

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

DOI: 10.22141/2224-0713.7.85.2016.86913

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 ДИНАМІКУ СИНДРОМУ СПАСТИЧНОСТІ ПІСЛЯ СПІНАЛЬНОЇ ТРАВМИ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Резюме. Мета — дослідити вплив імплантації NeuroGel™ в асоціації зі стовбуровими клітинами кісткового мозку (СККМ) на динаміку спастичності в паретичній задній кінцівці щури після 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 зі СККМ миши ($n = 16$). Модель травми — лівобічний перетин половини спинного мозку на рівні T₁₁; термін спостереження — 28 тиж., оцінку показника функції (ПФ) та показника спастичності (ПС) задньої інсилатеральної кінцівки (ЗІК) проводили за шкалами Basso — Beattie — Bresnahan та Ashworth відповідно. **Результати.** ПС ЗІК станом на 28-й тиждень експерименту в групі 1 становив $2,5 \pm 0,4$ бала за шкалою Ashworth, у групах 2 і 3 — $1,7 \pm 0,2$ бала та $1,7 \pm 0,3$ бала відповідно. Значущу різницю між значеннями ПС ЗІК у групах 1 і 2 виявили на 7-му добу, на 5–7-му та 12–24-му тижнях, між групами 1 і 3 — на 7-му добу, на 7–8-му та 16-му тижнях; максимальну різницю ПС ЗІК між групами 2 і 3 — на 12-му тижні спостереження ($p = 0,059$). Динаміка ПС ЗІК у групах 2 і 3 однотипна, відрізняється відсутністю значущого приросту протягом 3-го тижня, наявністю значущого приросту протягом 3–4-го місяця. На відміну від групи 1 у групах 2 і 3 при від'ємній кореляції індивідуальних значень ПФ та ПС ЗІК у межах кожного з термінів спостереження визначали сильну додатну кореляцію значень обох показників, усереднених по групах, упродовж загального періоду спостереження. **Висновок.** Ксенотрансплантація СККМ у комплексі з NeuroGel™ не призводить до значущих змін рівня спастичності порівняно з ізольованою імплантацією NeuroGel™, однак суттєво змінює динаміку цього ускладнення спінальної травми.

Ключові слова: травма спинного мозку; синдром спастичності; відновне лікування; тканинна нейроінженерія; штучний тканинний матрикс; стовбурові клітини кісткового мозку

Вступ

Спастичність — частий неврологічний розлад, елемент синдрому центрального парезу, притаманний для 85 % випадків розсіяного склерозу [1], 35 % — гострого порушення мозкового кровообігу

з персистуючою геміплегією [2], 72–91 % — дитячого церебрального паралічу [3], 45–78 % — спінальної травми [4–8]. Тяжкі форми спастичності з розвитком контрактур у паретичних кінцівках протягом 1-го року спостерігають в 11–43 % спінальних хворих [9].

Станом на 2005 рік у світі проживало 2,5 млн осіб, які перенесли хребетно-спинномозкову травму [10]. Отже, контингент спінальних хворих, які страждають від синдрому спастичності, становить тепер не менше 2 млн осіб.

Традиційне визначення спастичності (за Lance J.W., 1980): це руховий розлад, для якого характерне посилення рефлексів розтягу (міотатичних рефлексів), обумовлене надмірною збудливістю нейронального апарату, є компонентом синдрому центрального парезу [11]. Сучасні дані свідчать, що цей розлад є наслідком неадекватної компенсації втрати збуджуючих супраспінальних впливів на мотонейрони нижче рівня травми. Нормальна функція мотонейрона полягає в чітко окресленому в часі підсиленні точних низхідних супраспінальних впливів до величини, достатньої для активації м'яза. Це забезпечується здатністю мотонейронів у відповідь на супраспінальні серотонін- та норадренергічні впливи, синхронні до тригерних кірково-спинномозкових, генерувати так звані платоподібні підпорогові деполяризаційні потенціали; за наявності платодеполяризації поодинокі збуджувальні кірково-спинномозкові впливи призводять до кількасекундного розрядження мотонейронів у вигляді пачок потенціалів дії (ПД), достатнього для формування збуджуючого електричного впливу на м'яз задовільної інтенсивності [12, 13]. Після спінальної травми денервовані мотонейрони поступово набувають здатності генерувати платоподібні деполяризаційні потенціали незалежно від супраспінальних впливів [13]. На початкових етапах травми, під час нівелювання спінального шоку, збільшення збудливості мотонейронів нижче рівня травми пов'язане з підвищенням експресії субодонічних NMDA-рецепторів глутамату [14], збільшенням активності глутаматергічних аферентів мотонейронів [15]. Починаючи з третього тижня (не раніше 14-ї доби, зазвичай через кілька тижнів після спінальної травми) [13, 16] провідну роль відіграє механізм зміни редагування пре-мРНК серотонінових 5-HT_{2C} і, ймовірно, норадреналінових $\alpha 1$ -рецепторів мотонейрона [17–19]. У певних точках пре-мРНК деаміназа ADAR2 (adenine deaminase acting on RNA 2) перетворює аденозин в інозин, що системою трансляції розпізнається як гуанозин, що змінює амінокислотну послідовність і зменшує афінність рецептора до ліганду — нередагований варіант має значну конституційну, незалежну від наявності ліганду активність [16, 20, 21]. За умов спінальної травми експресія ADAR2 у тканині спинного мозку зменшується [18].

З урахуванням наведених даних актуалізуються дослідження впливу нейроінженерних втручань на перебіг синдрому спастичності, оскільки їх ефективність щодо відновлення функції травмованого спинного мозку зазвичай пов'язують із протизапальними, нейропротекторними та ремієлінізуючими ефектами [22]. Такого роду дослідження нині проводяться рідко [23, 24] і не торкаються випадків трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин у комплексі зі штучними матриксами.

Зважаючи на це, ми дослідили вплив імплантації фрагментів аморфного макропористого біосумісного матриксу NeuroGel™ [25–30], асоційованого з ксеногенними стовбуровими клітинами кісткового мозку (СККМ), на перебіг синдрому спастичності при експериментальній спінальній травмі.

Матеріали та методи

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

Макропористий гідрогель NeuroGel™ (полі[N-(2-гідроксипропіл)-метакриламід]) є комерційним препаратом, синтезованим у лабораторії E. Pinet (FISO Technologies Inc., Quebec, Канада) шляхом гетерогенної полімеризації та асоціації, має пори різних розмірів — < 2, 2–50 та 51–300 нм [26].

СККМ отримували від мишей-самців, позитивних за експресією зеленого білка флуоресценції (лінія FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J), віком 3 міс. і масою 40 г, шляхом вимивання зі стегнових кісток середовищем RPMI-1640 (Sigma, США). Із цією метою в глибоко анестезованій тварині (внутрішньоочеревинне введення суміші розчинів ксилазину (Sedazin, Biowet, Польща; 15 мг/кг) та кетаміну (Calypsol, «Гедеон Ріхтер А.О.», Угорщина; 70 мг/кг)) обидві стегнові кістки в стерильних умовах видаляли 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 в отриманому змиві його об'ємну одиницю змішували з 3% розчином оцтової кислоти в пропорції 1 : 20 і переглядали в камері Горяєва. Клітинний змив вносили в культуральний флакон із площею поверхні 25 см² або чашку Петрі діаметром 60 мм, загальна кількість клітин становила не менше 10 млн. У подальшому клітини висівали по 4 • 10⁵ клітин/см² та культивували в CO₂-інкубаторі в умовах зволоженого повітря з 5% CO₂ при температурі 37 °С протягом 2 тижнів, змінюючи живильне середовище кожні 2–3 доби. Перший пасаж проводили при 80% конfluентності моношару, знімаючи клітини за допомогою 0,02% розчину трипсину/версену (Sigma, США), та пересаджували їх в нові флакони з щільністю 2 • 10⁴ клітин/см². СККМ на другий пасаж висаджували в 4-лункові планшети по 3 × 10⁴ у кожну лунку та культивували протягом 7 діб.

Частку життєздатних клітин у суспензії визначали на лазерному цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria

(Vecton Dickinson, США) за рівнем накопичення в клітині флуоресцентного ДНК-зонда 7-аміноактиноміцину. Упродовж експерименту частка життєздатних клітин становила $94,1 \pm 0,6 \%$.

Культивування СККМ здійснювали в середовищі, що містило 42,5 % RPMI-1640 (Sigma, США), 42,5 % DMEM, 15 % фетальної бичачої сироватки, 2 mM 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 (Vecton Dickinson, США). Клітини культури досліджували на здатність до направленного диференціювання в адипогенному та остеогенному напрямках. Проадипогенне 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 диференціації — 14 діб. Середовище для проостеогенного диференціювання містило: DMEM з 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 спектром експресії поверхневих маркерів та здатністю до спрямованого диференціювання клітини відповідали ознакам СККМ.

Через 5 діб культивування в середовище укладали 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 у ньому пори, проявляють ознаки активної життєдіяльності та диференціювання.

Модель спінальної травми — лівобічне пересічення половини спинного мозку зрілого щура на рівні T₁₁ [31]. Оперативні втручання здійснювали в умовах загального знеболювання (внутрішньоочеревинне введення суміші розчинів ксилазину (Sedazin, Biowet, Польща; 15 мг/кг) і кетаміну (Calypsol, «Гедеон Ріхтер А.О.», Угорщина; 70 мг/кг)), після виконання доступу до спинного мозку на рівні T₁₁ здійснювали наскрізний прокол його тканини в дорсовентральному напрямку зразу ж ліворуч від задньої середньої судини, у сформований канал вводили браншу офтальмологічних ножиць, другою браншею охоплювали лівий півокіл спинного мозку і перетинали його в кілька прийомів, повноту перетину забезпечували проведенням кінця складених бранш зігнутого по ребру мікропінцета по внутрішній поверхні лівої частини стінки каналу

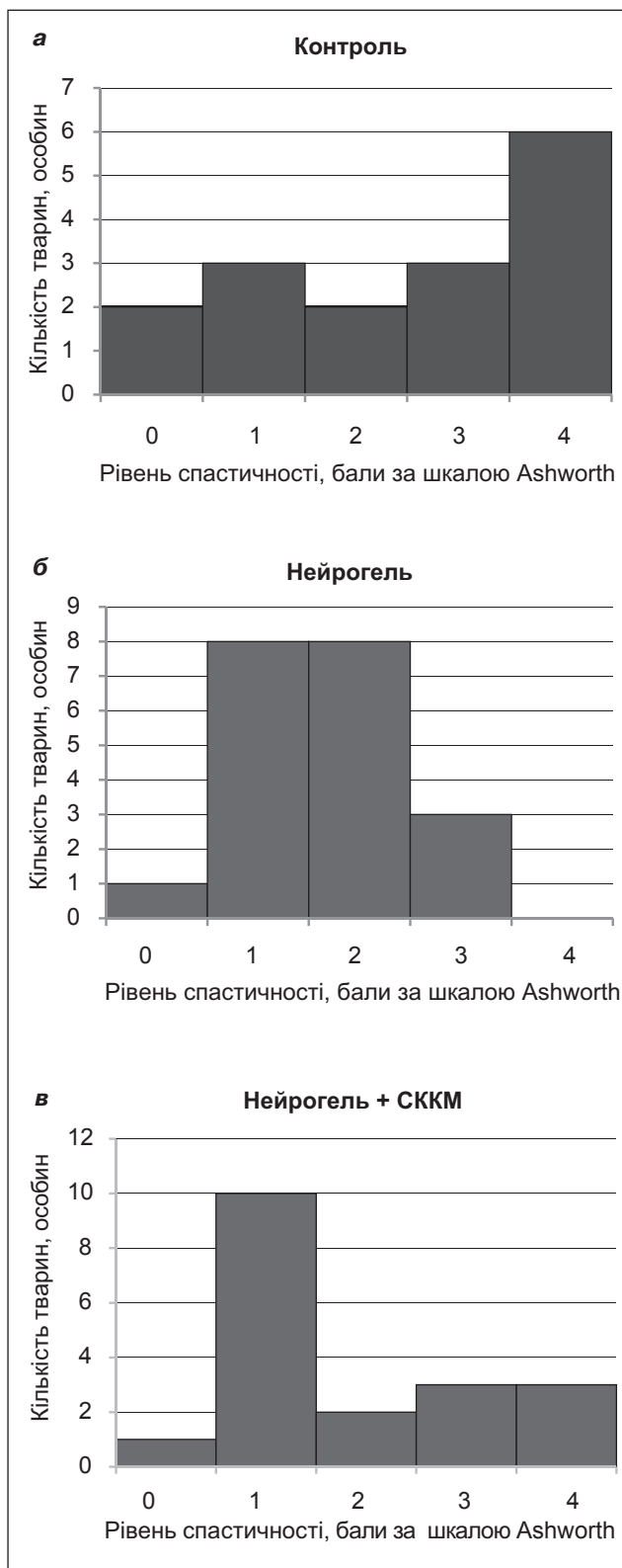


Рисунок 1. Розподіл значень показника спастичності задньої іпсилатеральної кінцівки в експериментальних групах на 28-му тижні спостереження

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

хребта. У тварин групи «нейрогель» у рану спинного мозку імплантували фрагмент NeuroGel™ розміром ~ 1 мм³, у тварин групи «нейрогель + СККМ» — фрагмент NeuroGel™, асоційований із ксеногенними СККМ. У тварин усіх експериментальних 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% спиртовим розчином йоду. У задню шийну ділянку підшкірно вводили розчин біциліну-5 (ПАТ «Київмедпрепарат»; ~ 150–200 тис. ОД на 1 тварину), внутрішньоочеревинно — розчин дексаметазону (KRKA, Словенія; 6 мг/кг). Після вказаних маніпуляцій протягом 2–4 годин тварин 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 D.M. Basso, M.S. Beattie та J.C. Bresnahan (BBB) [31, 32] (діапазон — 0–21 бал); показник спастичності (ПС) ЗІК — згідно зі шкалою Ashworth [33], що загалом включає виявлення легкого підвищення тону м'язів кінцівки під час пасивних рухів (1 бал), відчутного підвищення тону м'язів протягом усього обсягу пасивного руху (2 бали), значного підвищення тону м'язів з обмеженням пасивних рухів (3 бали), вираженої ригідності та контрактури досліджуваного суглоба (4 бали). Дослідження рівня спастичності здійснювали на рівні надп'ятково-гомількового та колінного суглоба ЗІК. Визначення ПФ та ПС ЗІК здійснювали 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 різниці ПФ та ПС ЗІК на різних термінах спостереження кожної окремо взятої групи оцінювали за Уїлкоксоном. Кореляцію між значеннями ПС та ПФ ЗІК тварин групи на кожному з термінів дослідження, на різних термінах спостереження кожної тварини, а також середніх по групі значень ПФ та ПС ЗІК упродовж експерименту оцінювали за допомогою непараметричного коефіцієнта рангової кореляції Спірмена, результати оцінки виражали у вигляді значення коефіцієнта r із звичним їх трактуванням.

Результати та обговорення

Імплантація NeuroGel™ нормалізує розподіл значень ПС ЗІК (рис. 1а, б), трансплантація СККМ, асоційованих із NeuroGel™, видозмінює його (рис. 1в).

Найінтенсивніший, лінійний приріст значень ПС ЗІК (до $1,8 \pm 0,3$ бала за шкалою Ashworth; $p < 0,05$) у групі «контроль» спостерігали протягом 1-го місяця (рис. 2); протягом 6–8-го тижня відмічали повільніше збільшення зі сталою швидкістю (протягом 6–7-го тижня — вірогідне, $p < 0,05$), протягом 5-го місяця реєстрували вірогідне ($p < 0,05$) збільшення показника до $2,6 \pm 0,4$ бала, у подальшому — невірогідне зменшення до $2,5 \pm 0,4$ бала, що відповідало суттєвому підвищенню мимовільного опору м'язів ЗІК при пасивних рухах у тестованих суглобах за умов обмеження діапазону цих рухів.

Перший період значущого ($p \leq 0,005$) приросту ПС ЗІК у групі «нейрогель» (рис. 2) виявляли на 3-му тижні (до $1,0 \pm 0,2$ бала за шкалою Ashworth), другим — протягом 7-го тижня ($1,4 \pm 0,1$ бала), третій — протягом 5-го місяця (до $1,8 \pm 0,2$ бала), у подальшому значущих змін не виявляли. Станом на 28-й тиждень спостереження ПС ЗІК становив $1,7 \pm 0,2$ бала, що відповідало суттєвому підвищенню мимовільного опору м'язів ЗІК при пасивних рухах у тестованих суглобах за умов обмеження діапазону цих рухів.

Динаміка ПС ЗІК у групі «нейрогель + СККМ» відповідає виявленій для групи «нейрогель» (рис. 2), відрізняючись відсутністю значущого приросту протягом 3-го тижня, наявністю значущого приросту протягом 3–5-го місяця. Станом на 28-й тиждень спостереження ПС ЗІК у групі становив $1,7 \pm 0,3$ бала за шкалою Ashworth.

Значущу різницю між значеннями ПФ ЗІК у групах «нейрогель» та «контроль» виявляли на 7-му добу та на 5–7-му і 12–24-му тижнях, між групами «нейрогель + СККМ» та «контроль» — на 7-му добу та 7–8-му та 16-му тижнях; максимальну різницю ПС ЗІК між групами «нейрогель + СККМ» та «нейрогель» — на 12-му тижні спостереження ($p = 0,059$).

При аналізі кореляції індивідуальних значень ПФ та ПС ЗІК кожної тварини на різних термінах спо-

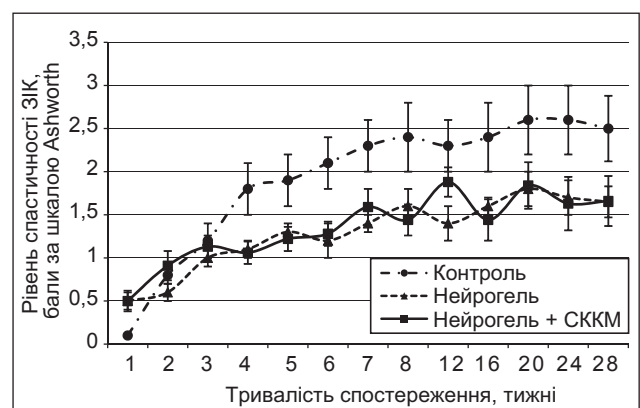


Рисунок 2. Динаміка ПС ЗІК у експериментальних групах протягом періоду спостереження

Примітки: різниця між групами «нейрогель» і «контроль» значуща на 7-му добу, 5–7-му та 12–24-му тижнях, між групами «нейрогель + СККМ» і «контроль» — на 7-му добу, 7–8-му та 16-му тижнях.

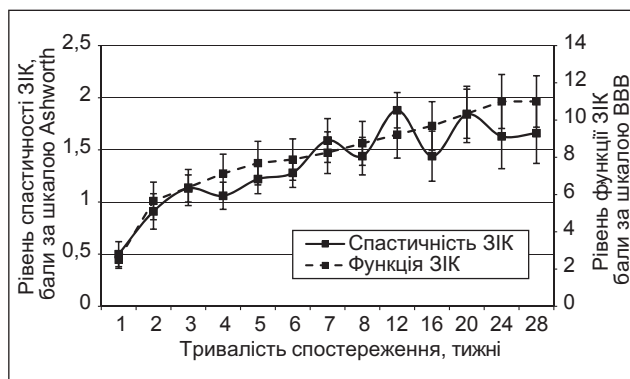


Рисунок 3. Співставлення в часі динаміки ПФ та ПС ЗІК у групі «нейрогель + СККМ»

стерезення в групі «контроль» виявлені 3 тварини (18,8 %) із помірною та сильною від'ємною кореляцією ($r = -0,69$, $r = -0,84$, $r = -0,64$ відповідно), 1 — з помірною додатною кореляцією ($r = 0,61$); у групі «нейрогель» — 3 тварини (20 %) із помірною додатною кореляцією ($r = 0,7$), 1 — із помірною від'ємною кореляцією ($r = -0,57$); у групі «нейрогель + СККМ» — 1 тварину із сильною ($r = 0,94$) та 2 — із помірною додатною кореляцією ($r = 0,58$, $r = 0,69$).

При аналізі кореляції індивідуальних значень ПФ та ПС ЗІК різних тварин на кожному з термінів спостереження в 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 на 12–28-му та 3–8-му тижнях відповідно; у групі «нейрогель + СККМ» — сильну (12–28-й тиждень, $r \leq -0,79$) та помірну (3-й, 5–7-й тиждень, $-0,73 \leq r \leq -0,58$) від'ємну кореляцію.

При аналізі кореляції середніх по групі значень ПФ та ПС ЗІК на різних термінах спостереження для групи «контроль» виявлено помірну додатну кореляцію ($r = 0,38$ за Спірменом, $r = 0,62$ за Пірсоном), для групи «нейрогель» — сильну додатну кореляцію ($r = 0,94$ за Спірменом), для групи «нейрогель + СККМ» — сильну додатну кореляцію ($r = 0,9$ за Спірменом), що відповідає картині, отриманій при співставленні динаміки обох показників у часі (рис. 3).

Висновки

1. Імплантація NeuroGel™ суттєво полегшує перебіг синдрому післятравматичної спастичності.

2. Трансплантація СККМ у комплексі з NeuroGel™ не призводить до значущих змін величини ПС ЗІК порівняно з ізольованою імплантацією NeuroGel™, однак суттєво змінює динаміку синдрому спастичності.

3. На відміну від групи «контроль» у разі імплантації NeuroGel™ та NeuroGel™, асоційованого зі СККМ, при від'ємній кореляції індивідуальних значень ПФ та ПС ЗІК у межах кожного з термінів спостереження визначали сильну додатну кореляцію значень обох показників, усереднених по групах, упродовж загального періоду спостереження.

Список літератури

1. Prevalence and treatment of spasticity reported by multiple sclerosis patients / M.A. Rizzo, O.C. Hadjimichael, J. Preiningerova, T.L. Vollmer // *Mult. Scler.* — 2004. — Vol. 10, № 5. — P. 589-595.
2. Spasticity after stroke: its occurrence and association with motor impairments and activity limitations / D.K. Sommerfeld et al. // *Stroke.* — 2004. — Vol. 35, № 1. — P. 134-139.
3. Odding E. The epidemiology of cerebral palsy: incidence, impairments and risk factors / E. Odding, M.E. Roebroek, H.J. Stam // *Disabil. Rehabil.* — 2006. — Vol. 28, № 4. — P. 183-191.
4. Maynard F.M. Epidemiology of spasticity following traumatic spinal cord injury / F.M. Maynard, R.S. Karunas, W.P. Waring // *Arch. Phys. Med. Rehabil.* — 1990. — Vol. 71, № 8. — P. 566-569.
5. Skold C. Spasticity after traumatic spinal cord injury: nature, severity, and location [Text] / C. Skold, R. Levi, A. Seiger // *Phys. Med. Rehabil.* — 1999. — Vol. 80, № 12. — P. 1548-1557.
6. A database of self-reported secondary medical problems among VA spinal cord injury patients: its role in clinical care and management [Text] / J.S. Walters et al. // *J. Rehabil. Res. Dev.* — 2002. — Vol. 39, № 1. — P. 53-61.
7. Spasticity, an impairment that is poorly defined and poorly measured / S. Malhotra, A.D. Pandyan, C.R. Day, P.W. Jones, H. Hermens // *Clin. Rehabil.* — 2009. — Vol. 23, № 7. — P. 651-658.
8. Longitudinal changes in medical complications in adults with pediatric-onset spinal cord injury / M. Hwang, K. Zebracki, K.M. Chlan, L.C. Vogel // *J. Spinal Cord Med.* — 2014. — Vol. 37, № 2. — P. 171-178.
9. Incidence and predictors of contracture after spinal cord injury — a prospective cohort study / J. Dion et al. // *Spinal Cord.* — 2012. — Vol. 50, № 8. — P. 579-584.
10. Adams M. International campaign for cures of spinal cord injury paralysis (ICCP): another step forward for spinal cord injury research [Text] / M. Adams, J.F. Cavanagh // *Spinal Cord.* — 2004. — Vol. 42, № 5. — P. 273-280.
11. Nielsen J.B. The spinal pathophysiology of spasticity — from a basic science point of view / J.B. Nielsen, C. Crone, H. Hultborn // *Acta Physiol. (Oxf.)* — 2007. — Vol. 189, № 2. — P. 171-180.
12. Heckman C.J. Persistent inward currents in motoneuron dendrites: implications for motor output [Text] / C.J. Heckman, M.A. Gorassini, D.J. Bennett // *Muscle Nerve.* — 2005. — Vol. 31, № 2. — P. 135-156.
13. Recovery of neuronal and network excitability after spinal cord injury and implications for spasticity [Text] / J.M. D'Amico, E.G. Condliffe, K.J.B. Martins et al. // *Front. Int. Neurosci.* — 2014. — Vol. 8, Art. 36. — P. 1-24.
14. Global gene expression analysis of rodent motor neurons following spinal cord injury associate molecular mechanisms with development of post — injury spasticity [Text] / J. Wienecke et al. // *J. Neurophysiol.* — 2010. — Vol. 103, № 2. — P. 761-778.
15. Spinal shock revisited: a four-phase model [Text] / J.F. Ditunno et al. // *Spinal Cord.* — 2004. — V. 42, № 7. — P. 383-395.
16. The time course of serotonin 2C receptor expression after spinal transection of rats: an immunohistochemical study [Text] / L.-Q. Ren et al. // *Neuroscience.* — 2013. — Vol. 236. — P. 31-46.
17. Recovery of motoneuron and locomotor function after spinal cord injury depends on constitutive activity in 5-HT2C receptors [Text] / K.C. Murray, A. Nakae, M.J. Stephens et al. // *Nature Med.* — 2010. — Vol. 16, № 6. — P. 694-701.

18. Decrease of mRNA editing after spinal cord injury is caused by down-regulation of ADAR2 that is triggered by inflammatory response [Text] / A.F. Di Narzo, A. Kozlenkov, Y. Ge et al. // *Sci. Rep.* — 2015. — Vol. 5, Art. 12615. — P. 1-15.
19. Serotonergic transmission after spinal cord injury [Text] / R. Nardone, Y. Holler, A. Thomschewski et al. // *J. Neural. Transm. (Vienna)*. — 2015. — Vol. 122, № 2. — P. 279-295.
20. Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing [Text] / C.M. Burns et al. // *Nature*. — 1997. — Vol. 387, № 6630. — P. 303-308.
21. RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor silences constitutive activity [Text] / C.M. Niswender, S.C. Copeland, K. Herrick-Davis et al. // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274, № 14. — P. 9472-9478.
22. 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.
23. Clinical observation of fetal olfactory ensheathing glia transplantation (OEGT) in patients with complete chronic spinal cord injury [Text] / J. Wu et al. // *Cell. Transplant.* — 2012. — Vol. 21, Suppl. 1. — P. 33-37.
24. Amelioration of motor/sensory dysfunction and spasticity in a rat model of acute lumbar spinal cord injury by human neural stem cell transplantation [Text] / S. van Gorp et al. // *Stem Cell. Res. Ther.* — 2013. — Vol. 4, Article 57. — P. 1-22.
25. 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.
26. 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.
27. Spinal cord repair with PHPMA hydrogel containing RGD peptides (NeuroGel) [Text] / S. Woerly et al. // *Biomaterials*. — 2001. — Vol. 22, № 10. — P. 1095-1111.
28. 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.
29. 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.
30. Цымбалюк В.И. Спинной мозг. Элегия надежды: Монография [Текст] / В.И. Цымбалюк, В.В. Медведев. — Винница: Новая Книга, 2010. — 944 с.
31. 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.
32. 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.
33. Модель поперечного пересічення половини спинного мозку. Частина II. Стан нервово-м'язового апарату, синдром посттравматичної спастичності та хронічний больовий синдром [Текст] / В.І. Цимбалюк та ін. // *Укр. нейрохірург. журнал*. — 2016. — № 3. — С. 5-13.

Отримано 03.10.2016 ■

Цымбалюк В.И.¹, Медведев В.В.², Рыбачук О.А.^{3,5}, Козьякин В.И.⁴, Драгунцова Н.Г.¹

¹ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины», г. Киев, Украина

²Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, г. Киев, Украина

³ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины», г. Киев, Украина

⁴Международная клиника восстановительного лечения, г. Трускавец, Украина

⁵Институт физиологии имени А.А. Богомольца НАН Украины, г. Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ ИМПЛАНТАЦИИ NEUROGEL™ В АССОЦИИИ С КСЕНОГЕННЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ КОСТНОГО МОЗГА НА ДИНАМИКУ СИНДРОМА СПАСТИЧНОСТИ ПОСЛЕ СПИНАЛЬНОЙ ТРАВМЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Резюме. Цель — изучить влияние имплантации NeuroGel™ в ассоциации со стволовыми клетками костного мозга (СККМ) на динамику спастичности в паретичной задней конечности крысы после 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-я — 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., оценку показателя функции (ПФ) и показателя спастичности (ПС) задней ипсилатеральной конечности (ЗИК) проводили по шкалам Basso — Beattie — Bresnahan и Ashworth соответственно. **Результаты.** ПС ЗИК по состоянию на 28-ю неделю эксперимента в группе 1 составил 2,5 ± 0,4 балла по шкале Ashworth, в группах 2 и 3 — 1,7 ± 0,2 балла и 1,7 ± 0,3 балла соответственно. Достоверную разницу между значениями ПС ЗИК

в группах 1 и 2 выявляли на 7-е сутки, на 5–7-й и 12–24-й неделях, между группами 1 и 3 — на 7-е сутки, на 7–8-й и 16-й неделях; максимальную разницу ПС ЗИК между группами 2 и 3 — на 12-й неделе (p = 0,059). Динамика среднего значения ПС ЗИК в группах 2 и 3 однотипна, отличается отсутствием достоверного увеличения в течение 3-й недели, наличием достоверного увеличения в течение 3–4-го месяца. В отличие от группы 1 в группах 2 и 3 при отрицательной корреляции индивидуальных значений ПФ и ПС ЗИК в пределах каждого срока наблюдения определяли сильную положительную корреляцию значений обоих показателей, усредненных по группам, в течение общего периода наблюдения. **Вывод.** Ксенотрансплантация СККМ в комплексе с NeuroGel™ не приводит к достоверным изменениям уровня спастичности в сравнении с изолированной имплантацией NeuroGel™, однако существенно изменяет динамику этого осложнения спинальной травмы.

Ключевые слова: травма спинного мозга; синдром спастичности; 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

¹State Institution «Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov of NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine

²The State Institution «Institute of Genetic and Regenerative Medicine of NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine

³Bogomoletz National Medical University, Kyiv, Ukraine

⁴International Clinic of Rehabilitation, Truskavets, Ukraine

⁵Bogomolets Institute of Physiology, Kyiv, Ukraine

THE EFFECT OF NEUROGEL™ USED WITH BONE MARROW STEM CELLS IMPLANTATION ON THE COURSE OF THE SPASTICITY SYNDROME AFTER EXPERIMENTAL SPINAL CORD INJURY

Abstract. Objective. To examine NeuroGel™ with bone marrow stem cells (BMSC) implantation on the dynamics of rat's paretic hind limb spasticity after experimental spinal cord injury. **Materials and methods.** Animals: outbred albino rats (male, 5.5 months, 250 g); experimental groups: 1 — spinal cord injury (n = 16); 2 — spinal cord injury + immediate homotopical transplantation of NeuroGel™ (n = 20); 3 — spinal cord injury + analogous transplantation of NeuroGel™ in association with adult mouse BMSC (n = 16). The model of injury was left-side spinal cord hemisection at T₁₁; the duration of observation was 28 weeks; the ipsilateral hind limb (IHL) function indicator (FI) and spasticity indicator (SI) were determined by the Basso — Beattie — Bresnahan scale (BBB) and Ashworth scale, respectively. **Results.** At the 28th week of the experiment IHL SI in group 1 was 2.5 ± 0.4 points at Ashworth scale, in group 2 and 3 — 1.7 ± 0.2 and 1.7 ± 0.3 , respectively. Significant difference between the values of the IHL SI in groups 1 and 2 was found on the 7th day, during 5–7th and 12–24th week,

between groups 1 and 3 — on the 7th day, during the 7–8th and at the 16th week. The maximum difference between groups 2 and 3 IHL SI value was observed at the 12th week (p = 0.059). The dynamics of IHL SI average value in groups 2 and group 3 was similar, except for the lack of significant growth during the 3rd week, and the presence of significant growth during the 3–4th months. Unlike group 1, in groups 2 and 3 there was observed negative correlation between individual IHL FI and SI values in each of the observation terms combined with the strong positive correlation between these values along the observation period. **Conclusion.** BMSC xenotransplantation using the NeuroGel™ does not lead to significant changes in the spasticity level compared to the isolated implantation using the NeuroGel™, but significantly alters the dynamic pattern of spinal injury complications.

Keywords: spinal cord injury; spasticity syndrome; restorative treatment; tissue neuroengineering; artificial tissue scaffold; bone marrow stem cells