

УДК 617.832-001-089.843-003.93: 616-74: [615.46+611.813-018.1]: 57.085.25: 541.1/.49

DOI 10.22141/2224-0713.6.84.2016.83117

ЦИМБАЛЮК В.І.¹, МЕДВЕДЕВ В.В.², РИБАЧУК О.А.^{3,5}, КОЗЯВКІН В.І.⁴, ДРАГУНЦОВА Н.Г.¹¹ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», м. Київ, Україна²Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна³ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», м. Київ, Україна⁴Міжнародна клініка відновного лікування, м. Трускавець, Україна⁵Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, м. Київ, Україна

ВПЛИВ ІМПЛАНТАЦІЇ NEUROGEL™ В АСОЦІАЦІЇ З КСЕНОГЕННИМИ СТОВБУРОВИМИ КЛІТИНАМИ КІСТКОВОГО МОЗКУ НА ВІДНОВЛЕННЯ РУХОВОЇ ФУНКЦІЇ ЗАДНЬОЇ КІНЦІВКИ ЩУРА ПІСЛЯ СПІНАЛЬНОЇ ТРАВМИ

Резюме. Мета — дослідити вплив імплантації NeuroGel™ в асоціації зі стовбуровими клітинами кісткового мозку (СККМ) на відновлення рухової функції задніх кінцівок щура після експериментальної травми спинного мозку. **Матеріали та методи.** Тварини — білі безпородні щури-самці (5 міс., 250 г); групи: 1-ша — травма спинного мозку ($n = 16$); 2-га — травма спинного мозку + гомотопічна імплантація фрагмента NeuroGel™ ($n = 20$); 3-тя — травма спинного мозку + гомотопічна імплантація фрагмента NeuroGel™, асоційованого з ксеногенними СККМ миші ($n = 16$). Модель травми — лівобічний перетин половини спинного мозку на рівні T₁₁; термін спостереження — 28 тиж., оцінка показника функції задньої інсультальної кінцівки (ПФ ЗІК) — за шкалою Basso — Beattie — Bresnahan. **Результати.** Ксенотрансплантація СККМ у комплексі з NeuroGel™ подовжує в часі, однак зменшує інтенсивність приросту ПФ ЗІК у гострому та ранньому періодах травматичного процесу, пролонгує фазу значимого збільшення ПФ ЗІК до 6-го місяця включно. У групі 1 значуще ($p < 0,05$) збільшення ПФ ЗІК спостерігали лише протягом 3–4-го тижня, у групі 2 — протягом 1–2-го та 5–6-го тижня експерименту, у групі 3 — протягом 1–2-го, 4–5-го та 8–24-го тижня. Станом на 28-й тиждень ПФ ЗІК у групі 1 становив $1,6 \pm 0,5$ бала, у групі 2 — $8,4 \pm 0,9$ бала, у групі 3 — $11,0 \pm 1,5$ бала за шкалою Basso — Beattie — Bresnahan. Значущу різницю ПФ ЗІК між групами 2 та 1 відмічали протягом 2–28-го тижня ($p < 0,001$), між групами 3 та 1 — протягом 1–28-го тижня ($p \leq 0,02$). Максимальну різницю ПФ ЗІК між групами 3 та 2 на користь першої відмічали на 24-му тижні ($p = 0,055$). **Висновок.** Ксенотрансплантація СККМ змінює динаміку відновлення рухової функції паретичної кінцівки за умови імплантації NeuroGel™, обумовлює тенденцію до потенціювання позитивного впливу матриксу на перебіг спінальної травми.

Ключові слова: травма спинного мозку, відновне лікування, тканинна нейроінженерія, штучний тканинний матрикс, стовбурові клітини кісткового мозку.

Адреса для листування з авторами:

Цимбалюк Віталій Іванович
ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова
НАМН України»,
вул. Платона Майбороди, 32, м. Київ, 04050, Україна
E-mail: V.tymbaliuk@i.ua

© Цимбалюк В.І., Медведєв В.В., Рибачук О.А., Козявкін В.І.,
Драгунцова Н.Г., 2016

© «Міжнародний неврологічний журнал», 2016

© Заславський О.Ю., 2016

Вступ

Відновлення функції спинного мозку є стратегічною біомедичною проблемою, вирішення якої пов'язують із вдосконаленням засобів тканинної інженерії [1–4], біонічного протезування [5–7], фізичної реабілітації [8–12], хірургічних методів трансформації периферійної ланки рухової системи та використання систем хронічної електростимуляції [13]. Трансплантаційні нейроінженерні втручання, що використовують для відновлення функції спинного мозку, з урахуванням історичного контексту можна умовно розділити на кілька поколінь: I — трансплантація в зону ураження спинного мозку цільних фрагментів тканини (тканинна нейротрансплантація, у тому числі — периферичних нервів) [14, 15], II — імплантація аморфних пористих матриксів різного походження [16–20], III — імплантація аморфних пористих матриксів в асоціації з одним чи кількома клітинними фенотипами [1, 3], IV — імплантація просторово впорядкованих матриксів [21], у тому числі асоційованих із незрілими клітинами, V — імплантація матриксів четвертого покоління з внутрішніми чи зовнішніми засобами векторизації аксонального росту, наприклад градієнтами атрактантів чи репелентів, ковалентно з'єднаних із матриксом, градієнтами щільності незрілих клітин у середині матриксу, засобами хронічного введення чи продукції атрактантів каудальніше від зони травми (засоби не розроблені; ті, що певною мірою відповідають вказаному принципу — поодинокі [22–25]).

Більшість сучасних робіт спрямовані на пошук засобів відновлення супраспинальних проєкцій на мотонейрони, розташовані нижче травми; відновлення самої популяції мотонейронів важливе у випадку локалізації травми на рівні шийного чи поперечного потовщення — зон інервації кінцівок та діафрагми [26–28].

На сьогодні тканинна нейроінженерія перебуває в стані вичерпання потенціалу III покоління, розробки та апробації IV покоління перелічених нейроінженерних засобів. До переліку найперспективніших видів незрілих клітин, що трансплантують у комплексі з біосумісними матриксами при травмі спинного мозку, відносять мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) різного походження [29–31], багатогранний позитивний ефект яких [32] пов'язують із патотропним хомінгом [32], рідкісним *in vivo* явищем нейрогенного трансдиференціювання [14, 32–34], зі здатністю до злиття з клітинами реципієнтної тканини [35], мікровезикулярним [36, 37], факторним [32] чи контактними [32, 37] впливами. При цьому трансплантація МСК (у зону травми, інтратектально, інтравентрикулярно чи внутрішньовенно) без використання супутніх нейроінженерних засобів покращує функцію задніх кінцівок щура на моделі забиття чи стиснення спинного мозку в середньому на 3,9 бала за шкалою D.M. Basso, M.S. Beattie та J.C. Bresnahan (BBB), тобто на 20 % від обсягу функції інтактної задньої кінцівки [32]. Аналіз деяких експериментальних робіт такого виду [38] дозволяє стверджувати, що ефективність трансплантації МСК у вигляді суспензії є доволі дискусійною, для її верифікації використовують тен-

денційно витончені, чутливіші методи функціонального тестування, оскільки звична шкала BBB не дозволяє виявити значущу перевагу.

У даній роботі наведено результати дослідження ефективності втручання III покоління — імплантації фрагментів аморфного макропористого біосумісного матриксу NeuroGel™ [16–19, 39, 40], асоційованого з ксеногенними стовбуровими клітинами кісткового мозку (СККМ), — сукупності гемопоетичних та стромальних стовбурових клітин.

Матеріали та методи

Дослідження виконано з дотриманням чинних норм біоетики на білих безпородних щурах-самцях (віварії Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України та ДУ «Інститут нейрохірургії імені акад. А.П. Ромоданова НАМН України») віком 5 міс., масою 250 г, утримуваних у стандартних умовах. Сформовано 3 експериментальні групи: контроль — травма спинного мозку (n = 16); «нейрогель» — травма спинного мозку + гомотопічна імплантація фрагмента NeuroGel™ (n = 20); «нейрогель + СККМ» — травма спинного мозку + гомотопічна імплантація фрагмента NeuroGel™, асоційованого із СККМ миші (n = 16).

Макропористий гідрогель NeuroGel™ (полі[N-(2-гідроксипропіл)-метакриламід]) є комерційним препаратом, синтезований у лабораторії E. Pinet (FISO Technologies Inc., Квебек, Канада) шляхом гетерогенної полімеризації та асоціації, має пори розміром 2–300 нм [17].

СККМ отримували від мишей-самців лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J (трансгенних за геном зеленого білка флуорисценції) віком 3 міс., масою 40 г, шляхом вимивання зі стегнових кісток середовищем RPMI-1640 (Sigma, США). Із цією метою в глибоко анестезованій тварини (внутрішньоочеревинне введення суміші розчинів ксилазину (Sedazin, Biowet, Польща; 15 мг/кг) та кетаміну (Calypsol, «Гедеон Ріхтер А.О.», Угорщина; 70 мг/кг)) видаляли обидві стегнові кістки шляхом перетину в ділянках колінного та кульшового суглобів, очищали від м'яких тканин, поміщали в 70 % розчин етилового спирту, обидва епіфізарні кінці кожної кістки стинали, під тиском через діафіз за допомогою інсулінового шприца пропускали рідке середовище RPMI-1640, вимиваючи вміст порожнини кістки. Для підрахунку кількості клітин об'ємну одиницю отриманого змиву змішували з 3% розчином оцтової кислоти в пропорції 1 : 20 і переглядали в камері Горяєва. Отриману суспензію вносили в культуральний флакон із площею поверхні 25 см² або на чашку Петрі діаметром 60 мм, загальна кількість клітин становила не менше 10 млн. У подальшому клітини висівали по $4 \cdot 10^5$ клітин/см² та культивували протягом 2 тижнів, змінюючи поживне середовище кожні 2–3 доби, в умовах зволоженого повітря з 5% CO₂ при температурі 37 °С. Перший пасаж проводили при 80% конфлуентності моношару, знімаючи клітини за допомогою 0,02% розчину трипсину/версену (Sigma, США), та пересаджували їх у нові флакони зі щільністю $2 \cdot 10^4$ клітин/см². СККМ на другий пасаж висаджували

в 4-лункові планшети по $3 \cdot 10^4$ у кожен лунку та культивували протягом 7 діб. Частку життєздатних клітин у суспензії визначали на лазерному цитофлюориметр-сортері BD FACSAria (Becton Dickinson, США) за рівнем накопичення в клітині з денатурованою, фрагментованою чи деспіралізованою ДНК флуоресцентного ДНК-зонда 7-аміноактиноміцину. Відсоток життєздатних клітин у культурі становив $94,1 \pm 0,6\%$.

СККМ культивували за стандартних умов у середовищі, що містило 42,5 % RPMI-1640 (Sigma, США), 42,5 % DMEM, 15 % FBS, 2 мМ L-глутаміну, 1 нг/мл основного фактора росту фібробластів (Sigma, США). Фенотипування клітин за маркерами CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD117 проводили з використанням моноклональних антитіл до мембранних антигенів миші, мічених флуорохромами (Becton Dickinson, США). Клітини культури досліджували на здатність до направленої диференціювання в адипогенному та остеогенному напрямках. Адипогенне диференціювання включало культивування в середовищі DMEM із високим вмістом глюкози (4,5 г/л; Sigma, США), 5% конячої сироватки та 10% ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), 1 мкл дексаметазону (Sigma, США), 200 мкл індометацину (Sigma, США), 500 мкл ізобутилметилксантину (Sigma, США) та 5 мкг/мл інсуліну (Sigma, США); середовище змінювали тричі на тиждень; тривалість диференціювання — 14 діб. Середовище для остеогенного диференціювання включало: DMEM із низьким вмістом глюкози (1 г/л; Sigma, США), 10 % ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), 100 нМ дексаметазону (Sigma, США), 10 мМ β -гліцерофосфату (Sigma, США) та 50 мкг/мл аскорбат-2-фосфату (Sigma, США). Середовище змінювали тричі на тиждень; тривалість диференціювання — 30 діб. За вивченими ознаками отримана культура відповідала мінімальним критеріям культури СККМ.

Через 5 діб культивування у середовище уклали фрагменти NeuroGel™ розміром 16 мм³, культивували протягом 10 діб, до моменту трансплантації. Фрагменти розтинали на рівновеликі частини розміром 2 мм³, одну з яких фіксували для імуногістохімічної верифікації асоційованих клітин у товщі матриксу, інші використовували для трансплантації. За даними імуногістохімічного дослідження, СККМ добре проникають у товщу гелю, колонізують наявні в ньому пори, проявляють ознаки активної життєдіяльності та диференціювання.

Модель спінальної травми — лівобічне пересічення половини спинного мозку на рівні T₁₁ [41]. Оперативні втручання здійснювали в умовах загального знеболювання (див. вище), після нанесення травми спинного мозку в тварин групи «нейрогель + СККМ» у рану спинного мозку імплантували фрагмент NeuroGel™, асоційований із СККМ, розміром 2 мм³, у тварин групи «нейрогель» — фрагмент нативного NeuroGel™ аналогічного розміру. У тварин усіх груп вікно доступу в хребтовий канал 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% спирто-

вим розчином йоду. У задню шийну ділянку підшкірно вводили розчин біциліну-5 (ПАТ «Київмедпрепарат»; ~150–200 тис. ОД на 1 тварину), внутрішньоочеревинно — розчин дексаметазону 6 мг/кг (KRKA, Словенія). Після вказаних маніпуляцій тварин протягом 2–4 годин утримували в приміщенні з підвищеною температурою повітря (30 °С), надалі — у клітках по 3–6 особин при середній температурі 21–24 °С.

Показник функції (ПФ) задньої іпсилатеральної щодо зони травми кінцівки (ЗІК) визначали згідно зі шкалою BBB [41, 42] протягом перших 2 місяців — наприкінці кожного тижня, у подальшому — наприкінці кожного місяця.

Тривалість спостереження для усіх тварин становила 28 тижнів; виведення тварин з експерименту здійснювали шляхом передозування вказаних вище наркотичних препаратів.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програмного пакета Statistica 10.0, для встановлення вірогідності різниці середніх значень ПФ ЗІК між групами використовували U-тест Манна — Уїтні, результати оцінки вірогідності подавали у вигляді значень показника p із звичним їх трактуванням. Вірогідність змін середніх значень ПФ ЗІК у межах групи впродовж експерименту оцінювали за Вілкоксоном.

Результати та їх обговорення

Імплантація NeuroGel™ станом на 28-й тиждень експерименту призводить до формування підгруп у розподілі значень ПФ ЗІК із квазінормальним розподілом у найбільшій із них (рис. 1а, б); імплантація NeuroGel™ у комплексі з СККМ не нормалізує розподіл ПФ ЗІК (рис. 1в).

Для динаміки ПФ ЗІК, середнього по групі контролю (рис. 2), характерна наявність двох фаз: протягом 1-го місяця спостерігали збільшення ПФ ЗІК до $1,7 \pm 0,5$ бала за BBB (приріст вірогідний упродовж 3-го та 2-го тижнів), рівновеликий невірогідний регрес протягом 5–8-го тижня, повторне збільшення протягом 12–16-го тижня ($p < 0,05$ порівняно зі значенням на 8-му та 16-му тижнях) та стабілізацію. Станом на 28-й тиждень експерименту ПФ ЗІК становив $1,6 \pm 0,5$ бала за BBB, що під час локомоції по горизонтальній поверхні відповідає наявності поширених рухів лише в одному із суглобів ЗІК за наявності слабких рухів у ще одному суглобі ЗІК [41, 42].

Для динаміки ПФ ЗІК, середнього по групі «нейрогель» (рис. 2), теж характерна наявність двох фаз: протягом 1–3-го тижня спостерігали значуще ($p \leq 0,001$) збільшення, що до кінця 5-го тижня частково нівелювалося ($p > 0,05$); протягом 6–12-го тижня спостерігали повторне збільшення (значуще протягом 7–8-го тижня, $p < 0,05$), яке з 16-го тижня змінювалося стабілізацією. ПФ ЗІК станом на 28-й тиждень становив $8,4 \pm 0,9$ бала за BBB ($p < 10^{-4}$ порівняно з групою контролю), що під час локомоції по горизонтальній поверхні відповідає наявності крокових синергій ЗІК подошвою вниз (плантарна установка) без підтримання маси тіла [41, 42].

Двофазність є властивою ознакою також і для ПФ ЗІК, середнього по групі «нейрогель + СККМ»: перша фаза триває протягом 1–2-го тижня, друга — протягом 3–28-го тижня. Протягом 2-го тижня спостерігали найінтенсивніший значущий приріст ПФ ЗІК (з $2,5 \pm 0,5$ до $5,7 \pm 1,0$ бала за BVB, $p = 0,001$), протягом 4–5-го тижня — менш інтенсивне, проте значуще збільшення ($p = 0,014$; $p = 0,002$), протягом 6–7-го тижня — невірогідне збільшення, протягом 8–24-го — поступове значуще збільшення ПФ ЗІК до $11,0 \pm 1,5$ бала за BVB ($p < 0,05$). Значення ПФ ЗІК станом на 28-й тиждень відповідає руховій активності, при якій тварина при русі по горизонтальній поверхні часто або постійно ($> 50\%$

часу) підтримує масу тіла, наявна плантарна постановка стопи, однак координація крокового ритму передніх і задніх кінцівок відсутня [41, 42].

Значущою особливістю динаміки ПФ ЗІК у групі «нейрогель + СККМ» є лінійний характер збільшення як протягом першої, так і протягом другої фази, швидкість приросту протягом другої фази стала, втричі поступається швидкості приросту, характерній для першої фази.

Значущу різницю ПФ ЗІК між групами «нейрогель» та «контроль» відмічали протягом 2–28-го тижня ($p \leq 4 \cdot 10^{-5}$), між групами «нейрогель + СККМ» та контролю — протягом 1–28-го тижня ($p \leq 0,02$). Максимальну фактичну різницю між групами «нейрогель + СККМ» та «нейрогель» на користь першої відмічали на 24-му тижні ($p = 0,055$).

Для висунення прийнятних припущень щодо механізмів зміни впливу імплантації NeuroGel™ на перебіг спінальної травми за наявності ксеногенних СККМ слід урахувати, що будь-який клітинний нейротрансплантат, зокрема мезенхімальної генеалогії, є тригером низки імунних реакцій, потенціює і подовжує тканинне запалення в перифокальній зоні [43–45], причому результат таких реакцій щодо реципієнтної тканини спинного мозку неоднозначний. Позитивний ефект СККМ пов'язують з їх здатністю модулювати імунні реакції в зоні травми шляхом продукції низки цитокінів, активувати антиоксидантні системи (глутатіонасоційованих ферментів, каталази та супероксиддисмутази) клітин перифокальної зони, чинити захисний вплив на аксони, потенціювати їх спраутинг та мієлінізацію [46]. З урахуванням того, що NeuroGel™ чинить подібний вплив на перебіг спінальної травми, що включає обмеження травматичної геморагії, запальних реакцій, активацію цитопротекторних систем, зокрема експресію білків теплового шоку [40], потенціювання спраутингу та росту нервових волокон [17, 19], видається обґрунтованим висновок щодо синергії обох нейроінженерних засобів за сумісним їх застосуванням. Для детального вивчення механізмів взаємодії необхідні подальші дослідження із залученням електрофізіологічного, імуногістохімічного та молекулярно-генетичного методів.

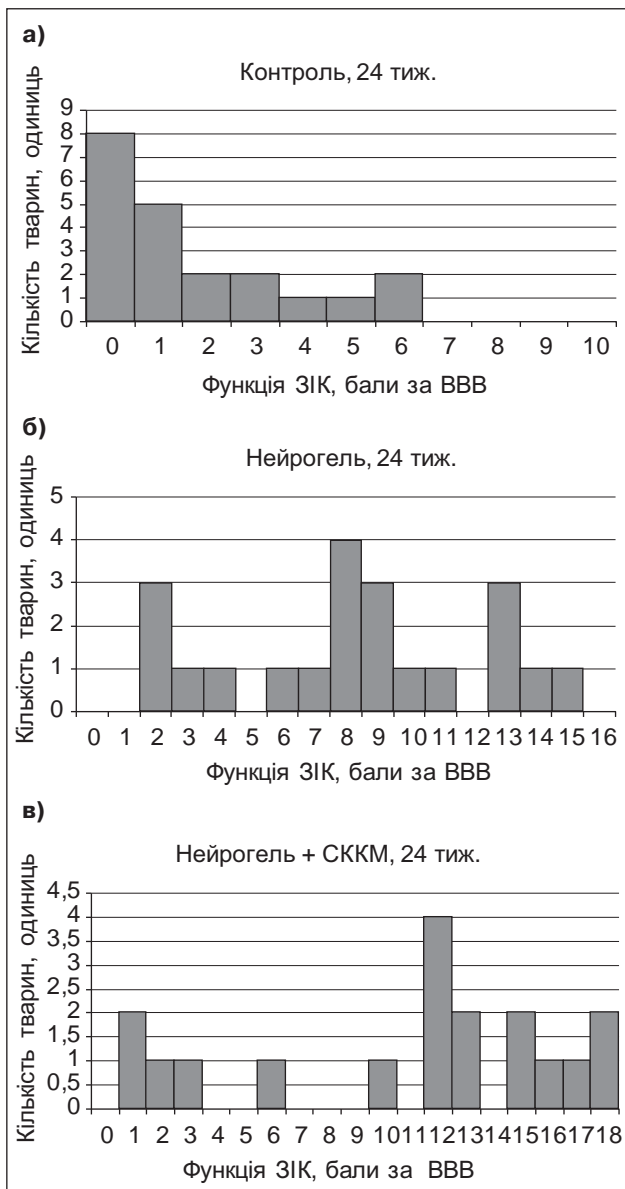


Рисунок 1. Розподіл значень показника функції ЗІК в експериментальних групах на 28-му тижні спостереження

Примітка: у випадку нецілого значення ПФ ЗІК тварину зараховували до обох суміжних цілих значень.

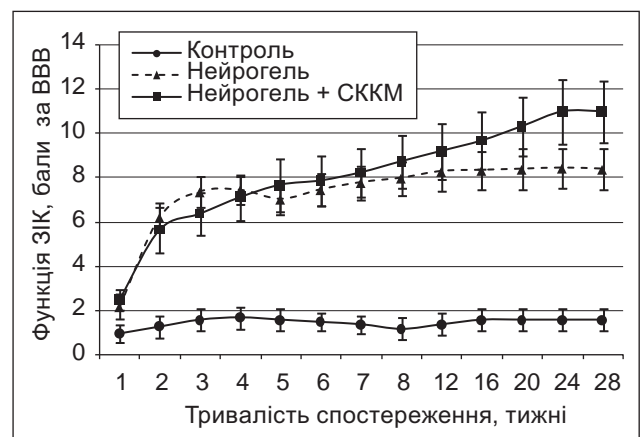


Рисунок 2. Динаміка ПФ ЗІК у різних експериментальних групах протягом періоду спостереження (пояснення в тексті)

Висновки

1. Ксенотрансплантація СККМ у комплексі з NeuroGel™ подовжує в часі, однак зменшує інтенсивність приросту ПФ ЗІК у гострому та ранньому періодах травматичного процесу, пролонгує фазу значимого збільшення рухової функції до 6-го місяця включно.

2. Незважаючи на подовження фази значущого збільшення, станом на 28-й тиждень експерименту ПФ ЗІК групи «нейрогель + СККМ» сягав 11 балів за ВВВ, невірогідно переважаючи показник групи «нейрогель» на 2,6 бала за ВВВ.

3. СККМ загалом змінює динаміку відновлення рухової функції паретичної кінцівки за умови імплантації NeuroGel™, формує тенденцію до потенціювання позитивного впливу апробованого матриксу на перебіг спінальної травми.

Список літератури

1. *Hydrogels and cell based therapies in spinal cord injury regeneration [Text]* / R.C. Assunção-Silva et al. // *Stem Cells International*. — 2015. — Vol. 2015, Article 948040. — P. 1-24.
2. *Siebert J.R. Biomaterial approaches to enhancing neurorestoration after spinal cord injury: strategies for overcoming inherent biological obstacles [Text]* / J.R. Siebert, A.M. Eade, D.J. Osterhout // *BioMed Res. Int.* — 2015. — Vol. 2015, Article 752572. — P. 1-20.
3. *Tsintou M. Advances in regenerative therapies for spinal cord injury: a biomaterials approach [Text]* / M. Tsintou, K. Dalamagkas, A.M. Seifalian // *Neural. Regen. Res.* — 2015. — Vol. 10, № 5. — P. 726-742.
4. *Using extracellular matrix for regenerative medicine in the spinal cord [Text]* / Volpato F.Z. et al. // *Biomaterials*. — 2013. — Vol. 34, № 21. — P. 4945-4955.
5. *Gait speed using powered robotic exoskeletons after spinal cord injury: a systematic review and correlational study* / D.R. Louie, J.J. Eng, T. Lam, SCIRE Research Team // *J. Neuroeng. Rehabil.* — 2015. — Vol. 12, Article 82. — P. 1-10.
6. *Control of an ambulatory exoskeleton with a brain-machine interface for spinal cord injury gait rehabilitation* / E. López-Larraz et al. // *Front. Neurosci.* — 2016. — Vol. 10, Article 359. — P. 1-15.
7. *Miller L.E. Clinical effectiveness and safety of powered exoskeleton-assisted walking in patients with spinal cord injury: systematic review with metaanalysis* / L.E. Miller, A.K. Zimmermann, W.G. Herbert // *Med. Devices (Auckl)*. — 2016. — Vol. 9. — P. 455-466.
8. *Changes in locomotor muscle activity after treadmill training in subjects with incomplete spinal cord injury [Text]* / M.A. Gorassini et al. // *J. Neurophysiol.* — 2009. — Vol. 101, № 2. — P. 969-979.
9. *Nogo-A antibodies and training reduce muscle spasms in spinal cord-injured rats [Text]* / R.R. Gonzenbach et al. // *Ann. Neurol.* — 2010. — Vol. 68, № 1. — P. 48-57.
10. *Fouad K. Rehabilitative training and plasticity following spinal cord injury [Text]* / K. Fouad, W. Tetzlaff // *Exp. Neurol.* — 2012. — Vol. 235. — P. 91-99.
11. *Knikou M. Neural control of locomotion and training-induced plasticity after spinal and cerebral lesions [Text]* / M. Knikou // *Clin. Neurophysiol.* — 2010. — Vol. 121, № 10. — P. 1655-1668.
12. *Recovery of neuronal and network excitability after spinal cord injury and implications for spasticity [Text]* / J.M. D'Amico et al. // *Front. Int. Neurosci.* — 2014. — Vol. 8, Article 36. — P. 1-24.

13. *Цимбалюк В.І. Реконструктивно-відновна хірургія спинного мозку [Текст]* / В.І. Цимбалюк, Ю.Я. Ямиський. — К.: Авіцена, 2009. — 248 с.

14. *Цимбалюк В.І. Нейрогенные стволовые клетки [Текст]* / В.І. Цимбалюк, В.В. Медведев. — К.: Коваль, 2005. — 596 с.

15. *Neurorehabilitation with neural transplantation [Text]* / M. Döbrössi, et al. // *Neurorehabil. Neural. Repair*. — 2010. — Vol. 24, № 8. — P. 692-701.

16. *Spinal cord reconstruction using NeuroGel implants and functional recovery after chronic injury [Text]* / S. Woerly et al. // *J. Neurosci. Res.* — 2001. — Vol. 66, № 6. — P. 1187-1197.

17. *Reconstruction of the transected cat spinal cord following NeuroGel implantation: axonal tracing, immunohistochemical and ultrastructural studies [Text]* / S. Woerly et al. // *Int. J. Dev. Neurosci.* — 2001. — Vol. 19, № 1. — P. 63-83.

18. *Spinal cord repair with PHPMA hydrogel containing RGD peptides (NeuroGel) [Text]* / S. Woerly et al. // *Biomaterials*. — 2001. — Vol. 22, № 10. — P. 1095-1111.

19. *Цимбалюк В.І. Спинной мозг. Элегия надежды: монография [Текст]* / В.І. Цимбалюк, В.В. Медведев. — Винница: Нова Книга, 2010. — 944 с.

20. *Kaneko A.A. 3D nanofibrous hydrogel and collagen sponge scaffold promotes locomotor functional recovery, spinal repair, and neuronal regeneration after complete transection of the spinal cord in adult rats [Text]* / A. Kaneko, A. Matsushita, Y. Sankai // *Biomed Mater.* — 2015. — Vol. 10, № 1. — ID: 015008, doi: 10.1088/1748-6041/10/1/015008.

21. *Multichannel silk protein/laminin grafts for spinal cord injury repair [Text]* / Q. Zhang et al. // *J. Biomed. Mater. Res. A*. — 2016, Jul. 30 [Epub ahead of print]. — doi: 10.1002/jbm.a.35851.

22. *Neurotrophin-3 gradients established by lentiviral gene delivery promote short-distance axonal bridging beyond cellular grafts in the injured spinal cord [Text]* / L. Taylor, L. Jones, M.H. Tuszynski, A. Blesch // *J. Neurosci.* — 2006. — Vol. 26, № 38. — P. 9713-9721.

23. *Vector-induced NT-3 expression in rats promotes collateral growth of injured corticospinal tract axons far rostral to a spinal cord injury [Text]* / N. Weishaupt et al. // *Neuroscience*. — 2014. — Vol. 272. — P. 65-75.

24. *Exogenous neuritin promotes nerve regeneration after acute spinal cord injury in rats [Text]* / R. Gao et al. // *Hum. Gene Ther.* — 2016. — Vol. 27, № 7. — P. 544-554.

25. *Sustained release of Neurotrophin-3 via calcium phosphate-coated sutures promotes axonal regeneration after spinal cord injury [Text]* / A. Hanna et al. // *J. Neurosci. Res.* — 2016. — Vol. 94, № 7. — P. 645-652.

26. *Human iPS cell-derived astrocyte transplants preserve respiratory function after spinal cord injury [Text]* / K. Li et al. // *Exp. Neurol.* — 2015. — Vol. 271. — P. 479-492.

27. *Respiratory outcomes after mid-cervical transplantation of embryonic medullary cells in rats with cervical spinal cord injury [Text]* / B.J. Dougherty et al. // *Exp. Neurol.* — 2016. — Vol. 278. — P. 22-26.

28. *Functional recovery after cervical spinal cord injury: role of neurotrophin and glutamatergic signaling in phrenic motoneurons [Text]* / L.C. Gill, H.M. Gransee, G.C. Sieck, C.B. Mantilla // *Respir. Physiol. Neurobiol.* — 2016. — Vol. 226. — P. 128-136.

29. Ex-vivo expanded human blood-derived CD133+ cells promote repair of injured spinal cord [Text] / N. Kamei et al. // *J. Neurol. Sci.* — 2013. — Vol. 328, № 1–2. — P. 41–50.
30. Safety and neurological assessments after autologous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells in subjects with chronic spinal cord injury [Text] / Mendonça M.V.P. et al. // *Stem Cell Res. Ther.* — 2014. — Vol. 5, Art. 126. — P. 1–11.
31. Transplantation of human amniotic mesenchymal stem cells promotes functional recovery in a rat model of traumatic spinal cord injury [Text] / H.-L. Zhou et al. // *Neurochem. Res.* — 2016, Jun 28 [Epub ahead of print]. — doi: 10.1007/s11064-016-1987-9.
32. Oliveri R.S. Mesenchymal stem cells improve locomotor recovery in traumatic spinal cord injury: Systematic review with meta-analyses of rat models [Text] / R.S. Oliveri, S. Bello, F. Biering-Sørensen // *Neurobiol. Dis.* — 2014. — Vol. 62. — P. 338–353.
33. Dennie D. Migration of bone marrow progenitor cells in the adult brain of rats and rabbits [Text] / D. Dennie, J. — P. Louboutin, D.S. Strayer // *World J. Stem Cells.* — 2016. — Vol. 8, № 4. — P. 136–157.
34. Huang B. Fate determination in mesenchymal stem cells: a perspective from histone-modifying enzymes [Text] / B. Huang, G. Li, X.H. Jiang // *Stem Cell Res. Ther.* — 2015. — Vol. 6, Article 35. — P. 1–9.
35. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation [Text] / N. Noiseux et al. // *Mol. Ther.* — 2006. — Vol. 14, № 6. — P. 840–850.
36. Xin H. Exosomes/miRNAs as mediating cell-based therapy of stroke [Text] / H. Xin, Y. Li, M. Chopp // *Front. Cell. Neurosci.* — 2014. — Vol. 8, Article 377. — P. 1–11.
37. Karantalis V. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease [Text] / V. Karantalis, J.M. Hare // *Circ. Res.* — 2015. — Vol. 116, № 8. — P. 1413–1430.
38. Bone marrow mesenchymal stromal cells and olfactory ensheathing cells transplantation after spinal cord injury — a morphological and functional comparison in rats [Text] / A. Torres-Espin, E. Redondo-Castro, J. Hernandez, X. Navarro // *Eur. J. Neurosci.* — 2014. — Vol. 39. — P. 1704–1717.
39. Prevention of gliotic scar formation by NeuroGel allows partial endogenous repair of transected cat spinal cord [Text] / S. Woerly et al. // *J. Neurosci. Res.* — 2004. — Vol. 75, № 2. — P. 262–272.
40. Expression of heat shock protein (HSP)-25 and HSP-32 in the rat spinal cord reconstructed with Neurogel [Text] / S. Woerly et al. // *Neurochem. Res.* — 2005. — Vol. 30, № 6–7. — P. 721–735.
41. Модель пересічення половини поперечника спинного мозку. I. Технічні, патоморфологічні та клініко-експериментальні особливості [Текст] / В.І. Цимбалюк та ін. // *Укр. нейрохірург. журнал.* — 2016. — № 2. — С. 18–27.
42. Basso D.M. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [Text] / D.M. Basso, M.S. Beattie, J.C. Bresnahan // *J. Neurotrauma.* — 1995. — Vol. 12, № 1. — P. 1–21.
43. Early inflammatory responses following cell grafting in the CNS trigger activation of the subventricular zone: a proposed model of sequential cellular events [Text] / J. Praet et al. // *Cell Transplant.* — 2015. — Vol. 24, № 8. — P. 1481–1492.
44. Immunosuppression of allogenic mesenchymal stem cells transplantation after spinal cord injury improves graft survival and beneficial outcomes [Text] / A. Torres-Espin, E. Redondo-Castro, J. Hernandez, X. Navarro // *J. Neurotrauma.* — 2015. — Vol. 32. — P. 367–380.
45. Immune remodelling of stromal cell grafts in the central nervous system: therapeutic inflammation or (harmless) side-effect? [Text] / D. Le Blon et al. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* — 2016 [Epub ahead of print].
46. Concise review: spinal cord injuries — how could adult mesenchymal and neural crest stem cells take up the challenge? [Text] / V. Neirinckx et al. // *Stem Cells.* — 2014. — Vol. 32, № 4. — P. 829–843.

Отримано 28.08.16 ■

Цимбалюк В.І.¹, Медведєв В.В.², Рыбачук О.А.^{3,5}, Козьявкін В.А.⁴, Драгунцова Н.Г.¹¹ГУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», г. Київ, Україна²Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, г. Київ, Україна³ГУ «Інститут генетической и регенеративной медицины НАМН України», г. Київ, Україна⁴Международная клиника восстановительного лечения, г. Трускавец, Україна⁵Інститут фізіології імені А.А. Богомольца НАН України, г. Київ, Україна

ВЛИЯНИЕ ИМПЛАНТАЦИИ NEUROGEL™ В АССОЦИИИ С КСЕНОГЕННЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ КОСТНОГО МОЗГА НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ ДВИГАТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ЗАДНЕЙ КОНЕЧНОСТИ КРЫСЫ ПОСЛЕ СПИНАЛЬНОЙ ТРАВМЫ

Резюме. *Цель* — изучить влияние имплантации NeuroGel™ в ассоциации со стволовыми клетками костного мозга (СККМ) на восстановление двигательной функции задних конечностей крысы после экспериментальной травмы спинного мозга. *Материалы и методы.* Животные — белые беспородные крысы-самцы (5 мес., 250 г); группы: 1-я — травма спинного мозга (n = 16); 2-я — травма спинного мозга + гомотопическая имплантация фрагмента NeuroGel™ (n = 20); 3 — травма спинного мозга + гомотопическая имплантация фрагмента NeuroGel™, ассоциированного с СККМ мыши (n = 16). Модель травмы — левостороннее пересечение половины спинного мозга на уровне T₁₁; длительность наблюдения — 28 нед., оценка показателя функции

задней ипсилатеральной конечности (ПФ ЗИК) — по шкале Basso — Beattie — Bresnahan. *Результаты.* Ксенотрансплантация СККМ в комплексе с NeuroGel™ удлиняет во времени, но уменьшает интенсивность прироста ПФ ЗИК в остром и раннем периодах травматического процесса, пролонгирует фазу значимого роста двигательной функции до 6-го месяца включительно. В группе 1 достоверное (p < 0,05) увеличение ПФ ЗИК наблюдали лишь в течение 3–4-й недели, в группе 2 — в течение 1–2-й и 5–6-й недель, в группе 3 — в течение 1–2-й, 4–5-й и 8–24-й недель. По состоянию на 28-ю неделю ПФ ЗИК в группе 1 составил 1,6 ± 0,5 балла, в группе 2 — 8,4 ± 0,9 балла, в группе 3 — 11,0 ± 1,5 балла по шкале Basso — Beattie —

Bresnahan. Достоверную разницу ПФ ЗИК между группами 2 и 1 отмечали в течение 2–28-й недель ($p < 0,001$), между группами 3 и 1 — в течение 1–28-й недель ($p \leq 0,02$). Максимальную разницу ПФ ЗИК групп 3 и 2 в пользу первой отмечали на 24-й неделе ($p = 0,055$). **Вывод.** Ксенотрансплантация СККМ в комплексе с NeuroGel™ в целом изменяет динамику восстановления

двигательной функции паретической конечности, обуславливает тенденцию к потенцированию положительного влияния матрикса на течение спинальной травмы.

Ключевые слова: травма спинного мозга, восстановительное лечение, тканевая нейроинженерия, искусственный тканевый матрикс, стволовые клетки костного мозга.

Tsybaliuk V.I.¹, Medvediev V.V.², Rybachuk O.A.^{3,5}, Kozyavkin V.I.⁴, Draguntsova N.G.¹

¹SI «Institute of Neurosurgery named after Acad. A.P. Romodanov of NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine

²SI «Institute of Genetic And Regenerative Medicine of NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine

³Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

⁴International Clinic of Rehabilitation, Truskavets, Ukraine

⁵Bogomolets Institute of Physiology, Kyiv, Ukraine

THE EFFECT OF IMPLANTATION OF NEUROGEL™ USED WITH XENOGENIC BONE MARROW STEM CELLS ON MOTOR FUNCTION RECOVERY AFTER EXPERIMENTAL SPINAL CORD INJURY

Summary. Objective. To examine NeuroGel™ with bone marrow stem cells (BMSC) implantation on rat's hind limb motor function recovery after experimental spinal cord injury. **Materials and methods.** Animals: outbred albino male rats (5.5 months, 250 g); experimental groups: 1st — spinal cord injury only (n = 16); 2nd — spinal cord injury + immediate homotopical transplantation of NeuroGel™ (n = 20); 3rd — spinal cord injury + analogous transplantation of NeuroGel™ in association with adult mouse BMSC (n = 16). Model of injury: left-side spinal cord hemisection at T11; the ipsilateral hindlimb function indicator (IHL FI) was detected using the Basso — Beattie — Bresnahan scale (BBB). **Results.** Xenotransplantation of the BMSC together with NeuroGel™ extends the period, but reduces the intensity of IHL FI growth in the acute and early period of traumatic process, prolongs a phase of significant IHL FI growth to the 6th month inclusive. In group 1

significant ($p < 0.05$) increase of IHL FI was observed during 3rd — 4th week only, in group 2 — during 1st — 2nd and 5th — 6th week, in group 3 — during 1st — 2nd, 4th — 5th and 8th — 24th week. At the 28th week in group 1 IHL FI was 1.6 ± 0.5 points, in group 2 — 8.4 ± 0.9 points, in group 3 — 11.0 ± 1.5 points by BBB scale. Significant difference in IHL FI between groups 2 and 1 was being registered for 2nd — 28th weeks ($p < 0.001$), between groups 3 and 1 — during 1st — 28th week ($p \leq 0.02$). The maximal difference between groups 2 and 3 in favor of the first one was noted on the 24th week ($p = 0.055$). **Conclusion.** BMSC-xenotransplantation in association with NeuroGel™ changes the dynamics of the paretic limb function recovery, it provides a tendency towards intensification of the NeuroGel™ positive impact on the course of the spinal cord injury.

Key words: spinal cord injury, recovery treatment, tissue neuroengineering, artificial tissue scaffold, bone marrow stem cells.