

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

DOI: 10.22141/2224-0713.1.87.2017.96533

Цимбалюк В.І.¹, Медведєв В.В.², Васильєв Р.Г.^{3,4}, Рибачук О.А.^{3,4}, Козьявкін В.І.⁵, Драгунцова Н.Г.¹

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

²Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

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

⁴Медична компанія «Ілаус», м. Київ, Україна

⁵Міжнародна клініка відновного лікування, м. Трускавець, Україна

Вплив імплантації NeuroGel™ у поєднанні з ксеногенними стовбуровими клітинами нервового гребеня на перебіг синдрому спастичності після експериментальної травми спинного мозку

Резюме. Мета — дослідити вплив імплантації NeuroGel™, асоційованого зі стовбуровими клітинами нервового гребеня (СКНГ), на динаміку синдрому спастичності в паретичній задній кінцівці щури після травми спинного мозку. **Матеріали та методи.** Тварини — білі безпородні щури (5 міс., 250 г); групи: 1 — травма спинного мозку (самці; $n = 16$); 2 — травма спинного мозку + гомотопічна імплантація фрагмента NeuroGel™ (самці; $n = 20$); 3 — травма спинного мозку + гомотопічна імплантація фрагмента NeuroGel™, асоційованого зі СКНГ миші ($n = 12$). Група 3 включала тварин чоловічої ($n = 6$) та жіночої статі ($n = 6$) — підгрупи 3_ч та 3_ж відповідно. Модель травми — лівобічний перетин половини спинного мозку на рівні T₁₁; термін спостереження — 28 тижнів; оцінка показника функції (ПФ) та показника спастичності (ПС) задньої інсультальної кінцівки (ЗІК) — шкала Basso — Beattie — Bresnahan (BBB) та шкала Ashworth відповідно. **Результати.** ПС ЗІК станом на 28-й тиждень експерименту в групі 1 становив $2,5 \pm 0,4$ бала за Ashworth, у групі 2 — $1,7 \pm 0,2$ бала, у групі 3 — $1,6 \pm 0,3$ бала, у підгрупі 3_ч — $1,6 \pm 0,5$ бала, у підгрупі 3_ж — $1,7 \pm 0,3$ бала за Ashworth. Значущу різницю ($p < 0,05$) між значеннями ПС ЗІК у групах 1 і 2 виявляли на 7-му добу, на 5–7-му та 12–24-му тижні, між групами 1 і 3 — на 2, 4–7 та 20-му тижні; максимальну різницю ПС ЗІК між групами 2 і 3 виявляли на 7-му добу спостереження ($p = 0,13$). Різниця між значеннями ПС ЗІК підгрупи 3_ч та групи 2, а також підгруп 3_ч і 3_ж значуща протягом 1–2-го тижня ($p \leq 0,05$), різниця між ПС ЗІК підгруп 3_ч та 3_ж максимальна протягом 3-го місяця, сягає 0,83 бала за Ashworth ($p = 0,124$). Динаміка ПС ЗІК у групі 3 різнилась від показників групи 2 наявністю значущого приросту протягом 3-го, 7-го тижня, 4-го та 5-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 наявна сильна додатна кореляція значень обох показників, усереднених по групах, протягом періоду спостереження. **Висновки.** Ксенотрансплантація СКНГ у комплексі з NeuroGel™ не призводить до значущих змін рівня спастичності порівняно з ізольованою імплантацією NeuroGel™, однак суттєво змінює динаміку цього ускладнення з тенденцією до погіршення перебігу у віддаленому періоді травми за умов різностатевості донора та реципієнта.

Ключові слова: травма спинного мозку; синдром спастичності; відновна нейрохірургія; тканинна нейроінженерія; штучний тканинний матрикс; стовбурові клітини нервового гребеня

Вступ

Спастичність визначають як розлад функції денервованої еферентної ланки рухового апарату, для якого характерне посилення рефлексів розтягу (міотатичних рефлексів), обумовлене надмірною збудливістю нейронального апарату спинного мозку, що є компонентом синдрому центрального парезу¹ [1, 2]. Усталена думка, що спастичність є «пасивним», виключно рефлексивним розладом нервового апарату. Однак деякі автори розглядають це ускладнення в одному ряду з продуктивними симптомами центрального парезу — судомами, гіперрефлексією, клонусами, спінальними автоматизмами [3, 4].

Як і у випадку будь-якого продуктивного розладу, в основі спастичності з патофізіологічної точки зору повинна лежати надмірна спонтанна активність (модель ендогенного стосовно мозку генератора збудження) або надмірна рефлексивність мотонейронів за наявності постійного зовнішнього подразнювача (модель екзогенного стосовно мозку генератора збудження). Сучасні уявлення про механізми спастичності після спінальної травми свідчать, що цей розлад є наслідком неадекватної компенсації втрати збуджувачих супраспінальних впливів на мотонейрони нижче від рівня травми. У нормі у відповідь на супраспінальні серотонін- та норадренергічні впливи мотонейрони генерують платоподібні підпорогові деполяризаційні потенціали; за їх наявності інші збуджувачі низхідні впливи, наприклад кірково-спинномозкові, призводять до розрядження мотонейрона, достатнього для збудження та скорочення м'яза [4, 5]. Після спінальної травми денервовані мотонейрони набувають підвищеної чутливості до глутаматергічних впливів [6] на тлі збільшення активності глутаматергічних аферентів [7]. У подальшому мотонейрони набувають здатності до генерування плато-потенціалів без супраспінальних впливів [4, 8], що пов'язано передусім з експресією серотонінових рецепторів 5-HT_{2C}, пре-мРНК яких не редагується у звичних для нормального стану сайтах [9–14]. Редагування здійснюється деаміназою ADAR2 (adenine deaminase acting on RNA 2), експресія якої в тканині спинного мозку нижче від рівня травми зменшується, ймовірно, у зв'язку з наявністю типового запального процесу в перифокальній зоні [10].

Трансплантація стовбурових клітин нервового гребеня (СКНГ) при спінальній травмі спричиняє протизапальну, нейропротекторну, антиапоптотичну та ремієлінізуючу дію, покращуючи результати функціональної регенерації спинного мозку, тобто реінервації мотонейронів нижче від рівня травми [15, 16]. Це означає, що СКНГ повинні впливати й на перебіг синдрому посттравматичної спастичності. Наявні поодинокі роботи, що торкаються цього питання [17]. Це актуалізує дослідження впливу СКНГ у комплексі

з прорегенеративним матриксом на перебіг синдрому спастичності при спінальній травмі.

Мета роботи — дослідити вплив імплантації NeuroGel™, асоційованого зі СКНГ, на динаміку спастичності в паретичній задній кінцівці щура після травми спинного мозку.

Матеріали та методи

Дослідження виконано з дотриманням існуючих норм біоетики на білих безпородних щурах (віварії ДУ «Інститут нейрохірургії імені акад. А.П. Ромоданова НАМН України» та Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України), віком 5 міс., масою 250 г, утримуваних у стандартних умовах. Сформовано 3 експериментальні групи: «контроль» — травма спинного мозку (щури-самці, $n = 16$); «нейрогель» — травма спинного мозку + гомотопічна імплантатія фрагмента NeuroGel™ (щури-самці, $n = 20$); «нейрогель + СКНГ» — травма спинного мозку + гомотопічна імплантатія фрагмента NeuroGel™, асоційованого із СКНГ зрілої миші-самця ($n = 12$). Остання група включала дві рівновеликі підгрупи: «нейрогель + СКНГ_♀» (щури-самці, $n = 6$) та «нейрогель + СКНГ_♂» (щури-самки, $n = 6$). Термін спостереження — 24 тижні.

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 різного діаметра — менше від 2 нм, 2–50 та 51–300 нм [18].

СКНГ отримували з експлантів потовщення піхви фолікула вібриси зрілої миші-самця лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J (трансгенні за геном зеленого білка флуоресценції). Капсулу фолікула розрізали вздовж, фолікул пересікали поперечно вище та нижче від потовщення, що виділяли з капсули та вмішували в чашку Петрі, вкриту колагеном. Після прикріплення протягом однієї години експлантати заливали середовищем росту: α MEM (Sigma, США) з додаванням 10% 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 мМ глютаміну, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 2,5 мкг/мл амфотерицину В. Культивування проводили в CO₂-інкубаторі в умовах зволоженого повітря з 5% CO₂ при температурі 37 °C. Перший пасаж проводили на десяту добу в культуральний флакон 25 см², культивували до конфлуентного стану. Пасажування проводили за допомогою 0,05% розчину трипсину в 0,53 мМ розчині 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 фірми-виробника (Becton Dickinson, США). Визначення інтенсивності проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері BDFACSAria (Becton Dickinson, США) за допомогою комп'ютерної програми

¹ Дослівно: «motor disorder characterized by a velocity dependent increase in the tonic stretch reflex (muscle tone) with exaggerated tendon jerks, resulting from hyper excitability of the stretch reflex, as one component of the upper motor neurone syndrome» [1]. За іншою версією, спастичність — це «disordered sensori-motor control, resulting from an upper motor neurone lesion, presenting as intermittent or sustained involuntary activation of muscles» [3].

BDFACS Diva 6.1, виражали у відсотках, аналізували з використанням U-тесту Манна — Уїтні.

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

Клітини культури досліджували на здатність до направленого диференціювання в адипогенному та остеогенному напрямках. Адипогенне диференціювання активували шляхом 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 містило 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 сукупністю ознак більшість культивованих клітин відповідали фенотипу СКНГ.

Через 5 діб культивування в середовище укладали фрагменти NeuroGel™ розміром 16 мм³, культивували протягом 10 діб, до моменту трансплантації. Безпосередньо перед трансплантацією 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, СКНГ добре проникають у товщу гелю, колонізують наявні в ньому пори, проявляють ознаки активної життєдіяльності та диференціювання.

Для відтворення спінальної травми використали модель лівобічного пересічення поперечника спинного мозку зрілого щура на рівні T₁₁ [19]. Оперативні втручання здійснювали при загальному знеболюванні (внутрішньоочеревинне введення суміші розчинів ксилазину (Sedazin, Biowet, Польща; 15 мг/кг) і кетаміну (Calypsol, «Гедеон Ріхтер А.О.», Угорщина; 70 мг/кг)). У тварин групи «нейрогель» у рану спинного мозку імплантували фрагмент NeuroGel™ розміром ~2 мм³, у тварин групи «СКНГ + нейрогель» — фрагмент NeuroGel™, асоційований із СКНГ. 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 тварини 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 Basso — Beattie — Bresnahan (BBB) [19, 20]. Показник спастичності (ПС) ЗІК визначали на рівні надп'яtkово-гомількового та колінного суглобів, використовуючи загальновідому шкалу Ashworth [21]. Діапазон ПФ ЗІК згідно зі шкалою BBB — 0–21 бал, діапазон ПС ЗІК згідно зі шкалою Ashworth — 0–4 бали. Тестування здійснювали протягом перших 2 місяців — наприкінці кожного тижня, у подальшому — наприкінці кожного місяця. Тривалість спостереження для тварин усіх експериментальних груп становила 28 тижні; введення 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 (Mann — Whitney U-test), 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 (Wilcoxon). 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 (Spearman), результати оцінки виражали у вигляді значення коефіцієнта r із звичним їх трактуванням.

Результати та обговорення

Імплантація NeuroGel™ та трансплантація СКНГ, асоційованих з NeuroGel™, нормалізує розподіл значень ПС ЗІК (рис. 1).

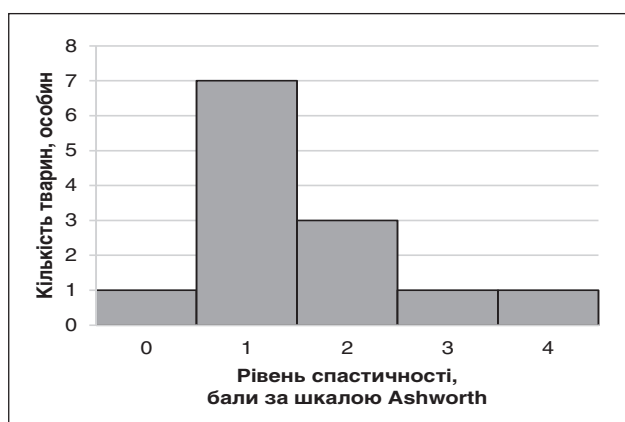


Рисунок 1. Розподіл значень ПС ЗІК у групі «нейрогель + СКНГ» на 28-му тижні спостереження
Примітка: у випадку нецілого значення ПФ ЗІК показник тварини зараховували до обох суміжних цілих значень.

Інтенсивний лінійний приріст значень ПС ЗІК у групі «контроль» спостерігали протягом 1-го місяця (рис. 2); протягом 6–8-го тижня відбувалося збільшення показника з однаковою швидкістю (протягом 6–7-го тижня — значуще, $p < 0,05$), протягом 5-го місяця — значуще ($p < 0,05$) збільшення показника до $2,6 \pm 0,4$ бала за Ashworth, у подальшому — невідповідне зменшення до $2,5 \pm 0,4$ бала за шкалою Ashworth, що відповідає суттєвому підвищенню мимовільного опору м'язів ЗІК при пасивних рухах у тестованих суглобах з обмеженням діапазону пасивних рухів.

Значущий ($p \leq 0,005$) приріст ПС ЗІК у групі «нейрогель» (рис. 2) виявляли протягом 3-го, 7-го тижня та 5-го місяця. Станом на 28-й тиждень спостереження ПС ЗІК становив $1,7 \pm 0,2$ бала за шкалою Ashworth, що відповідає суттєвому підвищенню мимовільного опору м'язів ЗІК при пасивних рухах у тестованих суглобах без обмеження обсягу пасивних рухів.

Динаміка ПС ЗІК групи «нейрогель + СКНГ» нагадувала динаміку в групі «нейрогель» (рис. 2), відрізняючись наявністю значущого приросту протягом 3-го й 7-го тижня, 4-го та 5-го місяця. Станом на 28-й тиждень спостереження ПС ЗІК у групі становив $1,6 \pm 0,3$ бала за шкалою Ashworth.

Значуще збільшення ПС ЗІК у підгрупі «нейрогель + СКНГ_ч» спостерігали лише протягом 3-го тижня ($p = 0,028$), у підгрупі «нейрогель + СКНГ_ж» — протягом 3, 7 та 8-го тижнів. Цікаво, що станом на 28-й тиждень експерименту значення ПС ЗІК у обох підгрупах практично збіглися з показниками групи «нейрогель» (рис. 26).

Значущу різницю між значеннями ПФ ЗІК у групах «нейрогель» та «контроль» виявляли на 7-му добу, на 5–7-му та 12–24-му тижні, між групами «нейрогель + СКНГ» та «контроль» — на 2, 4–7 та 20-му тижні; максимальну різницю ПС ЗІК між групами «нейрогель + СКНГ» та «нейрогель» відмічали на 7-му добу спостереження ($p = 0,13$).

Різниця між значеннями ПС ЗІК підгрупи «нейрогель + СКНГ_ч» та групи «нейрогель», а також підгруп

«нейрогель + СКНГ_ч» і «нейрогель + СКНГ_ж» значуща протягом 1–2-го тижня ($p \leq 0,05$), різниця між ПС ЗІК підгруп «нейрогель + СКНГ_ч» та «нейрогель + СКНГ_ж», максимальна протягом 3-го місяця, сягала 0,83 бала за шкалою Ashworth ($p = 0,124$).

Більш щадний варіант перебігу синдрому посттравматичної спастичності в підгрупі «нейрогель + СКНГ_ч» протягом 1–2-го та 3-го місяця, на нашу думку, пов'язаний з позитивним впливом СКНГ на перебіг спінальної травми та регенераційного процесу, його відсутність у підгрупі «нейрогель + СКНГ_ж» може бути пояснена негативним імунним впливом на трансплантовані клітини з боку реципієнта — тварини протилежної статі. Багатьма дослідженнями встановлено негативний ефект різностатевості донора та реципієнта (sex-mismatched transplantation) на результативність трансплантації [22, 23], що обумовлено наявністю кодованих статевими хромосомами другорядних антигенів гістосумісності (minor histocompatibility antigens, mHAs; Y-H та X-H) [23].

При аналізі кореляції індивідуальних значень ПФ та ПС ЗІК кожної тварини на різних термінах спостереження в групі «контроль» виявлено 18,8 % тварин з помірною та сильною від'ємною кореляцією ($p < 0,05$); у групі «нейрогель» — 20 % тварин з помірною додатною кореляцією ($p < 0,05$); у групі «нейрогель + СКНГ» — 2 тварини із сильною ($r = 0,82$, $r = 0,94$) та 4 — з помірною додатною кореляцією ($0,61 \leq r \leq 0,7$).

При аналізі кореляції індивідуальних значень ПФ та ПС ЗІК різних тварин на кожному з термінів спостереження у групі «контроль» виявлено помірну та сильну від'ємну кореляцію на 3–6-му та 8–28-му тижнях ($p < 0,05$); у групі «нейрогель» — сильну та помірну від'ємну кореляцію на 12–28-му та 3–8-му тижнях відповідно ($p < 0,05$); у групі «нейрогель + СКНГ» — сильну (7, 8, 16, 20-й тиждень, $r \leq -0,77$; $p < 0,05$) та помірну (7-ма доба, 12, 16, 24, 28-й тиждень, $-0,71 \leq r \leq -0,59$; $p < 0,05$) 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

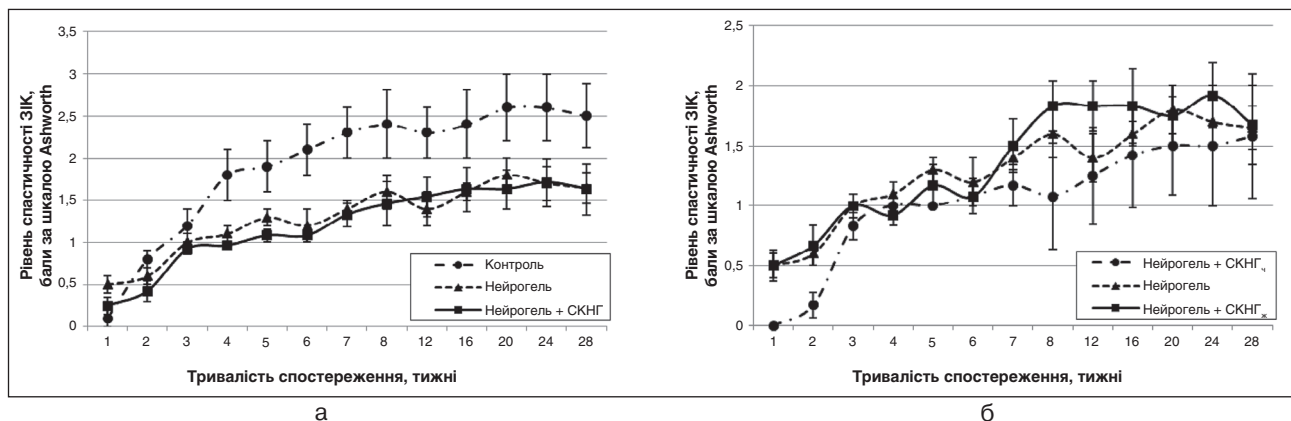


Рисунок 2. Динаміка ПС ЗІК протягом періоду спостереження: а) у групах «контроль», «нейрогель» і «нейрогель + СКНГ»; б) у групі «нейрогель» та підгрупах «нейрогель + СКНГ_ч» і «нейрогель + СКНГ_ж»

Примітка: різниця між групами «нейрогель» і «контроль» значуща на 7-му добу, на 5–7-му та 12–24-му тижні, між групами «нейрогель + СКНГ» і «контроль» — на 2, 4–7 та 20-му тижнях; різниця між підгрупою «нейрогель + СКНГ_ч» і групою «нейрогель», а також між підгрупами «нейрогель + СКНГ_ч» і «нейрогель + СКНГ_ж» значуща протягом 1–2-го тижня ($p \leq 0,05$).

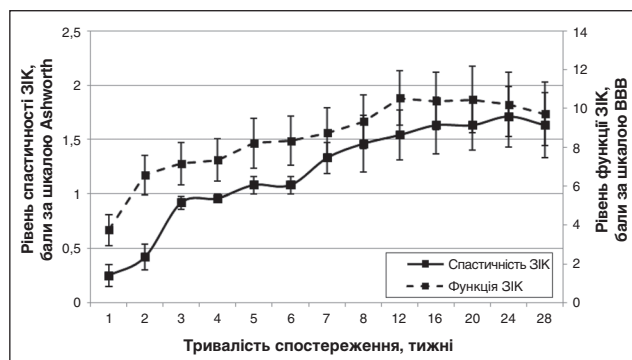


Рисунок 3. Зіставлення в часі динаміки ПФ та ПС ЗІК у групі «нейрогель + СКНГ»

($p < 0,05$), для групи «нейрогель» — сильну додатну кореляцію ($r = 0,94$; $p < 0,01$), для групи «нейрогель + СКНГ» — сильну додатну кореляцію ($r = 0,92$; $p < 0,01$), що вповні відповідає картині, отриманій при зіставленні динаміки обох показників у часі (рис. 3).

Висновки

1. Ксенотрансплантація СКНГ у комплексі з NeuroGelTM не призводить до значущих змін величини ПС ЗІК порівняно з ізольованою імплантацією NeuroGelTM, однак вірогідно змінює динаміку синдрому спастичності.

2. Динаміка ПС ЗІК підгрупи «нейрогель + СКНГ_ж» близька до динаміки групи «нейрогель», динаміка ПС ЗІК підгрупи «нейрогель + СКНГ_ч» суттєво різниться, характеризується нижчими значеннями показника, особливо протягом 1–2-го та 8-го тижня.

3. На відміну від групи «контроль», у випадку імплантації NeuroGelTM та NeuroGelTM у комплексі з СКНГ при від'ємній кореляції індивідуальних значень ПФ та ПС ЗІК у межах кожного з термінів спостереження наявна сильна додатна кореляція значень обох показників, усереднених по групах, протягом періоду спостереження.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів при підготовці даної статті.

Список літератури

1. Lance J.W. The control of muscle tone, reflexes, and movement: Robert Wartenberg Lecture [Text] / J.W. Lance // *Neurology*. — 1980. — Vol. 30, № 12. — P. 1303-1313.
2. 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.
3. Spasticity: Clinical perceptions, neurological realities and meaningful measurement [Text] / A.D. Pandyan et al. // *Disabil. Rehabil.* — 2005. — Vol. 27, № 1–2. — P. 2-6.
4. 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, doi: 10.3389/fnint.2014.00036.
5. 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.

6. 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.

7. Spinal shock revisited: a four-phase model [Text] / J.F. Di-tunno et al. // *Spinal Cord*. — 2004. — Vol. 42, № 7. — P. 383-395.

8. 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.

9. Recovery of motoneuron and locomotor function after spinal cord injury depends on constitutive activity in 5-HT_{2C} receptors [Text] / K.C. Murray et al. // *Nature Med.* — 2010. — Vol. 16, № 6. — P. 694-701.

10. 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 et al. // *Sci. Rep.* — 2015. — Vol. 5, Article 12615. — P. 1-15, doi: 10.1038/srep12615.

11. Serotonergic transmission after spinal cord injury [Text] / R. Nardone et al. // *J. Neural. Transm. (Vienna)*. — 2015. — Vol. 122, № 2. — P. 279-295, doi 10.1007/s00702-014-1241-z.

12. 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.

13. RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor silences constitutive activity [Text] / C.M. Niswender et al. // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274, № 14. — P. 9472-9478.

14. New insights into the biological role of mammalian ADARs; the RNA editing proteins [Text] / N. Mannion et al. // *Biomolecules*. — 2015. — Vol. 5, № 4. — P. 2338-2362, doi:10.3390/biom5042338.

15. 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, doi: 10.1002/stem.1579.

16. 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, doi: 10.1016/j.nbd.2013.10.014.

17. Potential of olfactory ensheathing cells from different sources for spinal cord repair [Text] / A. Mayeur et al. // *PLoS ONE*. — 2013. — Vol. 8, № 4. — P. 1-12, doi:10.1371/journal.pone.0062860.

18. 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.

19. Модель пересічення половини поперечника спинного мозку. І. Технічні, патоморфологічні та клініко-експериментальні особливості [Текст] / В.І. Цимбалюк та ін. // *Укр. нейрохірург. журнал*. — 2016. — № 2. — С. 18-27.

20. 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.

21. 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.

22. Clinical impact of H-Y alloimmunity [Text] / Popli R., Sahaf B., Nakasone H. et al. // *Immunol. Res.* — 2014. — Vol. 58, № 2–3. — P. 249-258, doi: 10.1007/s12026-014-8514-3.

23. Spierings E. Minor histocompatibility antigens: past, present, and future [Text] / E. Spierings // *Tissue Antigens*. — 2014. — Vol. 84, № 4. — P. 347-360, doi: 10.1111/tan.12445.

Отримано 03.10.2016 ■

Цымбалюк В.И.¹, Медведев В.В.², Васильев Р.Г.^{3,4}, Рыбачук О.А.^{3,4}, Козьявкин В.И.⁵, 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

⁴Медицинская компания «Илаа», г. Киев, Украина

⁵Международная клиника восстановительного лечения, г. Трускавец, Украина

Влияние имплантации NeuroGel™ в сочетании с ксеногенными стволовыми клетками нервного гребня на течение синдрома спастичности после экспериментальной травмы спинного мозга

Резюме. Цель — изучить влияние имплантации NeuroGel™, ассоциированного со стволовыми клетками нервного гребня (СКНГ), на динамику спастичности в паретической задней конечности крысы после травмы спинного мозга. **Материалы и методы.** Животные — белые беспородные крысы (5 мес., 250 г); группы: 1 — травма спинного мозга (самцы; n = 16); 2 — травма спинного мозга + гомотопическая имплантация фрагмента NeuroGel™ (самцы; n = 20); 3 — травма спинного мозга + гомотопическая имплантация фрагмента NeuroGel™, ассоциированного с СКНГ мыши (n = 12). Группа 3 включала животных мужского (n = 6) и женского пола (n = 6) — подгруппы 3_м и 3_ж соответственно. Модель травмы — левостороннее пересечение половины спинного мозга на уровне T₁₁; длительность наблюдения — 28 недель; оценка показателя функции (ПФ) и показателя спастичности (ПС) задней ипсилатеральной конечности (ЗИК) — шкала Basso — Beattie — Bresnahan и шкала 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 группе 2 — 1,7 ± 0,2 балла, в группе 3 — 1,6 ± 0,3 балла, в подгруппе 3_м — 1,6 ± 0,5 балла, в подгруппе 3_ж — 1,7 ± 0,3 балла по шкале Ashworth. Достоверную (p < 0,05) разницу между значениями ПС ЗИК в группах 1 и 2 выявляли на 7-е сутки, на 5–7 и 12–24-ю неделю, между группами 1 и 3 — на 2, 4–7 и 20-ю

неделю; максимальную разницу ПС ЗИК между группами 2 и 3 выявляли на 7-е сутки наблюдения (p = 0,13). Разница между значениями ПС ЗИК подгруппы 3_м и группы 2, а также подгрупп 3_м и 3_ж достоверная в течение 1–2-й недели (p ≤ 0,05), разница между ПС ЗИК подгрупп 3_м и 3_ж максимальна в течение 3-го месяца, достигает 0,83 балла по Ashworth (p = 0,124). Динамика ПС ЗИК в группе 3 отличается от показателей группы 2 наличием достоверного прироста в течение 3-й, 7-й недели, 4-го и 5-го месяца. В отличие от группы 1, в группах 2 и 3 при отрицательной корреляции индивидуальных значений ПФ и ПС ЗИК в пределах каждого термина наблюдения присутствует сильная положительная корреляция значений обоих показателей, усредненных по группам, на протяжении периода наблюдения. **Выводы.** Ксенотрансплантация СКНГ в комплексе с NeuroGel™ не приводит к значительным изменениям уровня спастичности в сравнении с изолированной имплантацией NeuroGel™, однако существенно изменяет динамику этого осложнения, с тенденцией к ухудшению течения в отдаленном периоде травмы в условиях несовпадения пола донора и реципиента.

Ключевые слова: травма спинного мозга; синдром спастичности; восстановительная нейрохирургия; тканевая нейротехника; искусственный тканевый матрикс; стволовые клетки нервного гребня

V.I. Tsybaliuk¹, V.V. Medvediev², R.G. Vasiliev^{3,4}, O.A. Rybachuk^{3,4}, V.I. Koz'yavkin⁵, N.G. Draguntsova¹

¹State Institution "Institute of Neurosurgery named after Academician A.P. Romodanov of the NAMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine

²Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

³State Institution "Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, Ukraine

⁴Medical Company "Ilaa", Kyiv, Ukraine

⁵International Clinic of Rehabilitation, Truskavets, Ukraine

The effect of NeuroGel™ with xenogenic neural crest stem cells implantation on the course of spasticity syndrome after experimental spinal cord injury

Abstract. The aim of the study was to examine NeuroGel™ with xenogenic neural crest stem cells (NCSC) implantation on the rat's paretic hind limb spasticity dynamics after experimental spinal cord injury. **Materials and methods.** 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 — subgroups 3_m and 3_f, respectively. Model of injury — left-side spinal cord hemisection at T₁₁; the duration of observation — 28 weeks; ipsilateral hindlimb (IHL) function indicator (FI) and spasticity indicator (SI) determination — the Basso-Beattie-Bresnahan scale and Ashworth scale, respectively. **Results.** At the 28th week, in the group 1 IHL SI was 2.5 ± 0.4 points, in group 2 — 1.7 ± 0.2 points, in group 3 — 1.6 ± 0.3 points, in a subgroup 3_m — 1.6 ± 0.5 points, in a subgroup 3_f — 1.7 ± 0.3 points of Ashworth scale. Significant (p < 0.05) differences between the IHL SI in the group 1 and group 2 were noted at the 7th day, 5th–7th and 12th–24th weeks, between IHL FI in the group 1 and group 3 — at the

2nd, 4th–7th and 20th weeks. The maximum prevalence of group 3 IHL FI over the group 2 IHL FI was observed at the 7th day (p = 0.13). Significant difference between IHL FI in the subgroup 3_m and group 2 and between IHL FI in the subgroup 3_m and group 3_f was found at the 1st–2nd week. Difference between IHL FI in the subgroup 3_m and group 3_f was maximal during 3rd month (0.83 points of the Ashworth scale; p = 0.124). Dynamics of the group 2 IHL FI and group 3 IHL FI differs by the presence of significant growth on the 3rd, 7th week, 4th and 5th month. Unlike group 1, in group 2 and group 3 a negative correlation was observed between individual IHL FI and SI values in each of the observation terms combined with the strong positive correlation between average IHL FI and SI values along the observation period. **Conclusions.** NCSC xenotransplantation in association with NeuroGel™ does not change the level of spasticity compared to the implantation of NeuroGel™ only, but significantly alters its dynamics, with the trend towards worsening in the remote period of injury in the case of different donor and recipient sexes.

Keywords: spinal cord injury; spasticity syndrome; restorative neurosurgery; tissue neuroengineering; artificial tissue scaffold; neural crest stem cells