

УДК616.853+616.831.-0,06:611.018.013

Дослідження вмісту стовбурових гемопоетичних клітин в крові при деяких нейрохірургічних захворюваннях

Лісяний М.І., Бичкова С.А., Лісяний О.М., Потапова А.Г.

Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова АМН України, м. Київ

Наведені дані про вміст стовбурових кісткомозкових гемопоетичних (СД34⁺) клітин та попередників лімфоцитів (СД38⁺) в крові пацієнтів при деяких нейрохірургічних захворюваннях, зокрема, при пухлині головного мозку, епілепсії та наслідках ішемічного інсульту. При епілепсії відзначали збільшення у 8–10 разів кількості СД34⁺ клітин у порівнянні з такою у здорових осіб. У відновний період після ішемічного інсульту збільшувалась також кількість стовбурових гемопоетичних клітин в крові. При менінгіомі та медулобластомі також спостерігали збільшення в 2–3 рази кількості стовбурових клітин в крові, при гліальних пухлинах вона не змінювалась.

Автори припускають, що збільшення кількості гемопоетичних клітин в крові пов'язане з їх диференціацією в нервові стовбурові клітини та міграцією в зону патологічного процесу, що виникає у центральній нервовій системі (ЦНС).

Ключові слова: стовбурові гемопоетичні клітини, нейрохірургічні захворювання.

В останні роки дослідники приділяють багато уваги вивченню природи стовбурових клітин, на які покладають великі надії щодо лікування різних захворювань, зокрема, ЦНС та пухлинної природи.

За даними експериментальних і клінічних досліджень встановлено, що стовбурові клітини присутні і в організмі дорослих, кожен орган має свої органоспецифічні стовбурові клітини, які забезпечують репарацію та відновлення пошкоджених тканин. Існує багато даних про те, що гемопоетичні стовбурові клітини за певних умов можуть диференціюватися не лише в клітини крові, а й в клітини інших органів; гемопоетичні стовбурові клітини кісткового мозку — це універсальні стовбурові клітини, які можуть диференціюватись в нейрони, гепатоцити, ендотеліальні та м'язові клітини залежно від мікрооточення [3, 6, 11, 12, 16]. При нейрохірургічних захворюваннях вміст в крові стовбурових гемопоетичних клітин, які визначають з використанням моноклональних антитіл як СД34⁺ клітини, недостатньо вивчений [4]. За даними деяких дослідників [5], при нейрохірургічних захворюваннях, зокрема, епілепсії, в мозку накопичуються стовбурові нервові клітини, що можуть бути однією з причин виникнення судорожної готовності.

Метою роботи було вивчення вмісту СД34⁺ стовбурових гемопоетичних клітин в крові пацієнтів з деякими нейрохірургічними захворюваннями: пухлиною мозку, наслідками ішемічного інсульту та епілепсією, що, можливо, дозволить встановити залежність між характером

ураження ЦНС та рівнем в крові універсальних стовбурових клітин як показником інтенсивності процесів їх генерації та міграції в організмі.

Матеріали і методи дослідження. Обстежені 78 пацієнтів з нейрохірургічними захворюваннями. У 32 з них діагностовано гліомні пухлини головного мозку, у 14 дітей — медулобластому, у 9 — менінгіому, у 14 — ішемічний інсульт та його наслідки, у 9 — епілепсію. До контрольної групи включені 12 умовно здорових донорів. У хворих забирали для дослідження кров з периферичної вени, виділяли на градієнті щільності фікол-верографін популяцію мононуклеарів. Тестування стовбурових клітин в популяції мононуклеарів здійснювали за допомогою моноклональних антитіл: до СД34 антигену — для виявлення стовбурових гемопоетичних клітин та до СД38 антигену — незрілих лімфоїдних клітин з використанням методу непрямой імунофлуоресценції [14] за допомогою проточного цитофлуориметра. Кількість стовбурових клітин обчислювали на 5000–6000 клітин. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програм Microsoft Excel та Access, інтегрованих в систему Microsoft Office, з використанням t-критерію Ст'юдента.

Результати їх обговорення. Кількість стовбурових клітин у пацієнтів з різними нейрохірургічними захворюваннями становила від 0,2 до 30%, що свідчило про її залежність від багатьох чинників. При гліомі мозку вміст СД34⁺ клітин становив у середньому (1,63±0,18)%, незрілих СД38⁺ лімфоїдних клітин — (15,1±2,65)% (див. таблицю). На 6–8-

Вміст CD34⁺ та CD38⁺ клітин в периферичній крові хворих з пухлинами мозку, епілепсією та наслідками ішемічного інсульту

Захворювання	Кількість спостережень	Вміст клітин, % (M±m)	
		CD34 ⁺	CD38 ⁺
Пухлина мозку:			
глиома до операції	17	1,63±0,18	15,1±2,65
глиома після операції	15	2,1±0,35	11,85±1,83*
менінгіома до операції	9	5,6±2,5*	12,6±2,67*
медулобластома	14	3,3±1,1*	15,1±1,87
Епілепсія:			
часті приступи	5	11,6±3,9*	16,7±6,75
рідкі приступи	4	4,9±2,6*	16,8±8,34
Ішемічний інсульт:			
гострий період	7	0,16±0,02	15,9±2,7
відновний період	7	6,53±1,75*	20,8±3,6
Контрольна група	12	1,55±0,18	20,4±2,25

Примітка. * — різниця показників вірогідна у порівнянні з такою у контрольній групі (P<0,05)

му добу після операції кількість стовбурових клітин в крові дещо збільшувалась у порівнянні з такою до операції та в контрольній групі, проте, ці відмінності були невірогідними. Незважаючи на деяке підвищення рівня в крові стовбурових клітин, кількість попередників лімфоцитів CD38 зменшилась до (11,85±1,83)%, що вірогідно відрізнялось від цього показника в контрольній групі.

У хворих з менінгіомою, на відміну від пацієнтів з гліальною пухлиною, виявляли більшу кількість стовбурових CD34⁺ клітин — (5,6±2,5)%, вміст попередників лімфоцитів CD38⁺ був достовірно менше, ніж у контролі. У дітей з медулобластомою стовбурових CD34⁺ клітин було менше, ніж при менінгіомі, але в 2 рази більше, ніж при гліальних пухлинах у дорослих пацієнтів. Рівень CD34⁺ клітин становив (3,3±1,1)%, CD38⁺ клітин у хворих з медулобластомою — був дещо знижений, але більший, ніж за наявності інших пухлин — (15,1±1,87)%.

Таким чином, за наявності різних первинних пухлин головного мозку відбуваються неоднозначні зміни в складі CD34⁺ та CD38⁺ субпопуляцій клітин. Так, при гліомі практично не змінюється кількість стовбурових клітин в крові, при медулобластомі і особливо при менінгіомі — спостерігають значне (у 2–3 рази) збільшення кількості в крові стовбурових гемопоетичних клітин. Збільшення вмісту в крові CD34⁺ стовбурових клітин в крові повинне було б супроводжуватися підвищенням рівня попередників лімфоїдних CD38⁺ клітин, які

утворюються з стовбурових клітин, проте, цього не спостерігали, навпаки, при гліомі та менінгіомі їх кількість була вірогідно меншою, ніж у донорів, що може свідчити про гальмування диференціювання лімфоїдних попередників гемопоетичних клітин з стовбурових клітин. Для медулобластоми також характерне зменшення кількості CD38⁺ клітин, але воно дещо менш виражене, ніж при інших пухлинах.

Під час дослідження вмісту CD34⁺ і CD38⁺ клітин в крові пацієнтів з неонкологічними захворюваннями, а саме у гострому (1–4-та доба) та у віддаленому (20–30 діб) періоді після ішемічного інсульту, а також при епілепсії з частими (до 2 судомою протягом тижня) та рідкими (не частіше 2 раз на місяць) приступами встановлено, що в гострому періоді ішемічного інсульту рівень CD34⁺ клітин був знижений до (0,16±0,02)%, у відновному періоді — збільшений до (6,53±1,75)%, що може свідчити про активацію гемопоетичних процесів та міграцію стовбурових клітин в організмі. На відміну від нейроонкологічних хворих, рівень CD38⁺ лімфоцитів в крові у хворих після інсульту практично не змінювався у порівнянні з таким у донорів, хоча певне зниження (невірогідне) спостерігали у гострому періоді захворювання.

У хворих на епілепсію, як з рідкими, так і частими судомою відзначали суттєве збільшення вмісту стовбурових клітин, зокрема, у хворих з частими судомою (майже у 10 разів). В той же час вміст попередників лімфоцитів CD38⁺ практично не відрізнявся від такого у донорів.

Таким чином, у хворих з наслідками ішемічного інсульту та епілепсією спостерігали значне збільшення вмісту в крові гемопоетичних стовбурових CD34⁺ клітин, які не всі в подальшому диференціювалися у лімфоїдні попередники, про що свідчила відсутність збільшення кількості CD38⁺ клітин. Виявлені розбіжності кількості CD34⁺ та CD38⁺ клітин в крові потребують пояснення, найбільш імовірним може бути таке, що при цих захворюваннях підсилено генеруються гемопоетичні стовбурові CD34⁺ клітини, частина яких мігрує з циркулюючою кров'ю до патологічного вогнища, де, можливо, вони трансформуються у нервові стовбурові клітини та їх послідовники.

Співставляючи вміст у крові стовбурових клітин при пухлинах мозку, інсульті та епілепсії, слід відзначити, що при гліомі він практично не змінюється, на відміну від інших пухлин, за наявності яких спостерігали його збільшення. Це можна пояснити тим, що гліоми здатні виділяти імуносупресивні фактори, які пригнічують як гемопоетичні стовбурові клітини, їх диференціацію в лімфоїдні попередники, так і певні імунні функції [1, 2].

При менінгіомі та медулобластомі кількість CD34⁺ клітин збільшувалась на фоні зменшення кількості CD38⁺ клітин, це можна пояснити тим, що для цих пухлин не характерне пригнічення гемопоезу на рівні стовбурових клітин. Що є сигналом для кісткового мозку для підсиленої генерації та підвищення циркуляції стовбурових клітин та в який спосіб це відбувається, невідомо. Можливо, за наявності цих пухлин виділяються ростові цитокіни, потрібні для збільшення розмірів пухлин, і вони допоміжно індукують генерацію певних гемопоетичних стовбурових клітин. Хоча можливі й інші механізми, пов'язані не з дією пухлини, а з реакцією організму на утворення пухлини. Подібну ситуацію відзначають і при ішемічному інсульті, у відновний період відбуваються інтенсивні репараційні процеси в головному мозку і, можливо, виникає нестача стовбурових нервових клітин, тому генеруються гемопоетичні стовбурові клітини, які йдуть в кров, а потім в ЦНС і там диференціюються в нервові клітини. Можливо, діють і інші механізми, наприклад, у відновний період після інсульту запускаються всі регенераційні процеси в організмі, в тому числі і в системі кровотворення.

До цього слід додати, що в гострому періоді ішемічного інсульту ми не виявили збільшення в крові хворих вмісту стовбурових клітин. При

епілепсії спостерігали найбільшу кількість стовбурових клітин в крові, встановлено певну залежність цього показника від тяжкості захворювання: чим частіше судороги, тим більша (до 10% і більше) кількість гемопоетичних стовбурових клітин. На перший погляд, це дещо незрозумілі й неочікувані результати. В той же час, в експериментальних дослідженнях були отримані дані про зв'язок судорожної готовності з кількістю стовбурових клітин в головному мозку, більше того, частота приступів пов'язується з кількістю та швидкістю генерації стовбурових клітин [5, 7, 10]. Так, під час моделювання епілептогенезу виявлене підвищення мітотичної активності стовбурових прогеніторних клітин передніх та ростральних відділів системи шлуночків мозку [15]. Вже перша судорожна реакція, спричинена, наприклад, флуротиловим кіплінгом, зумовлювала підвищення мітотичної активності стовбурових клітин, яка утримувалася протягом 3 діб, а після генерування восьмої судорожної реакції підвищення їх мітотичної активації спостерігали протягом 7 діб [10]. Нові нейрони, що виникали з стовбурових клітин, були неповноцінними і швидко гинули шляхом апоптозу, особливо під час формування епілептичного статусу [9].

Аналіз великої кількості джерел про зміни стану та активності стовбурових клітин при епілепсії показав, що нейрогенні стовбурові клітини є центральною ланкою патологічних та судорожних реакцій, характерних для сформованої епілептичної системи [5]. Можливо, за іншої ситуації при епілепсії сигнали для проліферації та міграції стовбурових клітин поступають не лише до нейрональних, а й гемопоетичних стовбурових клітин, які потім диференціюються в нейрональні, тому і спостерігають суттєве (у 8–9 разів) збільшення кількості цих клітин у периферичній крові. Прямі докази щодо перетворення гемопоетичних стовбурових клітин в нейрональні можливо отримати в спеціальних дослідках *in vitro* та *in vivo*. В той же час отримані нами результати не дозволяють однозначно стверджувати участь гемопоетичних стовбурових клітин в нейроонкологічних процесах. Так, якщо за наявності менінгіоми та медулобластоми відзначали збільшення кількості цих стовбурових клітин в крові, то це співпадає з твердженням деяких авторів, що медулобластома може утворюватися з первинних детермінованих нервових клітин [5, 8], при гліомі цього не виявляли, хоча існує і така точка зору, що

астроцити утворюються з ембріональних стовбурових клітин [13]. Можливо, супресивні чинники гліоми блокують фактори активації лише з нервових клітин, не залучаючи гемопоетичні клітини [1].

Отримані результати мають не лише теоретичне, а й практичне значення. Так, викликаючи в той чи інший спосіб активацію продукції гемопоетичних стовбурових клітин, можна підвищити регенеративний потенціал при інсульті, а, можливо, й при інших дегенеративних захворюваннях (атрофії мозку, паркінсонізмі, енцефалопатії). З іншого боку, гальмування продукції цих клітин перспективне при лікуванні епілепсії. Крім того, встановлення природи ендogenous стимулюючого чинника, який виділяється при менінгіомі, інсульті та епілепсії, визначення його структури та механізму дії дозволить використовувати його в інших галузях медицини.

Таким чином, при деяких нейрохірургічних захворюваннях виявляють значне збільшення кількості стовбурових гемопоетичних клітин в крові, що можна пов'язати з подальшою генерацією з них нервових стовбурових клітин та їх послідовників.

Висновки. 1. При нейрохірургічних захворюваннях залежно від характеру патологічного процесу в головному мозку відбувається збільшення вмісту в крові стовбурових CD34⁺ гемопоетичних клітин за відсутності лімфоцитарних CD38⁺ попередників.

2. При менінгіомі та медулобластомі рівень стовбурових CD34⁺ клітин підвищується у 2–3 рази, при гліомі — не спостерігають збільшення їх кількості, що свідчить про імуносупресивну дію цих пухлин на процеси генерації та міграції гемопоетичних стовбурових клітин в крові.

3. При епілепсії та у відновний період після ішемічного інсульту вміст в крові стовбурових CD34⁺ гемопоетичних клітин збільшується у 5–8 разів при незмінній кількості CD38⁺ попередників лімфоцитів, що можна пов'язати з активністю репараційно-відновних процесів, а також підвищенням патологічної епілептогенної активності головного мозку.

Список літератури

- Лісяний М.І., Скитяк С.А. Особливості стану клітинної ланки імунітету та продукції цитокінів у хворих з гліальними пухлинами головного мозку // Укр. мед. часопис. — 2002. — №5. — С.29–31.
- Лісяний М.І., Розуменко В.Д., Скитяк С.А. Особливості імунного та цитокінового статусу у хворих з гліомами головного мозку // Укр. нейрохірург. журн. — 2001. — №1. — С.24–31.
- Малейцев В.В., Богданова И.М., Сухих Г.Т. Современные представления о биологии стволовой клетки // Арх. патологии. — 2002. — Т.64, №4. — С.71.
- Петренко А.Ю., Грищенко В.И. Трансплантация стволовых клеток — перспективное направление терапии XXI века // Міжнар. мед. журн. — 2003. — №1. — С.123–129.
- Цимбалюк В.І., Медведєв В.А. Роль нейрональних стовбурових прогеніторів в процесах виникнення і прогресування деяких пухлин головного мозку, а також епілептогенезу // Укр. нейрохірург. журн. — 2004. — №1. — С.9–11.
- Azizi S., Stokes D., Augelli B. et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brain of albino rats: similarities to astrocyte grafts // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — V.95. — P.3908–3913.
- Blumche I., Schewe J., Normann S. et al. Increase of nestin-immunoreactive mural precursor cells in dentate gyrus of pediatric patients with early onset temporal lobe epilepsy // Hippocampus. — 2001. — V.11, N3. — P.311–321.
- Buhren J., Christoph A.H., Buslei R. et al. Expression of the neurotrophin receptor p75NTR in medulloblastomas is correlated with distinct histological and clinical features // J. Neuropathol. Exp. Neurol. — 2000. — V.59, N3. — P.229–240.
- Ekdahl C.T., Mohapel P., Webar E. et al. Caspase-mediated death of newly formed neurons in the adult rat dentate gyrus following status epilepticus // Europ. J. Neurosci. — 2002. — V.16, N8. — P.1463–1471.
- Ferland R.J., Gross R., Applagate C. Increased mitotic activity in the dentate gyrus of the hippocampus of adult C57BL/67 mice exposed to the flurothyl kindling model of epileptogenesis // Neuroscience. — 2002. — V.115, N3. — P.669–683.
- Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Colefta M. et al. Muscle regeneration by bone marrow derived myogenic precursors // Science. — 1998. — V.279. — P.1528–1530.
- Gunsilins E., Gastl G., Petzez A. Hematopoietic stem cells // Bioneed Pharmacotherap. — 2001. — V.4. — P.186–191.
- Konopka G., Bonni A. Signaling pathways regulation gliomagenesis // Curr. Mol. Med. — 2003. — V.3, N1. — P.73–84.
- Parcs D.R., Lanier L.L., Herrenberg L.A. Flow cytometry and fluorescence activated cell sortins (Facs) // Handbook of Experimental Immunology. — 1986. — P.302–324.
- Parent J.M., Lowenstein D.H. Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain? // Prog. Brain Res. — 2002. — V.135. — P.121–131.
- Petersen B., Bowen W., Patrene K. et al. Bone marrow as source of hepatic oval cells // Science. — 1998. — N284. — P.1168–1170.

**Исследование содержания стволовых
гемопоэтических клеток в крови
при некоторых нейрохирургических
заболеваниях**

*Лісяний Н.І., Бичкова С.А., Лісяний А.Н.,
Потапова А.І.*

Приведены данные о содержании в крови CD34⁺ костномозговых стволовых гемопоэтических клеток и CD38⁺ предшественников лимфоцитов. Установлено, что при глиоме головного мозга отмечен более низкий, чем у здоровых лиц, уровень CD34⁺ и CD38⁺ клеток в крови, при менингиоме и медуллобластоме — увеличение в 2–3 раза количества CD34⁺ клеток. У больных с ишемическим инсультом в восстановительный период наблюдали достоверное увеличение содержания только CD34⁺ клеток без изменения уровня CD38⁺ клеток.

Наибольшее количество стволовых гемопоэтических клеток в крови определяли при эпилепсии с тяжелым течением, содержание CD34⁺ клеток было увеличено в 8–10 раз, CD38⁺ клеток — не изменялось; при эпилепсии с редкими эпилептиками увеличение было менее выражено. Авторы предполагают, что увеличение количества стволовых гемопоэтических клеток в крови связано с их вовлечением в патологический процесс в головном мозгу и возможной дифференцировкой в нервные клетки. При злокачественных опухолях глиального ряда отмечено угнетение генерации как самих стволовых клеток, так и их последующей дифференцировки в предшественники лимфоцитов, что может быть связано с иммунным гемодепрессивным действием глиом.

**The research of trunk hemopoietic
cells maintenance in patients with some
neurosurgical diseases**

*Lisyany N.I., Bychkova S.A., Lisyany A.N.,
Potapova A.I.*

The data about maintenance of the CD34⁺ marrow trunk hemopoietic cells and CD38⁺ lymphatic predecessors in the blood are given in the article. It is set that in a case of glioma levels of CD34⁺ and CD38⁺ cells in a blood were lower than in blood of healthy persons, while at meningioma and medulloblastoma only level of CD34⁺ cells increased in 2–3 times. In patients with an ischemic stroke the reliable increase of maintenance of only the CD34⁺ cells without the change of the CD38⁺ cells level was marked in a period of rehabilitation.

Most quantity of trunk hemopoietic cells in blood was determined at epilepsy with the heavy flow, when the maintenance of only CD34⁺ cells increased in 8–10 times and the maintenance of the CD38⁺ cells did not change, but at epilepsy with rare attacks registered the increase of CD34⁺ cells was less expressed. The authors speak out the suppose, that the increase of trunk hemopoietic cells in a blood amount is related to their involving in a pathological process in CNS and possible into nervous cells. At the malignant glial tumors the depression is marked for trunk cells generation and their subsequent differentiation into the lymphocytes predecessors, that can be related to gliomas immune hemodepression.

Коментар

до статті Лісяного М.І., Бичкової С.А., Лісяного О.М., Потапової А.Г. “Дослідження вмісту стовбурових гемопоетичних клітин в крові при деяких нейрохірургічних захворюваннях”

Стаття присвячена актуальній проблемі — дослідженню стовбурових клітин в організмі людини. Стовбурові клітини є важливою складовою більшої частини органів і тканин, забезпечують їх регенерацію та відновлення функцій при різних пошкодженнях. Поряд з цим, досліджень, присвячених стовбуровим клітинам у дорослої людини, дуже мало, за винятком досліджень гемопоетичних клітин, наявних у невеликій кількості в крові, які, за даними багатьох авторів, можуть за певних умов диференціюватися не лише в кровотворні, а й в інші клітини організму. В той же час, досліджень, присвячених визначенню стовбурових клітин в крові при захворюваннях ЦНС, дуже мало, тому можна вважати, що тема статті актуальна і має важливе значення для нейрохірургії. Автори обстежили 78 пацієнтів з різними захворюваннями ЦНС, у яких за допомогою сучасних методик з використанням моноклональних антитіл визначили вміст в периферичній крові стовбурових (CD34⁺) гемопоетичних клітин та CD38⁺ мононуклеарів, які є попередниками лімфоцитів.

На основі аналізу отриманих результатів виявлені цікаві закономірності: при пухлинах головного мозку рівень стовбурових клітин практично не змінювався, тоді як при епілепсії він підвищувався у 6–8 разів, що співпадає з даними, наведеними В.І. Цимбалюком і В.І. Медведєвим (2004), які свідчили про накопичення в мозку стовбурових клітин, що є однією з причин виникнення судорожної готовності.

В той же час при ішемічному інсульті збільшення кількості цих клітин в крові виявляли лише у відновному періоді, починаючи з 15–20-ї доби від моменту виникнення інсульту, коли відбувалися інтенсивні процеси відновлення та репарації головного мозку.

Авторами висловлене теоретичне припущення, що підвищення рівня гемопоетичних клітин в крові пов'язане з підсиленою репарацією цих клітин та міграцією їх в зону патологічного процесу в головному мозку, де вони можуть диференціюватися в нейрональні клітини. Причини цієї активації невідомі, тому потрібні подальші дослідження. Можливо, в майбутньому за показниками цих клітин в крові хворих можна буде оцінювати здатність та інтенсивність репараційних процесів в мозку.

*В.М.Семенова, доктор мед. наук
зав. лабораторією культивування тканин
Інституту нейрохірургії ім. акад.А.П.Ромоданова АМН України*