



ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 616.832-001:616-056.265-092.9:611-018.5:615.361:573.4:616-089.843

ВПЛИВ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦІЇ НЕЙРОГЕННИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН У КОМПЛЕКСІ З ТКАНИННИМ МАТРИКСОМ NEUROGEL™ НА ВІДНОВЛЕННЯ РУХОВОЇ ФУНКЦІЇ СПИННОГО МОЗКУ ЩУРА ПІСЛЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ СПІНАЛЬНОЇ ТРАВМИ

**В. І. Цимбалюк, В. В. Медведєв, О. А. Рибачук, В. І. Козявкін,
Н. Г. Драгунцова, Д. Г. Нестеренко**

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України,
Інститут нейрохірургії імені акад. А. П. Ромоданова НАМН України,
Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України,
Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України, м. Київ

IMPACT OF XENOTRANSPLANTATION OF NEUROGENIC STEM CELLS IN COMPLEX WITH THE TISSUE MATRIX NEUROGEL™ ON RESTORATION OF MOTOR FUNCTION OF A RAT SPINAL CORD AFTER EXPERIMENTAL SPINAL TRAUMA

**V. I. Tsymbalyuk, V. V. Medvedyev, O. A. Rybachuk, V. I. Kozyavkin, N. G.
Dragutsova, D. G. Nesterenko**

Bogomolets National Medical University,
Romodanov Institute of Neurosurgery,
Bogomolets Institute of Physiology,
Institute of Genetic and Regenerative Medicine, Kyiv

Реферат

Апробований спосіб відновного лікування експериментальної травми спинного мозку (СМ) шляхом імплантації синтетичного матриксу в поєднанні з нейрогенними стовбуровими клітинами (НСК). Рухову функцію задньої іпсилатеральної кінцівки (ЗІК) оцінювали за шкалою Basso-Beattie-Bresnahan (BBB). Застосування запропонованого способу сприяло суттєвому збільшенню раннього нейропротекторного впливу імплантованого NeuroGel™, зменшенню інтенсивності і збільшенню тривалості раннього відновлення функції ЗІК.

Ключові слова: травма спинного мозку; відновна нейрохірургія; тканинна нейроінженерія; штучний матрикс; нейрогенні стовбурові клітини; експеримент.

Abstract

The method of restorative treatment for experimental spinal cord trauma (SCT), using implantation of synthetic matrix in combination of neurogenic stem cells, was introduced. Motor function of posterior ipsilateral extremity (PIE) was estimated in accordance to Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) scale. Application of the method proposed have promoted essential enhancement of early neuroprotecting impact of the implanted NeuroGel™, reducing time of early restoration of the PIE function.

Keywords: spinal cord trauma; restoration surgery; the tissue neuroengineering; artificial matrix; neurogenic stem cells; experiment.

Відновне лікування наслідків травми СМ є однією з найскладніших прикладних проблем сучасної біомедичної науки, вирішення якої неможливе без здійснення широких фундаментальних досліджень з вивчення питань онтогенезу та регенерації нервової системи, пластич-

ності СМ, механізмів функції рухової системи тощо. За низької частоти травма СМ має кумулятивні епідеміологічні властивості [1]. Першочерговим завданням є розробка засобів відновлення низхідного супраспинального впливу на популяції мотонейронів, розташованих ниж-

че зони травми. Перспективним біогенним засобом відновного лікування є тканинна нейроінженерія, основана на створенні локальних умов для росту та мієлінізації травмованих аксонів, імплантації у зону травми клітин різного походження та ступеня диференціювання у ком-

плексі з матриксами (англ. "scaffolds" — будівельні риштування) [2 — 5]. Одним з найбільш ефективних синтетичних матриксів за спінальної травми є макропористий гідрогель NeuroGel™ з аморфною мікроструктурою [6 — 11], позитивний ефект імплантації якого за умови гомолатерального поперечного пересічення СМ зрілого щура у нижньогрудному відділі оцінюється різницею у 10% повного прояву функції у порівнянні з таким у контрольній групі [11] і, ймовірно, визначається раннім антигеморагічним, імунотактивацією регенераційного росту аксонів у зоні травми за периферійним типом [11]. Можливість поєднання *in vitro* NeuroGel™ з незрілими клітинами того чи іншого фенотипу, що стимулюють регенерацію СМ, а також ефективність трансплантації такого комплексу на моделі травми СМ не вивчена.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено з дотриманням існуючих норм біоетики на білих безпородних щурах—самцях (віваріїв Інституту нейрохірургії імені А. П. Ромоданова НАМН України та Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України), віком 5 міс, масою тіла 250 г, яких утримували у стандартних умовах. Сформовані 3 експериментальні групи: "нейрогель+НСК" — травма СМ + гомотопічна імплантacja фрагмента NeuroGel™, асоційованого з НСК миші (n=20); "нейрогель" — травма СМ + гомотопічна імплантacja фрагмента NeuroGel™ (n=20); "контроль" — травма СМ (n=16). Строки спостереження — 28 тиж.

Макропористий гідрогель NeuroGel™ — полі[N-(2-гідроксипропіл)-метакриламід] — комерційний препарат, синтезований в лабораторії E. Pinet (FISO Technologies Inc., Quebec, Canada) шляхом гетерогенної полімеризації та асоціації, має пори розмірами 2 — 300 нм [7].

У стерильних умовах у самки миші лінії FVB—Cg—Tg(GFPU) 5Nagy/J (трансгенної за геном зеле-

ного флуоресцентного білка) на 17—ту добу гестації після анестезії вилучали плоди, у яких виділяли гіпокампи; тканину механічно подрібнювали пастерівськими піпетками різного діаметра у середовищі Neurobasal ("Gibco Invitrogen", США), суспензію пропускали крізь нейлонові клітинні фільтри ("Falcon", США) з діаметром пор 40 мкм, центрифугували у градієнті щільності (22% розчин Percoll), життєздатність клітин визначали методом проточної цитометрії на лазерному цитофлуориметрі—сортері FACSAria ("Becton Dickinson", США) після інкубації суспензії клітин з 7-аміноактиноміцином, вона становила $(91,6 \pm 0,7)\%$. Вміст GFP—позитивних клітин у культурі становив $(97,5 \pm 0,5)\%$, Nestin—позитивних клітин — $(96 \pm 0,5)\%$. У подальшому НСК культивували у багатокомпонентному середовищі (96% Neurobasal, 2% B—27 Supplement, 1% Glutamax, 0,1% Sodium pyruvate, 0,1% NAC, 0,5% пеніцилін/стрептоміцин) у присутності 10 нмоль фактору росту фібробластів 2. Через 5 діб у середовище вкладали фрагменти NeuroGel™ розміром 16 мм³, культивували протягом 10 діб, до моменту трансплантації.

Модель спінальної травми — лівобічне пересічення половини поперечника СМ на рівні T_{XI} [12]. Оперативне втручання здійснювали в умовах загального знеболення: внутрішньоочеревинного введення суміші розчинів ксилазину 15 мг/кг і кетаміну 70 мг/кг. Після травми СМ у тварин групи "нейрогель+НСК" у рану імплантували фрагмент NeuroGel™ у поєднанні з НСК, розміром ~2 мм³; у тварин групи "нейрогель" — фрагмент нативного NeuroGel™ аналогічних розмірів. У тварин усіх груп вікно доступу в хребтовий канал прикривали фрагментом підшкірної фасції, м'які тканини та шкіру з'єднували крученими поліамідними хірургічними нитками, накладали 2 ряди вузлових швів, ділянку рани обробляли 5% спиртовим розчином йоду. У задню шийну ділянку підшкірно вводили розчин біциліну—5 ~150—200 тис ОД на 1 тварину; внутрішньоочеревинно —

розчин дексаметазону 6 мг/кг. Після цього тварин протягом 2 — 4 год утримували в приміщенні з підвищеною температурою повітря (30 °С), у подальшому — у клітках по 3 — 6 особин за середньої температури 21 — 24 °С. Тривалість спостереження 28 тиж; тварин виводили з експерименту шляхом передозування зазначених наркотичних засобів.

Показник функції (ПФ) ЗІК визначали за шкалою ВВВ [12, 13], протягом перших 2 міс — наприкінці кожного тижня, у подальшому — наприкінці кожного місяця.

Статистична обробка даних проведена за допомогою програмного пакета Statistica 10.0, для встановлення достовірності різниці середніх значень ПФ ЗІК в групах використовували U—тест Мана—Уїтні, результати оцінки достовірності представляли у вигляді показника р. Достовірність змін середніх значень ПФ ЗІК в межах групи впродовж експерименту оцінювали за Уїлкоксоном.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При імплантації NeuroGel™ через 28 тиж експерименту відзначали формування трьох виражених підгруп у розподілі значень ПФ ЗІК; при імплантації NeuroGel™ у поєднанні з НСК нормалізувався розподіл ПФ ЗІК (рис. 1).

Динаміка ПФ ЗІК у групі "контроль" (рис. 2) характеризувалася двофазністю: протягом 1—го місяця відзначали збільшення ПФ ЗІК до $(1,66 \pm 0,54)$ бала (достовірно протягом 3—го тижня, $p < 0,01$ при порівнянні з таким наприкінці 1—го та 2—го тижня), у подальшому — регрес (5 — 8—й тиждень), збільшення (12—16—й тиждень, $p < 0,05$ при порівнянні на 16—му та 8—му тижні), стабілізацію. Через 28 тиж ПФ ЗІК становив $(1,6 \pm 0,5)$ бала.

Динаміка ПФ ЗІК в групі "нейрогель" також двофазна: протягом 1 — 3—го тижня — значуще ($p < 0,001$) збільшення, що до кінця 5—го тижня частково нівелювалося; протягом 6 — 12—го тижня — повторне збільшення (значуще на 7 — 8—му тижні, $p < 0,05$), з 16—го тижня — стабілі-

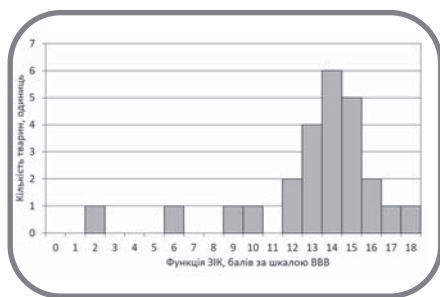


Рис. 1.
Розподіл ПФ ЗІК у групі "нейрогель+НСК" на 28-му тижні спостереження.

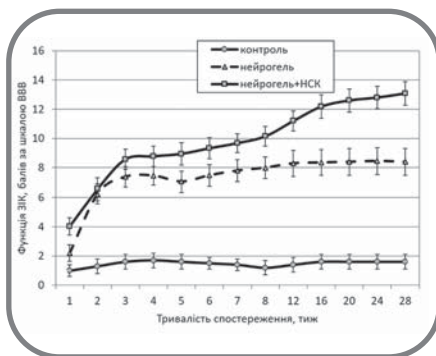


Рис. 2.
Динаміка ПФ ЗІК в експериментальних групах протягом періоду спостереження. Різниця ПФ ЗІК в групах "нейрогель" та "нейрогель+НСК" на 1-му та 5-28-му тижні статистично значуща ($p < 0,05$).

зая. ПФ ЗІК наприкінці 4-го місяця становив $(8,4 \pm 0,9)$ бала,

наприкінці експерименту — $(8,4 \pm 0,9)$ бала.

Динаміка ПФ ЗІК у групі "нейрогель+НСК" було результативною. На 7-му добу експерименту ПФ ЗІК становив $(4,0 \pm 0,6)$ бала, достовірно перевищував такий в групі "контроль" та "нейрогель" — відповідно $(1,0 \pm 0,4)$ та $(2,2 \pm 0,6)$ бала. Протягом подальших 2 тиж спостерігали збільшення ПФ ЗІК, протягом 2-го тижня — менш інтенсивне, ніж у групі "нейрогель", що, ймовірно, зумовлене реалізацією імунної відповіді на ксеногенні клітини та негативним впливом її медіаторів на перифокальну зону [14, 15]; протягом 3-го тижня — більш інтенсивне. Починаючи з 4-го тижня, відзначали стабілізацію ПФ ЗІК — $(8,8 \pm 0,7)$ бала, що тривала до кінця 5-го тижня — $(9,0 \pm 0,8)$ бала, і змінювалася періодом повільного (6 — 7-й тижень) — до $(9,7 \pm 0,7)$ бала та інтенсивного (8 — 20-й тижень) — до $(12,6 \pm 0,8)$ бала значущого збільшення; яке завершувалася прикінцевою стабілізацією (24 — 28-й тижень) — $(13,1 \pm 0,9)$ бала.

Протягом періоду спостереження ПФ ЗІК в групі "нейрогель+НСК" достовірно перевищував такий в групі "контроль" ($p < 0,0002$); в групі

"нейрогель" — достовірно перевищував такий в групі "контроль" впродовж 2—28-го тижня спостереження ($p < 0,00004$); в групі "нейрогель+НСК" перевищував такий в групі "нейрогель" на 7-му добу та протягом 5 — 28 тиж спостереження ($p < 0,05$).

ВИСНОВКИ

1. Процес регенерації в моделі травми СМ характеризувався фазністю; тривалість фаз за умови імплантації NeuroGel™ та NeuroGel™ у поєднанні з НСК змінювалася аналогічно.

2. Використання НСК у комплексі з NeuroGel™ суттєво підвищувало нейротекторний потенціал матриксу.

3. За наявності НСК інтенсивність відновлення функції ЗІК протягом 2-го тижня після травми зменшувалась.

4. Ксенотрансплантація НСК у поєднанні з NeuroGel™ покращувала результативність імплантації матриксу внаслідок подовження фази раннього збільшення рухової функції ЗІК, нівелювання негативних тенденцій на початку 2-го місяця та потенціювання процесу регенерації у віддаленому періоді після травми СМ.

ЛІТЕРАТУРА

- Lee B. B., Cripps R. A., Fitzharris M., Wing P. C. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate // *Spin. Cord.* — 2014. — Vol. 52, N 2. — P. 110 — 116.
- Hydrogels and cell based therapies in spinal cord injury regeneration / R. C. Assuncao—Silva et al. // *Stem Cells Intern.* — 2015. — Vol. 2015. — P. 1 — 24.
- Siebert J. R., Eade A. M., Osterhout D. J. Biomaterial approaches to enhancing neurorestoration after spinal cord injury: strategies for overcoming inherent biological obstacles // *BioMed. Res. Intern.* — 2015. — Vol. 2015. — P. 1 — 20.
- Tian L., Prabhakaran M. P., Ramakrishna S. Strategies for regeneration of components of nervous system: scaffolds, cells and biomolecules // *Regen. Biomater.* — 2015. — Vol. 2, N 1. — P. 31 — 45.
- Tsintou M., Dalamagkas K., Seifalian A. M. Advances in regenerative therapies for spinal cord injury: a biomaterials approach // *Neur. Regen. Res.* — 2015. — Vol. 10, N 5. — P. 726 — 742.
- Spinal cord reconstruction using NeuroGel implants and functional recovery after chronic injury / S. Woerly et al. // *J. Neurosci. Res.* — 2001. — Vol. 66, N 6. — P. 1187 — 1197.
- Reconstruction of the transected cat spinal cord following NeuroGel implantation: axonal tracing, immunohistochemical and ultrastructural studies / S. Woerly et al. // *Int. J. Dev. Neurosci.* — 2001. — Vol. 19, N 1. — P. 63 — 83.
- Spinal cord repair with PHPMA hydrogel containing RGD peptides (NeuroGel) / S. Woerly et al. // *Biomaterials.* — 2001. — Vol. 22, N 10. — P. 1095 — 1111.
- Prevention of gliotic scar formation by NeuroGel allows partial endogenous repair of transected cat spinal cord / S. Woerly et al. // *J. Neurosci. Res.* — 2004. — Vol. 75, N 2. — P. 262 — 272.
- Expression of heat shock protein (HSP)—25 and HSP—32 in the rat spinal cord reconstructed with Neurogel / S. Woerly et al. // *Neurochem. Res.* — 2005. — Vol. 30, N 6—7. — P. 721 — 735.
- Цымбалюк В. И., Медведев В. В. Спинальный мозг. Элегия надежды: монография. — Винница: Нова Книга, 2010. — 944 с.
- Модель пересічення половини поперечника спинного мозку. І. Технічні, патоморфологічні та клініко—експериментальні особливості / В. І. Цимбалюк та ін. // *Укр. нейрохірург. журн.* — 2016. — № 2. — С. 18 — 27.
- Basso D. M., Beattie M. S., Bresnahan J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats // *J. Neurotrauma.* — 1995. — Vol. 12, N 1. — P. 1 — 21.
- Early inflammatory responses following cell grafting in the CNS trigger activation of the subventricular zone: a proposed model of sequential cellular events / J. Praet et al. // *Cell Transplant.* — 2015. — Vol. 24, N 8. — P. 1481 — 1492.
- Immune remodelling of stromal cell grafts in the central nervous system: therapeutic inflammation or (harmless) side—effect? / D. Le Blon et al. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* — 2016 [Epub ahead of print], doi: 10.1002/term.2188.