



В. І. ЦИМБАЛЮК¹, В. В. МЕДВЕДЕВ², Р. Г. ВАСИЛЬЄВ^{3,4},
О. А. РИБАЧУК^{3,4}, В. І. КОЗЯВКІН⁵, Н. Г. ДРАГУНЦОВА¹

¹ ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України», Київ

² Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ

³ ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Київ

⁴ Медична компанія «Ілава», Київ

⁵ Міжнародна клініка відновного лікування, Трускавець

Вплив імплантації Neurogel у поєднанні з ксеногенними стовбуровими клітинами нервового гребня на відновлення рухової функції задніх кінцівок щура після травми спинного мозку

Мета — дослідити вплив імплантації Neurogel у комплексі зі стовбуровими клітинами нервового гребня (СКНГ) на відновлення рухової функції задніх кінцівок щура після травми спинного мозку.

Матеріали і методи. Дослідження виконано на білих безпородних щурах (вік — 5 міс, маса тіла — 250 г), яких було розподілено на три групи: 1-ша — травма спинного мозку (самці; n = 16), 2-га — травма спинного мозку + гомотопічна імплантація фрагмента Neurogel (самці; n = 20), 3-тя — травма спинного мозку + гомотопічна імплантація фрагмента Neurogel, асоційованого зі СКНГ зрілої миші (n = 12, з них 6 самців та 6 самок — підгрупи 3А та 3Б відповідно). Моделю травми — лівобічний перетин половини спинного мозку на рівні Т11. Термін спостереження — 28 тиж. Оцінку показника функції задньої іпсилатеральної кінцівки (ПФ ЗІК) здійснювали за шкалою Basso—Beattie—Bresnahan.

Результати. Ксенотрансплантація СКНГ у комплексі з Neurogel чинить відтермінований ефект на відновлення рухової функції ЗІК, що виявляється раннім дебютом та подовженням тривалості другої фази збільшення ПФ ЗІК, наявністю значущого ($p < 0,05$) регресу ПФ ЗІК протягом 6—7-го місяця спостереження. У 1-й групі значуще збільшення ПФ ЗІК спостерігали протягом 3—4-го тижня, у 2-й групі — протягом 1—2-го та 5—6-го тижня, у 3-й групі — протягом 1—2, 5, 8-го тижня та 3-го місяця. У 3-й групі відзначено значуще зменшення ПФ ЗІК протягом 6—7-го місяця. Значуще збільшення ПФ ЗІК у підгрупі 3А виявляли на 2-му, 4—5-му тижнях та впродовж 3-го місяця, у підгрупі 3Б — на 2-му, 7—8-му тижні. У підгрупі 3Б протягом 5-го місяця спостерігали значуще зменшення ПФ ЗІК. На 28-й тиждень ПФ ЗІК у 1-й групі оцінено ($1,6 \pm 0,5$) бала за шкалою Basso—Beattie—Bresnahan, у 2-й групі — ($8,4 \pm 0,9$) бала, у 3-й групі — ($9,7 \pm 1,6$) бала (у підгрупі 3А — ($11,0 \pm 2,2$) бала, у підгрупі 3Б — ($8,4 \pm 2,5$) бала. Значущу різницю за ПФ ЗІК між 1-ю та 2-ю групами відзначено протягом 2—28-го тижня ($p < 0,001$), між 1-ю та 3-ю групами — протягом 1—28-го тижня ($p \leq 0,02$). Максимальну різницю між 2-ю та 3-ю групами на користь 3-ї групи зафіксовано на 24-му тижні ($p = 0,055$). Значущу різницю між підгрупою 3А та 2-ю групою виявлено на 1—2-му та 5—16-му тижні, між підгрупами 3А та 3Б — на 1—6-му тижні. Значущої різниці між підгрупою 3Б та 2-ю групою впродовж експерименту не зафіксовано, максимальні її значення були характерні для 3—4-го тижня спостереження.

Висновки. Ксенотрансплантація СКНГ за умови імплантації Neurogel у цілому змінює динаміку відновлення рухової функції паретичної кінцівки, зумовлює тенденцію до потенціювання позитивного впливу Neurogel на перебіг спінальної травми. Її ефективність значною мірою залежить від статі донора та реципієнта.

Ключові слова: травма спинного мозку, відновна нейрохірургія, тканинна нейроінженерія, штучний тканинний матрикс, стовбурові клітини нервового гребня.

© В. І. Цимбалюк, В. В. Медведєв, Р. Г. Васильєв, О. А. Рибачук,
В. І. Козявкін, Н. Г. Драгунцова, 2017

Спінальна травма — нечасте, але у більшості випадків складне ураження нервової системи, яке суттєво погіршує якість життя постраждалого та зменшує його тривалість [7, 9, 12, 17, 24]. Тяжкість перебігу, висока ймовірність інвалідизації та розвитку ускладнень неврологічного або сомато-вісцерального характеру зумовлюють значну вартість лікування та утримання спінальних хворих [21], необхідність перелаштування міської та транспортної інфраструктури у прийнятний для комфортного життя спінальних хворих спосіб. Це робить актуальним пошук ефективних засобів відновного лікування спінальної травми. Протягом останніх десятиліть дослідження, присвячені вирішенню цієї проблеми, значно активізувалися, що пов'язано з успіхами у вивченні біології стовбурових клітин, їх потенціалу у лікуванні різноманітної патології нервової системи [1, 3]. Однією з вимог до перспективного у клінічному відношенні джерела стовбурових клітин є автологічність та доступність, тобто можливість нескладного отримання у пацієнта. У цьому плані оптимальними є стовбурові клітини нервового гребня (СКНГ, neural crest stem cells).

Під час нейроонтогенезу внаслідок змикання нервових валиків утворюється структура, яка отримала назву «нервовий гребінь». Клітини нервового гребня мігрують у товщі сомітів, формуючи елементи периферичної нервової системи та значну кількість структур типового мезенхімального походження. Наявність серед клітин нервового гребня ссавців стовбурових установлено недавно [18]. СКНГ дають початок широкому спектру клітин [10] нейрального фенотипу — нейронам та глії чутливих вузлів, більшості черепно-мозкових нервів (за винятком зорового, нюхового, ймовірно, присінково-завиткового), елементам периферичної частини смакового (за винятком сенсорних клітин [5]) і нюхового [27] аналізаторів (однак не слухового [28]), гангліям вегетативної нервової системи, шваннівським клітинам периферичних нервів тощо. Спектр клітин мезенхімального («ектомезенхімального») фенотипу та структур, які утворюються із СКНГ, охоплює [10] фібробласти периферичних нервів, кістки черепа, гладенькі міоцити артерій голови та шиї, перицити судин мозку, мозкові оболонки, одонтобласти, клітини перидонтальної зв'язки та зубного сосочка, адипоцити і клітини дерми обличчя, сполучнотканинні елементи залоз, м'язів та сухожиль голови, сполучнотканинні елементи рогівки, м'язи в'язчастого тіла. Окремим типом клітин, які утворюються із СКНГ, є пігментоцити різної локалізації — меланоцити шкіри, хромафінні клітини мозкової речовини наднирників, пігментні клітини внутрішнього вуха (проміжні клітини судинної стрічки бічної стінки завитки), хромафінні клітини каротидного тіла, кальцитонін-продукувальні клітини прищип-

топодібних залоз [10]. СКНГ дають початок також нестин-позитивним стовбуровим клітинам строми кісткового мозку [15]¹.

З огляду на нейрогенний гліальний (шванноцит-продукувальний) потенціал СКНГ, їх використання у відновному лікуванні ураження спинного мозку є перспективним [20], особливо з урахуванням факту регенерації аксонів у зоні травми за периферичним типом [4, 30]. На моделях спінальної травми вивчають ефективність трансплантації СКНГ різного походження, зокрема кістково-мозкового [19] та найдоступнішого епідермального фолікулярного [11, 13, 16, 25]. Стовбурові клітини фолікулярного походження розташовані у зоні 'bulge of hair follicles' — потовщенні піхви волосяного фолікула у точці прикріплення м'яза-підіймача волосини (*musculus arrector pili*). Ефективність цього типу стовбурових клітин, особливо в асоціації з просторовими матриксами, на лацераційних моделях спінальної травми практично не вивчено.

Мета роботи — дослідити вплив імплантації Neurogel у комплексі зі стовбуровими клітинами нервового гребня на відновлення рухової функції задніх кінцівок щура після травми спинного мозку.

Матеріали і методи

Дослідження виконано з дотриманням чинних норм біоетики на білих безпородних щурах (віварії Інституту нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України та Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України) віком 5 міс з масою тіла 250 г, яких утримували у стандартних умовах. Було сформовано три експериментальні групи: «контроль» — травма спинного мозку (самці, n = 16), «нейрогель» — травма спинного мозку + гомотопічна імплантатія фрагмента Neurogel (самці, n = 20), «СКНГ+нейрогель» — травма спинного мозку + гомотопічна імплантатія фрагмента Neurogel, асоційованого із СКНГ зрілої миші-самця (n = 12). Остання група об'єднувала дві рівновеликі підгрупи: А (самці, n = 6) та Б (самки, n = 6).

Макропористий гідрогель Neurogel (полі [N-(2-гідроксипропіл)-метакриламід] — комерційний препарат, синтезований у лабораторії E. Pinet (FISO Technologies Inc., Quebec, Канада) шляхом гетерогенної полімеризації та асоціації, має пори трьох розмірів, зокрема 2—50 та 51—300 нм [30].

СКНГ отримували з експлантів потовщення піхви фолікула відрізу зрілої миші-самця лінії FVB-Cg-Tg(GFP)5Nagy/J (трансгенні за геном зеленого білка флуорисценції). Капсулу фолікула розрізали вздовж, фолікул пересікали вище та нижче за потовщення, яке виділяли з капсули та поміщали в чашку Петрі, вкриту колагеном. Після прикріплення протягом 1 год експлантати заливали середовищем росту: α MEM (Sigma, США) з додаванням 10 %

¹ Нестин-негативні МСК строми кісткового мозку мезодермального походження, володіють остеогенними та картилягенними властивостями [14].

фетальної телячої сироватки (Sigma, США), 5 нг/мл основного фактора фібробластів (Sigma, США), 10 нг/мл епідермального фактора росту (Sigma, США), 1 % розчину вітамінів MEM (Sigma, США), 1 % поживної добавки B27 (Gibco, США), 2 ммоль глутаміну, 100 ОД/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 2,5 мкг/мл амфотерицину В. Культивування здійснювали в CO₂-інкубаторі в умовах зволоженого повітря з 5 % CO₂ за температури 37 °С. Перший пасаж проводили на 10-ту добу в культуральний флакон площею 25 см², культивували до конфлюентного стану. Пасажування проводили за допомогою 0,05 % розчину трипсину в 0,53 ммоль розчину Na₂EDTA (Sigma, США).

Фенотипування клітин здійснювали шляхом визначення експресії маркерів Nestin, Sca-1, CD44, CD45, CD73, CD90, CD117 з використанням моноклональних антитіл, мічених флуорохромами, згідно з рекомендаціями виробника (Becton Dickinson, США). Визначення інтенсивності проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері BDFACSAria (Becton Dickinson, США) за допомогою комп'ютерної програми BDFACS Diva 6.1, аналізували з використанням U-тесту Манна — Уїтні.

Клітини експресували Nestin (98 %), Sca-1 (97,7 %), маркери клітин нервового гребня — Sox10 та p75 (CD271), маркери мультипотентних стромальних клітин кісткового мозку — CD44 (97,7 %), CD90 (99,8 %), CD73 (95 %), маркер клітин нервового гребня та меланобластів c-Kit (CD117; 30—45 %). У культурі не виявлено значущих рівнів експресії CD45 — маркера гемопоетичних клітин.

Клітини культури досліджували на здатність до диференціювання в адипогенному та остеогенному напрямі. Адипогенне диференціювання активували шляхом культивування у середовищі DMEM з високим вмістом глюкози (4,5 г/л; Sigma, США), 5 % кінської 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 містило DMEM з низьким рівнем глюкози (1 г/л; Sigma, США), 10 % ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), 100 нмоль дексаметазону (Sigma, США), 10 ммоль β-гліцерофосфату (Sigma, США) та 50 мкг/мл аскорбат-2-фосфату (Sigma, США). Середовище змінювали тричі на тиждень. Тривалість диференціювання — 30 діб.

За сукупністю ознак більшість культивованих клітин відповідали фенотипу СКНГ.

Через 5 діб культивування у середовище поміщали фрагменти Neurogel об'ємом 16 мм³, культивували протягом 10 діб до моменту трансплантації. Безпосередньо перед трансплантацією фрагменти розрізали на рівновеликі частини об'ємом 2 мм³, одну з яких фіксували для імуногістохімічної вери-

фікації асоційованих клітин у товщі матриксу, решту використовували для трансплантації. За даними імуногістохімічного дослідження, СКНГ добре проникають у товщу гелю, колонізують наявні у ньому пори, виявляють ознаки активної життєдіяльності та диференціювання.

Для відтворення спінальної травми використовували уніфіковану нами модель — лівобічний перетин поперечника спинного мозку зрілого щура на рівні T11 [2]. 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 хірургічного доступу та ламінектомії на рівні T10 за допомогою голки стерильного інсулінового шприца здійснювали наскрізний прокол тканини спинного мозку в дорсовентральному напрямку безпосередньо ліворуч від задньої середньої судини. У сформований травматичний канал вводили браншу офтальмологічних ножиць, другою браншою охоплювали лівий півкіл спинного мозку, перетинали його у декілька прийомів, повноту перетину забезпечували проведенням кінця складених бранш зігнутого по ребру мікропінцета по внутрішній поверхні лівої частини стінки каналу хребта. У тварин групи «нейрогель» у рану спинного мозку імплантували фрагмент Neurogel об'ємом 2 мм³, у тварин групи «СКНГ + нейрогель» — фрагмент Neurogel, асоційований із ксеногенними СКНГ. У тварин усіх експериментальних груп вікно доступу в хребтовий канал вкривали 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») у дозі 150—200 тис. ОД на 1 тварину, внутрішньоочеревинно — розчин дексаметазону (KRKA, Словенія) у дозі 6 мг/кг маси тіла. Тварин протягом 2—4 год утримували в приміщенні з підвищеною температурою повітря (30 °С), далі — у клітках по 3—6 особин при середній температурі 21—24 °С.

Показник функції (ПФ) задньої іпсилатеральної щодо зони травми кінцівки (ЗІК) оцінювали за шкалою D. M. Basso, M. S. Beattie та J. C. Bresnahan (BBB) [2, 6] (діапазон значень — 0—21 бал) протягом перших 2 міс — наприкінці кожного тижня, у подальшому — наприкінці кожного місяця.

Тривалість спостереження для всіх тварин — 28 тиж. Виведення тварин з експерименту здійснювали шляхом передозування зазначених вище наркотичних препаратів.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програмного пакета Statistica 10.0. Для встановлення значущості відмінності середніх значень ПФ ЗІК між групами використовували U-тест

Манна — Уїтні. Результати оцінки значущості представлено у вигляді значень показника p . Значущість змін середніх значень ПФ ЗІК у групах упродовж експерименту оцінювали за Уїлкоксоном та виражали у вигляді значень показника p .

Результати та обговорення

Імплантація Neurogel на 24-й тиждень експерименту зумовила формування трьох підгруп з квазі-нормальним розподілом значень ПФ ЗІК у найбільшій з них. Імплантація Neurogel у комплексі із СКНГ не нормалізує розподіл ПФ ЗІК, призводить до формування двох рівновеликих підгруп (0—5 та 10—16 балів за шкалою ВВВ; рис. 1), які збігаються з підгрупами А та Б.

Протягом експерименту спостерігали двохфазну динаміку значень ПФ ЗІК, усереднених по групі «контроль» (рис. 2): 1-ша фаза — збільшення до $(1,7 \pm 0,5)$ бала за шкалою ВВВ, значуще впродовж 3-го тижня ($p < 0,01$), рівновеликий незначущий регрес протягом 5—8-го тижня, 2-га фаза — по-

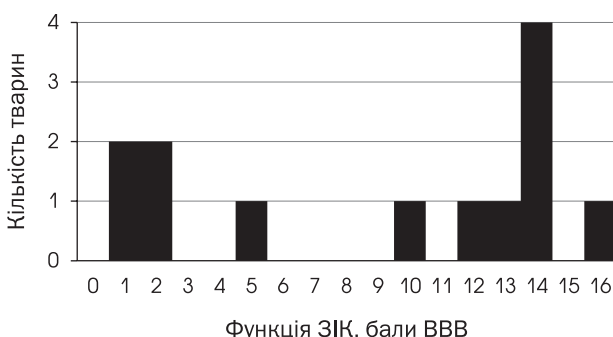


Рис. 1. Розподіл значень показника функції задньої іпсилатеральної кінцівки у групі «нейрогель + СКНГ» на 28-й тиждень спостереження (у випадку реєстрації дробового значення ПФ ЗІК кількість тварин, що припадає на два найближчі цілі значення, збільшували на одиницю)

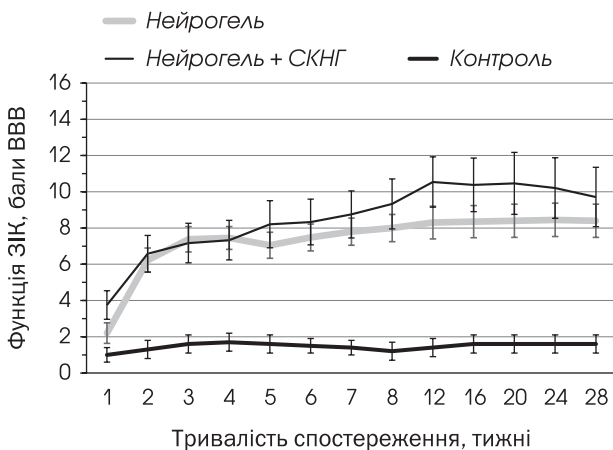


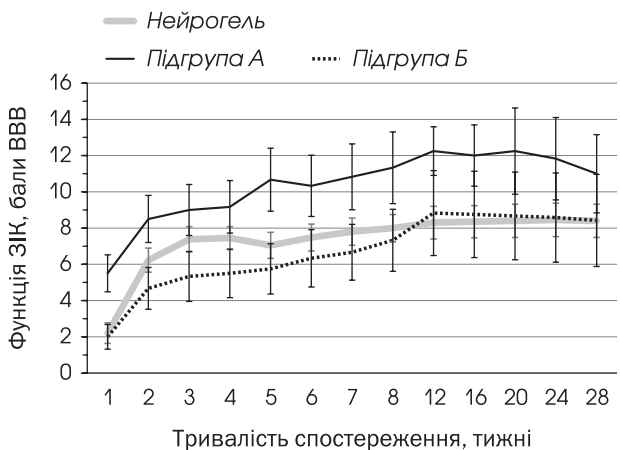
Рис. 2. Динаміка показника функції задньої іпсилатеральної кінцівки у групах «контроль», «нейрогель», «нейрогель + стовбурові клітини нервового гребня» та підгрупах А та Б протягом періоду спостереження. Пояснення у тексті

вторне збільшення протягом 12—16-го тижня ($p < 0,05$ при досягненні однакових значень на 8-му і 16-му тижні) та стабілізація. На 28-й тиждень експерименту ПФ ЗІК оцінено $(1,6 \pm 0,5)$ бала за шкалою ВВВ, що під час локомоції експериментальної тварини по горизонтальній поверхні відповідає наявності поширених рухів в одному суглобі ЗІК та слабких рухів у іншому [2, 6].

Двофазність динаміки ПФ ЗІК характерна також для групи «нейрогель» (див. рис. 2): 1-ша фаза — значуще ($p \leq 0,001$) збільшення протягом 1—3-го тижня, часткове нівелювання до кінця 5-го тижня ($p > 0,05$), 2-га фаза — повторне збільшення протягом 6—12-го тижня (значуще протягом 7—8-го тижня, $p < 0,05$), стабілізація, починаючи з 16-го тижня. На 28-й тиждень експерименту ПФ ЗІК оцінено $(8,4 \pm 0,9)$ бала за шкалою ВВВ, що в умовах локомоції тварини по горизонтальній поверхні відповідає наявності крокових синергій ЗІК підшовою вниз без підтримування маси тіла [2, 6].

У групі «нейрогель + СКНГ» зазначена двофазна динаміка була доповнена фазою прикінцевого регресу. Протягом 1—2-го тижня спостерігали швидке значуще ($p \leq 0,002$) збільшення ПФ ЗІК до $(6,6 \pm 1,0)$ бала за шкалою ВВВ, протягом 3—4-го тижня — відсутність змін ПФ ЗІК, протягом 5-го, 8-го тижня і 3-го місяця — значуще ($p < 0,05$) збільшення ПФ ЗІК з екстремумом на 12-му тижні $(10,5 \pm 1,4)$ бала, впродовж 6—7-го місяця — значуще ($p = 0,043$) зменшення ПФ ЗІК до $(9,7 \pm 1,6)$ бала, що в умовах локомоції тварини по горизонтальній поверхні відповідає наявності поодиноких моментів підтримання маси тіла, постановки стопи підшовою вниз на тлі відсутності координації крокового ритму передніх і задніх кінцівок [2, 6].

Значущу відмінність за ПФ ЗІК між групами «нейрогель» та «контроль» відзначено протягом 2—28-го тижня ($p \leq 0,0001$), між групами «нейрогель + СКНГ» та «контроль» — протягом 1—28-го тижня ($p \leq 0,02$). Максимальну відмінність між групами «нейрогель +



СКНГ» та «нейрогель» спостерігали на 12-му та 16-му тижні ($p = 0,097$ і $p = 0,095$ відповідно).

Значуще збільшення ПФ ЗІК у підгрупі А виявлено на 2-му, 4—5-му тижні та впродовж 3-го місяця, у підгрупі Б — на 2-му, 7—8-му тижні, зменшення — протягом 5-го місяця. Значущу ($p < 0,05$) відмінність між підгрупою А та групою «нейрогель» зафіксовано на 1—2-му та 5—16-му тижні, між підгрупами А та Б — на 1—6-му тижні. Значущої різниці між підгрупою Б та групою «нейрогель» упродовж експерименту не виявлено, максимальні її значення характерні для 3—4-го тижня спостереження ($p = 0,13$ і $p = 0,18$ відповідно).

Будь-який клітинний нейротрансплантат, зокрема клітини мезенхімального походження, потенціює тканинне запалення у перифокальній зоні, яке характеризується нейтрофільною інвазією, залученням макрофагів та мікрогліоцитів, активацією астроцитарної глії, неоангіогенезом [8, 14, 23]. У більшості публікацій, присвячених ефективності трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин чи СКНГ при травмі спинного мозку, згадано про їх протизапальні властивості, здатність активувати антиоксидантну систему клітин перифокальної зони, чинити антиапоптотичний вплив, потенціювати спраунтінг та мієлінізацію аксонів [20]. Neurogel чинить багатогранний позитивний вплив на перебіг спінальної травми (обмеження травматичної геморагії, запальних реакцій у гострий та ранній період, активація експресії білків теплового шоку [29], потенціювання регенераційного росту нервових волокон за периферійним типом [4, 30]). Отже, синергія обох засобів тканинної нейроінженерії за їх спільного застосування має патофізіологічну основу.

Багатьма дослідженнями встановлено негативний вплив різностатевості донора та реципієнта (sex-mismatched transplantation) на результативність трансплантації [22], що зумовлено наявністю кодованих генами Y- та X-хромосоми протейнових антигенів (антигенів Y-H та X-H) — представників так званих другорядних антигенів гістосумісності (minor histocompatibility antigens, mHAs; звідси аббревіатура Y-H та X-H) [26]. Ці антигени сформовані продуктами розщеплення білків (кодованих генами статевих хромосом), презентованими молекулами

головного комплексу гістосумісності (major histocompatibility complex) [22, 26]. На нашу думку, описаний імунологічний механізм є причиною практично повного нівелювання позитивного ефекту СКНГ на тлі імплантації Neurogel у відтвореному нами випадку різностатевості донора (миша-самець) та реципієнта (щури-самки підгрупи Б).

Ці та інші аспекти отриманих емпіричних даних потребують детального вивчення із залученням сучасних методів дослідження.

Висновки

Ксенотрансплантація стовбурових клітин нервового гребня у комплексі з Neurogel чинить відтермінований ефект на перебіг регенераційного процесу, що виявляється ранішим дебютом та подовженням тривалості другої фази збільшення рухової активності задньої іпсилатеральної кінцівки, а також значущим регресом показника функції задньої іпсилатеральної кінцівки протягом 6—7-го місяця спостереження.

Максимальна відмінність за показником функції задньої іпсилатеральної кінцівки між групами «нейрогель + стовбурові клітини нервового гребня» та «нейрогель», виявлена на 12-му та 16-му тижні, була незначущою ($p = 0,097$) та дорівнювала 2,24 бала за шкалою Basso — Beattie — Bresnahan.

Динаміка показника функції задньої іпсилатеральної кінцівки в підгрупі А суттєво відрізнялася від такої у групі «нейрогель» та підгрупі Б. Значущу ($p < 0,05$) відмінність між показниками підгрупи А та групи «нейрогель» виявлено на 1—2-му та 5—16-му тижні спостереження, між показниками підгруп А та Б — на 1—6-му тижнях.

Протягом перших 2 міс ефективність відновного процесу у підгрупі Б поступалася такій у групі «нейрогель», у подальшому — збігалася.

Ксенотрансплантація стовбурових клітин нервового гребня у цілому змінює динаміку відновлення рухової функції паретичної кінцівки за умови імплантації Neurogel, зумовлює тенденцію до потенціювання позитивного впливу апробованого матриксу на перебіг спінальної травми. Її ефективність значною мірою залежить від статі донора та реципієнта.

Конфлікту інтересів немає.

Участь авторів: концепція і дизайн дослідження — В. Ц., В. М., В. К.; моделювання травми, імплантація Neurogel, моніторинг рухової функції, первинна обробка цифрових даних, інтерпретація отриманих результатів, написання та редагування тексту — В. М.; отримання та культивування СКНГ разом з Neurogel — Р. В., О. Р.; статистичне опрацювання даних — Н. Д.

Література

1. Цымбалюк В. І., Медведєв В. В. Нейрогенні стовбурові клітини у неврології та нейрохірургії // Журн. НАМН України. — 2011. — Том 17, № 1. — С. 76—80.
2. Цымбалюк В. І., Медведєв В. В., Семенова В. М. та ін. Модель пересічення половини поперечника спинного мозку. І. Технічні, патоморфологічні та клініко-експериментальні особливості // Укр. нейрохір. журн. — 2016. — № 2. — С. 18—27.
3. Цымбалюк В. І., Медведєв В. В. Нейрогенные стволовые клетки. — К.: Коваль, 2005. — 596 с.
4. Цымбалюк В. І., Медведєв В. В. Спинной мозг. Элегия надежды: Монография. — Вінниця: Нова книга, 2010. — 944 с.

5. Barlow L.A. Progress and renewal in gustation: new insights into taste bud development // *Development*.— 2015.— Vol. 142, N 21.— P. 3620—3629.
6. 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.
7. Boakye M., Leigh B.C., Skelly A.C. Quality of life in persons with spinal cord injury: comparisons with other populations // *J. Neurosurg. Spine*.— 2012.— Vol. 17.— P. 29—37.
8. Coyne T., Marcus A., Woodbury D., Black I. Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia // *Stem Cells*.— 2006.— Vol. 24, N 11.— P. 2483—2492.
9. DeVivo M.J. Epidemiology of traumatic spinal cord injury: trends and future implications // *Spinal Cord*.— 2012.— Vol. 50, N 5.— P. 365—372.
10. Dupin E., Sommer L. Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood // *Dev. Biol*.— 2012.— Vol. 366, N 1.— P. 83—95.
11. Gericota B., Anderson J.S., Mitchell G. et al. Canine epidermal neural crest stem cells: characterization and potential as therapy candidate for a large animal model of spinal cord injury // *Stem. Cells. Transl. Med*.— 2014.— Vol. 3, N 3.— P. 334—345.
12. Geyh S., Ballert C., Sinnott A. et al. Quality of life after spinal cord injury: a comparison across six countries // *Spinal Cord*.— 2013.— Vol. 51, N 4.— P. 322—326.
13. Hu Y.F., Gourab K., Wells C. et al. Epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC)-mediated recovery of sensory function in a mouse model of spinal cord injury // *Stem Cell Rev. Rep*.— 2010.— Vol. 6, N 2.— P. 186—198.
14. Le Blon D., Hoornaert C., Detrez J.R. et al. Immune remodelling of stromal cell grafts in the central nervous system: therapeutic inflammation or (harmless) side-effect? // *J. Tissue Eng. Regen. Med*.— 2016.— Jun. 20, [Epub ahead of print].
15. Lindsay S.L., Barnett S.C. Are nestin-positive mesenchymal stromal cells a better source of cells for CNS repair? // *Neurochem. Int*.— 2016.— Aug 3, [Epub ahead of print].
16. McMahlill B.G., Spriet M., Sisó S. et al. Feasibility study of canine epidermal neural crest stem cell transplantation in the spinal cords of dogs // *Stem Cells Transl. Med*.— 2015.— Vol. 4, N 10.— P. 117—186.
17. Middleton J.W., Dayton A., Walsh J. et al. Life expectancy after spinal cord injury: a 50-year study // *Spinal Cord*.— 2012.— Vol. 50, N. 11.— P. 803—811.
18. Morrison S.J., White P.M., Zock C., Anderson D.J. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells // *Cell*.— 1999.— Vol. 96, N 5.— P. 737—749.
19. Neirinckx V., Agirman G., Coste C. et al. Adult bone marrow mesenchymal and neural crest stem cells are chemoattractive and accelerate motor recovery in a mouse model of spinal cord injury // *Stem Cell Res. Ther*.— 2015.— Vol. 6, Article 211.— P. 1—15.
20. Neirinckx V., Cantinieaux D., Coste C. et al. Concise review: spinal cord injuries — how could adult mesenchymal and neural crest stem cells take up the challenge? // *Stem Cells*.— 2014.— Vol. 32, N 4.— P. 829—843.
21. Oliveri R.S., Bello S., Biering-Sørensen F. Mesenchymal stem cells improve locomotor recovery in traumatic spinal cord injury: systematic review with meta-analyses of rat models // *Neurobiol. Dis*.— 2014.— Vol. 62.— P. 338—353.
22. Popli R., Sahaf B., Nakasone H. et al. Clinical impact of H-Y alloimmunity // *Immunol. Res*.— 2014.— Vol. 58, N 2—3.— P. 249—258.
23. Praet J., Santermans E., Daans J. et al. Early inflammatory responses following cell grafting in the CNS trigger activation of the subventricular zone: a proposed model of sequential cellular events // *Cell. Transplant*.— 2015.— Vol. 24, N 8.— P. 1481—1492.
24. Pretz C.R., Kozlowski A.J., Chen Y. et al. Trajectories of life satisfaction after spinal cord injury // *Arch. Phys. Med. Rehabil*.— 2016.— May 27, [Epub ahead of print].
25. Sieber-Blum M. Epidermal neural crest stem cells and their use in mouse models of spinal cord injury // *Brain Res. Bull*.— 2010.— Vol. 83, N 5.— P. 189—193.
26. Spierings E. Minor histocompatibility antigens: past, present, and future // *Tissue Antigens*.— 2014.— Vol. 84, N 4.— P. 347—360.
27. Suzuki J., Osumi N. Neural crest and placode contributions to olfactory development // *Curr. Top. Dev. Biol*.— 2015.— Vol. 111.— P. 351—374.
28. Whitfield T.T. Development of the inner ear // *Curr. Opin. Genet. Dev*.— 2015.— Vol. 32.— P. 112—118.
29. Woerly S., Awosika O., Zhao P. et al. Expression of heat shock protein (HSP)-25 and HSP-32 in the rat spinal cord reconstructed with Neurogel // *Neurochem. Res*.— 2005.— Vol. 30, N 6—7.— P. 721—735.
30. Woerly S., Doan V.D., Sosa N. et al. Reconstruction of the transected cat spinal cord following NeuroGel implantation: axonal tracing, immunohistochemical and ultrastructural studies // *Int. J. Dev. Neurosci*.— 2001.— Vol. 19, N 1.— P. 63—83.

В. И. ЦЫМБАЛЮК¹, В. В. МЕДВЕДЕВ², Р. Г. ВАСИЛЬЕВ^{3,4},
О. А. РЫБАЧУК^{3,4}, В. И. КОЗЯВКИН⁵, Н. Г. ДРАГУНЦОВА¹

¹ ПУ «Институт нейрохирургии им. акад. А. П. Ромоданова НАМН Украины», Киев

² Национальный медицинский университет им. А. А. Богомольца, Киев

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

⁴ Медицинская компания «Лауа», Киев

⁵ Международная клиника восстановительного лечения, Трускавец

Влияние имплантации Neurogel в сочетании с ксеногенными стволовыми клетками нервного гребня на восстановление двигательной функции задних конечностей крысы после травмы спинного мозга

Цель — изучить влияние имплантации Neurogel в комплексе со стволовыми клетками нервного гребня (СКНГ) на восстановление двигательной функции задних конечностей крысы после травмы спинного мозга.

Материалы и методы. Исследование выполнено на белых беспородных крысах (возраст — 5 мес, масса тела — 250 г), которых распределили на три группы: 1-я — травма спинного мозга (самцы; n = 16); 2-я — травма спинного мозга + гомотопическая имплантация фрагмента Neurogel (самцы; n = 20); 3-я — травма спинного мозга + гомотопическая имплантация фрагмента Neurogel, ассоциированного с СКНГ зрелой мыши (n = 12, из них 6 самцов и 6 самок — подгруппы 3А и 3Б соответственно). Модель травмы — левостороннее пересечение

половины спинного мозга на уровне T11. Длительность наблюдения — 28 нед. Оценку показателя функции задней ипсилатеральной конечности (ПФ ЗИК) проведено по шкале Basso—Beattie—Bresnahan.

Результаты. Ксенотрансплантация СКНГ в комплексе с Neurogel оказывает отсроченное влияние на восстановление двигательной функции ЗИК, что проявляется ранним дебютом и удлинением второй фазы увеличения ПФ ЗИК, наличием значимого ($p < 0,05$) регресса ПФ ЗИК в течение 6—7-го месяца наблюдения. В 1-й группе значимое увеличение ПФ ЗИК наблюдали в течение 3—4-й недели, во 2-й группе — в течение 1—2-й и 5—6-й недели, в 3-й группе — в течение 1—2, 5, 8-й недели и 3-го месяца. В 3-й группе в течение 6—7-го месяца отмечено значимое уменьшение ПФ ЗИК. Значимое увеличение ПФ ЗИК в подгруппе 3А выявляли на 2-й, 4—5-й неделе и в течение 3-го месяца, в подгруппе 3Б — на 2-й, 7—8-й неделе. В подгруппе 3Б в течение 5-го месяца наблюдали значимое уменьшение ПФ ЗИК. На 28-ю неделю ПФ ЗИК в 1-й группе оценено ($1,6 \pm 0,5$) балла по шкале Basso—Beattie—Bresnahan, во 2-й группе — ($8,4 \pm 0,9$) балла, в 3-й группе — ($9,7 \pm 1,6$) балла (в подгруппе 3А — ($11,0 \pm 2,2$) балла, в подгруппе 3Б — ($8,4 \pm 2,5$) балла. Значимое отличие по ПФ ЗИК между 1-й и 2-й группами отмечали в течение 2—28-й недели ($p < 0,001$), между 1-й и 3-й группами — в течение всего периода наблюдения ($p \leq 0,02$). Максимальные различия между 2-й и 3-й группами в пользу показателя 2-й группы зафиксировали на 24-й неделе ($p = 0,055$). Значимые ($p < 0,05$) различия между подгруппой 3А и 2-й группой выявили на 1—2-й и 5—16-й неделе, между подгруппами 3А и 3Б — на 1—6-й неделе. Значимых различий между подгруппой 3Б и 2-й группой в течение эксперимента не выявлено, максимальные ее значения были характерны для 3—4-й недели наблюдения.

Выводы. Ксенотрансплантация СКНГ вместе с имплантацией Neurogel в целом изменяет динамику восстановления двигательной функции паретичной конечности, обуславливает тенденцию к потенцированию положительного влияния Neurogel на течение спинальной травмы. Ее эффективность в значительной мере зависит от пола донора и реципиента.

Ключевые слова: травма спинного мозга, восстановительная нейрохирургия, тканевая нейроинженерия, искусственный тканевый матрикс, стволовые клетки нервного гребня.

V. I. TSYMBALIUK¹, V. V. MEDVEDIEV², R. G. VASILIEV^{3,4},
O. A. RYBACHUK^{3,4}, V. I. KOZYAVKIN⁵, N. G. DRAGUNTSOVA¹

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

²O. O. Bogomolets National Medical University, Kyiv

³SI «Institute of Genetic and Regenerative Medicine of NAMS of Ukraine», Kyiv

⁴Medical Company Ilaya, Kyiv

⁵International Clinic of Rehabilitation, Truskavets

The effect of Neurogel with neural crest stem cells implantation on motor function recovery after experimental spinal cord injury

Objective — to examine examine Neurogel with xenogenic neural crest stem cells (NCSC) implantation on rat's hind limb motor function recovery after experimental spinal cord injury.

Methods and subjects. Animals: outbred albino rats (5.5 months, 250 g); experimental groups: 1 — spinal cord injury only (males; $n = 16$); 2 — spinal cord injury + immediate homotopical transplantation of Neurogel (males; $n = 20$); 3 — spinal cord injury + analogous transplantation of Neurogel in association with adult mouse NCSC ($n = 12$). Group 3 consisted of male ($n = 6$) and female ($n = 6$) animals, respectively, — subgroups 3m and 3f. Model of injury was left-side spinal cord hemisection at T11; duration of observation was 28 weeks; ipsilateral hindlimb function indicator (IHL FI) determination was obtained with the Basso—Beattie—Bresnahan scale (BBB).

Results. NCSC xenotransplantation in association with Neurogel has a delayed effect on the IHL motor function recovery, that manifests by second phase of IHL FI increase early onset and prolongation, presence of significant ($p < 0,05$) IHL FI regression within 6th–7th months. In group 1 a significant IHL FI increase was observed over the 3rd–4th weeks, in a group 2 — over the 1st–2nd and 5th–6th weeks, in a group 3 — over the 1st–2nd, 5th, 8th weeks and during the 3rd month. In a group 3 a significant IHL FI decrease was observed within 6th–7th months. Significant IHL FI increase in a subgroup 3m was identified over the 2nd, 4th–5th weeks and during the 3rd month, in the subgroup 3f — over the 2nd, 7th–8th weeks. During the 5th month a significant decrease of the IHL FI in a subgroup 3f was detected. Over the 28th week the group 1 IHL FI demonstrated $1,6 \pm 0,5$ BBB points, group 2 IHL FI — $8,4 \pm 0,9$ points, group 3 IHL FI — $9,7 \pm 1,6$ points, a subgroup 3m IHL FI — $11,0 \pm 2,2$, a subgroup 3f IHL FI — $8,4 \pm 2,5$ points BBB. Significant differences between the group 2 and group 1 IHL FI was noted during a period of 2th–28th weeks ($p < 0,001$), between IHL FI of the group 1 and group 3 — during the whole observation period ($p \leq 0,02$). The maximum prevalence of group 3 IHL FI over the group 2 IHL FI was pointed over the 24th week ($p = 0,055$). Significant ($p < 0,05$) difference between IHL FI of the subgroup 3m and group 2 was found over the 1st–2nd and 5th–16th weeks, between IHL FI of the subgroup 3m and group 3f — during period of the 1st–6th weeks. Significant difference between the subgroup 3f and group 2 IHL FI was not observed, the maximum value of its difference was found over the 3rd–4th weeks.

Conclusions. NCSC xenotransplantation in association with Neurogel generally changes the parietic limb motor function recovery dynamics, conditioned a trend towards potentiation of the Neurogel positive effect on the course of the spinal cord injury; efficiency of this influence significantly depends on the sex of recipient and donor organism.

Key words: spinal cord injury, restorative neurosurgery, tissue neuroengineering, artificial tissue scaffold, neural crest stem cells.