

УДК: 616-089.843:616.831.71-001-092.9.259

Цимбалюк В. І.¹, Медведєв В. В.², Сенчик Ю. Ю.³¹ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН», Київ, Україна²Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна³Київська міська клінічна лікарня швидкої медичної допомоги, Київ, Україна

e-mail: vavo2010@gmail.com

ВПЛИВ ТКАНИННОЇ НЕЙРОТРАНСПЛАНТАЦІЇ НА ВІДНОВЛЕННЯ ТОНУСУ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ ПРИ МЕХАНІЧНІЙ ТРАВМІ МОЗОЧКА В ЕКСПЕРИМЕНТІ

РЕЗЮМЕ

В роботі проведено порівняльне дослідження впливу трансплантації фетальної нервової тканини щурів 18 дня гестації (ТФНТ), трансплантації тканини нюхової цибулини статевозрілих щурів (ТТНЦ) та фетальної нирки щурів 18 дня гестації (ФН) на динаміку м'язової гіпотонії після травми півкулі мозочку у статевозрілих щурів. Тест «ходіння по бруску» дозволив виявити щонайменше три ступені гіпотонії, які відповідають 2, 3, та 4 балам оцінювальної шкали. Для дослідження відбирали тварин, у яких на третю добу після нанесення травми показник функції за шкалою *BWT* (ПФ) був строго меншим 4 балів. Стан вираженої гіпотонії асоціювали з ПФ у 3 бали, значно вираженої – з 2 балами, слабкої – з 4 балами. Основні відмінності у динаміці відновного процесу між вибірками виявляли протягом першого місяця спостереження: у вибірках контрольних груп констатували повільне відновлення функції статокординаторної сфери, у вибірках груп ФН, ТТНЦ та ТФНТ – швидке (протягом перших 9 діб), що змінювався повільним приростом (протягом 9–33 діб). Стан легкої гіпотонії у вибірках контрольних груп відмічали на кінець першого місяця, у вибірках груп ФН, ТТНЦ та ТФНТ – на 9-у добу, причому нормотонію спостерігали на 21-у (вибірка групи ТФНТ) та 30-у добу (вибірки груп ФН і ТТНЦ). Отримані дані свідчать, що нейротрансплантація чинить суттєвий вплив на відновлення м'язового тонузу після травми мозочка, кількісні та якісні показники якого залежать від виду трансплантату.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: експериментальна травма мозочка, мозочкова гіпотонія, трансплантація фетальної нервової тканини, трансплантація тканини нюхової цибулини, відновна нейрохірургія.

Нервова система, беззаперечно, є прикладом найскладнішої форми організації матерії, що, вочевидь, пов'язано з реалізацією нею найрізноманітніших, часто невідтворно складних функцій. В силу складності внутрішньої функціональної структури, наслідки ураження нервової системи неможливо розглядати у контексті прийнятної для опису уражень інших систем організму схеми: «ураження частини системи – зниження її результуючої функціональної активності». Частіше за все наслідком ураження нервової системи є зміна її функцій: зменшення реалізації одних поряд із надмірним увиразненням інших. Класичним прикладом такого стану є формування надмірної неусвідомленої активності рухового апарату на тлі зниження чи нормального рівня усвідомленої, що характерно для центрального парезу і його крайнього вияву – синдрому спастичності, а також гіперкінезів, судомної активності при епілепсії тощо. Проявом цієї ж особливості патології нервової системи є формування різного виду нейропатичних больових синдромів.

Протягом тривалого часу синдром спастичності (патологічний стан, поширений у клініці нервових хвороб) перебував поза увагою дослідників патологічних станів нервової системи. Зараз ситуація помітно змінюється, дослідженню патофізіологічних механізмів цього убиквіторного фундаментального прояву низки захворювань нервової системи надається значна увага. Передусім це стосується травми спинного мозку, при якій синдром спастичності виявляють у 60–78% хворих [1]. Деконструкція значної частини низхідних впливів на рухові нейрони і формування синдрому спастичності є провідною особливістю патогенезу значної кількості гострих порушень мозкового кровообігу (35% випадків), розсіяного склерозу (85% випадків), більшості форм дитячого церебрального паралічу [2–4].

У загальному вигляді ушкодження нервової системи, що не призводить до смерті хворого, є тим фактором, що обумовлює пластичну її реорганізацію, оптимізацію власної структури з огляду на відновлення втрачених функцій або компенсацію втрат. Основним механізмом

такого процесу є пластичність нейрональних мереж, молекулярні механізми якої протягом останнього часу активно вивчаються. Незважаючи на можливість пластичної перебудови нейрональної мережі вцілілої частини нервової системи, можна констатувати, що цей механізм є досить обмеженим і у більшості випадків без отримання значного позитивного ефекту призводить до формування стійкої значно спрощеної, патологічної топології нейрональних мереж – субстрату гіперпродуктивних синдромів, передусім – спастичності. При цьому зміни відбуваються на рівні протеому, транскриптому, а можливо – геному вцілілих нейронів [5]. Так, формування синдрому спастичності на моделі травми спинного мозку включає стійкі зміни рецепторного апарату рухових нейронів нижче рівня травми, особливо рецепторів глутамату, серотоніну та норадреналіну, причому у двох останніх випадках нові види рецепторів володіють здатністю до аутоактивації G-білка без зв'язування з медіатором [6–8]. Не слід виключати і можливість зміни медіаторного типу інтернейронів, збільшення активності існуючих серотонінергічних інтернейронів чи появу нових серотонінсинтезуючих клітин, що загалом призводить до збільшення продукції серотоніну у тканині денервованих сегментів спинного мозку [8, 9]. Є суттєві підстави вважати такий механізм розвитку синдрому спастичності при травмі спинного мозку та інших варіантах патології низхідних проєктивних нейронів провідним.

У фізіологічних умовах чутливість рухових нейронів до серотоніну, котрий виділяється синаптичними закінченнями багатьох низхідних волокон, визначає базову деполаризацію мембрани – стан, без якого жоден інший вхід на руховий нейрон не може спричинити його збудження і активацію скорочення відповідних м'язових волокон [10]. Різка виключення такого механізму підтримання збудливості рухових нейронів при спінальній травмі, на думку більшості дослідників, є провідною причиною виникнення спінального шоку, а недосконала у більшості випадків компенсація втрати веде до формування нерегульованої постійної надмірної збудливості рухових нейронів, що є електрофізіологічним субстратом синдрому спастичності [10].

Можна констатувати, що на даний час об'єктом більшості досліджень є наслідки швидкого виключення значної кількості низхідних серотонін- чи норадренергічних проєкцій на рухові нейрони. Однак практично невивченими залишаються випадки часткового виключення чи зниження активності серотонін- та норадренергічних проєкцій. Такого роду патологічні стани повинні характеризуватися наявністю симптому гіпотонії. Одним з прикладів є ураження мозочка і формування атаксії, складовим симптомом якої є гіпотонія. Механізми розвитку мозочкової гіпотонії, її можливий зв'язок з виникненням гіперметрії (ймовірно, обумовленої надмірною збудливістю рухових нейронів), динаміка змін м'язового тону при травмі мозочка залишаються практично невивченими, незважаючи на певну обґрунтованість припущення щодо можливого зв'язку нейронів мозочка з серотонін- та адренергічними нейронами стовбура мозку [11].

У світі щорічно реєструють близько 10 млн випадків ЧМТ, пряме ураження мозочка спостерігається у 0,8% таких випадків [12–15]. Значно частіше ураження мозочка при ЧМТ є непрямыми, вторинними, відтермінованими у часі [16–19]. При первинному пошкодженні мозочка в гострому періоді травми виявляють гіпотонію, атаксію, дисметрію, мозочковий тремор, адіадохікінез, запаморочення [20].

Патологічні особливості перебігу прямого ураження мозочка відображають загальновідомі закономірності розвитку травматичного процесу в центральній нервовій системі (ЦНС) і доповнюються специфікою динаміки загибелі нейронів мозочка, особливо клітин Пуркіньє [21–24]. У ранньому періоді прямої травми мозочка нейрони цього відділу ЦНС гинуть як внаслідок безпосередньої дії механічного чинника, ішемії, так і через розвиток неспецифічного запалення. У подальшому на тлі санації вогнища травми, затишання аутоімунного нейродегенеративного процесу, а також проявів організації травматичного вогнища спостерігають поступову дифузну елімінацію нейронів мозочка, особливо перифокальної зони.

Розвиток нейродегенеративного процесу у мозочку при травмуванні інших відділів головного мозку виявляють не у всіх випадках ЧМТ, зазвичай, він ініціюється уже протягом першої доби після травми і триває не менше одного місяця. При цьому виявляють дифузну загибель нейронів кори мозочка з астрогліозом її гранулярного та молекулярного шару, ступінь прояву якої корелює із тяжкістю ЧМТ [25–28]. Найбільш ймовірними причинами такого виду дегенерації клітин Пуркіньє є ексайтотоксичність, вплив активованої мікроглії, опосередкований механічний вплив травмуючого чинника [26, 27, 29, 30]. Однією з причин дегенерації клітин Пуркіньє при різних видах ЧМТ вважають також аксонотомію – потужний проапоптотичний чинник [17, 31, 32]. Однак значна кількість авторів ставить під сумнів таку гіпотезу, оскільки існують вагомі докази виняткової стійкості клітин Пуркіньє до цього виду ураження, що обумовлено, вочевидь, низькою експресією ними внутрішньоклітинного фактора росту аксонів GAP-43 (*growth associated protein 43*) [16, 26, 27, 33, 34]. Гени, які запускають каскад трансформації нейронів після аксонотомії, активуються лише в поодиноких клітинах Пуркіньє, розташованих поруч з осередком травми, що вказує на низьку здатність клітин Пуркіньє до повноцінного відновлення власних аксонів [35, 36]. Після аксонотомії цього виду нейронів будь-які регенераційні зміни протягом кількох тижнів відсутні; у подальшому спостерігають широке розгалуження (спраутинг) проксимальної кульги ушкодженого аксона, з формуванням значної кількості тонких терміналей, що повертаються до кори мозочка, де формують гетеротопічні синапси з дендритами клітин-зерен [33].

На даний час існує невелика кількість даних відносно ефективності відновного лікування наслідків ушкодження мозочка [25, 36, 37]. Перспективним методом відновлення функцій ЦНС з точки зору можливого клінічного використання на даний час вважається трансплантація тканини нюхової цибулини (ТТНЦ) зрілого організму, однак найбільш вивченим на моделі ЧМТ – трансплантація фетальної нервової тканини (ТФНТ) [38–41]. При використанні кожного із вказаних методів позитивний функціональний ефект досягається, в основному, шляхом стимуляції аутогенних нейропластичних регенераційних процесів. Вплив нейротрансплантації на формування симптому гіпотонії не вивчений, що, поряд із викладеним вище, стало передумовою для проведення даного дослідження.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У якості експериментальних тварин використовували статево-зрілих щурів-самок, вагою 250–300 г, середнього віку 5,5 міс. з виводку віварію ДУ «Інститут нейрохірургії імені акад. А. П. Ромоданова НАМН». Усі маніпуляції проводили із урахуванням існуючих норм біоетики. Було сформовано наступні групи тварин: 1) група «контроль-1» (К-1), тваринам якої наносили локальну дозовану травму лівої півкулі мозочка середнього ступеня тяжкості (n = 30); 2) група «контроль-2» (К-2), тваринам якої на 7-у добу після нанесення локальної дозованої травми лівої півкулі мозочка проводили повторне хірургічне втручання з механічним очищенням вогнища забиття мозочка шляхом видалення некротичних мас (n = 21); 3) група «ТФНТ», тваринам якої на 7-у добу після локальної дозованої травми лівої півкулі мозочка проводили хірургічне втручання з механічним очищенням вогнища забиття від некротичних мас та подальшою негайною трансплантацією у сформований дефект тканини півкулі мозочка фрагменту аlogenної фетальної нервової тканини 18 доби гестації (n = 20); 4) група «ТТНЦ», тваринам якої на 7-у добу після локальної дозованої травми лівої півкулі мозочка проводили хірургічне втручання з механічним очищенням вогнища забиття від некротичних мас та подальшою негайною трансплантацією у сформований дефект тканини півкулі мозочка фрагменту аlogenної тканини зрілої нюхової цибулини (n = 21); 5) група «ФН», тваринам якої на 7-у добу після нанесення травми мозочка проводили повторне

хірургічне втручання з механічним очищенням вогнища забиття від некротичних мас та подальшою негайною трансплантацією у сформований дефект тканини півкулі мозочка аlogenної фетальної нирки (n = 20); 6) група інтактних тварин (n = 13). Групу з трансплантацією аlogenної фетальної нирки було сформовано для контролю специфічності впливу трансплантованих тканин нейрогенного походження на травмований мозочок.

Оперативні втручання здійснювали під загальним знеболенням, що досягалося шляхом внутрішньоочеревинного введення суміші розчинів ксилазину («Sedazin», Biowet, Польща) з розрахунку 15 мг/кг маси та кетаміну («Calypsol», Gedeon Rihter, Угорщина) з розрахунку 70 мг/кг маси тіла експериментальної тварини. Після видалення шерстистого покриву голови та верхньої шийної ділянки, дезінфекції шкіри 5%-ним спиртовим розчином йоду на рівні зовнішнього потиличного гребня проводили поздовжній лінійний розріз шкіри, відступивши на 3-4 мм від серединної лінії ліворуч. Потиличну та частину лівої тім'яної кістки скелетували, фрезовий отвір накладали на лусці потиличної кістки, відступивши на 3 мм від лівої гілки лямбдовидного шва та на 5-7 мм від серединної лінії. Отвір розширювали до розмірів трепанаційного вікна діаметром 5 мм, тверду мозкову оболонку (ТМО) залишали інтактною. Тварину фіксували на операційному столику черевцем донизу, голову фіксували плоскими боковими затискачами. Пристрій для нанесення травми складався з пружинного ударника та металевої пластини з реєструючими тензоелементами, до якої перпендикулярно жорстко фіксували стрижень зі змінною довжиною, діаметром 3 мм [42]. Вільний кінець стрижня вводили в трепанаційний отвір впритул до поверхні ТМО. Пластину жорстко фіксували над предметним столиком додатковими затискачами. Пружинний ударник фіксували над пластиною, а його бойок підводили до проекції точки кріплення ударного стрижня на протилежній поверхні пластини. Удар бойка із силою 81,79 Н передавався через стрижень на ТМО та прилеглу мозкову речовину. Паралельно відбувалася деформація пластини з тензоелементами, що реєстрували за допомогою аналогово-цифрового перетворювача у вигляді тензографічної кривої.

Після нанесення травми проводили гемостаз, апоневроз та зашивали шкіру пошарово поліамідними хірургічними нитками, ділянку рани обробляли 5%-ним спиртовим розчином йоду. Тварини протягом 2-4 год утримувалися при температурі повітря 30-33 °С, в подальшому – у спеціальних клітках по 3-6 особин у кожній при середній температурі 21-24 °С та за умов постійного вентилявання приміщення.

Повторні хірургічні втручання у групах К-2, ТФНТ, ТТНЦ та ФН проводили на 7-у добу експерименту, осередок забиття очищали від некротичних мас, трансплантацію фрагментів певного виду тканини здійснювали у сформоване таким чином ложе. Тканину нюхової цибулини отримували у статевозрілих самок щурів білої безпородної лінії віком 5,5 міс одразу ж після забиття шляхом передозування

суміші описаних вище наркотичних засобів. В стерильних умовах матеріал максимально очищали від судинної оболонки, подрібнювали на фрагменти розміром 2×3 мм. Аlogenну фетальну нервову тканину та тканину фетальної нирки отримували на 18-у добу гестації, формували фрагменти розміром 2×3 мм, які до моменту трансплантації утримували у фізіологічному розчині при температурі 37°С.

Оцінку стану статокоординаторної сфери експериментальних тварин проводили за допомогою тесту «ходьби по бруску» – *beam walking test (BWT)*, згідно із 7-бальною шкалою, яка дозволяє з високою точністю визначити рівень функції статокоординаторної сфери (табл. 1) [43]. Тест проводили за допомогою бруска шириною 2 см і довжиною 122 см, встановленого під кутом 18° у напрямку руху. На кінці бруска монтували закриту освітлену комірку з їжею. Проходження тваринами *BWT* реєстрували на аналогову відеокамеру *SONY CCD-TRV408E* (Sony Co., Японія). Перед початком експерименту протягом 2 тижнів піддослідних тварин навчали правильно виконувати тест. Тварин, які після курсу навчання виконували *BWT* з помилками, в експеримент не включали.

Під час експерименту у всіх групах *BWT* проводили, починаючи з 3-ї доби після першого оперативного втручання, що пояснюється тривалим відновленням рухової активності тварин після виходу із стану операційного наркозу. У подальшому тестування кожної тварини проводили щотри доби. Тестування кожної тварини включало три спроби, результат тестування розраховували як середнє арифметичне і у роботі означували як показник функції (ПФ) статокоординаторної сфери тварини. Максимальний термін спостереження тварин складав 60 діб.

З метою деталізації даних щодо динаміки перебігу відновного процесу проводили дослідження динаміки величини приросту ПФ (ΔПФ). Оскільки протягом перших двох діб після нанесення травми мозочка з огляду на складний післяопераційний стан тварин визначення ПФ не проводили, момент завершення падіння значень ПФ після травми залишився нез'ясованим. За таких умов абсолютна величина падіння ПФ протягом перших трьох діб експерименту значно перевищувала абсолютні величини ΔПФ, розраховані протягом подальшого процесу відновлення, що унеможливило їх детальний аналіз. Тому умовно приймали, що протягом третьої доби експерименту ΔПФ становив третю частину від величини падіння ПФ упродовж перших трьох діб: $\Delta\text{ПФ}_{\text{станом на 3 добу}} = (7 - \text{ПФ}_{\text{станом на 3 добу}})/3$.

З метою нівелювання дрібних часових варіацій ΔПФ, укрупнення абсолютних величин її значення, протягом усього подальшого періоду експерименту цей показник розраховували як зміну ПФ за 6 діб спостереження: $\Delta\text{ПФ} = \text{ПФ}_2 - \text{ПФ}_1$, де ПФ_1 – показник рухової активності, визначений шляхом *BWT*, станом на початок обраного 6-добового періоду спостереження; ПФ_2 – показник рухової активності, визначений шляхом *BWT*, станом на кінець обраного 6-добового періоду спостереження.

Таблиця 1. Шкала для оцінки стану стато-координаторної сфери тварин під час виконання *BWT*.

7 балів	Піддослідна тварина менше двох разів оступається при проходженні всієї траєкторії однонаправленого руху по бруску.
6 балів	При проходженні всієї траєкторії однонаправленого руху по бруску тварина оступається у менш ніж 50% виконаних кроків.
5 балів	При проходженні всієї траєкторії однонаправленого руху по бруску тварина оступається у більш ніж 50% виконаних кроків.
4 бали	При проходженні всієї траєкторії однонаправленого руху по бруску тварина оступається і хоча б один раз повністю зісковзує з бруска задніми кінцівками але, утримавшись за нього передніми кінцівками, повертається на брусок і продовжує рух.
3 бали	Піддослідна тварина пересувається по бруску повзком, на череві.
2 бали	Піддослідна тварина не може пересуватися по бруску, при посадці на брусок охоплює його кінцівками, тримаючись спиною доверху, перебуває майже нерухомо, однак не падає, тривалий час утримуючи рівновагу.
1 бал	Піддослідна тварина не може ані пересуватися по бруску, ані утримувати тривалий час рівновагу, падаючи одразу ж після посадки на брусок.

Статистичну обробку результатів дослідження рухової активності експериментальних тварин, а також імунологічних досліджень проводили за допомогою програмного забезпечення *Matlab R2010B* (*Mathworks*, США). Для оцінки достовірності різниці середніх значень ПФ між групами використовували U-тест Манна-Уїтні. Апроксимацію отриманих цифрових даних проводили за допомогою стандартного програмного пакету *Microsoft Excel*. При цьому використовували поліноміальну апроксимацію даних з мірою полінома 6.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз динаміки ПФ, проведений у наших попередніх дослідженнях [44], засвідчив, що результативність відновного процесу найнижча у групі ФН, дещо вища у групах К-1 та К-2, істотно вища у групі ТТНЦ і максимальна у групі ТФНТ (рис. 1).

Так, приріст ПФ у групах К-1, К-2, ФН, ТТНЦ та ТФНТ протягом загального періоду спостереження склав відповідно 2,1, 2, 1,8, 2 та 2,5 бала, а станом на 60-у добу експерименту середнє значення ПФ у вказаних групах становило $5,4 \pm 1,2$, $5,7 \pm 1$, $6,2 \pm 1,1$, $6,3 \pm 0,7$ та $6,6 \pm 0,5$ бала відповідно. При цьому у групах ФН та ТТНЦ відновний процес мав трьохфазний характер, з максимальною інтенсивністю протягом 3–9-ї, 23–27-ї та 45–57-ї доби, а у групах К-1, К-2 і ТФНТ – двохфазний, з максимальною інтенсивністю протягом 21–27-ї та 45–57-ї доби (рис. 2).

Протягом 2-го тижня експерименту найвищий приріст ПФ спостерігали у групах ТТНЦ і ФН, протягом 3–4-го тижнів – у групі ТФНТ, протягом 2-го місяця – у групах ТТНЦ, К-1 і К-2. Останній момент відображає відомий факт відтермінованої у часі регенерації клітин Пуркінє після аксонотомії – основних функціональних одиниць кори мозочка [33].

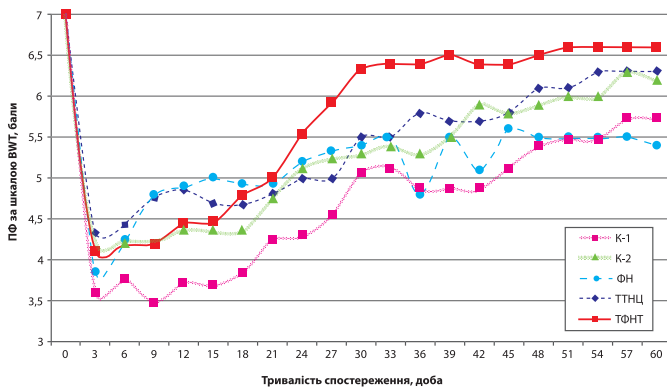


Рис. 1. Динаміка відновлення функції статокоординаторної сфери (ПФ) тварин усіх експериментальних груп протягом 60 днів спостереження.

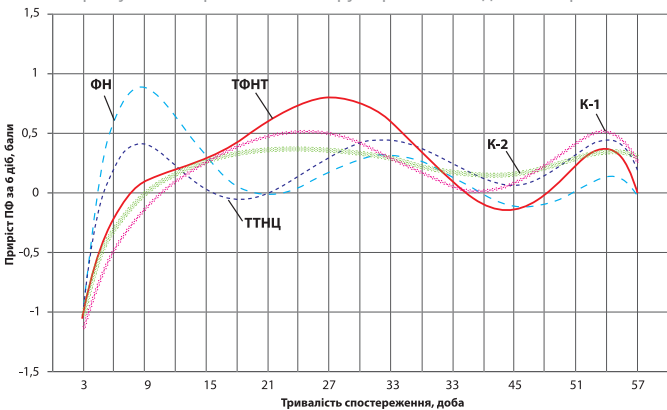


Рис. 2. Динаміка шестидобового приросту ПФ (Δ ПФ) в експериментальних групах протягом загального періоду спостереження після поліноміальної апроксимації з коефіцієнтом міри 6.

Використаний нами функціональний тест *BWT* дозволяє виявляти та оцінювати не лише комплексний розлад функції статокоординаторної сфери при травмі мозочка, а й один із найменш вивчених на сьогоднішній день прояв мозочкової патології – гіпотонію. Під час виконання тесту гіпотонію виявляли у тварин з показником функції статокоординаторної сфери у 2, 3 та деякою мірою 4 бали. Симптом проявлявся у неможливості тварини відірвати тіло від поверхні бруска, що ми воліємо трактувати не лише як ознаку специфічної захисної реакції у відповідь на значне порушення механізмів підтримання рівноваги тіла (більшою мірою – у тварин з ПФ у 2 бали), а й як зниження тонусу м'язів-розгиначів кінцівок (більшою мірою у тварин з ПФ у 3 та 4 бали). Крім того, вивчаючи специфіку рухів лапами у момент промахування, ми дійшли висновку, що помилки у виконанні крокових рухів під час *BWT* можуть бути пов'язані не лише з порушенням механізму забезпечення точності рухових реакцій (оскільки ці реакції тварини виконують після тривалого навчання, а тому їх виконання меншою мірою залежить від поточної корекції мозочком і є, значним чином, автоматизованою реакцією), а й з слабкістю м'язів, особливо аддукторів задніх кінцівок. Однак гіпотетичність такого роду припущень не дає змоги асоціювати менш виражені варіанти гіпотонії зі значеннями ПФ вище 4 балів. Стосовно тварин, у яких ПФ визначали на рівні 4 балів, нами не виявлено однорідності стосовно стану тонусу м'язів-розгиначів: під час дослідження ми спостерігали як повне, так і часткове (тимчасове, з низьким розташуванням черевця над бруском) підтримання маси тіла протягом руху тварини від початку до кінця тестової траєкторії. Зважаючи на це, для аналізу стану тонусу м'язів після травми мозочка та різних видів нейротрансплантації нами були відібрані лише ті тварини, у яких на 3-ю добу після нанесення травми ПФ виявляли на рівні строго меншому 4 балів (ПФ < 4). Стан вираженої гіпотонії асоціювали з ПФ у 3 бали, значно вираженої – гіпотетично з ПФ у 2 бали, слабкої – з ПФ у 4 бали. Згідно з цими критеріями було створено вибірки: група К-1 – 15 тварин, К-2 – 6, ФН – 6, ТТНЦ – 6, ТФНТ – 7 тварин.

Аналіз динаміки зміни ПФ у зазначених вибірках експериментальних груп виявив істотну різницю від виявлених особливостей відновлення функції в цілому по групах (рис. 3, 4). У вибірці з групи К-1 на 3-ю добу середній ПФ становив 2,7, на 30-у – 4,5, на 60-у – 5,3 бала (рис. 3 а, б); протягом періоду спостереження ПФ подвоювався (зростав на 2,6 бала), причому суттєве збільшення ПФ спостерігали як протягом першого, так і протягом другого місяця (відповідно на 1,8 та 0,8 бала). Протягом 33–42 днів спостерігали суттєвий регрес ПФ (з 4,7 до 4 балів), який згодом замінювався подальшим прогресом з уповільненням до кінця експерименту. Швидкість зміни ПФ у цій вибірці відображала таку особливість динаміки: відзначали два її максимуми на 9–21-у та 39–57-у доби спостереження (рис. 4 а). Рівня 4 балів тварини цієї вибірки досягали до 27-ї доби, 5 балів (гіпотетично – відсутність функціонально значимої гіпотонії) – лише до 48-ї доби.

У вибірці з групи К-2 на 3-ю добу середній ПФ становив 3, на 30-у – 4,2, на 60-у – 5,6 бала (рис. 3 а, б); протягом періоду спостереження ПФ практично подвоювався (зростав на 2,6 бала), загальний приріст ПФ протягом першого та другого місяця був практично рівновеликим (1,2 та 1,4 бала відповідно). При цьому протягом перших 18 днів експерименту ПФ практично не змінювався (загальний приріст – 0 балів), неухильне, поступове збільшення ПФ зі сталою швидкістю відзначали, починаючи з 21-ї доби і до кінця експерименту. Швидкість зміни ПФ протягом цього періоду коливалася у межах 0,5 бала (за 6 днів) з тенденцією до поступового зменшення (рис. 4 а). Рівня 4 балів тварини вибірки досягали до 30-ї доби, 5 балів – до 42-ї доби.

У вибірках груп ФН, ТТНЦ та ТФНТ динаміка ПФ істотно різнилася. У вибірці з групи ФН на 3-ю добу середній ПФ становив 3 бали, на 30-у – 5, на 60-у – 4,8 бала (рис. 3, 4); протягом періоду спостереження ПФ збільшувався на 1,8 бала, протягом першого місяця – на 2 бала, протягом другого – коливався в межах 5 балів

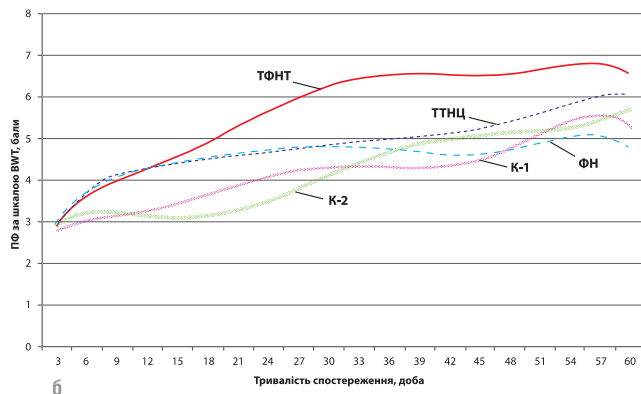
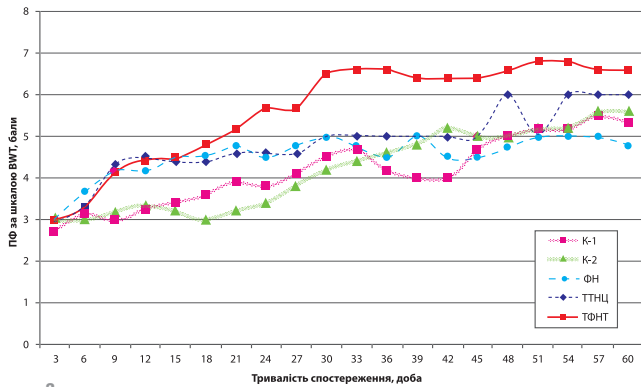


Рис. 3. Динаміка відновлення функції стато-координаторної сфери тварин з вираженою мозочковою гіпотонією, вибраних з кожної експериментальної групи (а); б – поліномальна апроксимація первинних даних, міра полінома – 6.

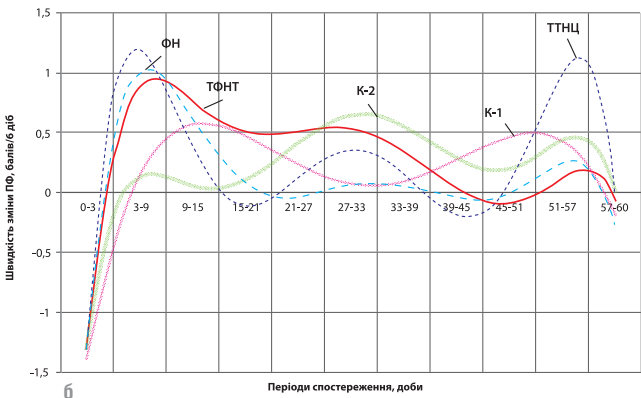
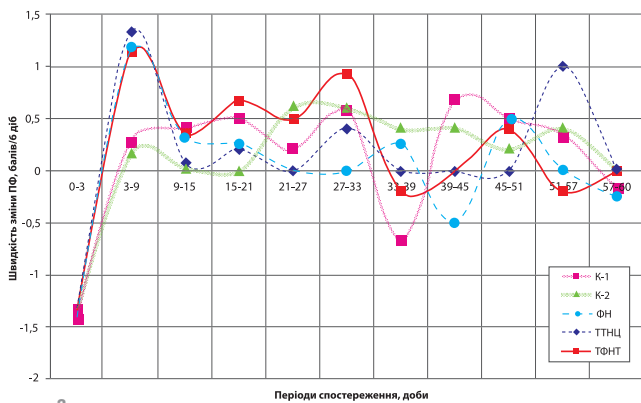


Рис. 4. Динаміка шестидобового приросту ПФ у тварин з вираженою мозочковою гіпотонією, вибраних з кожної експериментальної групи (а); б – поліномальна апроксимація первинних даних, міра полінома – 6.

з тенденцією до зниження. Найбільш інтенсивний прогрес ПФ спостерігали протягом перших 9 днів експерименту (рис. 3 а, б; 4 а), а протягом 9-27 днів відбувалося менш швидке збільшення ПФ (Δ ПФ – 0,3 бала/6 днів). Рівня 4 балів тварини цієї вибірки досягали уже на 9-у добу, 5 балів – на 30-у.

Динаміка ПФ у вибірці з групи ТТНЦ протягом першого місяця експерименту була аналогічною такій у вибірці групи ФН (рис. 3, 4), за виключенням того факту, що фази швидкого (3-9 доба) та повільного (9-27 доба) збільшення ПФ у цій вибірці були чітко відмежовані у часі: протягом 9-15-ї доби приріст ПФ практично не відзначали (рис. 4 а). Достовірний аналіз динаміки ПФ у вибірці групи ТТНЦ протягом другого місяця експерименту здійснити не вдалося через недостатню кількість тварин такого терміну спостереження. Тим не менш можна стверджувати, що рівня 4 балів ПФ у цій вибірці (як і у вибірці з групи ФН) досягав уже на 9-у добу експерименту, 5 балів – очевидно, після 30-ї доби.

Динаміка ПФ у вибірці групи ТФНТ протягом перших 15 днів практично не відрізнялася від виявленої для вибірок груп ФН та ТТНЦ (рис. 3 а, б): станом на 3-ю добу ПФ складав 3 бали, на 15-у – 4,5 бала. Фаза дещо стриманішого швидкого росту у цій вибірці, як і у двох попередніх, обмежувалася 9-ю добою експерименту (рис. 3 а, б; 4 а). У подальшому відзначали неухильне повільне зростання ПФ до 33-ї доби зі зростаючим значенням Δ ПФ (0,4; 0,6; 0,9 балів/6 днів). Ця фаза різнилася від фази повільного росту ПФ у вибірках груп ФН та ТТНЦ, передусім, більшими значеннями Δ ПФ. Завдяки такій динаміці, станом на 30-у добу спостереження ПФ у вибірці склав 6,5 бала, суттєво перевищуючи аналогічний показник у вибірках усіх інших груп. Протягом другого місяця спостерігали швидку стабілізацію ПФ на рівні 6,6 балів з коливаннями навколо цього значення до кінця експерименту (рис. 3 а, б; 4 а). Рівня 4 балів тварини цієї вибірки досягали на 9-у добу, 5 балів – на 21-у.

Виходячи з отриманих даних, можна стверджувати, що тварини з найважчим варіантом травми проявляють іншу динаміку відновного процесу. На відміну від загальних груп, слід виділяти щонайменше 3 варіанти перебігу відновного процесу: у вибірках груп К-1 та К-2, у вибірках груп ФН та ТТНЦ, у вибірці групи ТФНТ. Основна відмінність полягає у перебігу відновного процесу протягом першого місяця спостереження. За цією ознакою слід виділяти групи К-1 та К-2 (повільний перебіг) і ФН, ТТНЦ та ТФНТ (швидкий перебіг протягом 9 днів, повільний – протягом 9-33 днів). Протягом другого місяця експерименту у вибірках груп К-1 та К-2 спостерігали повільне збільшення ПФ, у вибірках ФН та ТФНТ – стабілізацію. Лідерні позиції вибірки групи ТФНТ обумовлені значною активністю тієї складової відновного процесу, що обмежена часовими рамками 9-33 доби, тобто 2-4 тижні післятравматичного періоду.

Найбільш повільно відновлення м'язового тонусу відбувалося у вибірці групи К-1 (тривало 7 тижнів після нанесення травми). Дещо швидше цей процес відбувався у вибірці групи К-2 (протягом 6 тижнів). При цьому рівень 4 балів, тобто стан легкої гіпотонії, відзначали у обох вибірках на кінець першого місяця. У вибірках груп ФН, ТТНЦ та ТФНТ досягнення стану легкої гіпотонії констатували уже на 9-у добу експерименту; нормотонію (у межах ВМТ) – на 21-у (вибірка групи ТФНТ) та на 30-у добу (вибірки груп ФН і ТТНЦ). Таким чином, нейротрансплантація чинить суттєвий позитивний вплив на відновлення м'язового тонусу після травми мозочка.

Згідно з існуючими даними, можна припускати, що кора мозочка відсилає еферентні волокна до присінкових (вестибулярних) ядер у складі нижньої ніжки [11]. Медіаторна специфіка цих впливів не встановлена. Крім того, деякі ядра мозочка (передусім ядро верхини, зубчасте ядро та міжпозиційні ядра) відсилають впливи до присінкових ядер, ретикулярних (сітчастих) ядер однойменної речовини стовбура мозку, червоного ядра та спинного мозку. Усі ці проєкції можуть мати безпосереднє значення до формування тонічних впливів на мотонейрони спинного мозку, передусім через систему низхідних серотонінергічних (від ядер шва ретикулярної

формації) та норадренергічних (від ядер блакитного місця) волокон, що забезпечують добре вивчений механізм підтримання збудливості мотонейронів та тонуусу скелетних м'язів у спокої [10]. Зважаючи на те, що основний об'єм проекцій кори мозочка формують волокна грушоподібних нейронів (ГАМК-ергічні, тобто гальмівні клітини), ядер мозочка – в основному збуджувальні волокна, виникає питання щодо можливого механізму розвитку гіпотонії при ушкодженні саме кори мозочка. Адаже при ушкодженні популяції грушоподібних нейронів вираженість гальмівного впливу на нейрони ядер мозочка і вестибулярних ядер повинна зменшуватися, що означає збільшення активності цих нейронів і, відповідно, їх гіпотетичного впливу на систему підтримання м'язового тонуусу. Очевидно, відповідь на це питання слід шукати у архітектурі та медіаторній специфіці зв'язків між корою мозочка та вестибулярними ядрами, ядрами мозочка та низхідними

серотонін- і адренергічними системами. Окрім того, слід враховувати, що тяжка травма мозочка, нанесена при ударі по поверхні його кори, безсумнівно, супроводжується формуванням вогнища некрозу та набряку мозкової речовини, що виходить далеко за межі кори мозочка. Це означає залучення у патологічний процес нейронів ядер мозочка. Важливо, що у разі дистонії, тією чи іншою мірою пов'язаної з патологією мозочка, видалення останнього призводить до зникнення симптоматики цього розладу [45]. Насамкінець, гіпотонія у дещо відтермінованому періоді травматичного процесу може бути обумовлена надмірною активністю ГАМК-ергічних грушоподібних нейронів кори, вогнища якої цілком можуть виникати внаслідок післятравматичної перебудови нейрональної мережі мозочка. Проте відповіді на ці питання потребують подальших ретельних досліджень феномену мозочкової гіпотонії.

ВИСНОВКИ

КОМПЛЕКС РІЗНОПЛАНОВИХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ, СПРЯМОВАНИХ НА ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЕФЕКТИВНОСТІ МЕТОДУ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ З МЕТОЮ ОПТИМІЗАЦІЇ ВІДНОВНОГО ЛІКУВАННЯ ТРАВМАТИЧНОГО УРАЖЕННЯ МОЗОЧКУ, ДОЗВОЛЯЄ СТВЕРДЖУВАТИ, ЩО ВИКОРИСТАННЯ ТТНЦ ТА ТФТН ЗАГАЛОМ ПОКРАЩУЄ ФУНКЦІОНАЛЬНУ РЕЗУЛЬТАТИВНІСТЬ ВІДНОВНОГО ПРОЦЕСУ І Є ПЕРСПЕКТИВНИМ З ОГЛЯДУ НА МОЖЛИВЕ КЛІНІЧНЕ ВПРОВАДЖЕННЯ У ОБ'ЄМІ, ЩО НЕ СУПЕРЕЧИТЬ ІСНУЮЧИМ БІОЕТИЧНИМ НОРМАМ.

СУКУПНІСТЬ ОТРИМАНИХ НАМИ ДАНИХ, А ТАКОЖ НАЙБІЛЬШ ВАГОМИХ ДАНИХ ЛІТЕРАТУРИ, ДОЗВОЛЯЄ ПРИПУСКАТИ, ЩО ВИСОКА ІНТЕНСИВНІСТЬ ВІДНОВНОГО ПРОЦЕСУ ПРОТЯГОМ ДРУГОГО ТИЖНЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ ХАРАКТЕРНА ДЛЯ ГРУП ФН ТА ТТНЦ, ПОВ'ЯЗАНА З ПРОАНГІОГЕННИМ, У ГРУПІ ТТНЦ – ТАКОЖ І ПРОНЕЙРОПЛАСТИЧНИМ ВПЛИВОМ ТРАНСПЛАНТАТІВ НА ТКАНИНУ МОЗОЧКУ.

НАЙМЕНША ШВИДКІСТЬ ВІДНОВЛЕННЯ М'ЯЗОВОГО ТОНУСУ ХАРАКТЕРНА ДЛЯ ВИБІРОК КОНТРОЛЬНИХ ГРУП. У ВИБІРКАХ ГРУП ФН, ТТНЦ ТА ТФТН ДОСЯГНЕННЯ СТАНУ ЛЕГКОЇ ГІПОТОНІЇ КОНСТАТУВАЛИ УЖЕ НА 9-У ДОБУ ЕКСПЕРИМЕНТУ; НОРМОТОНІЮ – НА 21-У (ВИБІРКА ГРУПИ ТФТН) ТА 30-У ДОБУ (ВИБІРКИ ГРУП ФН І ТТНЦ).

ТАКИМ ЧИНОМ, НЕЙРОТРАНСПЛАНТАЦІЯ ЧИНИТЬ СУТТЄВИЙ ПОЗИТИВНИЙ ВПЛИВ НА ВІДНОВЛЕННЯ М'ЯЗОВОГО ТОНУСУ ПІСЛЯ ТРАВМИ МОЗОЧКА, ЩО, ЙМОВІРНО, ПОВ'ЯЗАНО З КОМПЕНСАТОРНОЮ ПЛАСТИЧНОЮ ПЕРЕБУДОВОЮ НЕЙРОНАЛЬНИХ МЕРЕЖ ЦІЄЇ ЧАСТИНИ НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ, ОСОБЛИВО СТОСОВНО ЇХНІХ ЗВ'ЯЗКІВ ЗІ СТОВБУРОВИМИ ЦЕНТРАМИ ПІДТРИМАННЯ ТОНУСУ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Maynard F., Karunas R., Waring P. Epidemiology of spasticity following traumatic spinal cord injury. // Arch. Phys. Med. Rehabil. – 1990. – **71**. – P. 566–569.
2. Sommerfeld D., Eek E., Svensson A. et al. Spasticity after stroke: its occurrence and association with motor impairments and activity limitations. // Stroke. – 2004. – **35**. – P. 134–139.
3. Rizzo M., Hadjimichael O., Preiningerova J., Vollmer T. Prevalence and treatment of spasticity reported by multiple sclerosis patients. // Mult. Scler. – 2004. – **10**. – P. 589–595.
4. Nielsen J., Crone C., Hultborn H. The spinal pathophysiology of spasticity – from a basic science point of view // Acta Physiologica. – 2007. – **189**, № 2. – P. 171–180.
5. Медведев В. В. Вырождение биологических систем // В. И. Цымбалюк, В. В. Медведев / Спинной мозг. Элегия надежды. – Винница: Нова Книга. – 2010. – С. 541–635.
6. Rank M., Li X., Bennett D., Gorassin M. Role of endogenous release of norepinephrine in muscle spasms after chronic spinal cord injury // J. Neurophysiol. – 2007. – **97**. – P. 3166–3180.
7. Murray K., Nakae A., Stephens M. et al. Recovery of motoneuron and locomotor function after spinal cord injury depends on constitutive activity in 5-HT_{2C} receptors // Nat. Med. – 2010. – **16**. – P. 694–700.
8. Ren L.-Q., Wienecke J., Chen M. et al. The time course of serotonin 2c receptor expression after spinal transection of rats: an immunohistochemical study // Neurosci. – 2013. – **236**. – P. 31–46.
9. Newton B., Hamill R. The morphology and distribution of rat serotonergic intraspinal neurons: an immunohistochemical study // Brain Res. Bull. – 1988. – **20**. – P. 349–360.
10. Heckman C., Enoka R. Motor Unit // Comprehensive Physiology. – 2012. – **2**. – P. 2629–2682.
11. Haines D., Mihailoff G., Bloedel J. The Cerebellum // Fundamental neuroscience ed. D.E. Haines. – New York: Churchill Livingstone, 2002. – P. 370–388.
12. Hyder A., Wunderlich C., Puvanachandra P. et al. The impact of traumatic brain injuries: a global perspective // NeuroRehabilitation. – 2007. – **22**, N 5. – P. 341–353.

13. Крылов В. В., Талыпов. А. Э. Повреждения структур задней черепной ямки // Неврол. журнал. – 2002. – 7, № 6. – С. 4–9.
14. Taniura S., Okamoto H. Traumatic cerebellar infarction // J. Trauma. – 2008. – 64. – P. 1674.
15. Takeuchi S., Takasato Y., Masaoka H., Hayakawa T. Traumatic intra-cerebellar haematoma : study of 17 cases // Br. J. Neurosurg. – 2011. – 25, № 1. – P. 62–67.
16. Spanos G., Wilde E., Bigler E. et al. Cerebellar atrophy after moderate-to-severe pediatric traumatic brain injury // Am. J. Neuroradiol. – 2007. – 28, № 3. – P. 537–542.
17. Louis E., Lynch T., Ford B. et al. Delayed-onset cerebellar syndrome // Arch. Neurol. – 1996. – 53, № 5. – P. 450–454.
18. Sato M., Chang E., Igarashi T., Noble L. Neuronal injury and loss after traumatic brain injury: time course and regional variability // Brain Res. – 2001. – 917, № 1. – P. 45–54.
19. Gale S. D., Baxter L., Roundy N., Johnson S. Traumatic brain injury and grey matter concentration: a preliminary voxel based morphometry study // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. – 2005. – 76, № 7. – P. 984–988.
20. Ide H., Terado Y., Tokiwa S. et al. Novel germ line mutation p53–P177R in adult adrenocortical carcinoma producing neuron-specific enolase as a possible marker // Jpn. J. Clin. Oncol. – 2010. – 40, № 8. – P. 815–818.
21. Зильберштейн Х. Н. Механическая травма черепа и головного мозга // Многотомное руководство по патологической анатомии / отв. ред. А. И. Струков и др. – Т. 2: Патологическая анатомия нервной системы / ред. Б. С. Хоминский. – М.: Медгиз, 1962. – С. 336–342.
22. Andriessen T., Jacobs B., Vos P. Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury // J. Cell. Mol. Med. – 2010. – 14, № 10. – P. 2381–2392.
23. Bramlett H., Dietrich W. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: Similarities and differences // J. Cereb. Blood. Flow. Metab. – 2004. – 24. – P. 133–150.
24. Ai J., Liu E., Park E., Baker A. Structural and functional alterations of cerebellum following fluid percussion injury in rats // Exp. Brain Res. – 2007. – 177. – P. 95–112.
25. Seo T.-B., Kima B.-K., Koa I.-G. et al. Effect of treadmill exercise on Purkinje cell loss and astrocytic reaction in the cerebellum after traumatic brain injury // Neurosci. Lett. – 2010. – 481. – P. 178–182.
26. Potts M., Adwanikar H., Noble-Haeusslein L. Models of traumatic cerebellar injury // The Cerebellum. – 2009. – 8. – P. 211–221.
27. Igarashi T., Potts M., Noble-Haeusslein L. Injury severity determines Purkinje cell loss and microglial activation in the cerebellum after cortical contusion injury // Exp. Neurol. – 2007. – 203, №1. – P. 258–268.
28. Park E., McKnight S., Ai J., Baker A. Purkinje cell vulnerability to mild and severe forebrain head trauma // J. Neuropathol. Exp. Neurol. – 2006. – 65, № 3. – P. 226–234.
29. Ai J., Baker A. Presynaptic excitability as a potential target for the treatment of the traumatic cerebellum // Pharmacology. – 2004. – 71, № 4. – P. 192–198.
30. Marin-Teva J., Dusart I., Colin C. et al. Microglia promote the death of developing Purkinje cells // Neuron. – 2004. – 41. – P. 535–547.
31. Viscomi M., Florenzano F., Latini L., Molinari M. Remote cell death in the cerebellar system // The Cerebellum. – 2009. – 8. – P. 184–191.
32. Hains B., Black J., Waxman S. Primary cortical motor neurons undergo apoptosis after axotomizing spinal cord injury // J. Comp. Neurol. – 2003. – 462, № 3. – P. 328–341.
33. Rossi F., Glanola S., Corvetti L. The strange case of Purkinje axon regeneration and plasticity // The Cerebellum. – 2006. – 5. – P. 174–182.
34. Buffo A., Holtmaat A., Savio T. et al. Targeted overexpression of the neurite growth-associated protein B-50/GAP-43 in cerebellar Purkinje cells induces sprouting after axotomy, but not axon regeneration into growth-permissive transplants // J. Neurosci. – 1997. – 17. – P. 8778–8791.
35. Chaiksuksunt V., Zhang Y., Anderson P. et al. Axonal regeneration from CNS neurons in the cerebellum and brainstem of adult rats: correlation with the patterns of expression and distribution of messenger RNAs for L1, CHL1, c-Jun and growth-associated protein-43 // Neuroscience. – 2000. – 100. – P. 87–108.
36. Gianola S., Rossi F. Long-term injured Purkinje cells are competent for terminal arbour growth, but remain unable to sustain stem axon regeneration // Exp. Neurol. – 2002. – 176. – P. 25–40.
37. Li J., Imitola J., Snyder E., Sidman R. Neural stem cells rescue nervous purkinje neurons by restoring molecular homeostasis of tissue plasminogen activator and downstream targets // J. Neurosci. – 2006. – 26, № 30. – P. 7839–7848.
38. Pagano S., Impagnatiello F., Girelli M. et al. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb // Stem. Cells. – 2000. – 18, № 4. – P. 295–300.
39. Ромоданов А. П., Копьев О. В., Цымбалюк В. И. и др. Влияние трансплантации эмбрионального неокортекса на выживаемость крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы // Третий Тбилисский междунар. симпозиум “Функциональная нейрохирургия” (28–30 мая 1990 г.): тезисы докл. – Тбилиси, 1990. – С. 247.
40. Цымбалюк В. І., Сутковий Д. А., Троян О. І. Вплив трансплантації фетальної нервової тканини на активність процесів перекисного окислення ліпідів та антиоксидантного захисту у віддалений період експериментальної тяжкої черепно-мозкової травми // Укр. нейрохірург. журнал. – 2001. – 1. – С. 109–114.
41. Цымбалюк В. І., Щерба І. Н., Гордиенко О. В. Влияние трансплантации эмбриональной нервной ткани на динамику отека головного мозга при экспериментальной черепно-мозговой травме. // Нейрофизиология. – 1998. – 30, №3. – С. 206–211.
42. Пат. UA №49196, МПК А61В17/00. Спосіб моделювання у експерименті локальної дозованої черепно-мозкової травми гемісфер мозочку у щурів, що є методом моделювання експериментальної черепно-мозкової травми / Цымбалюк В.І., Сенчик Ю.Ю., Медведєв В.В. – Заявл. 02.10.2009; Опубл. 26.04.2010, Бюл. №8.
43. Goldstein L., Davis J. Beam-walking in rats: Studies towards developing an animal model of functional recovery after brain injury // J. Neurosci. Methods. – 1990. – 31. – P. 101–107.
44. Цымбалюк В. І., Лісяний М. І., Семенова В. М. та ін. Вплив різних видів нейротрансплантації на перебіг травми мозочку у щурів // “Журнал НАМН України”. – 2013. – 19, № 2. – С. 171–183.
45. Filip P., Lungu O., Vareš M. Dystonia and the cerebellum: A new field of interest in movement disorders? // Clin. Neurophysiol. – 2013, Feb 17 [Epub. ahead of print].