УДК 616.832–001–089.843:591.88:612.827:616–003.93–092.9
doi:10.22494/cot.v4i2.57

Вплив трансплантації тканини фетального мозочка на відновлення локомоторної функції задньої кінцівки при травмі спинного мозку у щура

Медведєв В. В.[1], Сенчик Ю. Ю.[2], Драгунцова Н. Г.[3], Дичко С. М.[3], Цимбалюк В. І.[1,3]
[1]Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна
[2]Київська міська клінічна лікарня швидкої медичної допомоги, Київ, Україна
[3]ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України», Київ, Україна

e-mail: vavo2010@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Тканина фетального мозочка містить значну кількість нейрогенних прогеніторів, комітованих на шлях диференціювання у глутаматергічні нейрони, що може бути використано в розробці нових перспективних методів лікування пошкоджень спинного мозку.

МЕТА РОБОТИ. *Оцінити вплив алогенної трансплантації тканини фетального мозочка (ТТФМ) на відновлення рухової функції травмованого спинного мозку в експерименті.*

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. *Експериментальні тварини – білі щурі-самці інбредної лінії на базі породи Wistar віком 5,5 міс.; основні експериментальні групи: 1 – травма спинного мозку + негайна гомотопічна трансплантація фрагменту фетального (E18) мозочка щура, 2 – травма спинного мозку. Модель травми – лівобічний половинний перетин спинного мозку на рівні T_{11}; моніторинг показника функції (ПФ) задньої іпсилатеральної кінцівки (ЗІК) – шкала Basso-Beattie-Bresnahan (BBB).*

РЕЗУЛЬТАТИ. *ТТФМ нормалізує розподіл значень ПФ ЗІК, деформує динаміку відновлення рухової функції, перетворюючи її з прогредієнтної, характерної для контрольних груп, у константну з недостовірними коливаннями ПФ ЗІК у межах 3-3,6 бала за шкалою BBB протягом усього експерименту. ТТФМ спричиняє ранній тимчасовий позитивний вплив на функціональний стан еферентної частини рухової системи, обумовлений, ймовірно, медіаторним, нейропротекторним, проангіогенним та ремієлінізуючим ефектом. На нашу думку, поступове виснаження позитивного впливу ТТФМ внаслідок резорбції трансплантату впродовж перших 2 міс. компенсується ауторегенераційним нейропластичним процесом, характерним для контрольної групи, а також аутоімунною утилізацією мієлінових інгібіторів аксонального росту у зоні травми, що обумовлює стабільність значень ПФ ЗІК протягом усього періоду спостереження.*

ВИСНОВКИ. *Трансплантація тканини фетального мозочка спричиняє тимчасовий, обмежений першим місяцем травматичного процесу, позитивний вплив на відновлення рухової функції. Оцінка ефективності цього виду нейротрансплантації потребує окремого вивчення динаміки синдрому спастичності та хронічного больового синдрому.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: *травма спинного мозку; трансплантація фетальної нервової тканини; відновлення рухової функції; синдром посттравматичної спастичності*

Відновлення функцій травмованого спинного мозку є, без перебільшення, однією з найскладніших проблем сучасної медико-біологічної науки, що, поряд з прикладним, має суттєве фундаментальне значення, слугує верифікатором успішності новітніх досягнень у сфері регенеративної медицини та нейроінженерії. Незважаючи на низьку частоту, когорта осіб, що перенесли спінальну травму, складає 2,5 млн хворих, в основному працездатного віку, часто глибоко інвалідизованих [1]. Це надає проблемі відчутного соціально-економічного аспекту.

Переважна більшість перспективних засобів відновного лікування травми спинного мозку на даний час перебуває на етапі перманентної оптимізації в умовах експерименту, повноцінна клінічна їх апробація

утруднена, передусім, з організаційних причин. Коротко, вони базуються на двох відмінних підходах: біогенне відновлення апарату низхідних волокон травмованого спинного мозку та абіогенне протезування тієї чи іншої частини рухового апарату. Засоби, що ґрунтуються на першому підході, на даний час репрезентуються напрямком, що отримав назву «тканинна нейроінженерія», як окремий варіант більш загальних напрямків – тканинної інженерії та нейроінженерії.

У цьому контексті з метою впорядкування тканинних реакцій у зоні травми у потрібному для досягнення функціонального результату руслі апробовуються варіанти трансплантації незрілих клітин різного походження та ступеня диференціювання у комплексі з матриксами, або "скефолдами" (від англ. scaffold) – штучно створеними тканинними каркасами [2]. Запропоновані найрізноманітніші щодо первинної хімічної структури та просторової будови матрикси на основі коротких послідовностей біоактивних пептидів (аргінін-гліцин-аспартат, тирозин-ізолейцин-гліцин-серин-аргінін), із очищених протеїнів природнього походження (фібрин, ламінін, колаген, фібронектин), синтетичні матрикси (наприклад, полі[N-(2-гідроксипропіл)-метакриламід – NeuroGel™), гібриди з поєднанням штучних (полікапролактон, полі[лактид-ко-гліколід]) та природних (фібрин, колаген) полімерів [2–8]. Варіанти комплексування включають поєднання матриксів з факторами росту чи стовбуровими клітинами того чи іншого фенотипу [4, 6–8].

Не менш інтенсивно вивчається ефективність введення клітинних суспензій у тканину спинного мозку чи у порожнину посттравматичної кісти [4, 7]. Прикладом такої концепції є використання імплантації матриксу NeuroGel™ для відновного лікування повного [9-12] чи часткового перетину спинного мозку [13]. Позитивний ефект імплантації NeuroGel™ у зону травми пов'язаний з антигеморагічними, імуносупресивними та антифіброзними властивостями гідрогелю. Зменшення тривалості кровотечі, обмеження прямого контакту тканини спинного мозку з ліквором за очевидних причин зменшують інтенсивність імунних реакцій у зоні травми. Нейропротекторний вплив NeuroGel™ виражається, окрім іншого, змінами експресії білків теплового шоку HSP-25 і HSP-32 (heme oxygenase 1, HO-I) у тканині перифокальної зони [14].

При розташуванні вогнища ураження спинного мозку поза зонами рухової іннервації кінцівок та діафрагми (шийне та поперково-крижове потовщення) ключовою проблемою є відтворення супраспінальних впливів на каудальніше розташовані популяції мотонейронів, що звужує завдання до створення просторових та молекулярних умов для росту регенеруючих аксонів. Відновлення популяції мотонейронів і реіннервація ними відповідних м'язів на даний час далекі до експериментального вирішення, не кажучи про створення клінічно прийнятних способів [15–17].

Загалом, відомі на даний час засоби тканинної нейроінженерії можна розділити на кілька поколінь: I – тканинна нейротрансплантація [18, 19], II – імплантація аморфних матриксів різної хімічної структури [10, 13], III – імплантація аморфних матриксів у поєднанні з незрілими клітинами [4, 8], IV – імплантація поздовжньо тунельованих матриксів [20], у тому числі асоційованих з незрілими клітинами; V – використання засобів IV покоління у поєднанні зі способами спрямування росту регенеруючих аксонів [21–23]. Важливим є порівняння сучасних засобів II–IV покоління з ефективністю втручань I-го покоління, тобто з трансплантацією природніх аналогів конструйованих матриксів – фрагментів тканин з присутністю прогеніторів у звичному для них оточенні.

Попри існуючий традиційний перелік джерел трансплантатів такого роду (нюхова цибулина, нюхова зона слизової носа, стінка бічних шлуночків, зубчата звивина), на нашу думку, більш вагомим є тканина мозочку ссавців на пізніх строках гестації або у ранньому постнатальному періоді. Саме у цій ділянці мозку розташована чи не найбільша природно ущільнена популяція нейрогенних прогеніторів та нейрональних прекурсорів мозкового походження. Такий висновок обумовлений рядом непрямих, проте добре верифікованих аргументів.

Так, мозочок дорослої людини (і ссавців загалом) за середньої маси 10 % від маси мозку містить 80 % усіх нейронів мозку [24], переважна більшість яких – клітини-зерна: невеликі глутаматергічні нейрони однойменного шару, що отримують збуджувальні глутаматергічні входи від мохоподібних волокон (аксони нейроцитів ядер мосту, ретикулярних та релейних ядер стовбура) та віддають Т-подібні відростки, контактуючи ними з дендритами ГАМК-ергічних клітин Пуркіньє – головним джерелом еферентних зв'язків кори мозочка [25]. Зернистий шар кори мозочка вважають місцем найбільш щільного розташування клітин у організмі загалом: при діаметрі тіла клітини-зерна 5-8 мкм їх популяція у людини складає 10^{10}-10^{11} клітин [24]. У більшості представників класу ссавців клітини-зерна формуються і дозрівають протягом пренатального та раннього постнатального періоду (у людини – від третього триместру гестації до 2 років після народження) з прекурсорів, що є нащадками Atoh1-позитивних прогеніторів – похідних нейроепітелію мозочкової губи (домен C1), її каудального краю, згодом – дорзальної поверхні, так званого зовнішнього зернистого шару. Прогеніори цього шару мігрують вентрально, углиб зачатку мозочка, проходячи поміж дозріваючих клітин Пуркіньє, так що у зрілому мозочку клітини-зерна розташовуються вентральніше грушоподібних нейронів [26–28].

Завдяки інтенсивному постнатальному нейрогенезу протягом перших 9 місяців позаутробного життя масова частка мозочку у людини зростає від 5,7 до 10 % від усієї маси мозку (станом на 14-17-й тиждень внутрішньоутробного розвитку частка складає <5 %). У подальшому ріст маси мозочка відбувається у відповідності із загальномозковими віковими індексами [28]. У період 15-28-го тижня внутрішньоутробного розвитку площа поверхні кори мозочка зростає у 30 разів [28]. Ці нейрометричні дані, ряд інших фактів [29–33], а також дані щодо ролі постнатальної популяції нейрогенних прогеніторів мозочка у формуванні медулобластоми дитячого віку [34–36] вказують на потужність нейрогенної популяції мозочка у момент народження. Тканина мозочка щура, отримана наприкінці гестаційного періоду або одразу ж після народження, містить чи не найбільшу серед природніх джерел кількість нейрогенних прогеніторів, комітованих на шлях диференціювання у глутаматергічні нейрони (клітини-зерна).

Враховуючи наведені дані, ми вважали за доцільне дослідити вплив трансплантації тканини фетального мозочка (ТТФМ) на перебіг травми спинного мозку та її ускладнень – синдрому посттравматичної спастичності та хронічного больового синдрому, що склало мету даної роботи.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експериментальні тварини та експериментальні групи. Дослідження виконано з дотриманням існуючих норм біоетики, а саме: European Communities Council Directives of 24 November 1986 (86/609/EEC), Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей (1986 р.) та Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006). У експеримент залучені білі безпородні щурі-самці інбредної 20-річної лінії на базі породи Wistar віком 5,5 міс. з масою ~350 г, яких утримували у стандартних умовах віварію ДУ «Інститут нейрохірургії імені акад. А. П. Ромоданова НАМН України» за звичного харчування з вільним доступом до води та їжі. Сформовано наступні експериментальні групи:

1) група «контроль-1», тваринам якої моделювали травму спинного мозку (n = 16; максимальний строк спостереження – 24 тиж.);

2) група «контроль-2» – інтегральна група порівняння, сформована протягом 2006-2015 рр. (включає у тому числі тварини групи «контроль-1»); модель спінальної травми, біологічні характеристики та умови утримання тварин аналогічні (n = 40; максимальний строк спостереження – 16 тиж.);

3) група «ТТФМ», тваринам якої моделювали аналогічну травму спинного мозку і одразу ж у зону ураження трансплантували фрагмент алогенної тканини фетального мозочка (n = 15; максимальний строк спостереження – 24 тиж.).

Матеріал, що використовували для трансплантації. Тканину фетального мозочка вилучали у плодів щурів 18-ї доби гестації (E18). Вагітну самку щура наркотизували інтраперитонеально сумішшю розчинів ксилазину (*«Sedazin», Biowet*, Польща, 15 мг/кг) і кетаміну (*«Calypsol», Gedeon Richter*, Угорщина, 70 мг/кг), матку з плодами видаляли, тварину виводили з експерименту шляхом передозування вказаних наркотичних препаратів; головку плода поперечно розсікали у місці переходу її у тіло, видаляли головний мозок, мозочок відокремлювали, кожну його півкулю розділяли на дві приблизно рівні половини розміром 2 мм^3. Один з фрагментів після дисоціації тканини у середовищі MEM (*Sigma*, США) використовували для підрахунку кількості живих клітин в камері Горяєва за допомогою стандартного тесту з трипановим синім. Кількість життєздатних клітин, що визначена таким методом, становила 76 ± 5 %. До моменту трансплантації фрагменти утримували у ізотонічному розчині натрію хлориду при температурі 37 °C. Тканину мозочка, отриману в одного плода, використовували для трансплантації двом тваринам. Протягом одного операційного дня здійснювали 5 трансплантацій загальною тривалістю 2,5 год.

Моделювання травми спинного мозку. Оперативні втручання здійснювали за загального знеболення (внутрішньоочеревинне введення суміші розчинів 15 мг/кг ксилазину і 70 мг/кг кетаміну) фіксованої на спеціальному операційному столику тварини, витримуючи необхідний для ксилазинового наркозу температурний режим. Детально технічні та оперативно-хірургічні особливості використаної моделі спінальної травми (лівобічний перетин половини спинного мозку) описані нами у попередній роботі [37].

Дотримуючись умов асептики, шкіру розтинали по лінії, що з'єднує остисті відростки T_8–L_2 хребців, скелетували остисті відростки T_9-L_1 та перфорували міждужковий простір. Виконували обмежену, латералізовану ліворуч ламінектомію на рівні T_{11}, зберігаючи при цьому суглобові відростки та максимально відкриваючи лівий півкіл задньобічної поверхні спинного мозку. Списоподібним офтальмологічним скальпелем тканину спинного мозку наскрізно проколювали біля задньої серединної артерії перпендикулярно дорсальній поверхні спинного мозку. У рану спинного мозку заводили одну з бранш офтальмологічних ножиць, другою браншою охоплювали тканину лівої половини спинного мозку і перетинали її, контролюючи повноту перетину пучків. Після зупинки кровотечі у тварин групи «ТТФМ» у рану спинного мозку укладали фрагмент тканини фетального мозочка розміром ~2 мм^3. У тварин усіх експериментальних груп вікно доступу в хребтовий канал прикривали фрагментом підшкірної фасції, м'які тканини та шкіру в зоні доступу зашивали поліамідними хірургічними нитками №1 (*Київхімволокно*, Україна) у два ряди вузлових швів. Область рани обробляли 5 %-ним спиртовим розчином йоду, у шийну ділянку підшкірно вводили розчин біциліну-5 в дозі ~150–200 тис ОД на 1 тварину (*Київмедпрепарат*, Україна) та внутрішньоочеревинно 6 мг/кг розчину дексаметазону (KRKA, Словенія). Після вказаних маніпуляцій тварини протягом 2-4 годин утримували в приміщенні з підвищеною температурою повітря (30 °C), надалі – у клітках по 3-6 особин при середній температурі 21-24 °C.

Реєстрація функціональної активності задніх кінцівок. Оцінку функціональної активності задньої іпсилатеральної щодо зони травми кінцівки (ЗІК) проводили згідно із шкалою, запропонованою D. Basso, M. Beattie та J. Bresnahan (BBB) [38], детальний опис та особливості використання якої розглянуті нами у попередній публікації [37]. Коротко зазначимо, що діапазон шкали BBB становить 0-21 бал; у межах 0-11 балів оцінка враховує широту рухової активності у кожному із трьох ключових суглобів задньої кінцівки, у межах 8-11 балів – постановку ступні та час підтримання маси тіла задньою кінцівкою при пересуванні по горизонтальній поверхні; принципи оцінки функції вище 11 балів – не наводимо. З огляду на етичний регламент роботи з експериментальними тваринами облік значень показника функції (ПФ) ЗІК здійснювали, починаючи з 7-ї доби після проведення оперативного втручання.

Статистична обробка отриманих даних. Статистичну обробку даних моніторингу функції ЗІК здійснювали за допомогою програмного пакету Statistica 10.0. Для оцінки результатів моніторингу синдрому спастичності і ПФ ЗІК, виражених у балах, використовували непараметричний U-тест Манна-Уітні. Результати оцінки достовірності представляли у вигляді показника p: відмінності вважалися достовірними при $p < 0,05$. Достовірність різниці ПФ ЗІК та ступеня спастичності на різних строках спостереження кожної окремо взятої групи оцінювали за Уілкоксоном, оцінку зв'язку і направленості їх змін – на основі рангового коефіцієнту Спірмена.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз розподілу значень ПФ ЗІК (**рис. 1**) у контрольних групах демонструє кількісні та якісні відмінності між ними: у групі «контроль-2» наявні три підгрупи (0-2, 4-6 та 8-10 балів BBB); у групі «контроль-1» відсутня третя, а розподіл на проміжку 0–6 балів аналогічний. Розподіл значень ПФ ЗІК у групі «ТТФМ» на 16-й та 24-й тиждень спостереження суттєво відрізняється: наявні дві підгрупи – з гіршими та кращими показниками відновлення. У підгрупі з гіршими

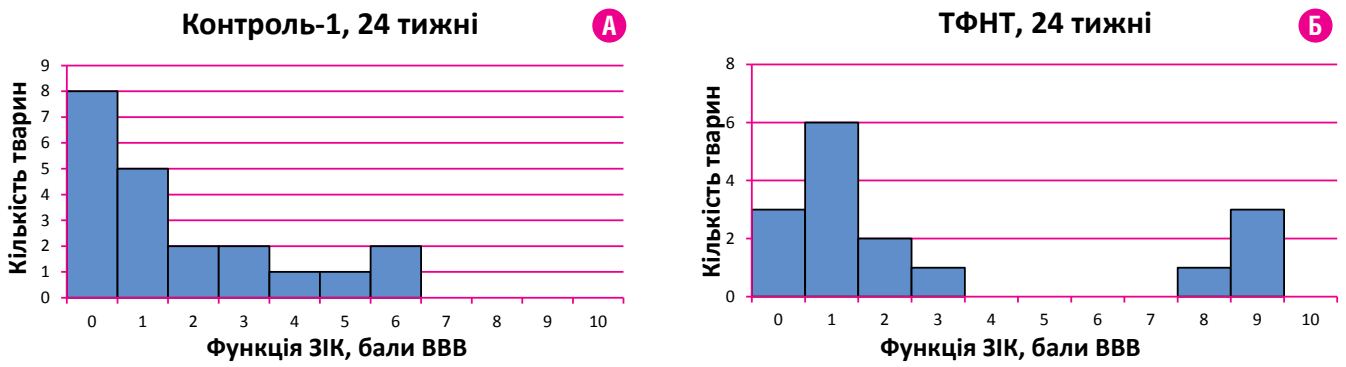

Рис. 1. Розподіл значень показника функції задньої іпсилатеральної кінцівки (ЗІК) в експериментальних групах через 24 тижні після моделювання пошкодження спинного мозку (А) і трансплантації тканини фетального мозочка – ТТФМ (Б).

показниками відновлення, на відміну від груп «контроль-1» та «контроль-2», спостерігають нормальний розподіл, аналогічний виявленому нами для випадку імплантації NeuroGel™ у зону половинного перетину спинного мозку [13]. Це, на нашу думку, свідчить про обмеження патологічних тканинних реакцій, які в сумі деформують функціональне відображення первинного нормального розподілу кількісних показників повноти перетину волокон іпсилатеральної частки спинного мозку. У процесі виконання запропонованої моделі закономірно залишається певна кількість волокон іпсилатеральної частки спинного мозку, які не зазнають перетину. Виходячи з імовірнісного характеру процесу у цих вузьких межах кількість таких волокон у групі тварин є величиною, що повинна характеризуватися нормальним розподілом.

Наявність умовно інтактних (у подальшому вони можуть зазнавати вторинної альтерації) волокон травмованої половини спинного мозку є основою ауторегенерації і відновлення функції кінцівок. У такому випадку результативність відновлення функції ЗІК прямо залежить від кількості таких волокон у тварини. У межах групи ПФ ЗІК через період часу, достатній для розгортання регенераційного процесу за участю цих волокон, повинен мати нормальний розподіл. Однак вторинна альтерація волокон, що в силу означених причин уціліли під час моделювання травми, їх демієлінізація та дегенерація під дією запальних реакцій в осередку травми, зменшує їх кількість. Розподіл активності цих альтераційних реакцій поміж тварин групи – не відомий, отже їх наявність повинна деформувати первинний нормальний розподіл ПФ ЗІК. Обмеження цих реакцій, навпаки, є фактором збереження нормального розподілу ПФ ЗІК, що ми і спостерігаємо у групі «ТТФМ».

Наявність підгрупи з кращими показниками відновлення, на нашу думку, свідчить про існування ще більш суттєвої різниці у повноті перетину низхідних волокон іпсилатеральної частки мозку серед тварин групи «ТТФМ», за умови аналогічної особливості у обох контрольних групах порівняння у межах пар «ТТФМ»–»контроль-1» та «ТТФМ»–»контроль-2», є правомірним. Виключення до порівняння тварин з кращими показниками відновлення знижує результативність відновного процесу у групі «ТТФМ», однак не впливає на його динаміку.

Динаміка ПФ ЗІК у групі «ТТФМ» характерна відсутністю прогредієнтності (**рис. 2**). Ця непересічна обставина не виявлена у жодній із досліджуваних нами раніше експериментальних ситуацій на основі модельованого варіанту травми спинного мозку. Протягом усього періоду спостереження нами не виявлено достовірних змін середнього по групі значення ПФ ЗІК. Станом на кінець 1-го тижня значення ПФ ЗІК склало 3,6 ± 0,8 бала за шкалою ВВВ, що достовірно переважало значення групи «контроль-1» (p = 0,007) та «контроль-2» (p = 0,01). Достовірна різниця з показником групи «контроль-1» зберігалася ще протягом 2-го тижня, а її зникнення у період 3-5-го тижня пов'язана не лише зі зменшенням ПФ ЗІК у групі «ТТФМ», а й неухильним достовірним зростанням даного показника в контрольних групах.

Протягом усього періоду спостереження значення ПФ ЗІК у групі «ТТФМ» коливалися в інтервалі 3-3,6 бала ВВВ. Протягом 6-8-го тиж. відмічали достовірну перевагу значень ПФ ЗІК групи «ТТФМ» над групою «контроль-1» на тлі недостовірного зменшенням значень ПФ ЗІК у цій групі (протягом 5-8-го тижня) та недостовірного збільшення значень ПФ ЗІК групи «ТТФМ» (протягом 6-го тижня). Станом на 12-й та 16-й тиждень реєстрували рівновеликі значення ПФ ЗІК у групах «ТТФМ» та «контроль-2» (відповідно, 3,3 ± 0,9 та 3,4 ± 1,0 бала ВВВ). Станом на 24-й тиждень ПФ ЗІК у групі «ТТФМ» склав 3,2 ± 0,9 бала ВВВ і поступався значенню 1-го тижня спостереження недостовірно (p = 0,144). Достовірна різниця з ПФ ЗІК контрольних груп на цьому етапі спостереження не виявлена.

Динаміка ПФ ЗІК у групі «контроль–1» дещо інша (**рис. 2**). Починаючи відновний процес із значенням ПФ ЗІК 1,0 ± 0,35 бала, протягом першого місяця тварини групи нарощують функцію (починаючи з 3-го тижня – достовірно: p = 0,018 та p = 0,043 відносно значень на 1-му та 2-му тижнях) до середнього значення 1,66 ± 0,54 бала ВВВ на кінець 4-го тижня. У подальшому спостерігають рівновеликий недостовірний регрес ПФ ЗІК з мінімумом на кінець 8-го тижня (1,19 ± 0,48 бала ВВВ) і достовірне відновлення до рівня 1,63 ± 0,46 бала на 16-му тижні (p = 0,018 у порівнянні з 8-м тижнем). До кінця експерименту суттєвих змін ПФ ЗІК не виявлено (24-й тиждень – 1,59 ± 0,49 бала ВВВ).

Динаміка ПФ ЗІК у групі «контроль-2» (**рис. 2**) відрізняється від такої для групи «контроль-1» кількісно; наявні достовірні дві фази регенераційного процесу: 1-8-й тиждень і 8-16-й тиждень спостереження. На відміну від групи «контроль-1» перша фаза завершується стабілізацією значення ПФ ЗІК (5-7-й тиждень, ~2,86 ± 0,53 бала ВВВ). Двофазність динаміки ПФ ЗІК для використаної моделі раніше не відмічалася через слабку виразність [24], наявна у групі «контроль-1» і привнесена у інтегральну групу «контроль-2». Станом на 16-й тиждень ПФ ЗІК у групі «контроль-2» склав 3,41 ± 0,59 бала ВВВ. Достовірної різниці між значеннями ПФ ЗІК груп «контроль-1» та «контроль-2» протягом усього експерименту не виявили.

Виходячи з отриманих результатів, спираючись на дані літератури, вважаємо доцільним запропонувати наступне пояснення виявлених особливостей динаміки ПФ ЗІК у групі «ТТФМ». Низкою попередніх досліджень [13] нами було встановлено, що у випадку імплантації у зону травми спинного мозку прорегенеративного матриксу NeuroGel™ уже через 1 тиждень наявний достовірний позитивний функціональний ефект, пов'язаний, ймовірно, з антигеморагічними, імуносупресивними та антифіброзними властивостями імплантату. Зменшення тривалості тканинної кровотечі обмежує

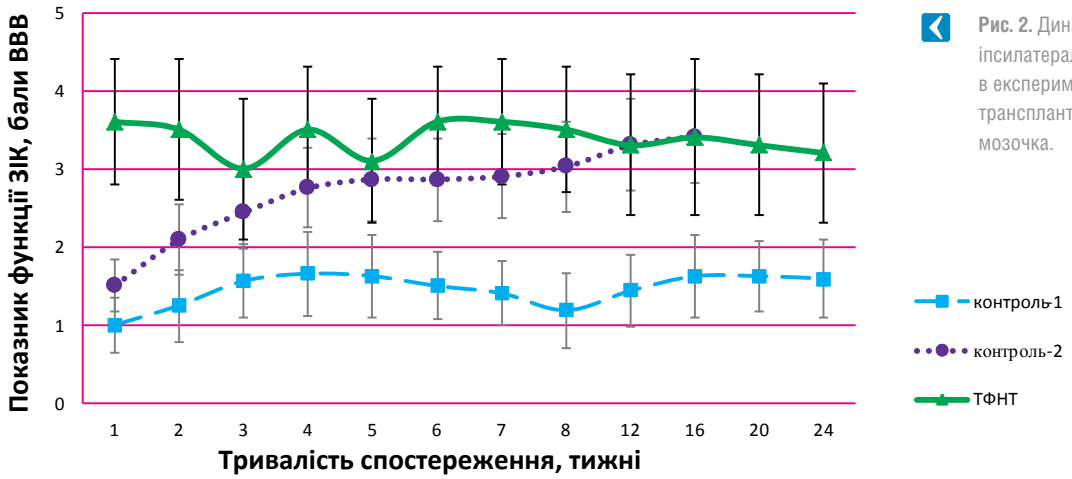

Рис. 2. Динаміка показника функції задньої іпсилатеральної кінцівки (ЗІК) в експериментальних групах. ТТФМ – трансплантація тканини фетального мозочка.

імбібіцію перифокальної зони кров'ю, експозицію та інтенсивність стимуляції імунної системи антигенами спинного мозку. Нейропротекторний вплив NeuroGel™ виражається, окрім іншого, змінами експресії білків теплового шоку HSP-25 і HSP-32 у тканині спинного мозку [14]. Значення ПФ ЗІК протягом перших двох тижнів після ТТФМ та імплантації фрагменту NeuroGel™ відрізняються недостовірно. Про ступінь подібності тканинних реакцій у цих двох експериментальних ситуаціях стверджувати важко.

Тканина фетального мозочку на цьому строку гестації (E18) містить нейротропні фактори росту, які у інтактних умовах регулюють міграцію прекурсорів та дозрівання клітин-зерен, формування Т-подібних аксонів, утворення нейрональних мереж мозочка. До цих факторів належать ефрини, семафорини, нетрини, кадгерини, представники сімейств FGF, Wnt та BMP, білки Shh, PDGF та VEGF [39-43]. На нашу думку, у випадку травми спинного мозку опосередкована цитокінами нейропротекція, швидка активація ангіогенезу і налагодження перфузії у перифокальній зоні мають важливе значення у формуванні динаміки ПФ ЗІК протягом першого тижня після травми.

На моделі забиття мозочка нами встановлено факт тривалої (щонайменше протягом 2 міс.) персистенції у трансплантаті фетального мозочку незрілих клітин нейронального фенотипу з наступним повільним зменшенням їх популяції [25]. Це визначає часові рамки значимого впливу ТТФМ на травматичний процес. Важливо, що за цей період часу ауторегенерація спинного мозку досягає аналогічного функціонального результату. На нашу думку, тимчасовий характер ефекту ТТФМ пов'язаний із впливом на ті структурні елементи спинного мозку, можливість існування яких в умовах травми визначається наявністю ростових факторів чи метаболічної підтримки. Формування нових елементів (передусім, нових магістральних нервових волокон) малоймовірне, оскільки потребує більшого часу (не менше 2-4 тижнів) та супроводжується позитивним функціональним ефектом (2-8-й тиждень), нівелювання якого у зв'язку з організацією зони травми та погіршенням метаболічних умов у товщі рубця настає у віддаленому періоді (6-7-й місяць) [13].

Отже, найбільш ймовірним об'єктом впливу ТТФМ є нейрональні мережі та транзитні волокна перифокальної зони – ділянки, що у найгострішому та гострому періоді травми перебуває у стані васкуляторної та метаболічної катастрофи, зазнає вторинного альтераційного впливу, демієлінізації і тому критично залежить від метаболічного, перфузійного, антиапоптотичного та ремієлінізуючого супроводу. У випадку ТТФМ трансплантат може виступати тригером перелічених позитивних впливів.

Подальший розвиток подій включає аутоімунне ураження тканини перифокальної зони у зв'язку з неповноцінністю бар'єрної функції новоутворених капілярів та їх руйнуванням [44]; активацію імунної агресії трансплантатом з продукцією альтераційних прозапальних факторів; подальшу утилізацію трансплантату із виснаженням позитивного факторного і клітинного впливу; механічне стиснення та деформацію зони трансплантації і прилеглих ділянок внаслідок організації [25].

Найбільш інтенсивний сегмент позитивного впливу ТТФМ на функцію мозочка відзначали протягом 3-4-го тижня експерименту, що не характерно для травми спинного мозку [25]. Отже, раннього факторного чи замісного клітинного впливу ТТФМ, активації трансплантатом аутоімунної агресії не достатньо для посилення регенерації спинного мозку. ТТФМ стимулює імунну агресію щодо тканини мозочка у більшій мірі, ніж трансплантація тканини нюхової цибулини [25]. Аутоімунна агресія, спрямована проти тканини спинного мозку, теоретично повинна сприяти утилізації залишків мієліну у зоні травми – основних перешкод для регенеруючих аксонів спинного мозку [13]. Причиною слугує, на нашу думку, передусім, суттєва різниця у розмірах цих двох частин нервової системи, тобто у величині бази регенераційної перебудови ураженого органу: у спинному мозку, у порівнянні з мозочком, вона мізерна. Можливо, що активна аутоімунна утилізація перешкод аксонального росту із зони травми є фактором посилення регенераційного процесу у період 2-3-го місяця, тобто на тлі виснаження перелічених вище гіпотетичних механізмів раннього позитивного впливу ТТФМ у зв'язку з резорбцією трансплантату. Якщо ці два процеси пов'язані між собою (утилізація трансплантату є тригером аутоімунного процесу), їх вплив на динаміку ПФ ЗІК повинен певною мірою урівноважуватися, що є основою константності ПФ ЗІК протягом експерименту зі слабко вираженою тенденцією до регресу.

Оскільки дефіцит функції ЗІК при травмі спинного мозку на вказаному рівні практично повністю залежить від перетину низхідних шляхів передачі збудження на мотонейрони, наявність нейроногенного потенціалу трансплантату не може бути визначним чинником впливу на регенераційний процес. Навпаки, гліогенна (олігодендрогліальна, передусім) спроможність трансплантату, продукція незрілими клітинами та прогеніторами нейропротекторних цитокінів може слугувати позитивним фактором регенераційного процесу, компенсувати вплив патологічних чинників у перифокальній зоні, сприяти ремієлінізації уцілілих волокон обох часток спинного мозку. Нарешті, це сприяє проростанню регенеруючих низхідних волокон, локальному ремоделюванню сегментарних нейрональних мереж з метою налагодження альтернативних, полісинаптичних шляхів передачі збудження на мотонейрони нижче рівня травми за участю пропріоспінального нейронального апарату. Значимість цих ефектів за вірогідно негативного впливу сполучнотканинних компонентів рубця, що щільнішає у ході організації зони ТТФМ, обмежується тривалістю існування тканини трансплантату, його прогліогенного (олігодендрогліального) компоненту.

Ще одним можливим механізмом раннього позитивного ефекту ТТФМ є медіаторний (синаптичний чи позасинаптичний) вплив глутаматергічних нащадків незрілих клітин трансплантату на розташовані поблизу мотонейрони травмованого спинного мозку, що перебувають у стані спінального шоку (передусім, L_1-L_4, відповідальні за приведення стегна та згинання у кульшовому суглобі). Початкова стадія спінального шоку пов'язана з втратою глутамат-, а особливо серотонін- та норадренергічних впливів на мотонейрони, розташовані каудальніше місця травми, відтак – із неможливістю реалізації точних дискретних супраспінальних впливів, що в нормі завдяки серотоніновому та норадренергічному тривалому деполяризуючому впливу (генерування плато-потенціалів), не зважаючи на свою обмеженість у часі та силі деполяризації, викликають збудження мотонейрона і скорочення м'язу [45, 46]. Тому за спінального шоку, навіть при наявності поодиноких вцілілих та функціонально активних синаптичних супраспінальних входів на мотонейрони нижче рівня травми, активація відповідних рухових одиниць неможлива.

Однак уже протягом гострого періоду травми (у людини – протягом 2-4-ї доби [47]) спостерігають компенсаторну денерваційну гіперчутливість мотонейронів до збуджуючих медіаторних впливів, в основі якої, окрім іншого, лежить компенсаторне підвищення експресії субодиниць N-methyl-D-aspartate-рецепторів глутамату [48]. Тканина фетального мозочку містить значну кількість попередників глутамат-ергічних нейронів, отже, гіпотетичний ТТФМ-залежний глутаматергічний вплив на проксимальні мотонейрони у гострому та ранньому періоді спінальної травми, за умови збереження функції провідності деяких уцілілих волокон перифокальної зони, уможливлює результативну передачу дискретних супраспінальних впливів на вказані мотонейрони. Це може реалізуватись у раннє (швидше, ніж у інших групах) відновлення рухової активності на рівні одного-двох суглобів іпсилатеральної кінцівки, у даному випадку – кульшового та колінного. Так, для 3 балів за шкалою BBB (рівень ПФ ЗІК у групі «ТТФМ» станом на 7-му добу склав 3,6 ± 0,8 бала) характерна наявність поширених рухів у 2 суглобах ЗІК.

ВИСНОВКИ

1. ***Трансплантація тканини фетального мозочка після змодельованої травми спинного мозку якісно змінює розподіл значень показника функції задньої іпсилатеральної кінцівки у підгрупі щурів з гіршими показниками відновлення та повертає його до нормального.***
2. ***ТТФМ змінює динаміку відновлення рухової функції, перетворюючи її з прогредієнтної, характерної для контрольних груп, у константну, для якої характерні недостовірні коливання показника з максимумом на 1-, 6-, 7-му та мінімумом на 3-му тижні.***
3. ***ТТФМ спричиняє ранній тимчасовий позитивний вплив на функціональний стан еферентної частини рухової системи, що перебуває під дією вторинних альтераційних факторів травматичного процесу, обумовлений, ймовірно, медіаторним, нейропротекторним, проангіогенним та ремієлінізуючим ефектом трансплантату.***
4. ***Поступове зменшення позитивного впливу ТТФМ внаслідок резорбції трансплантату впродовж перших 2 міс., ймовірно, компенсується ауторегенераційним пластичним процесом та збільшенням числа залучених до здійснення рухової функції елементів спинного мозку, що визначає стабільність значень ПФ ЗІК протягом усього періоду спостереження.***

СПИСОК ЦИТОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate [Text] / *B. B. Lee, R. A. Cripps, M. Fitzharris, et al.* // Spinal Cord. – 2014. – **Vol. 52, № 2**. – P. 110-116.
2. Using extracellular matrix for regenerative medicine in the spinal cord [Text] / *F. Z. Volpato, T. Führmann, C. Migliaresi, et al.* // Biomaterials. – 2013. – **Vol. 34, № 21**. – P. 4945-55.
3. *Gu X.* Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration [Text] / *X. Gu, F. Ding, D. F. Williams* // Biomaterials. – 2014. – **Vol. 35, № 24**. – P. 6143-6156.
4. Hydrogels and cell based therapies in spinal cord injury regeneration [Text] / *R. C. Assunção- Silva, E. D. Gomes, N. Sousa, et al.* // Stem Cells International. – 2015. – **Vol. 2015**, Article ID 948040. doi.org/10.1155/2015/948040
5. Chitosan and its potential use as a scaffold for tissue engineering in regenerative medicine [Text] / *M. Rodríguez-Vázquez, B. Vega-Ruiz, R. Ramos-Zúñiga, et al.* // Bio Med Research International. – 2015. – **Vol. 2015**, Article ID 821279
6. *Siebert J. R.* Biomaterial approaches to enhancing neurorestoration after spinal cord injury: strategies for overcoming inherent biological obstacles [Text] / *J. R. Siebert, A. M. Eade, D. J. Osterhout* // Bio Med Research International. – 2015. – **Vol. 2015**, Article ID 752572
7. *Tian L.* Strategies for regeneration of components of nervous system: scaffolds, cells and biomolecules [Text] / *L. Tian, M. P. Prabhakaran, S. Ramakrishna* // Regen Biomater. – 2015. – **Vol. 2, № 1**. – P. 31-45, doi: 10.1093/rb/rbu017
8. *Tsintou M.* Advances in regenerative therapies for spinal cord injury: a biomaterials approach [Text] / *M. Tsintou, K. Dalamagkas, A. M. Seifalian* // Neural Regen Res. – 2015. – **Vol. 10, № 5.** – P. 726-742.
9. Spinal cord reconstruction using NeuroGel implants and functional recovery after chronic injury [Text] / *S. Woerly, V. D. Doan, F. Evans-Martin, et al.* // J. Neurosci Res. – 2001. – **Vol. 66, № 6.** – P. 1187-1197.
10. Reconstruction of the transected cat spinal cord following NeuroGel implantation: axonal tracing, immunohistochemical and ultrastructural studies [Text] / *S. Woerly, V. D. Doan, N. Sosa, et al.* // Int J Dev Neurosci. – 2001. – *Vol. 19, № 1.* – P. 63-83.
11. Spinal cord repair with PHPMA hydrogel containing RGD peptides (NeuroGel) [Text] / *S. Woerly, E. Pinet, L. de Robertis, et al.* // Biomaterials. – 2001. – **Vol. 22, №. 10.** – P. 1095-1111.
12. Prevention of gliotic scar formation by NeuroGel allows partial endogenous repair of transected cat spinal cord [Text] / *S. Woerly, V. D. Doan, N. Sosa, et al.* // J Neurosci Res. – 2004. – **Vol. 75, № 2**. – P. 262-272.
13. *Цымбалюк В. И.* Спинной мозг. Элегия надежды: монография [Текст] / *В. И. Цымбалюк, В. В. Медведев*. – Винница: Нова Книга, 2010. – 944 с.
14. Expression of heat shock protein (HSP)-25 and HSP-32 in the rat spinal cord reconstructed with Neurogel [Text] / *S. Woerly, O. Awosika, P. Zhao, et al.* // Neurochem Res. – 2005. – **Vol. 30, № 6-7.** – P. 721-735.
15. Human iPS cell-derived astrocyte transplants preserve respiratory function after spinal cord injury [Text] / *K. Li, E. Javed, D. Scura, et al.* // Exp Neurol. – 2015. – **Vol. 271**. – P. 479-492.
16. Respiratory outcomes after mid-cervical transplantation of embryonic medullary cells in rats with cervical spinal cord injury [Text] / *B. J. Dougherty, E. J. Gonzalez-Rothi, K. Z. Lee, et al.* // Exp Neurol. – 2016. – **Vol. 278.** – P. 22-26.
17. Functional recovery after cervical spinal cord injury: role of neurotrophin and glutamatergic signaling in phrenic motoneurons [Text] / *L. C. Gill, H. M. Gransee, G. C. Sieck, et al.* // Respir Physiol Neurobiol. – 2016. – **Vol. 226**. – P. 128-136.
18. *Цымбалюк В. И.* Нейрогенные стволовые клетки [Текст] / *В. И. Цымбалюк, В. В. Медведев*. – К.: Коваль, 2005. – 596 с.
19. Neurorehabilitation with neural transplantation [Text] / *M. Döbrössy, M. Busse, T. Piroth, et al.* // Neurorehabil Neural Repair. – 2010. – **Vol. 24, № 8**. – P. 692-701.
20. Multichannel silk protein/laminin grafts for spinal cord injury repair [Text] / *Q. Zhang, Sh. Yan, R. You, et al.* // J Biomed Mater Res A. – 2016 [Epub ahead of print]. – doi: 10.1002/jbm.a.35851
21. Neurotrophin-3 gradients established by lentiviral gene delivery promote short-distance axonal bridging beyond cellular grafts in the injured spinal cord [Text] / *L. Taylor, L. Jones, M. H. Tuszynski, et al.* // J Neurosci. – 2006. – **Vol. 26, № 38**. – P. 9713-21.
22. Exogenous neuritin promotes nerve regeneration after acute spinal cord injury in rats [Text] / *R. Gao, X. Li, Sh. Xi, et al.* // Hum Gene Ther. – 2016. – **Vol. 27, № 7**. – P. 544-554.
23. Sustained release of Neurotrophin-3 via calcium phosphate-coated sutures promotes axonal regeneration after spinal cord injury [Text] / *A. Hanna, D. L. Thompson, D. J. Hellenbrand, et al.* // J Neurosci Res. – 2016. – **Vol. 94, № 7**. – P. 645-652.
24. How many neurons do you have? Some dogmas of quantitative neuroscience under revision [Text] / *R. Lent, F. A. C. Azevedo, C. H. Andrade-Moraes, et al.* // Eur J Neurosci. – 2002. – **Vol. 35**. – P. 199, doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07923.x

25. *Цимбалюк В. І.* Cerebellum, або мозочок: монографія [Текст] / *В. І. Цимбалюк, В. В. Медведєв, Ю. Ю. Сенчик* // Вінниця: Нова Книга, 2013. – 272 с.
26. *Hashimoto M.* Development and evolution of cerebellar neural circuits [Text] / *M. Hashimoto, M. Hibi* // Dev Growth Differ. – 2012. – **Vol. 54, № 3**. – P. 373-89.
27. *Hoshino M.* Neuronal subtype specification in the cerebellum and dorsal hindbrain [Text] / *M. Hoshino* // Dev Growth Differ. – 2012. – **Vol. 54, № 3**. – P. 317-326.
28. Cellular commitment in the developing cerebellum [Text] / *H. Marzban, M. R. Del Bigio, J. Alizadeh, et al.* // Front Cell Neurosci. – 2015. – doi: 10.3389/fncel.2014.00450
29. Endogenous cerebellar neurogenesis in adult mice with progressive ataxia [Text] / *M. Kumar, Z. Csaba, S. Peineau, et al.* // Ann Clin Transl Neurol. – 2014. – **Vol. 1, № 12**. – P. 968 –981, doi: 10.1002/acn3.137
30. Mitotic events in cerebellar granule progenitor cells that expand cerebellar surface area are critical for normal cerebellar cortical lamination in mice [Text] / *J. C. Chang, M. Leung, H. N. Gokozan, et al.* // J Neuropathol Exp Neurol. – 2015. – **Vol. 74, № 3**. – P. 261-272, doi:10.1097/NEN.0000000000000171
31. N-myc is a key switch regulating the proliferation cycle of postnatal cerebellar granule cell progenitors [Text] / *M. Ma, W. Wu, Q. Li, et al.* // Sci. Rep. – 2015. – **Vol. 5, Article 12740**. – P. 1–13, doi: 10.1038/srep12740
32. A mathematical model of granule cell generation during mouse cerebellum development [Text] / *S. R. Leffler, E. Legué, O. Aristizábal, et al.* // Bull Math Biol. – 2016. – **Vol. 78, №. 5.** – P. 859-878, doi 10.1007/s11538-016-0163-3
33. Transplantation of human induced cerebellar granular-like cells improves motor functions in a novel mouse model of cerebellar ataxia [Text] / *T. Zhu, H. Tang, Y. Shen, et al.* // Am J Transl Res. – 2016. – **Vol. 8, № 2**. – P. 705-718.
34. *Vriend J.* The role of the ubiquitin proteasome system in cerebellar development and medulloblastoma [Text] / *J. Vriend, S. Ghavami, H. Marzban* // Mol Brain. – 2015. – **Vol. 8, № 1, Article 64**. – P. 1-14, doi 10.1186/s13041-015-0155-5
35. PERK activation promotes medulloblastoma tumorigenesis by attenuating premalignant granule cell precursor apoptosis [Text] / *Y. Ho, X. Li, S. Jamison, et al.* // Am J Pathol. – 2016. – **Vol. 186, № 7**. – P. 1939-1951, doi: 10.1016/j.ajpath.2016.03.004
36. YB-1 is elevated in medulloblastoma and drives proliferation in Sonic hedgehog-dependent cerebellar granule neuron progenitor cells and medulloblastoma cells [Text] / *A. Dey, M. Robitaille, M. Remke, et al.* // Oncogene. – 2016 (Epub ahead of print). – P. 1-13, doi:10.1038/onc.2015.491
37. *Цимбалюк В. І.* Модель перетину половини поперечника спинного мозку. І. Технічні, патоморфологічні та клініко–експериментальні особливості [Текст] / *В. І. Цимбалюк, В. В. Медведєв, В. М. Семенова, та ін.* // Укр. нейрохірург. журнал. – 2016. – **№ 2**. – С. 18-27.
38. *Basso D. M.* A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [Text] / *D. M. Basso, M. S. Beattie, J. C. Bresnahan* // J Neurotrauma. – 1995. – **Vol. 12, № 1**. – P. 1-21.
39. Vascular endothelial growth factor and its high–affinity receptor (VEGFR–2) are highly expressed in the human forebrain and cerebellum during development [Text] / *L. Sentilhes, C. Michel, M. Lecourtois, et al.* // J Neuropathol Exp Neurol. – 2010. – **Vol. 69, № 2**. – P. 111-128.
40. Vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform regulation of early forebrain development [Text] / *D. C. Darland, J. T. Cain, M. A. Berosik, et al.* // Developmental Biology. – 2011. – **Vol. 358**. – P. 9-22.
41. Cell death as a regulator of cerebellar histogenesis and compartmentation [Text] / *J. Jankowski, A. Miething, K. Schilling, et al.* // Cerebellum. – 2011. – **Vol. 10**. – P. 373-392.
42. Nuclear factor I and cerebellar granule neuron development: an intrinsic–extrinsic interplay [Text] / *D. L. Kilpatrick, W. Wang, R. Gronostajski, et al.* // Cerebellum. – 2012. – **Vol. 11**. – P. 41-49.
43. Sonic hedgehog patterning during cerebellar development [Text] / *A. De Luca, V. Cerrato, E. Fuca, et al.* // Cell Mol Life Sci. – 2016. – **Vol. 73, № 2**. – P. 291-303, doi 10.1007/s00018-015-2065-1
44. Stroke–evoked angiogenesis results in a transient population of microvessels [Text] / *S.W. Yu, B. Friedman, Q. Cheng, et al.* // J Cereb Blood Flow Metab. – 2007. – **Vol. 27**. – P. 755-763.
45. *Heckman C. J.* Motor unit [Text] / *C. J. Heckman, R. M. Enoka* // Compr Physiol. – 2012. – **Vol. 2**. – P. 2629-2682, doi: 10.1002/cphy.c100087
46. Recovery of neuronal and network excitability after spinal cord injury and implications for spasticity [Text] / *J. M. D'Amico, E. G. Condliffe, K. J. B. Martins, et al.* // Front Int Neurosci. – 2014. – **Vol. 8, Article 36.** – P. 1-24, doi: 10.3389/fnint.2014.00036
47. Spinal shock revisited: a four–phase model [Text] / *J. F. Ditunno, J. W. Little, A. Tessler, et al.* // Spinal Cord. – 2004. – **Vol. 42**. – P. 383-395.
48. Global gene expression analysis of rodent motor neurons following spinal cord injury associate molecular mechanisms with development of post-injury spasticity [Text] / *J. Wienecke, A.C. Westerdahl, H. Hultborn, et al.* // J Neurophysiol. – 2010. – **Vol. 103, № 2.** – P. 761-778.

СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 21.07.2016 р.
Прийнята до друку 04.11.2016 р.