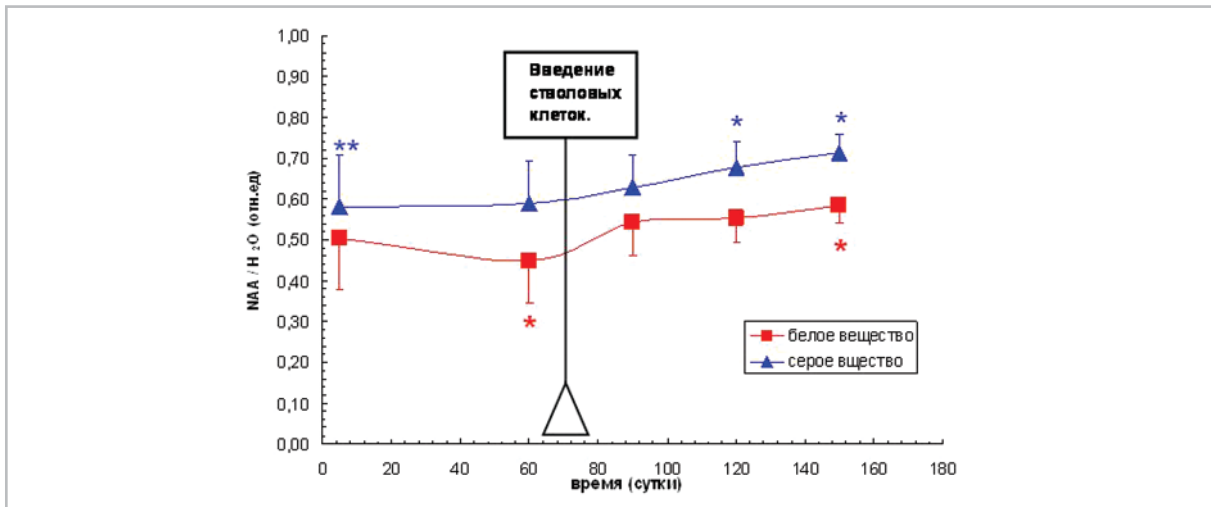


Рис. 4. Средние величины \pm стандартное отклонение уровня NAA в коре (1) и белом веществе (2) теменной доли мозга детей с тяжелой хронической черепно-мозговой травмой в начале исследования (время 0) и в динамике до и после введения клеток пуповинной/плацентарной крови.
* $p = 0,01$; ** $p \leq 0,05$ по сравнению с уровнем доведения клеток.

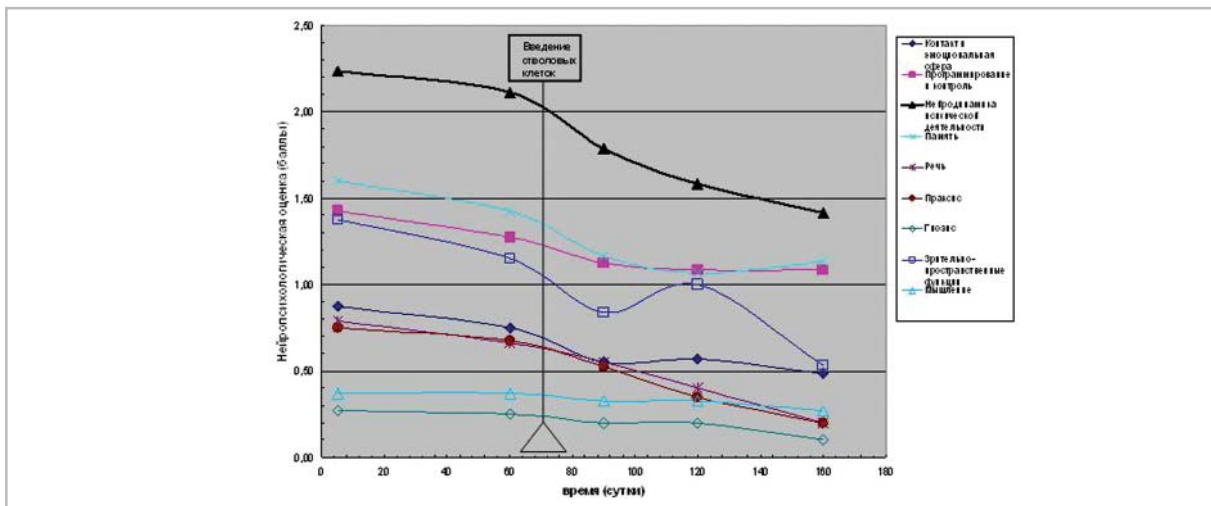


Рис. 5. Средние значения показателей выраженности нарушений (в баллах; 3 балла соответствуют наиболее выраженным нарушениям) при нейропсихологическом исследовании в группе детей с тяжелой черепно-мозговой травмой в начале исследования (время 0) и в динамике до и после введения клеток пуповинной/плацентарной крови.

4. Gao J, Prough D.S., McAdoo D.J., Grady J.J., et al // Exp. Neurol. 2006. V. 201. № 2. P. 281-292.
5. Lu D, Sanberg PR, Mahmood A, et al. // Cell Transplant. // 2002. V. 11. P. 275–281.
6. Mahmood A, Lu D, Wang L, et al. // Neurosurgery. 2001. V. 49. P. 1196–1203.
7. Moffet J. N-acetylaspartate: a unique neuronal molecule in the central nervous system. New York: Springer. 2006. V. 576. 350 p.
8. Pan W, Banks W.A., Kastin A.J. // Brain Res. 1998. V. 30. № 788 (1-2). p. 87- 94.
9. Qu R, Li Y, Gao Q, et al. // Neuropathology. // 2007. V. 27. P. 355–363.
10. Richardson R. M., A. Singh, D. Sun, H. L. et al. // Neurosurg. 2010. V. 112. № 5. P. 1125-1138.
11. Ross B, Bluml S. // Anat. Rec. 2001. V. 265. № 2. P. 54-84.
12. Walker P. A., Harting M. T., Baumgartner J. E. et al. Modern Approaches to Pediatric Brain Injury Therapy. 2009. V. 67. № 2. P. 120–127.

От редколлегии

Читайте в следующем номере:

О некоторых новациях в проекте нового закона о здравоохранении.

Варшавский Ю. В., Китаев В. В., Еришов В. В.

К вопросу о постдипломной подготовке рентгенологов.

Сапранов Б. Н.