



УДК 616-092.9-089.843:616-001-021.6:616.8-009.12:576.3/7

## ВПЛИВ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦІЇ НЕЙРОГЕННИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН У КОМПЛЕКСІ З ТКАНИННИМ МАТРИКСОМ NEUROGEL™ НА ПЕРЕБІГ СИНДРОМУ ПОСТТРАВМАТИЧНОЇ СПАСТИЧНОСТІ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

**В. І. Цимбалюк, В. В. Медведєв, О. А. Рибачук, В. І. Козьявкін, Н. Г. Драгунцова**

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

## THE IMPACT OF XENOTRANSPLANTATION OF NEUROGENIC STEM CELLS IN COMPLEX WITH THE TISSUE MATRIX NEUROGEL™ ON THE POSTTRAUMATIC SPASTICITY SYNDROME COURSE IN EXPERIMENT

**V. I. Tsymbalyuk, V. V. Medvedyev, O. A. Rybachuk, V. I. Kozyavkin, N. G. Draguntsova**

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

### Реферат

Вивчений вплив імплантації синтетичного матриксу NeuroGel™ у поєднанні з нейрогенними стовбуровими клітинами (НСК) на перебіг синдрому посттравматичної спастичності. Тварини — білі безпородні щури—самці (5 міс, 250 г); модель травми — пересічення лівої половини спинного мозку (СМ) на рівні T<sub>XI</sub>; експериментальні групи: 1 — травма СМ, гомотопічна імплантація NeuroGel™ у поєднанні з НСК фетального (E17) гіпокампа миші (n=20); 2 — травма СМ, гомотопічна імплантація NeuroGel™ (n=20); 3 — травма СМ (n=16). Дослідження показника функції (ПФ) та показника спастичності (ПС) задньої іпсилатеральної кінцівки (ЗІК) за шкалою Basso—Beattie—Bresnahan (BBB) та шкалою Ashworth. Зв'язок ПФ та ПС ЗІК в усіх групах за різних варіантів формування виборок неоднозначний, що свідчить про можливість додаткової кореляції між цими характеристиками рухової системи. Ксенотрансплантація НСК у поєднанні з NeuroGel™ змінює перебіг синдрому спастичності, створює передумови для його полегшення у віддаленому періоді після травми СМ.

**Ключові слова:** травма спинного мозку; синдром спастичності; тканнна нейроінженерія; штучний тканинний матрикс; нейрогенні стовбурові клітини; експеримент.

### Abstract

The impact of implantation of synthetic matrix NeuroGel™ together with neurogenic stem cells (NSC) on the course of posttraumatic spasticity syndrome was studied. The laboratory animals were white mongrel male rats (5 mo, 250 g); the trauma simulation — transection of the left half of spinal cord (SC) on the T<sub>XI</sub> level. Experimental group 1 consisted of a SC trauma, homotopic implantation of NeuroGel™ together with NSC of fetal (E17) mice hippocampus (n=20); while group 2 — a SC trauma, homotopic implantation of NeuroGel™ (n=20); and group 3 — a SC trauma (n=16). Investigation of the function index and the spasticity index of posterior ipsilateral extremity was done in accordance to Basso—Beattie—Bresnahan and Ashworth scales. Association of the function index and the spasticity index of posterior ipsilateral extremity in all groups in various variants of the samples formation is ambiguous, witnessing possibility of additional correlation between these characteristics of a movement system. The NSC xenotransplantation in conjunction with NeuroGel™ changes the spasticity syndrome course, creates conditions for its facilitation in remote period after a SC trauma.

**Keywords:** spinal cord trauma; syndrome of spasticity; neuroengineering of the tissues; artificial matrix of tissue; neurogenic stem cells; experiment.

Нейрогенні ускладнення травми СМ включають девіації трьох його основних функцій: чутливості (хронічний больовий синдром), рухової

(спастичність) та вегетативної (розлади функції органів таза) регуляції [1]. Більшість варіантів перебігу значених синдромів характеризу-

ються продуктивністю, тобто, появою надмірних патологічних проявів функціональної активності на тлі зникнення чи зменшення вира-

женності нормальних. У теперішній час лікування травми СМ передбачає застосування методологічно та телеологічно сепарованих напрямків — відновлення нормальної функції та зменшення патологічної активності денервованих відділів СМ. Суттєвий прогрес у вирішенні цих завдань не досягнутий, дослідження суміжної ефективності лікувальних засобів, наприклад, антиспастичного ефекту відновних трансплантаційних [2, 3], фізичних реабілітаційних [4 — 8], біонічних [9] засобів чи очікуваного відновного ефекту лікування синдрому спастичності [8] нечисленні. Поєднання відновного та антиспастичного впливу можливе щодо фізичної реабілітації [8], а також біонічних [9] чи тканинних нейроінженерних втручань. Дані щодо впливу нейротрансплантаційних втручань на перебіг синдрому спастичності при травмі СМ практично відсутні.

Наведені результати вивчення впливу ксенотрансплантації НСК у поєднанні з тканинним матриксом NeuroGel™ на перебіг синдрому спастичності при експериментальній травмі СМ.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведене з дотриманням норм біоетики на білих безпородних щурах—самцях віком 5 міс, масою тіла 250 г, яких утримували у стандартних умовах віварію. Сформовані 3 експериментальні групи: "НСК+нейрогель" — травма СМ, гомотопічна імплантація фрагмента NeuroGel™ у поєднанні з НСК фетального гіпокампа миші (n=20); "нейрогель" — травма СМ, гомотопічна імплантація фрагмента NeuroGel™ (n=20); "контроль" — травма СМ (n=16). Тривалість спостереження 28 тиж.

Макропористий гідрогель NeuroGel™ (полі[N—(2—гідроксипропіл)—метакриламід]) є комерційним препаратом, синтезованим в лабораторії E. Pinet (FISO Technologies Inc., Quebec, Canada) шляхом гетерогенної полімеризації та асоціації. Культуру НСК отримували з тканини гіпокампа зародку миші лінії

FVB—Cg—Tg(GFPU)5Nagy/J (трансгенні за геном зеленого білка флуоресценції) на 17—ту добу гестації шляхом механічної дисоціації у середовищі Neurobasal ("Gibco Invitrogen", США), фільтрування (клітинні фільтри "Falcon", США) та центрифугування у градієнті щільності (22% розчин Percoll). Життєздатність культури визначали методом точної 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 первинній культурі  $(97,5 \pm 0,5)\%$ , Nestin—позитивних клітин —  $(96 \pm 0,5)\%$ . У подальшому НСК культивували у багатокомпонентному поживному середовищі (96% Neurobasal, 2% B—27 Supplement, 1% Glutamax, 0,1% Sodium-pyruvate, 0,1% NAC, 0,5% пеніцилін/стрептоміцин "Gibco", Велика Британія) з вмістом 10 нмоль фактору росту фібробластів 2 ("Sigma", США). Через 5 діб у середовище вкладали фрагменти NeuroGel™ об'ємом 16 мм<sup>3</sup> і продовжували культивування протягом 10 діб, до моменту імплантації.

Модель спінальної травми — пересічення лівої половини поперечника СМ на рівні T<sub>11</sub> [10]. Оперативне втручання здійснювали в умовах загального знеболення (внутрішньоочеревинне введення суміші розчинів ксилазину ["Sedazin", "Bio-wet", Польща] 15 мг/кг і кетаміну ["Calypsol", "Гедеон Ріхтер А.О.", Угорщина] 70 мг/кг). Після нанесення травми СМ у тварин групи "нейрогель+НСК" у рану імплантували фрагмент NeuroGel™, у поєднанні з НСК розміром ~2 мм<sup>3</sup>; у тварин групи "нейрогель" — фрагмент нативного NeuroGel™ аналогічного розміру. У тварин усіх експериментальних груп вікно доступу в канал хребта прикривали фрагментом підшкірної фасції, м'які тканини та шкіру з'єднували крученими поліамідними хірургічними нитками (ум. № 1, ПАТ "Київхімволокно") у два ряди вузлових швів, ділянку рани обробляли 5% спиртовим розчином йоду. У задню шийну ділянку під-

шкірно вводили розчин біциліну—5 (ПАТ "Київмедпрепарат"; ~150 — 200 тис ОД на 1 тварину), внутрішньоочеревинно — розчин дексаметазону (KRKA, Словенія; 6 мг/кг). Після зазначених маніпуляцій тварин протягом 2 — 4 год утримували в приміщенні з підвищеною температурою повітря (30 °С), у подальшому — при температурі 21 — 24 °С.

ПФ ЗІК визначали за шкалою BBB [10, 11], ПС на рівні над'яткового—гомілкового та колінного суглобів ЗІК — за шкалою Ashworth [12]. Протягом 2 міс ПФ та ПС ЗІК реєстрували наприкінці кожного тижня, у подальшому — наприкінці кожного місяця. Максимальна тривалість спостереження — 28 тиж, тварин виводили з експерименту шляхом передозування наркотичних препаратів.

Статистична обробка отриманих даних проведена у програмному пакеті Statistica 10.0. Результати моніторингу ПФ та ПС ЗІК в експериментальних групах порівнювали за непараметричним U—тестом Манна—Уїтні, результати представляли у вигляді значень показника р. Достовірність різниці ПФ та ПС ЗІК у різні строки спостереження у кожній групі оцінювали за Уїлкоксоном. Кореляцію між значеннями ПС та ПФ ЗІК тварин у групі у кожний строк спостереження, у кожній тварини у різні строки спостереження, а також середніх у групі значень ПФ і ПС ЗІК впродовж періоду спостереження оцінювали за непараметричним коефіцієнтом рангової кореляції Спірмена та параметричним коефіцієнтом кореляції Пірсона, результати виражали у вигляді коефіцієнту r зі звичним трактуванням.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Імплантація NeuroGel™ нормалізує розподіл значень ПС ЗІК станом на 28—й тиждень, ксенотрансплантація НСК у поєднанні з NeuroGel™ — маргіналізує у бік 1 бала Ashworth (рис. 1).

Найбільш інтенсивний лінійний приріст значень ПС ЗІК — до  $(1,8 \pm 0,3)$  бала ( $p < 0,05$ ) у групі "контроль"

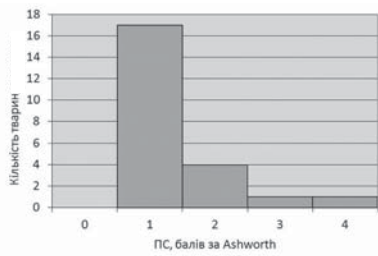


Рис. 1.

Розподіл ПС у групі "нейрогель+НСК" на 28-му тижні спостереження.

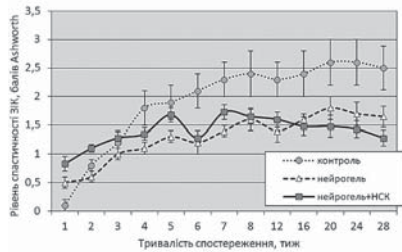


Рис. 2.

Динаміка ПС ЗІК в експериментальних групах протягом періоду спостереження.

**Примітка.** Різниця між групами "нейрогель" і "контроль" значуща на 1-му, 5-7-му та 12-24-му тижні, між групами "нейрогель+НСК" і "контроль" - на 1-2-му, 6-7-му та 16-28-му тижні, між групами "нейрогель" та "нейрогель+НСК" - на 1-2-му та 5-му тижні.

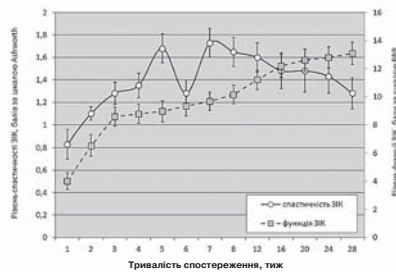


Рис. 3.

Зіставлення динаміки ПФ та ПС ЗІК в групі "нейрогель+НСК".

спостерігали протягом 1-го місяця (рис. 2); протягом 6-8-го тижня відзначали повільніше збільшення показника з однаковою швидкістю (протягом 6-7-го тижня — достовірно,  $p < 0,05$ ); протягом подальших 2 міс значущі зміни ПС ЗІК не виявляли, протягом 5-го місяця реєстрували достовірно ( $p < 0,05$ ) збільшення показника до  $(2,6 \pm 0,4)$  бала, у подальшому — недостовірне зменшення — до  $(2,5 \pm 0,38)$  бала.

Перший період значущого ( $p < 0,005$ ) приросту ПС ЗІК у групі "нейрогель" виявляли на 3-му тижні — до  $(1,0 \pm 0,2)$  бала, другий — протягом 7-го тижня —  $(1,4 \pm 0,1)$  бала, третій — протягом 5-го місяця — до  $(1,8 \pm 0,2)$  бала, у подальшому значущі зміни не виявляли. Станом на 28-й тиждень спостереження ПС ЗІК становив  $(1,7 \pm 0,2)$  бала.

На 7-му добу ПС ЗІК в групі "нейрогель+НСК" становив  $(0,8 \pm 0,1)$  бала, достовірно переважав показник в групах "контроль" ( $p = 0,0002$ ) та групі "нейрогель" ( $p = 0,03$ ). Значуще повільне збільшення ПС ЗІК реєстрували протягом 3-4-го тижня, більш інтенсивне — протягом 5-го тижня, до максимуму —  $(1,7 \pm 0,1)$  бала. На кінець 6-го тижня констатували значуще зменшення ПС ЗІК — до  $(1,3 \pm 0,1)$  бала, що протягом наступного тижня змінювалося рівновеликим збільшенням. Починаючи з 8-го тижня, до кінця експерименту відзначали повільне зменшення ПС ЗІК, 24-й та 28-й тиждень — значуще — до  $(1,3 \pm 0,1)$  бала.

Значуща різниця ( $p < 0,05$ ) ПС ЗІК між групами "контроль" та "нейрогель" виявлена протягом 5-7-го та 12-24-го тижнів; між групами "нейрогель" та "контроль" ( $p < 0,05$ ) — на 1-му, 5-7-му та 12-24-му тижнях; ПС між групами "нейрогель+НСК" та "контроль" — на 6-7-му та 16-28-му тижнях; між групами "нейрогель+НСК" та "нейрогель" — на 1-2-му та 5-му тижнях.

При аналізі кореляції індивідуальних значень ПФ та ПС ЗІК у кожній тварини у різні строки спостереження у групі "контроль" у 3 (18,8%) з 16 особин виявлено помірну та сильну від'ємну кореляцію (відповідно  $r = -0,69$ ,  $-0,84$  та  $-0,64$ ), в 1 особини — помірну позитивну кореляцію ( $r = 0,61$ ); у групі "нейрогель" — у 3 (20%) особин — помірну позитивну кореляцію ( $r = 0,7$ ), в 1 — помірну від'ємну кореляцію ( $r = -0,57$ ); у групі "нейрогель+НСК" — в одній тварини — помірну від'ємну кореляцію ( $r = -0,7$ ).

При аналізі кореляції індивідуальних значень ПФ та ПС ЗІК у різ-

них тварин у кожний період спостереження у групі "контроль" виявлено помірну та сильну від'ємну кореляцію ( $r < -0,5$ ) на 3-6-му та 8-28-му тижнях; у групі "нейрогель" — сильну ( $r \leq -0,75$ ) та помірну ( $-0,75 < r \leq -0,65$ ) від'ємну кореляцію відповідно на 12-28-му та 3-8-му тижнях; у групі "нейрогель+НСК" — сильну (7-й тиждень,  $r = -0,80$ ) та помірну (3-й, 8-й, 20-28-й тижні,  $r \leq -0,64$ ) від'ємну кореляцію.

При аналізі кореляції середніх по групі значень ПФ та ПС ЗІК у різні строки спостереження в групі "контроль" виявлено помірну позитивну кореляцію ( $r = 0,38$  за Спірменом,  $r = 0,62$  за Пірсоном); в групі "нейрогель" — сильну позитивну кореляцію ( $r = 0,94$  за Спірменом,  $r = 0,83$  за Пірсоном); в групі "нейрогель+НСК" — помірну позитивну кореляцію ( $r = 0,4$  за Спірменом), що певною мірою відповідало слабій комплексності динаміки обох показників, візуалізованій шляхом простого зіставлення (рис. 3).

## ВИСНОВКИ

1. Імплантація NeuroGel™ у поєднанні з ксеногенними НСК супроводжується значущим підвищенням мимовільного тону м'язів ЗІК протягом 1-2-го тижня після травми у порівнянні з таким при імплантації нативного NeuroGel™. Перевага порівняно з групою "контроль" нівелюється до кінця 3-го тижня, з групою "нейрогель" — утримується до 6-го тижня спостереження.

2. ПС ЗІК у тварин групи "контроль" достовірно переважає показники в групі "нейрогель", починаючи з 12-го тижня експерименту, в групі "нейрогель+НСК" — протягом 6-7-го тижня та 5-8-го місяця експерименту.

3. При ксенотрансплантації НСК у поєднанні з NeuroGel™ у віддаленому періоді травми ПС ЗІК зменшується на 28-му тижні на 0,37 бала ( $p = 0,07$ ).

4. Від'ємну кореляцію між ПС та ПФ ЗІК виявляли в основному при аналізі індивідуальних значень у різних тварин у кожний період спосте-

реження; позитивну — при аналізі середніх по групі значень у різні строки спостереження.

5. Трансплантація НСК у поєднанні з матриксом NeuroGel™ відоміє перебіг синдрому спас-

тичності, створює передумови для його послаблення у віддаленому періоді спінальної травми.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Цимбалюка ВІ, редактор. Нейрохірургія. Вінниця: Нова Книга; 2011.304 с.
2. Wu J, Sun T, Ye C, Yao J, Zhu B, He H. Clinical observation of fetal olfactory ensheathing glia transplantation (OEGT) in patients with complete chronic spinal cord injury. *Cell Transplant.* 2012;21, suppl. 1:33-7.
3. van Gorp S, Leerink M, Kakinohana O, Platoshyn O, Santucci C, Galik J, et al. Amelioration of motor/sensory dysfunction and spasticity in a rat model of acute lumbar spinal cord injury by human neural stem cell transplantation. *Stem Cell Res Ther.* [Internet]. 2013;4, article 57:1-22. Available from: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/scrt209>.
4. Gorassini MA, Norton JA, Nevett-Duchcherer J, Roy FD, Yang JF. Changes in locomotor muscle activity after treadmill training in subjects with incomplete spinal cord injury. *J Neurophysiol.* 2009;101(2):969-79.
5. Gonzenbach RR, Gasser P, Zorner B, Hochreutener E, Dietz V, Schwab ME. Nogo-A antibodies and training reduce muscle spasms in spinal cord-injured rats. *Ann Neurol.* 2010;68(1):48-57.
6. Knikou M. Neural control of locomotion and training-induced plasticity after spinal and cerebral lesions. *Clin Neurophysiol.* 2010;121(10):1655-68.
7. Fouad K, Tetzlaff W. Rehabilitative training and plasticity following spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 2012;235:91-9.
8. D'Amico JM, Condliffe EG, Martins KJB, Bennett DJ, Gorassini MA. Recovery of neuronal and network excitability after spinal cord injury and implications for spasticity. *Front Int Neurosci.* [Internet]. 2014;8, art. 36:1-24. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnint.2014.00036/full>. doi:10.3389/fnint.2014.00036,
9. Stampacchia G., Rustici A., Bigazzi S., Gerini A., Tombini T., Mazzoleni S. Walking with a powered robotic exoskeleton: subjective experience, spasticity and pain in spinal cord injured persons. *NeuroRehabilitation.* 2016;39(2):277-83.
10. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Семенова ВМ, Гридїна НЯ, Сенчик ЮЮ, Величко ОМ, та ін. Модель пересічення половини поперечника спинного мозку. I. Технічні, патоморфологічні та клініко-експериментальні особливості. *Укр нейрохірург журн.* 2016;(2):18-27.
11. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma.* 1995;12(1):1-21.
12. Dong HW, Wang LH, Zhang M, Han JS. Decreased dynorphin A (1-17) in the spinal cord of spastic rats after the compressive injury. *Brain Res Bull.* 2005;67(3):189-95.

