НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДУ «ІНСТИТУТ НЕЙРОХІРУРГІЇ
імені академіка А.П. РОМОДАНОВА НАМН УКРАЇНИ»

МЕДВЕДЄВ ВОЛОДИМИР ВІКТОРОВИЧ

УДК 616.832–001 : 616.8–009.12 : 616.8–089–092.9

СПАСТИЧНІСТЬ ПРИ ТРАВМІ СПИННОГО МОЗКУ: ПАТОГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ ТА ШЛЯХИ НЕЙРОХІРУРГІЧНОЇ КОРЕКЦІЇ ЗАСОБАМИ ТКАНИННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

14.01.05 — нейрохірургія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора медичних наук

Київ — 2017

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця МОЗ України.

Науковий консультант: доктор медичних наук, професор, академік НАМН України **Цимбалюк Віталій Іванович**, Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України, завідувач кафедри нейрохірургії.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор, член-кореспондент НАМН України **Поліщук Микола Єфремович**, Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика МОЗ України, завідувач кафедри нейрохірургії;

доктор медичних наук, професор **П'ятикоп Володимир Олександрович**; Харківський національний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри нейрохірургії;

доктор медичних наук, старший науковий співробітник **Салютін Руслан Вікторович**; ДУ "Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова" Національної академії медичних наук України, заступник директора з лікувальної роботи.

Захист відбудеться 17 жовтня 2017 р. о 12^{00} годині на засіданні Спеціалізованої вченої ради Д 26.557.01 в ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» за адресою: 04050, м. Київ, вул. П. Майбороди, 32.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» (04050, м. Київ, вул. П. Майбороди, 32).

Автореферат розіслано «____» вересня 2017 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
д.мед.н., с.н.с. **О.Є. Скобська**

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Однією з найскладніших проблем сучасної медичної науки є відновне лікування травми спинного мозку. Незважаючи на низьку частоту спінальної травми [Adams M., Cavanagh J.F.R., 2004; Ahn H. et al., 2011; Singh A. et al., 2014; Chamberlain J.D. et al., 2015; Oteir A.O. et al., 2016], пов'язаний з нею загальнонаціональний рівень витрат у розвинених країнах виражається мільярдними еквівалентами [Krueger H. et al., 2013; Oliveri R.S. et al., 2014].

У переліку можливих засобів відновлення втрачених функцій спинного мозку розглядають найрізноманітніші технології — від синтетико–хімічних до генно–інженерних, кібернетико–інформаційних, біонічних тощо [Volpato F.Z. et al., 2013; Assunção-Silva R.C. et al., 2015; Louie D.R. et al., 2015; López-Larraz E. et al., 2016; Miller L.E. et al., 2016]. Чи не найбільш перспективним засобом відновного лікування спінальної травми є тканинна нейроінженерія [Lin X.-Y. et al., 2016; Ahuja C., Fehlings M., 2016]. Існуючі на даний час прикладні рішення грунтуються на створенні умов для росту супраспінальних аксонів через зону травми із залученням штучних тканинних каркасів — матриксів, попередньо асоційованих з клітинами певного фенотипу [Weishaupt N. et al., 2014; J.R. Siebert et al., 2015; Tsintou M. et al., 2015; Hanna A. et al., 2016; Paveliev M. et al., 2016]. При цьому результативність втручань такого роду потребує клініко-експериментального співвіднесення з ефективністю засобів тканинної нейротрансплантації [Цимбалюк В.І., Ямінський Ю.Я., 2002; Яминский Ю.Я. и др., 2002; Цимбалюк В.І. та ін., 2004].

Спастичність характерна для різних видів патології мозку, що супроводжується дефіцитом супраспінальної інервації рухових нейронів [Sommerfeld D.K. et al., 2004; Rizzo M.A. et al., 2004; Odding E. et al., 2006; Malhotra S. et al., 2009; Schottler J. et al., 2012]. У випадку спінальної травми частота його маніфестації, поряд з хронічним больовим синдромом та синдромом вегетативної дисфункції, сягає 60–70 % [Burns A.S. et al., 2016; van der Meer P. et al., 2016; Burke D. et al., 2017]. Указані розлади суттєво погіршують якість життя спінальних хворих [Adriaansen J.J.E. et al., 2016], є основними тригерами фінансових витрат у віддаленому періоді травми [Saulino M. et al., 2015; Burns A.S. et al., 2016].

Попри значний прогрес у вивченні ролі серотонінергічної і норадренергічної систем у формуванні посттравматичної спастичності [D'Amico J.M. et al., 2014; Li Y. et al., 2014; Di Narzo A.F. et al., 2015; Fukuda M. et al., 2015; Nardone R. et al., 2015; Ren L.-Q. et al., 2016], механізми ранніх стадій патогенезу цього ускладнення спінальної травми, а також роль ноцицептивних нейрональних мереж спинного мозку не з'ясовано.

Розвиток спастичності залежить від реалізації компонентів запального процесу [Di Narzo A.F. et al., 2015], характерного в тому числі і для будь-якого нейроінженерного втручання трансплантаційного типу [Praet J. et al., 2015; Le Blon D. et al., 2016]. Попри це, оцінка впливу на динаміку посттравматичної спастичності відновних втручань із застосуванням тканинної інженерії у більшості робіт відсутня.

Нез'ясованою залишається кореляція рівня спастичності та рухової активності паретичної кінцівки під час перебігу спінальної травми, поєднання мотивованого (залежного від супраспінальних впливів на мотонейрони) та мимовільного

(залежного від викривлених електрофізіологічних властивостей мотонейронів) компонентів тонусу паретичних м’язів.

Іншою важливою проблемою є дослідження вікових особливостей розвитку спастичності на тлі спінальної травми, а також в умовах компресії травмованого спинного мозку стороннім тілом. Ця проблема є актуальною, зважаючи на значну частку спінальних уражень під час військових дій [Поліщук М.Є. та ін., 2015; Гурьєв С.О. та ін., 2016].

Враховуючи перелічені прикладні та фундаментальні аспекти проблеми травми спинного мозку, дослідження ланок патогенезу спастичності, перебігу цього ускладнення на тлі відновних нейроінженерних втручань є актуальним завданням сучасної нейрохірургії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в межах планових науково-дослідних робіт ДУ "Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України": "Дослідити механізм формування патологічної функціональної активності мотонейронів спинного мозку при розвитку синдрому посттравматичної спастичності", № держреєстрації 0111U002203 (2011–2013 рр.); "Вивчити особливості впливу різних видів нейротрансплантації на формування синдрому спастичності при травмі спинного мозку в експерименті", № держреєстрації 0113U007731 (2014–2016 рр.); "Дослідити ефективність іноваційних методів відновлення функції спинного мозку та периферичних нервів з використанням тканинної нейроінженерії та електрохірургічних технологій в експерименті", № держреєстрації 0117U004270 (2017–2019 рр.), а також у межах планових науково-дослідних робіт кафедри нейрохірургії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України: "Дослідити вплив імплантації синтетичних макропористих гідрогелів та клітин різного походження і ступеню диференціювання на відновлення функцій спинного мозку після його травматичного пошкодження в експерименті", № держреєстрації 0109U004227 (2009–2011 рр.); "Дослідити вплив трансплантації алогенних тканин різного походження і ступеню диференціювання на перебіг гострого травматичного ушкодження гемісфер мозочка в експерименті", № держреєстрації 0112U001412 (2012–2014 рр.); "Дослідити особливості розвитку синдрому спастичності при травмі спинного мозку в умовах застосування відновних нейроінженерних втручань", № держреєстрації 0115U000013 (2015–2017 рр.). У всіх зазначених науково-дослідних роботах автор брав участь як відповідальний виконавець.

Мета дослідження — покращення результатів відновного нейрохірургічного лікування травми спинного мозку на основі досліджень патогенезу та динаміки спастичності при застосуванні відновних нейроінженерних втручань в умовах експерименту.

Завдання дослідження.

1. Розробити та запровадити експериментальну модель відкритої проникної травми спинного мозку з тривалою його механічною компресією стороннім тілом, дослідити динаміку рівня спастичності та рухової функції паретичної кінцівки за цих експериментальних умов.

2. Дослідити динаміку рівня посттравматичної спастичності та рухової функції паретичної кінцівки у тварин різних вікових груп.
3. Проаналізувати зміни мережевої активності нейронів драглистої речовини спинного мозку та малих нейронів спинномозкових вузлів на рівні маніфестації посттравматичної спастичності.
4. Оцінити зміни експресії мРНК білків основних систем синаптичної передачі у речовині спинного мозку нижче рівня травми на тлі синдрому посттравматичної спастичності.
5. Розробити та запровадити експериментальну модель та дослідити динаміку мозочкової гіпотонії — тимчасового дефіциту супраспінального впливу на мотонейрони спинного мозку.
6. Проаналізувати вплив тканинної трансплантації на динаміку спастичності та частоту тяжкої форми хронічного больового синдрому при спінальній травмі.
7. Дослідити вплив на динаміку рівня спастичності та рухової функції сучасних двокомпонентних нейроінженерних втручань, а також обмеження довільної рухової активності та різностатевості донора і реципієнта стовбурових клітин у цих експериментальних умовах.
8. Оцінити кореляцію між рівнем спастичності та рухової функції паретичної кінцівки за умов різного перебігу спінальної травми та на тлі апробованих відновних нейроінженерних втручань.
9. Запропонувати шляхи оптимізації відновних нейроінженерних втручань при травмі спинного мозку з огляду на динаміку посттравматичної спастичності.

Об'єкт дослідження: спастичність при травмі спинного мозку.

Предмет дослідження: функціональні, електрофізіологічні, молекулярно-генетичні і структурні кореляти спастичності паретичної кінцівки на тлі спінальної травми та нейроінженерних втручань.

Методи дослідження: ***експериментальний*** (моделювання та відновне лікування травми спинного мозку; моніторинг спастичності та рухової функції паретичної кінцівки), ***електрофізіологічний*** (електронейроміографічне дослідження задніх кінцівок), ***клітинний електрофізіологічний*** (дослідження електричної активності нейронів II пластини [за Rexed B., 1952] сірої речовини спинного мозку, малих нейронів спинномозкових вузлів на рівні маніфестації посттравматичної спастичності), ***молекулярно-генетичний*** (дослідження рівня мРНК білків основних систем синаптичної передачі у речовині спинного мозку нижче зони травми), ***морфологічний*** (макроскопічне, світлооптичне, імуногістохімічне та ультраструктурне дослідження тканини спинного мозку, імуногістохімічне дослідження стовбурових клітин in vitro), ***методи математичного та статистичного аналізу***. Згідно з висновком Комісії з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, усі досліди на тваринах проведено у суворій відповідності до чинного нормативного документу «Порядок проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» (Наказ Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України №249 від 01.03.2012 р.) та згідно з правилами Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях.

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертації на підставі проведеного комплексного дослідження представлено теоретичне узагальнення та новий підхід до вирішення актуальної наукової проблеми нейрохірургії — розкриття патогенезу посттравматичної спастичності та удосконалення відновного лікування травми спинного мозку.

Автором розроблено та запроваджено модель відкритого проникного ураження спинного мозку стороннім тілом. Встановлено, що компресія спинного мозку стороннім тілом гальмує відновний процес, посилює спастичність. Поступове зменшення компресії у віддаленому періоді травми супроводжується помірним відновленням рухової функції та зниженням рівня спастичності.

Доведено, що ступінь відновлення рухової функції зменшується з віком експериментальних тварин на момент нанесення травми, вираженість спастичності збільшується.

Вперше на рівні маніфестації посттравматичної спастичності виявлено збільшення стимулюючого мережевого впливу на збуджувальні інтернейрони II пластини сірої речовини спинного мозку та зменшення — на гальмівні інтернейрони. Встановлено зниження експресії мРНК триптофан-гідроксилази–2, переносника моноамінів у синаптичні везикули Slc18a2 та субодиниці AMPA-рецептора глутамату Gria3 у речовині спинного мозку нижче рівня травми.

Запропоновано та впроваджено модель мозочкової гіпотонії. Виявлено, що динаміка спастичності при трансплантації тканини нюхової цибулини, ізольованій та поєднаній зі стовбуровими клінинами нервового гребеня імплантації макропористого гідрогелю, аналогічна динаміці відновлення м’язового тонусу після ураження мозочку та залежить від реалізації механізмів пластичності нейрональних мереж рухової системи.

Виявлено протилежний вплив на перебіг спастичності та тяжкого больового синдрому алотрансплантації у зону травми спинного мозку тканини фетального мозочку та тканини зрілої нюхової цибулини.

Поглиблено уявлення про ефективність трансплантації нейрогенних стовбурових клітин, стовбурових клітин кісткового мозку та стовбурових клітин нервового гребеня в комплексі з макропористим гідрогелем на динаміку рівня спастичності та рухової функції після спінальної травми. Доведено довготривалу персистенцію в товщі матриксу трансплантованих клітин, їх нейрональне диференціювання, формуваня розростань нервових волокон реципієнтного спинного мозку.

Встановлено, що обмеження спонтанної локомоторної активності на тлі трансплантації нейрогенних стовбурових клітин, асоційованих з макропористим гідрогелем, погіршує відновлення рухової функції при спінальній травмі, пришвидшує розвиток спастичності. Різностатевість донора та реципієнта трансплантованих стовбурових клітин суттєво погіршує відновний процес, сприяє розвитку спастичності.

У перелічених експериментальних умовах у динаміці спостереження виявлено додатну кореляцію між середніми у групі значеннями рівня рухової функції та спастичності паретичної кінцівки.

З урахуванням отриманих даних патогенетично обгрунтований алгоритм відновного лікування при лацераційній травмі спинного мозку повинен включати ранню імплантацію в зону ураження прорегенераторного матрикса, асоційованого з нейрогенними та ГАМК-продукуючими клітинами, а також засоби фізичної реабілітації, спрямовані на збільшення рухової активності паретичної кінцівки.

Практичне значення одержаних результатів. На підставі отриманих даних обгрунтовано усунення травматичної компресії спинного мозку у віддаленому періоді спінальної травми, використання трансплантації стовбурових клітин кісткового мозку, нервового гребеня, а також попередників ГАМК-продукуючих клітин у комплексі з біосумісним прорегенераторним матриксом для відновного лікування травми спинного мозку. Доведено доцільність збільшення об'єму ранньої мобілізації паретичної кінцівки в межах довільної просторової локомоції організму, дотримання еквістатевості донора та реципієнта трансплантованих клітин. Клінічне застосування апробованих засобів сприятиме суттєвому покращенню результатів лікування спінальної травми. Виявлені патогенетичні закономірності перебігу посттравматичної спастичності є перспективними щодо прогнозування, попередження та нейрохірургічного лікування цього ускладнення.

Запропоновано спосіб моделювання травми спинного мозку щура шляхом половинного його розрізу у нижньогрудному відділі, спосіб повного перетину спинного мозку щура у верхньокрижовому відділі, спосіб моделювання відкритої проникної дозованої спино-мозкової травми у експериментальних тварин, а також спосіб забору тканини кісткового мозку із стегнової кістки експериментальних тварин (патенти України на корисну модель №92522, №92520, №92561 та №92521 від 26.08.2014). Запропоновано спосіб моделювання синдрому мозочкової гіпотонії у експериментальних тварин (патент України на корисну модель №99511 від 10.06.2015), спосіб лікування забиття мозочка шляхом трансплантації фетальної нервової тканини (мозочка), тканини нюхової цибулини та фетальної нирки (патенти України на корисну модель №92562, №92523 та №92519 від 26.08.2014).

Результати дисертаційної роботи впроваджено у практичну діяльність лабораторії експериментальної нейрохірургії ДУ "Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України" та відділу сенсорної сигналізації Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України. Основні теоретичні результати дослідження включено до матеріалів робочих програм кафедри нейрохірургії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є особистим науковим дослідженням здобувача. Автором разом з науковим консультантом акад. НАМН України, проф., д.мед.н. Цимбалюком В.І. розроблено ідею, загальний дизайн дослідження, інтерпретовано основні результати. Автором самостійно сформульовано мету та завдання дослідження, проведено аналіз наукової літератури, патентоспроможність теми, запропоновано модель відкритої проникної травми спинного мозку з тривалою персистенцією стороннього тіла, модель тимчасової гіпотонії, спосіб виявлення прихованої рухової дизметрії у тварин після травми спинного мозку, виконано експериментальні дослідження — моделювання

травми спинного мозку, нейроінженерні втручання, моніторинг рівня спастичності та функції задніх кінцівок. Здобувач брав безпосередню участь у проведенні електрофізіологічних, патоморфологічних, культуральних дослідженнях, аналізі та статистичному опрацюванні цифрового матеріалу. Автором проаналізовано та узагальнено результати, сформульовано висновки, обґрунтовано теоретичні та практичні положення роботи. Усі розділи дисертації написано та оформлено автором особисто.

Матеріали, висновки та положення кандидатської дисертації автора не використовувалися в його докторській дисертації.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації оприлюднено на науково-практичній конференції нейрохірургів України за участю НДІ нейрохірургії ім. М.Н. Бурденка РАМН «Проблеми реконструктивної та відновної нейрохірургії» (*АР Крим, м. Партеніт, 7–8 жовтня 2010 р.*), ІІ-й Всеукраїнській науково–практичній конференції за міжнародною участю «Вейновские чтения в Украине» (*Київ, 23–24 травня 2012 р.*), Конференції нейрохірургів України (*Київ, 26–27 вересня 2012 р.*), VI-му Конгресі Українського товариства нейронаук (*Київ, 4–8 червня 2014 р.*), ІІІ-му Міжнародному науково-практичному конгресі «Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України» (*Київ, 14–16 жовтня 2014 р.*), XIV-й міжнародній науково-практичній студентській конференції «Науковий потенціал молоді — прогрес медицини майбутнього» (*Ужгород, 20–23 квітня 2016 р.*), V-му Міжнародному медичному конгресі «Впровадження сучасних досягнень медичної науки у практику охорони здоров'я України» (*Київ, 19–21 квітня 2016 р.*), у рамках міжнародного симпозіуму "Peripheral nerve reconstruction after severe injures" (*Kyiv, 19–21 May 2016*) та науково-практичної конференції нейрохірургів України за міжнародною участю «Травматичні ушкодження центральної та периферичної нервової системи» (*Кам'янець-Подільський, 15–16 вересня 2016 р.*).

Апробація дисертації відбулася на розширеному засіданні кафедри нейрохірургії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України спільно з Вченою радою ДУ "Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України" та кафедрою нейрохірургії Національної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика МОЗ України 19 травня 2017 р. (протокол засідання № 9 від 19.05.2017).

Публікації. За темою дисертаційної роботи опубліковано 52 наукові праці, у тому числі 30 статей (*4 — одноосібних*), з яких 25 — у фахових періодичних виданнях рекомендованих МОН України, 26 — у виданнях включених до міжнародних наукометричних баз, 3 ― у періодичних виданнях іноземних держав, 2 монографії у співавторстві, 8 патентів України на корисну модель; 12 тез доповідей на конгресах, з'їздах, конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, 7 розділів, підсумків, висновків, додатків та списку використаних джерел, викладена на 586-ти сторінках друкованого тексту, проілюстрована 130-ма рисунками та 6-ма таблицями, доповнена 7-ма додатками, у яких наведено результати статистичної обробки первинних цифрових даних, викладені у 158 таблицях, проілюстровані 46-

ма рисунками. Список використаних джерел включає 547 найменувань, з них 62 — кирилицею та 485 — латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріал і методи дослідження. Дослідження виконано на 287 білих безпородних щурах віварію ДУ "Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України" та Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України. Тварини утримувалися у звичних фізичних умовах при природній змінності циркадного світлового циклу та харчування збалансованим комбінованим кормом *ad libitum*.

Основні експериментальні групи:

- моделювання лівобічного половинного перетину (ЛПП) спинного мозку у тварин зрілого віку (*3–6 міс., самці, n=16*) — група "**ЛПП**";
- моделювання ЛПП у тварин молодого віку (*1 міс., самці, n=32*) — група "**ЛПП$_{JUV}$**" (*від '**juv**enis' — молоді*);
- моделювання ЛПП та негайна імплантація стороннього тіла (*5,5 міс., самці, n=10*) — група "**CΘRP$_{ALIEN}$**" (*від 'corpus alienum' — стороннє тіло*);
- моделювання ЛПП та негайна імплантація фрагмента макропористого гідрогеля (*"neurogel" — NG*) у зону травми (*5,5 міс., самці, n=20*) — група "**NG**";
- моделювання ЛПП та негайна імплантація тунельованого ксероматрикса на основі хітозану (*5,5 міс., самці, n=9*) — група "**ΧΙΤΩ**" (*від '**χιτών**san'*);
- моделювання ЛПП та негайна трансплантація тканини нюхової цибулини (ТТНЦ) у зону травми (*5,5 міс., самці, n=34*) — група "**ТТНЦ**";
- моделювання ЛПП та негайна трансплантація тканини фетального мозочка (ТТФМ) у зону травми (*5,5 міс., самці, n=15*) — група "**ТТФМ**";
- моделювання ЛПП та негайна трансплантація тканини фетальної нирки (ТТФН) у зону травми (*5,5 міс., самці, n=8*) — група "**ТТФН**";
- моделювання ЛПП та негайна імплантація фрагмента макропористого гідрогеля NG, асоційованого з нейрогенними стовбуровими клітинами (НСК) фетального гіпокампа миші (*5,5 міс., самці, n=20*) — група "**NG+НСК**";
- моделювання ЛПП та негайна імплантація фрагмента макропористого гідрогеля (NeuroGel — NG), асоційованого зі стовбуровими клітинами кісткового мозку (СККМ) зрілої миші (*5,5 міс., самці, n=16*) — група "**NG+СККМ**";
- моделювання ЛПП та негайна імплантація фрагменту макропористого гідрогеля NG, асоційованого зі стовбуровими клітинами нервового гребеня (СКНГ) зрілої миші–самця (*5,5 міс., самці — n=6, самиці — n=6*) — група "**NG+СКНГ**";
- моделювання супраспінальної гіпотонії шляхом локальної дозованої травми лівої півкулі мозочка та механічне очищення вогнища забиття на 7 добу (*5,5 міс., самці, n=15, n=6*) — групи "**К–1$_{CER}$**" та "**К–2$_{CER}$**" (*К — контроль, CER — cerebellum*);
- моделювання супраспінальної гіпотонії шляхом локальної дозованої травми лівої півкулі мозочка з механічним очищенням вогнища забиття на 7 добу і

алотрансплантацією тканини фетального мозочка (*5,5 міс., самці, n=15, n=6*) — група "**ТТФМ$_{CER}$**".

Оперативні втручання здійснено за умов загального знеболення (*внутрішньоочеревинне введення суміші розчинів ксилазину ["Biowet", Польща; 15 мг/кг] і кетаміну ["Гедеон Ріхтер А.О.", Угорщина; 70 мг/кг]*). Протокол виконання ЛПП включав ламінектомію на рівні T_{11}, перфорування спинного мозку одразу ж біля лівого краю задньої серединної артерії у дорсо-вентральному напрямку, перетин лівої половини спинного мозку браншами офтальмологічних ножиць, контроль повноти перетину.

Трансплантацію в рану спинного мозку фрагментів тканини чи матрикса здійснювали одразу ж після моделювання ЛПП; вікно доступу в канал хребта закривали фрагментом підшкірної фасції, рану пошарово зашивали, у задню шийну ділянку підшкірно вводили розчин біциліну-5 (*ОАО "Киевмедпрепарат"; ~150–200 тис ОД на 1 тварину*), внутрішньоочеревинно — розчин дексаметазону (*KRKA, Словенія; 6 мг/кг*).

У якості базового матрикса використано біосумісний **макро**пористий гідрогель (NeuroGel — NG), синтезований у лабораторії E. Pinet (*FISO Technologies Inc., Quebec, Canada*) з N-(2-гідроксипропіл)-метакриламіду в умовах гетерофазної сепарації шляхом радикальної полімеризації у пороутворюючому розчиннику з формуванням дивінілових поперечних зв'язків у присутності азоту у якості газової фази середовища. Гідрогель містив численні аморфні мікро- (<2 нм), мезо- (2–50 нм) і макропори (50–300 нм) [Woerly S. et al., 1993, 1996, 1999, 2001].

У якості стороннього тіла використано цільний фрагмент **мезо**пористого гідрогелю з аналогічною первинною хімічною структурою, меншим середнім поперечним перерізом аморфних каналів між елементами речовини гелю, вищим коефіцієнтом просторової щільності та більшою пружністю.

У тварин групи "ХІТΩ" в зону ЛПП імплантували фрагменти тунельованого ксероматриксу на основі хітозану — амінополісахариду 2-аміно-2-дезокси-b-D-глюкану, що утворюється при виробничому дезацетилюванні хітину панцирів червононогих крабів та нижчих грибів [Kozakevych R.B. et al., 2016].

Тканину нюхової цибулини отримували у щурів-самців (*5,5 міс., 300 г*) відразу після забиття шляхом передозування суміші зазначених вище наркотичних засобів. ***Фетальний мозочок*** та ***фетальну нирку*** вилучали у плода щура 18-ти діб гестації (*E18*), для чого вагітну самку щура наркотизували сумішшю зазначених вище наркотичних засобів. Підрахунок кількості живих клітин у трансплантаті у випадку ТТНЦ, ТТФМ та ТТФН здійснювали за допомогою стандартного тесту з трипановим синім після отримання дисоційованої культури.

Нейрогенні стовбурові клітини (НСК) отримували з гіпокампа плоду миші на 17-ту добу гестації, який вилучали в анестезованої самиці миші лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J (*трансгенної за геном зеленого флуорисцентного білка*). Життєздатність клітин (*(91,6±0,7) %*) визначено методом проточної цитометрії на лазерному цитофлюориметрі-сортері FACSAria (*"Becton Dickinson", США*) після інкубації суспензії клітин із 7-аміноактиноміцином; клітини культивували у багатокомпонентному середовищі (*96% Neurobasal, 2% B-27 Supplement, 1%*

Glutamax, 0.1% Sodiumpyruvate, 0.1% NAC, 0.5% пеніцилін/стрептоміцин — "Gibco", Велика Британія) в присутності 10 нМ фактора росту фібробластів 2 (*"Sigma", США*).

Стовбурові клітини кісткового мозку **(**СККМ) отримували в мишей-самців лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J віком 3 міс., масою 40 г шляхом вимивання зі стегнової кістки середовищем RPMI-1640 (*Sigma, США*). Частку життєздатних клітин (*(94,1±0,6) %*) визначено на лазерному цитофлюориметрі-сортері BD FACSAria (*див. вище*); клітини культивували за стандартних умов у середовищі, що містило 42,5 % RPMI-1640 (*"Sigma", США*), 42,5% DMEM, 15% FBS, 2 mM L-глутаміну, 1нг/мл основного фактора росту фібробластів (*bFGF, "Sigma", США*). Фенотипування клітин проводили з використанням моноклональних антитіл до мембранних антигенів миші, мічених флуорохромами (*"Becton Dickinson", США*). Клітини досліджено на здатність до диференціювання в адипогенному та остеогенному напрямках.

Стовбурові клітини нервового гребня (СКНГ) отримували з експлантів потовщення піхви фолікула вібриси зрілої миші–самця лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J [Васильєв Р.Г. та ін., 2016]. Після прикріплення на колагеновій культуральній поверхні клітинні експлантати заливали середовищем αMEM (*"Sigma", США*) з додаванням 10 % фетальної телячої сироватки (*"Sigma", США*), 5 нг/мл bFGF (*"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. Фенотипування клітин здійснювали з використанням моноклональних антитіл, мічених флуорохромами, згідно з рекомендаціями фірми-виробника (*"Becton Dickinson", США*); проведено контрольне адипо- та остеогенне диференціювання.

В усіх трьох випадках через 5 діб культивування в середовище вкладали фрагменти макропористого гідрогелю NG розміром 16 мм^3, культивували протягом 10 діб до моменту трансплантації. Безпосередньо перед трансплантацією фрагменти матриксу, асоційованого зі стовбуровими клітинами, розтинали на фрагменти, розміром 2 мм^3, один з яких фіксували для імуногістохімічної верифікації клітин, інші — використовували для трансплантації.

Тварини всіх груп утримувалися у спеціальних клітках розміром 40×30×15 см (*довжина*×*ширина*×*висота*) по 3–6 особини. Тварини підгрупи "**NG+НСК$_{мк}$**" протягом усього періоду спостереження після трансплантації утримувалися в клітках розміром 30×20×10 см (*мк — малі клітки*).

Показник функції (ПФ) задньої іпсилатеральної [щодо зони травми] кінцівки (ЗІК) тварин визначали, починаючи із 7-ї доби, під час спостереження за руховою активністю на обмеженому відкритому полі розміром ~1 м^2, оцінювали згідно зі шкалою, запропонованою D.M. Basso, M.S. Beattie та J.C. Bresnahan (BBB) [Basso D.M. et al., 1995].

Показник спастичності (ПС) ЗІК оцінювали за шкалою, запропонованою B. Ashworth (*1964*), на рівні надп’ятково-гомілкового та колінного суглобів паретичної кінцівки, реєстрували максимальне значення показника.

Враховуючи асинхронність визначення обох показників у різних когортах кожної експериментальної групи, було сформовано стандартизовану часову шкалу відображення результатів, яка включає 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 20, 24-ий та 26-ий (*28-ий*) тижні загального періоду спостереження. Приведення індивідуальних результатів моніторингу ПФ та ПС ЗІК до зазначеної шкали здійснено шляхом квазілінійної рандомізованої інтерполяції за алгоритмом ковзного середнього. Відсутність суттєвого впливу використаного алгоритму на динаміку та внутрішньогруповий розподіл досліджуваних показників верифіковано окремим дослідженням з використанням релевантних методів статистичного аналізу. У межах програмного пакета STATISTICA 10.0 для індивідуальних значень ПФ та ПС ЗІК розраховували тижневий приріст (**$V_{ПФ}$**, **$V_{ПС}$**) та прискорення приросту (**$a_{ПФ}$**, **$a_{ПС}$**). Значення ПФ та ПС ЗІК, **$V_{ПФ}$**, **$a_{ПФ}$**, **$V_{ПС}$** та **$a_{ПС}$** на момент виходу тварини зі стану наркотичного сну умовно приймали рівним нулю (*стан спінального шоку*).

Екстероцептивну чутливість оцінювали тестом M. von Frey, ***наявність тяжкого регіонарного больового синдрому*** — за наявністю аутофагічної поведінки чи доконаної аутофагії щодо паретичної кінцівки. Тварину з ознаками аутофагічної поведінки з етичних міркувань виводили з експерименту методом цервікальної дислокації у стані глибокого наркотичного сну (*див. вище*).

Стан еферентної ланки рухової системи оцінювали в умовах загального знеболення тварини (*див. вище*), шляхом ***електронейроміографічного*** дослідження Н-рефлексу (*Hoffmann's reflex*), реєстрованого у товщі литкового м'язу у відповідь на стимуляцію сідничого нерва цифровим електронейроміографом «Нейро-МВП-Мікро» (*НЕЙРОСОФТ, РФ*) у імпульсному режимі з частотою 0,2 Гц, автоматичним скачкоподібним збільшенням амплітуди кожного наступного імпульса на 1 мА до моменту зникнення Н-хвилі. Електричну відповідь реєстрували концентричним голковим електродом, із серії відповідей вибирали патерн з максимальною амплітудою Н-хвилі, Н/М-індекс виражали у відсотках. Після проведення дослідження глибоко анестезовану тварину виводили з експерименту методом цервікальної дислокації.

Клітинні електрофізіологічні дослідження проводили у щурів–самців віком 2–2,5 міс. через 4–6 тиж. після моделювання ЛПП за відсутності ознак нейропатичного больового синдрому та рівня спастичності не менше ніж 2 бали шкали Ashworth. У тварини, анестезованої описаним вище способом, після проведення електронейроміографічного дослідження в охолодженому бікарбонатному розчині, збагаченому сахарозою, за умов постійного оксигенування вилучали й ощищали від оболонок поперековий відділ спинного мозку, отримували поперечні його зрізи товщиною 350 мкм на вібротомі (*Tempden Instrument HA 752, Велика Британія*), які вміщали у фізіологічний бікарбонатний розчин Кребса в умовах постійної оксигенації. Нейрони драглистої речовини (*II пластина заднього рогу за Rexed*) виявляли за допомогою оптичного мікроскопа BX50WI (*Olympus, Japan*), реєстрацію спонтанних подій здійснювали методом '*patch-clamp*' у режимі "*ціла клітина*" за допомогою підсилювачів PC–505B (*Warner Instruments, Hamden, США*), Multipatch 700B та Digidataboard 1320A з програмним забезпеченням pClamp 9.2 (*Molecular Devices, Union City, США*). Для з'ясування AMPA-провідності під час

мініатюрних спонтанних збуджувальних постсинаптичних потенціалів (ЗПСП) реєстрацію електричної активності проводили в розчині з вмістом антагоністів інших каналів: D-APV (50 мкМ), бікукуліну (5 мкМ) та стрихніну (2 мкМ) — блокаторів NMDA, $ГАМК_А$ і гліцинових рецепторів відповідно, а також ТТХ (0,5 мкМ) і $CdCl_2$ (100 мкМ) — блокаторів натрієвих та потенціалзалежних кальцієвих каналів відповідно. Зазначені антагоністи додавали за 10 хв. до реєстрації електричної активності, яку здійснювали при встановленні трансмембранного потенціалу на рівні –70 мВ. З метою активації АМРА-рецепторів у кондиційний розчин додавали селективний однойменний агоніст, концентрацію якого на рівні 5 мкМ витримували протягом 10–15 хв. Математичний аналіз отриманих даних проводили за допомогою пакету Mini Analysis Program (*Synaptosoft, Decatur, Georgia, США*). Для спонтанних ЗПСП і гальмівних постсинаптичних потенціалів (ГПСП) оцінювали частоту, амплітуду, тривалість фази збільшення та зменшення сили трансмембранного струму, площу, обмежену кривою струму. Провідність окремих АМРА-каналів під час мініатюрного ЗПСП оцінювали нестаціонарним флуктуаційним аналізом величин, масштабованих за піковим значенням (*'peak-scaled non-stationary fluctuation analysis'*) [Markova O. et al., 2004].

Спинномозкові вузли L_4 та L_5 отримували шляхом препарування блока хребтового стовбура в перфузованому киснем розчині. Виокремлення нейронів здійснювали шляхом інкубування тканини вузлів в розчині Тіроде з додаванням 0,1 % колагенази IV-го типу та 0,05 % трипсину (*Worthington, USA*) з подальшою механічною дисоціацією окремих клітин. Електрофізіологічні дослідження нейронів з діаметром тіла менше ніж 30 мкм здійснювали методом '*patch-clamp*' у режимі "ціла клітина". Для першого, зареєстрованого при сходинковій стимуляції, потенціалу дії розраховували поріг, амплітуду, тривалість фази наростання та фази спаду, ширину на рівні –20 мВ та площу, обмежену кривою струму.

Дослідження рівня мРНК білків основних систем синаптичної передачі у речовині спинного мозку нижче нанесення травми здійснювали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з флюоресцентною детекцією в реальному часі. Сумарну РНК із заморожених (–196° С) фрагментів спинного мозку вилучали за допомогою набору PureLink RNA Mini Kit (*"Applied Biosystems", США*), використовували для синтезу комплементарної ДНК у реакції зворотної транскрипції (*'Tag man reverse transcription reagents'; "Applied Biosystems", США*). У якості затравки використовували праймери "oligo-dT". Визначали рівень мРНК дофамін-β-гідроксилази, субодиниць АМРА-залежних глутаматних рецепторів Gria1 (*glutamate receptor, ionotropic, AMPA type, subunit 1*), Gria2, Gria3 та Gria4, триптофан-гідроксилази 2 (*Tph2*), трансмембранного білка-переносника моноамінів і, можливо, ГАМК — Slc18a2 (*solute carrier family 18 member 2*), білка-переносника ГАМК у синаптичні везикули Slc32a1 (*solute carrier family 32 member 1*), маркера ГАМК-ергічних нейронів Ptf1a (*pancreas transcription factor 1a*). У якості референтної використовували мРНК глюкуронідази β (*glucuronidase β*). Визначення експресії мРНК здійснювали за допомогою системи CFX96 Touch (*"BioRad", США*) з використанням наборів 'Tag Man Universal PCR Master Mix' та 'Tag Man Gene Expression Assays' (*"Applied Biosystems", США*). Накопичення продуктів ампліфікації

визначали за допомогою флюоресцентних олігонуклеотидних проб типу 'Tag Man' (*"Applied Biosystems", США*). Аналіз даних проводили за пороговою флуоресценцією, що характеризує цикл ПЛР (Ct), на якому спостерігається достовірне збільшення флюоресценції порівняно з фоновим рівнем та ініціюється експоненціальна фаза ПЛР. Різницю рівня мРНК досліджуваних генів між групами оцінювали за методом ΔΔCt [Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001; Трофимов Д.Ю. и др., 2008]. Рівень експресії мРНК зазначених вище білків для кожного зразка речовини спинного мозку представляли у вигляді нормованої відносної кількості мРНК, обчисленої за спеціальною формулою.

З метою моделювання гіпотонії використовували оригінальну модель фокальної відкритої травми півкулі мозочка зрілого щура [Цимбалюк В.І., Сенчик Ю.Ю., Медведєв В.В., 2010]. Під загальним знеболенням (*див. вище*) виконували трепанаційний доступ до поверхні гемісфери мозочка без розкриття твердої мозкової оболонки, травму наносили спеціальним пружинним ударником з верифікацією сили удару, після чого м'які тканини над трепанаційним вікном пошарово зашивали. Очищення зони забиття мозочка у тварин групи "**К–2$_{CER}$**" та "**ТТФМ$_{CER}$**" здійснювали на 7-му добу під загальним знеболенням (*див. вище*), у сформоване ложе вкладали фрагмент фетального мозочка ("**ТТФМ$_{CER}$**"), після чого рану пошарово зашивали. Оцінку стану гіпотонії здійснювали за допомогою тесту "ходьби по бруску" (*beam walking test, BWT*).

Для аналізу динаміки гіпотонії відбирали тварин, для яких на 3-тю добу після нанесення травми ***показник функції статокоординаторної сфери*** ($ПФ_{CER}$) становив менше ніж 4 бали BWT. Стан вираженої гіпотонії асоціювали з $ПФ_{CER}$ у 3 бали, значно вираженої — гіпотетично з $ПФ_{CER}$ у 2 бали, слабкої — з $ПФ_{CER}$ у 4 бали BWT. Розраховували тижневий приріст $ПФ_{CER}$ (**V$_{ПГ}$**). З метою оцінки вкладу супраспінальних структур у відновлення тонусу м'язів при посттравматичній спастичності порівнювали динаміку $ПФ_{CER}$ та ПС ЗІК, **V$_{ПГ}$** та **V$_{ПС}$**. Для цього $ПФ_{CER}$ та **V$_{ПГ}$** виражали у зважених балах шкали BWT, з урахуванням міри градуальності шкали Ashworth: (*1 зважений бал*) = (*1 бал BWT*) × 0,71

Матеріал для ***патоморфологічних досліджень*** у особин групи "**СӨRP$_{ALIEN}$**" отримували відразу після забиття шляхом передозування вказаних вище наркотичних засобів, фіксували 10 % розчином нейтрального формаліну, через кілька тижнів препарували, забарвлювали гематоксилін-еозином та тіоніном (*за Ніслем*).

Ультраструктурні дослідження здійснювали за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії. Напівтонкі зрізи (1000 Å) епоксидних блоків забарвлювали метиленовим синім-піроніном, переглядали в світлооптичному мікроскопі Axiophot (*OPTON, Німеччина*). Ультратонкі зрізи (600 Å) отримували на ультратомах LKB (*Швеція*) і Reicherdt-Jung (*Австрія*), забарвлювали за Reynolds та переглядали в електронному мікроскопі EM-400T (*PHILIPS, Нідерланди*).

Імуногістохімічні дослідження здійснювали у тварин груп "**NG+НСК**", "**NG+СККМ**" та "**NG+СКНГ**" після префіксації 4 % розчином параформальдегіду глибоко анестезованої парами ефіру тварини. Спинний мозок вилучали у блоці хребта, переносили в 4 % розчині параформальдегіду для дофіксації, зразки

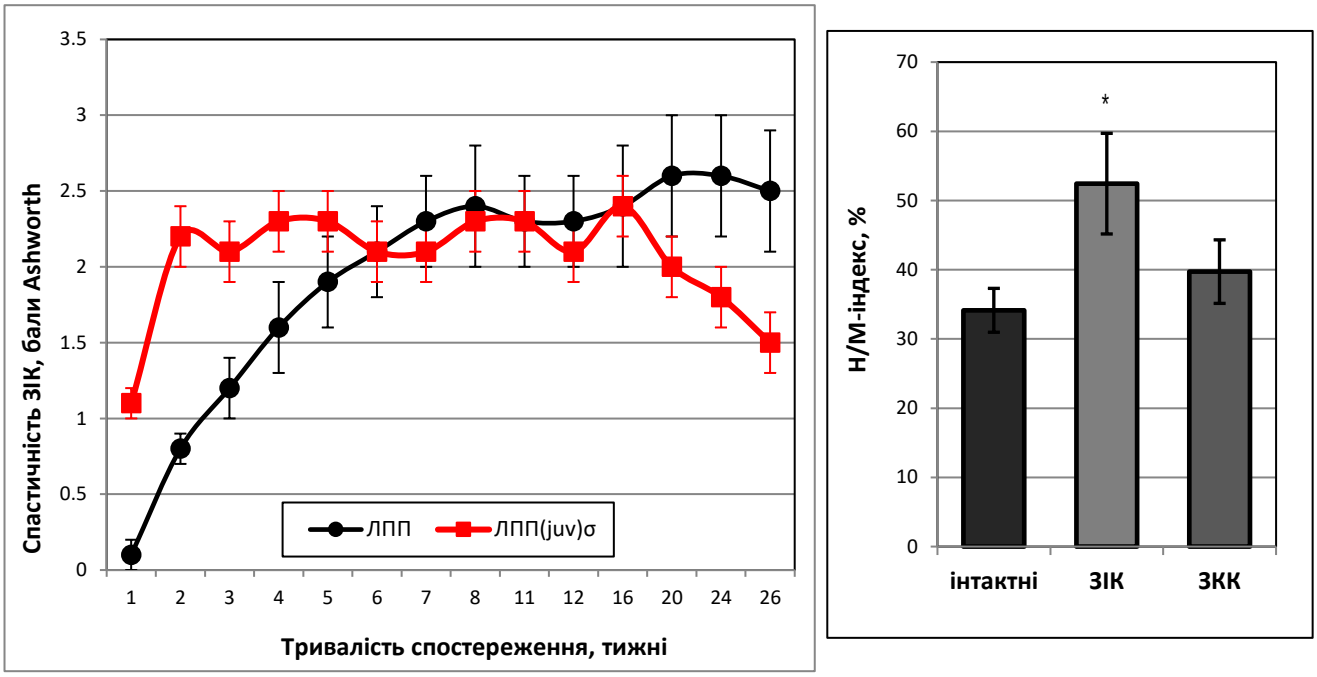
препарували через 3–4 доби, поздовжні зрізи товщиною 100, 80 та 60 мкм отримували на автоматичному вібротомі Leica VT1000 (*"Leica", Німеччина*). GFP-позитивні клітини, нейрони, астроцити та нейрити ідентифікували непрямим імуногістохімічним забарвленням з первинними антитілами до GFP (*1:700; "Molecular Probes Inc.", США*), βIII-tubulin (*1:300; "Sigma", USA*) та GFAP (*1:1500, "Dako", Нідерланди*). Оптичні дослідження проводили за допомогою конфокального мікроскопа FluoView™ FV1000 (*"Olympus Inc.", США*) з цифровою фотокамерою, поєднаною з комп'ютером.

Статистична обробка кількісних даних. Для порівняльної оцінки середніх у групах значень ПФ ЗІК та ПС ЗІК використовували непараметричний U-тест Мана-Уітні (*Mann-Whitney U-test*). Статистичну значущість різниці ПФ та ПС ЗІК на різних термінах спостереження кожної окремо взятої групи оцінювали за Уілкоксоном (*Wilcoxon*). Кореляційний аналіз значень ПС та ПФ ЗІК проводили з використанням непараметричного коефіцієнта Спірмена (*Spearman*). Статистичну обробку отриманих цифрових еквівалентів мережевої активності нейронів II пластини заднього рогу спинного мозку проводили за допомогою пакета Mini Analysis Program (*"Synaptosoft", США*). Нормальність розподілу величин оцінювали за Шапіро–Уілком (*Shapiro–Wilk test*), значущість міжгрупової різниці розподілу досліджуваних параметрів — двовибірковим тестом Колмогорова–Смірнова. Кореляцію між непараметрично розподіленими емпіричними величинами оцінювали коефіцієнтом рангової кореляції Спірмена. Точний тест Фішера (*Fisher's exact test*) використовували для встановлення відмінностей між двома категорійними змінними, тест z-трансформації r Фішера — для оцінки значущості різниці ступеня кореляції значень двох параметрів поміж двох порівнюваних груп. Значущість відмінності у провідності AMPA-каналів нейронів II пластини оцінювали методом бутстрепа (*'bootstrap hypothesis test for two-sample problem'*) [Efron B., 1994]. Аналіз результатів електрофізіологічного дослідження нейронів спинномозкових вузлів та імунологічного дослідження проводили з використанням непарного t-тесту Ст'юдента (*Student's t-test*). Порівняльний аналіз результатів ЕНМГ та молекулярно-генетичного дослідження здійснювали за допомогою U-тесту Мана-Уітні. У всіх випадках припущення щодо статистичної значущості отриманого результату вважали вірним, якщо ймовірність нульової гіпотези була меншою ніж 0,05 ($p<0,05$).

Результати дослідження та їх обговорення. У порівнянні з даними інших дослідницьких груп [Webb A.A., Muir G.D., 2002; Majczynski H., Slawinska U., 2007; Hsieh T.H. et al., 2010; Filli L. et al., 2011; Pertici V., 2013, 2014; Liu G.-M. et al., 2016; Zhang Q. et al., 2016; Li S.-H. et al., 2017; Chen H. et al., 2017] використана нами модель спінальної травми дозволяє відтворити найбільш глибокий дефіцит функції паретичної кінцівки. Станом на 11-ий тиждень спостереження ПФ ЗІК складав у дорослих тварин (*"**ЛПП**"*) (1,3±0,5) бала BBB, у молодих (*"**ЛПП$_{JUV}$**"*) — (5,3±0,8) бала (*$p<0,05$*), що свідчить про повноту перетину всіх груп нисхідних волокон іпсилатеральної частини спинного мозку.

Для групи "**ЛПП$_{JUV}$**" характерний значущий (*$p<0,05$*) приріст ПФ ЗІК протягом 1–3-го тижня, регрес — протягом 4–7-го тижня, повторне суттєве збільшення —

протягом 8-го тижня. Значущу різницю ($p<0,05$) між середніми значеннями ПФ ЗІК групи "**ЛППJUV**" та "**ЛПП**" виявляли протягом 1–3-го та 8–11-го тижнів спостереження. У молодих тварин (*підгрупа "**ЛППσJUV**" групи "**ЛППJUV**", n=8*) ПС ЗІК протягом 2–16-го тижня складав (2,2–2,5) бала Ashworth, наприкінці експерименту — (1,4±0,2) бала; у тварин групи "**ЛПП**" протягом 9–26-го тижня — на рівні (2,3–2,6) бала (*рис. 1*).



а б

Рис. 1 — **а)** Динаміка середніх значень спастичності м'язів паретичної кінцівки (ЗІК) у тварин групи "**ЛПП**" та підгрупи "ЛППσJUV" упродовж загального періоду спостереження, згідно із стандартизованою часовою шкалою. Примітка: протягом 1–3-го тижнів (а) різниця між значеннями ПС ЗІК статистично значуща (p<0,05); **б)** Н/М-індекс для литкового м'яза паретичної (ЗІК) та задньої контрлатеральної кінцівки (ЗКК) молодих та інтактних тварин. Примітка. *Різниця з показником групи інтактних тварин статистично значуща

Електронейроміографічні зміни збудливості сегментарних мереж спинного мозку поширені білатерально, Н/М-індекс наприкінці експерименту для паретичної (ЗІК) та інтактної задньої кінцівки тварин молодого віку склав, відповідно, (52,4±7,3) % та (39,7±4,6) %, дорослого — (74,1±12,9) % та (85,1±18,9) %, у інтактних тварин — (34,1±3,2) % (*рис. 1*).

Персистенція в каналі хребта біосумісного стороннього тіла (*рис. 2*) з тривалою компресією спинного мозку суттєво погіршує перебіг відновно-репараційного процесу (*рис. 3*): протягом перших двох місяців ПФ ЗІК у тварин "**CΘRPALIEN**" найнижчий серед усіх експериментальних груп на всіх термінах спостереження, ста овив (*(1,3±0,9) бала BBB*).

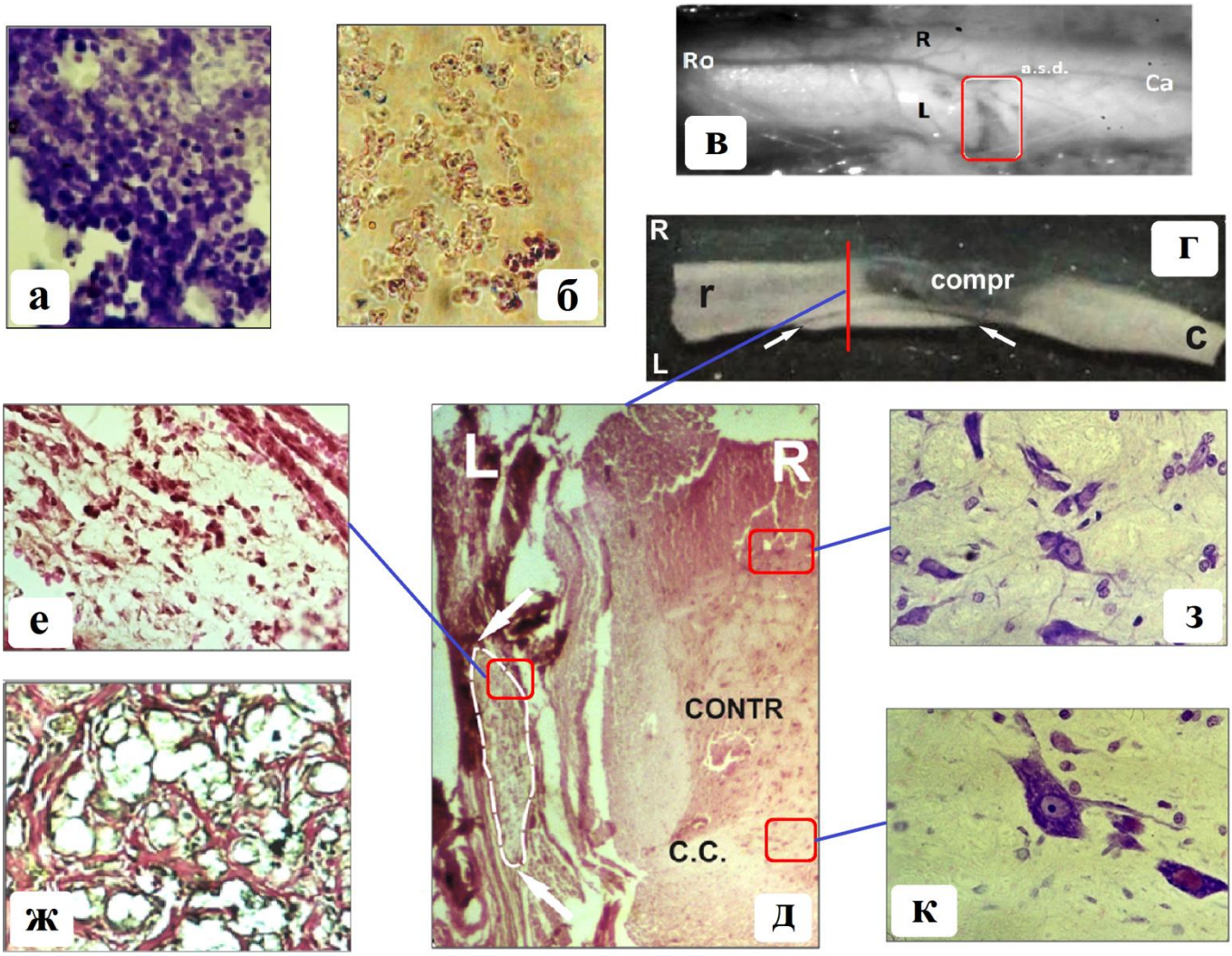


Рис. 2 — Структурні особливості стороннього тіла до та через 26 тижнів після імплантації у зону ЛППП

а, ***б*** — структура стороннього тіла (**а**) та макропористого гідрогелю (NG, **б**) у нативних умовах; ***в*** — вигляд операційного поля одразу після виконання ЛППП (*рамкою окреслено зону ЛППП*); ***г*** — поздовжній зріз фіксованого спинного мозку через 26 тиж. після імплантації стороннього тіла (*позначено стрілками*); ***д*** — оглядовий поперечний гістологічний зріз спинного мозку на рівні імплантації стороннього тіла на 26-му тижні спостереження (*фрагмент стороннього тіла окреслено пунктиром*); ***е***, ***ж*** — структура стороннього тіла (**е**) у порівнянні зі структурою макропористого гідрогеля (**ж**) на аналогічних термінах спостереження; ***з***, ***к*** — нейрони заднього рогу сірої речовини (**з**) та мотонейрон (**к**) контрлатеральної частини спинного мозку на аналогічному терміні спостереження.

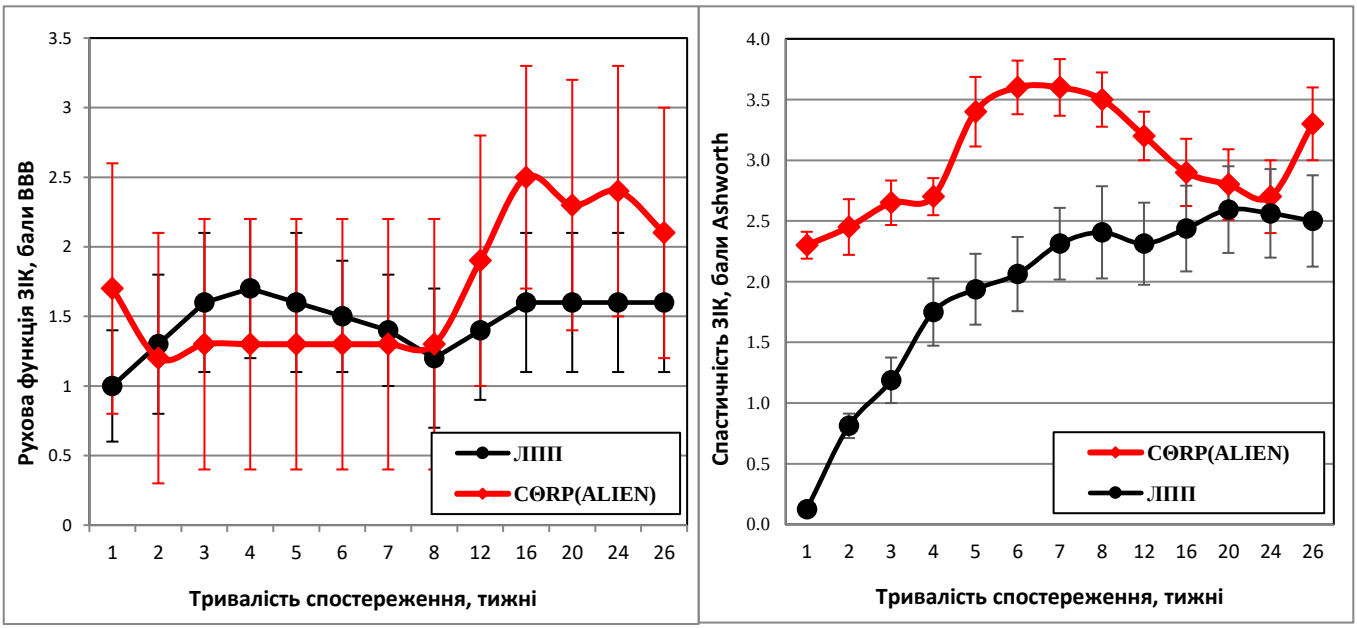
Умовні позначення: **a.s.d.** – a. spinalis dorsalis, **Ca**, **c** – каудально, **c.c.** — центральний канал, **compr** — компремована ділянка спинного мозку, **contr** — контралатеральна частина спинного мозку, **L** – ліворуч, **R** – праворуч, **Ro**, **r** – рострально.

Забарвлення: гематоксилін-еозином (***б, д, е, ж***), тіоніном за Нісслем (***а, з, к***).

Збільшення: ×50 (***а, б***), ×12 (***в***), ×8 (***г***), ×20 (***д***), ×400 (***е, ж***), ×800 (***з, к***).

Протягом 3-4-го місяця показник достовірно збільшувався до (2,4±1,0) бала ВВВ (*26-й тиждень*). Механічна дія стороннього тіла на спинний мозок потенціює формування синдрому спастичності: протягом 1-го місяця спостерігали збільшення ПС ЗІК до (2,7±0,15) бала Ashworth, протягом 4–5-го тижня — до абсолютного максимуму (*(3,6±0,2) бала Ashworth*), протягом 5–8-го тижнів — достовірну стабілізацію, з 8-го тижня — зниження до рівня першого місяця (*26-ий тиждень спостереження*).

Збільшення рухової активності та зменшення рівня спастичності ЗІК протягом 3–7-го місяців спостереження, найбільш імовірно, відображає зменшення ступеня компресії спинного мозку внаслідок видовження стороннього тіла та редукції його об'єму (*рис. 2*). На відміну від фрагментів хімічно ідентичного макропористого гідрогелю (NG), стороннє тіло на цьому терміні спостереження — не інтегроване в тканину спинного мозку, оточене щільною фіброзною капсулою, містить малу кількість клітин і міжклітинного матриксу.



а б

Рис. 3 — Динаміка рухової функції (а) та спастичності (б) паретичної кінцівки (ЗІК) у тварин зазначених експериментальних груп упродовж загального періоду спостереження згідно із стандартизованою часовою шкалою. Дані щодо значущості різниці значень ПФ ЗІК між групами на кожному з термінів спостереження наведено в тексті

Однією з найменш вивчених особливостей спастичності при травмі спинного мозку є епідеміологічний та клінічний паралелізм цього розладу у порівнянні з іншими продуктивними ускладненнями спінальної травми, передусім, хронічним больовим синдромом. Одержані нами дані свідчать, що на тлі ізольованої спастичності та зменшення механічної екстероцепції ЗІК мережева електрична активність у задньому розі зазнає суттєвих змін, що обумовлює збільшення

стимулюючого впливу на адаптивні (*збуджувальні*) інтернейрони драглистої речовини при одночасному помірному зменшенні такого впливу на тонічні (*гальмівні*) інтернейрони (*рис. 4*). ГАМК- та гліцинергічні гальмівні впливи у цих експериментальних умовах суттєво зменшуються стосовно адаптивних нейронів, різноспрямовано змінюються щодо тонічних нейронів.

Збільшення амплітуди та зменшення тривалості потенціалів дії виявлено стосовно дрібних (*ноцицептивних*) нейронів гомонімних спинномозкових вузлів, що свідчить про відсутність у залучених до експерименту тварин тяжкого больового синдрому периферичного генезу, а також обгрунтовує припущення щодо дефіциту певних видів аферентної стимуляції спинного мозку при синдромі спастичності.

Враховуючи існуючі епідеміологічні дані [Burns A.S. et al., 2016; van der Meer P. et al., 2016; Burke D. et al., 2017], одержані результати аргументують гіпотезу щодо спільного патофізіологічного компонента трьох основних нейрогенних ускладнень спінальної травми — перманентного стимулюючого впливу на мотонейрони та вегетативні нейрони бічних рогів збуджувальних інтернейронів поверхневих пластин заднього рогу.

Іншим важливим питанням патофізіології синдрому спастичності при ХСМТ є ендогенний синтез серотоніну, норадреналіну та дофаміну нижче рівня травми. Згідно з одержаними нами даними в речовині інтактного спинного мозку наявний низький рівень мРНК триптофан-гідроксилази 2 та дофамін-β-гідроксилази; ЛПП призводить до зменшення рівня мРНК триптофан-гідроксилази 2 іпсилатерально, везикулярного переносника моноамінів у пресинаптичних терміналях Slc18a2 — контрлатерально. Латералізація виявлених змін помірна, свідчить про залучення до патологічного процесу нейрональних мереж контрлатеральної частини спинного мозку.

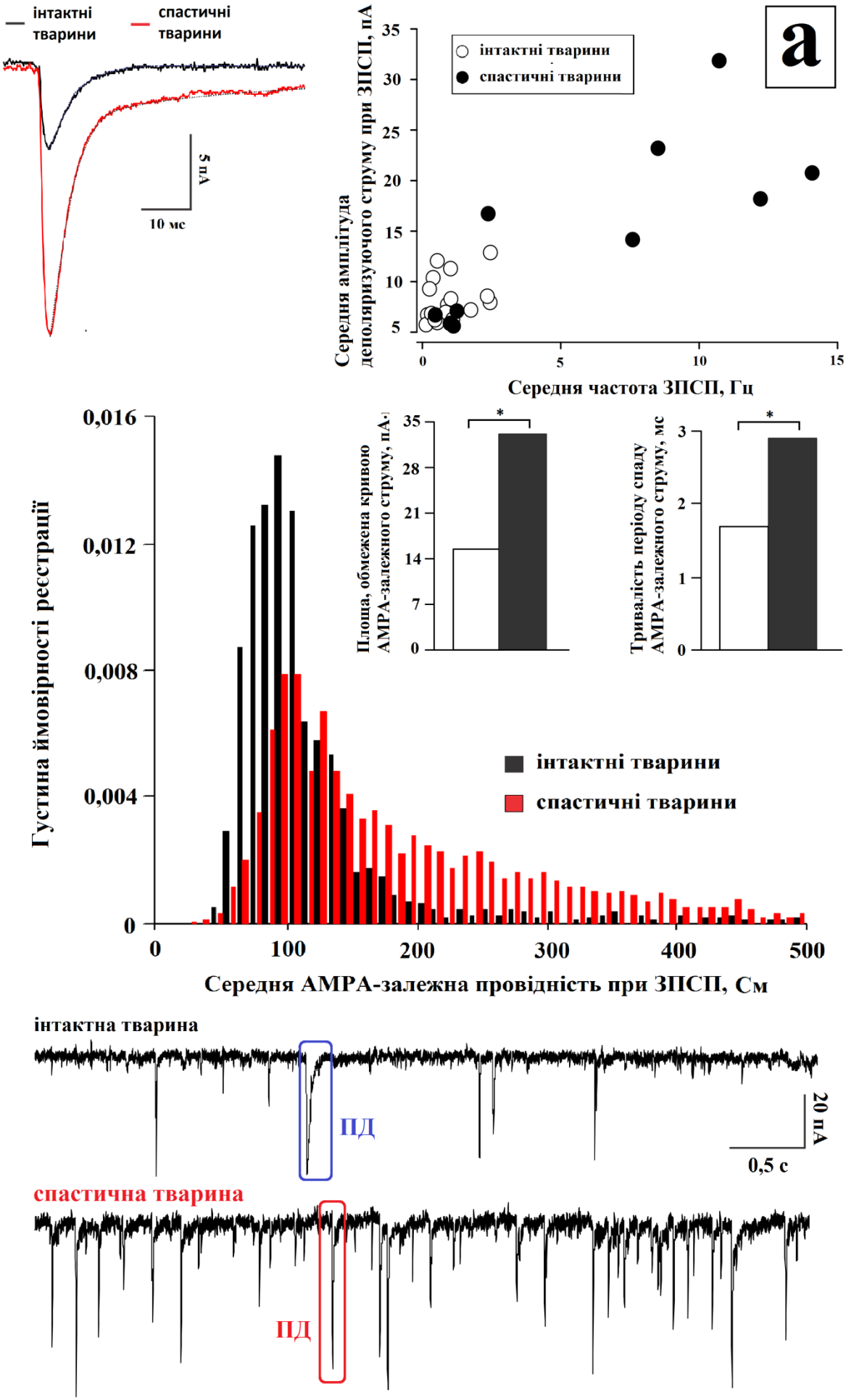
Незважаючи на ймовірну роль субодиниці AMPA-рецепторів глутамату GluR2 (*Gria2*) у змінах збудливості інтернейронів драглистої речовини на тлі посттравматичної спастичності, статистично значущі зміни рівня мРНК цієї субодиниці на моделі ЛПП у спиному мозку нижче зони ураження не виявлено. Попри це, при ЛПП виявлено двостороннє зменшення рівня мРНК іншої субодиниці AMPA-рецептора — Gria3.

Тканинна нейротрансплантація суттєво впливає як на перебіг відновного процесу, так і на динаміку синдрому спастичності.

У ранньому періоді після алотрансплантації тканини диференційованої нюхової цибулини (група "**ТТНЦ**") виявлено достовірну перевагу ПФ ЗІК щодо групи "**ЛПП**" з максимумом на 3-му тижні (*(3,7±0,5) бала BBB*) та подальшим поступовим зменшенням до (2,4±0,6) бала BBB (*26-ий тиждень*).

Алотрансплантація тканини фетального мозочка (група "**ТТФМ**") перетворює динаміку рухової функції ЗІК у константну, для якої характерні недостовірні коливання ПФ ЗІК у межах 3–3,6 балів BBB з максимумами на 1, 6, 7-му (*(3,6±0,8) бала BBB*) та мінімумом на 3-му (*(3,0±0,9) бала BBB*) тижні спостереження.

Трансплантація тканини фетальної нирки (група "**ТТФН**") чинить слабкий позитивний вплив на перебіг спінальної травми, обмежений 1–3-м тижнем, помірно


інтактні тварини
спастичні тварини
5 пА
10 мс
a
інтактні тварини
спастичні тварини
Середня амплітуда деполяризуючого струму при ЗПСП, пА
Середня частота ЗПСП, Гц
Густина ймовірності реєстрації
Площа, обмежена кривою АМРА-залежного струму, пА
Тривалість періоду спаду АМРА-залежного струму, мс
*
*
інтактні тварини
спастичні тварини
Середня АМРА-залежна провідність при ЗПСП, См
інтактна тварина
ПД
20 пА
0,5 с
спастична тварина
ПД

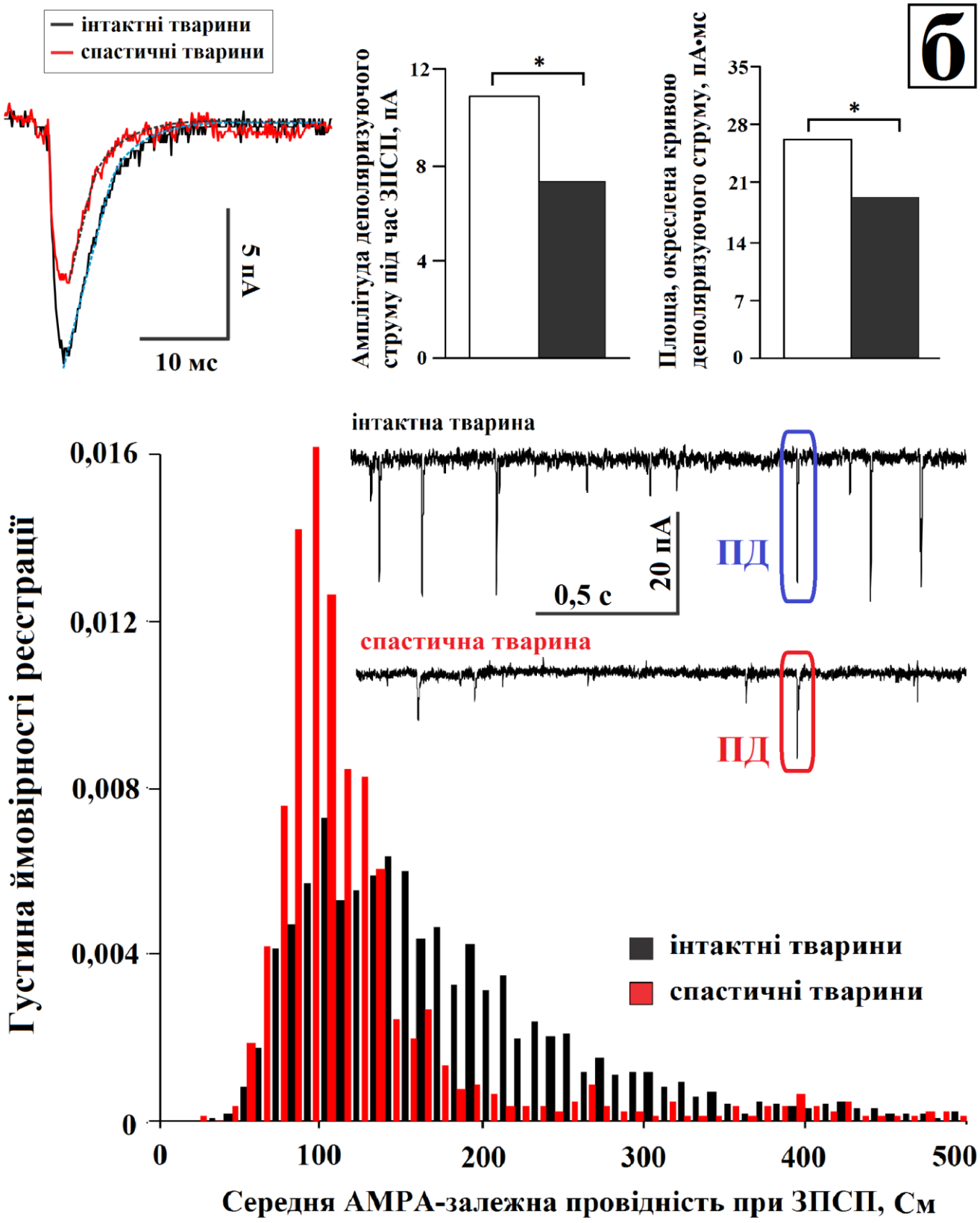


Рис. 4 — Спонтанні збуджувальні постсинаптичні потенціали (ЗПСП) та електрична активність адаптивних (а) і тонічних (б) нейронів драглистої речовини поперекового відділу спинного мозку на тлі посттравматичної спастичності та у інтактних тварин. ПД — потенціал дії, См — сіменси, * — різниця значуща

прискорює відновлення рухової функції. На тривалих термінах спостереження ТТФН не впливає ані на результативність відновного процесу (*ПФ ЗІК на 26-му тижні — (3,1±1,2) бала BBB*), ані на періодизацію його динаміки.

Загалом, при порівнянні з групою "**ЛПП**" достовірний позитивний ефект відзначали протягом перших 5-ти тижнів (*"**ТТНЦ**"*), 1–2-го та 6–7-го тижнів (*"**ТТФМ**"*), а також станом на кінець 8-го тижня (*"**ТТФН**"*). Статистично значущої різниці між рівнем ПФ ЗІК у групах "**ТТНЦ**", "**ТТФМ**" і "**ТТФН**" на жодному з термінів спостереження не виявлено. Попри це, відмінності ПФ ЗІК зазначених груп у порівнянні з контрольними, а також оцінка достовірності змін ПФ ЗІК у кожній з груп упродовж загального періоду спостереження свідчить про суттєві відмінності перебігу відновного процесу.

ТТНЦ станом на 14-ту добу статистично значущо зменшує вираженість синдрому спастичності на рівні дистальніше розташованих від місця ЛПП сегментів спинного мозку (*надп'ятково-гомілковий суглоб ЗІК*), сприяє поглибленню спінальної дизрефлексії та спастичності у прилеглих каудальних сегментах спинного мозку (*кульшовий та колінний суглоб ЗІК*). ТТФМ обумовлює наявність нормального розподілу значень ПС ЗІК упродовж загального періоду спостереження, супроводжуючись раннім (*протягом першого тижня*) дебютом синдрому спастичності, достовірно збільшує значення ПС ЗІК впродовж 1–3-го тижня в порівнянні з групою "**ЛПП**". Вплив ТТФН на динаміку синдрому спастичності характеризується достовірним потенціюванням протягом перших 2-ох тижнів і стабілізацією на рівні (1,9±0,3) бала Ashworth. Станом на 26-ий тиждень експерименту ПС ЗІК у групах "**ТТНЦ**", "**ТТФМ**" і "**ТТФН**" відрізнявся від показника групи "**ЛПП**" не значущо, складав, відповідно, (2,2±0,2), (2,1±0,3) та (1,8±0,3) бала Ashworth (*рис. 5*).

У 59 % тварин групи "**ТТНЦ**" було помічено ранній дебют спастичності зі згинально-привідною установкою в кульшовому, меншою мірою — колінному суглобі на тлі в'ялого парезу на рівні надп'ятково-гомілкового суглобу. Аналогічну спастичну установку було виявлено в 40 % тварин групи "**ТТФМ**" (*протягом 2-го місяця*) та 25 % тварин групи "**ТТФН**" (*протягом перших тижнів*).

Ознаки тяжкого больового синдрому у віддалені терміни спостереження виявлено у 27 % тварин групи "**ТТНЦ**", у однієї тварини (*6 %*) групи "**ТТФМ**", у групі "**ТТФН**" — не виявлено. У групі "**ТТНЦ**" усі випадки тяжкого больового синдрому виявлено у тварин, які протягом перших 2-ох місяців експерименту демонстрували явища в'ялого парезу дистальних відділів ЗІК (*9 особин з 20; 45 %*), що достовірно відрізняється від поширеності цього синдрому в іншій підгрупі групи "**ТТНЦ**", групах "**ТТФМ**" і "**ТТФН**".

Виявлені особливості можна інтерпретувати, виходячи із сучасних літературних даних [Kumar M. et al., 2014; Marzban H. et al., 2015; Nagayama S. et al., 2014; Lledo P.-M., Valley M., 2016] щодо клітинного складу трансплантатів, їх ангіогенних, імуногенних, прозапальних, нейротропних і медіаторних ефектів. Різниця медіаторного фенотипу нащадків нейрогенних клітин нюхової цибулини (*ГАМК-ергічні*) та фетального мозочку (*глутаматергічні*) є вірогідною передумовою протилежного впливу ТТНЦ та ТТФМ на динаміку рівня спастичності у ранньому

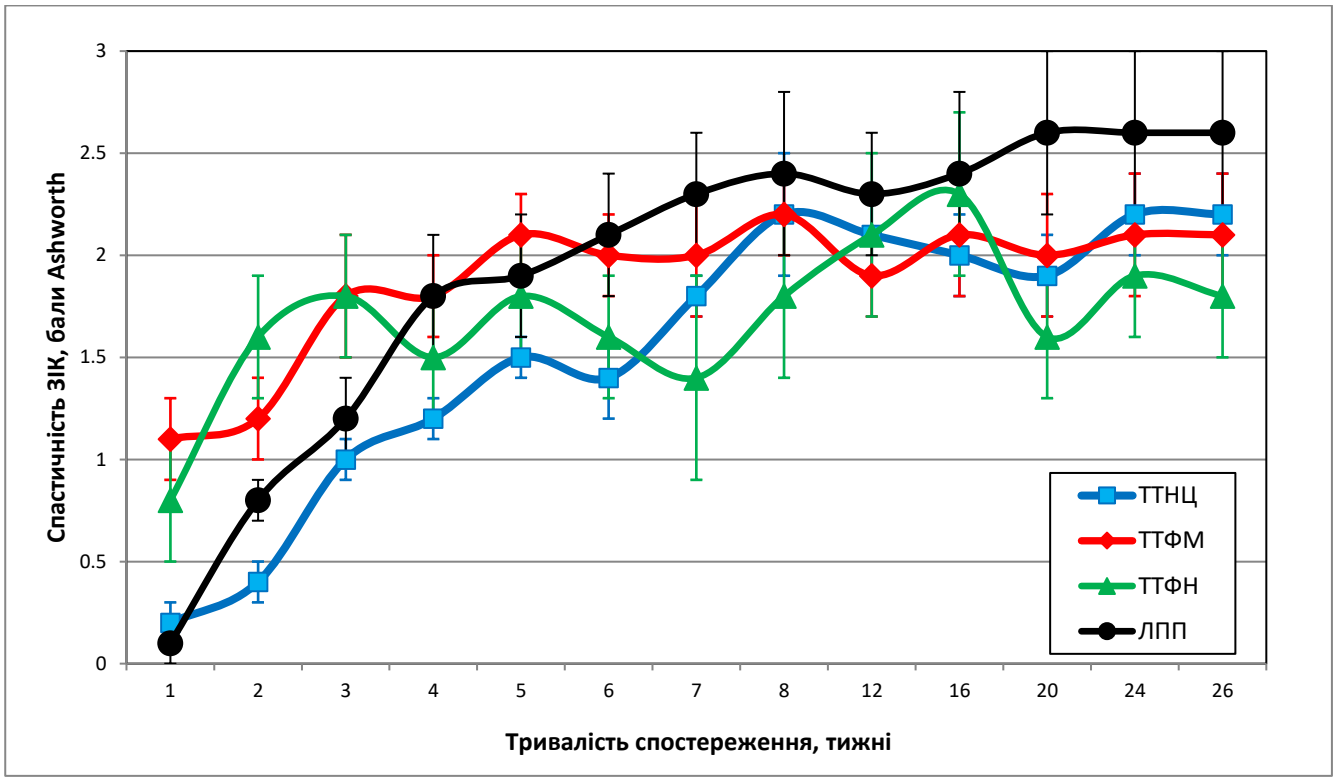


Рис. 5 — Динаміка спастичності м’язів паретичної кінцівки (ЗІК) у групах "**ЛППП**", "**ТТНЦ**", "**ТТФМ**" і "**ТТФН**" впродовж загального періоду спостереження згідно із стандартизованою часовою шкалою

періоді та частоту прояву тяжкого больового синдрому у віддаленому періоді травми. Мозочок щура на завершальному періоді нейроонтогенезу містить значну популяцію попередників глутаматергічних клітин-зерен [Kumar M. et al., 2014; Marzban H. et al., 2015], які, на нашу думку, у випадку ТТФМ чинять стимулюючий вплив на нейрональні мережі прилеглих ділянок спинного мозку. Окрім того, нейротрансплантат є тригером низки локальних імунних реакцій [Цимбалюк В.І., Медведєв В.В., 2013; Garcia E. et al., 2016; Kjell J., Olson L., 2016; Le Blon D. et al., 2016], ряд запальних цитокінів виявляють збуджувальний вплив на мотонейрони [Pajer K. et al., 2014; Centonze D., 2014], а серед низки антитіл, характерних для різноманітних імуногенних процесів у тканині мозку, визначають такі, що є тропними до глутаматних рецепторів [Levite M., 2014; Bakpa O.D. et al., 2016; Dalmau J. et al., 2017]. Вірогідно, що перелічені фактори обумовлюють ранній дебют спастичності паретичної кінцівки у групі "**ТТФМ**".

На наш погляд, причиною обмеження подальшого збільшення спастичності паретичної кінцівки в групі "**ТТФМ**" є поступова екзайтотоксична загибель мотонейронів [D’Amico J.M. et al., 2014; Moghaddam A. et al., 2015; Shabbir A. et al., 2015].

Перелічені патофізіологічні механізми, імовірно, стосуються й сенситизованих спіноталамічних нейронів — субстрату хронічного больового синдрому. Отже частота хронічного больового синдрому в групі "**ТТФМ**" не може перевищувати значення, характерні для групи "**ЛППП**".

Причиною антиспастичного ефекту ТТНЦ, ймовірно, є медіаторний вплив численних попередників ГАМК-ергічних інтернейронів — похідних НСК субвентрикулярної зони бічних шлуночків [Nagayama S. et al., 2014; Lledo P.-M., Valley M., 2016]. Попередження екзайтотоксичної загибелі сенситизованих ноцицептивних інтернейронів заднього рогу у випадку ТТНЦ уможливлює розвиток больового синдрому у віддаленому періоді травми.

Новітні засоби тканинної нейроінженерії, застосовані нами у роботі, виявляють суттєвий вплив на динаміку рухової функції та спастичності (*рис. 6, 7 а*).

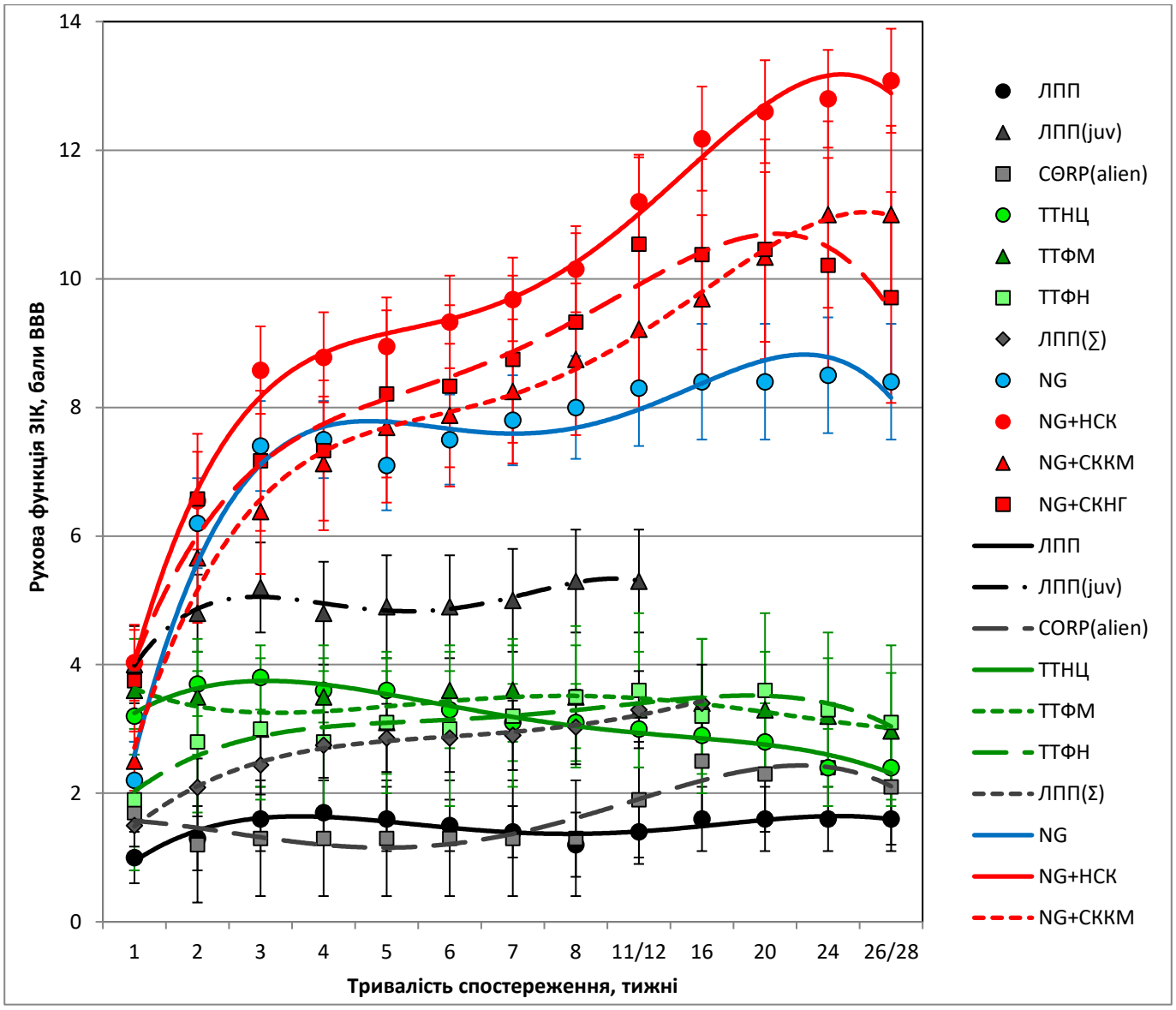
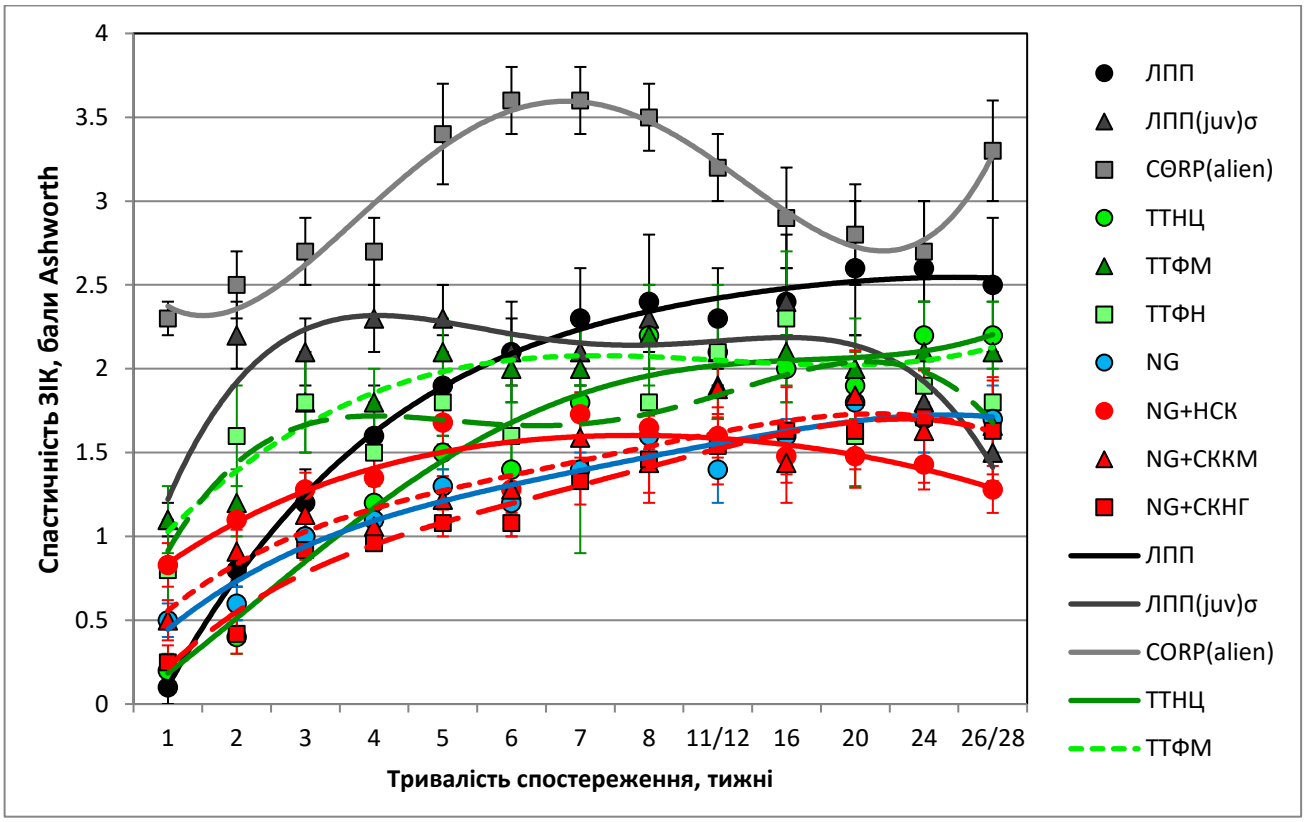
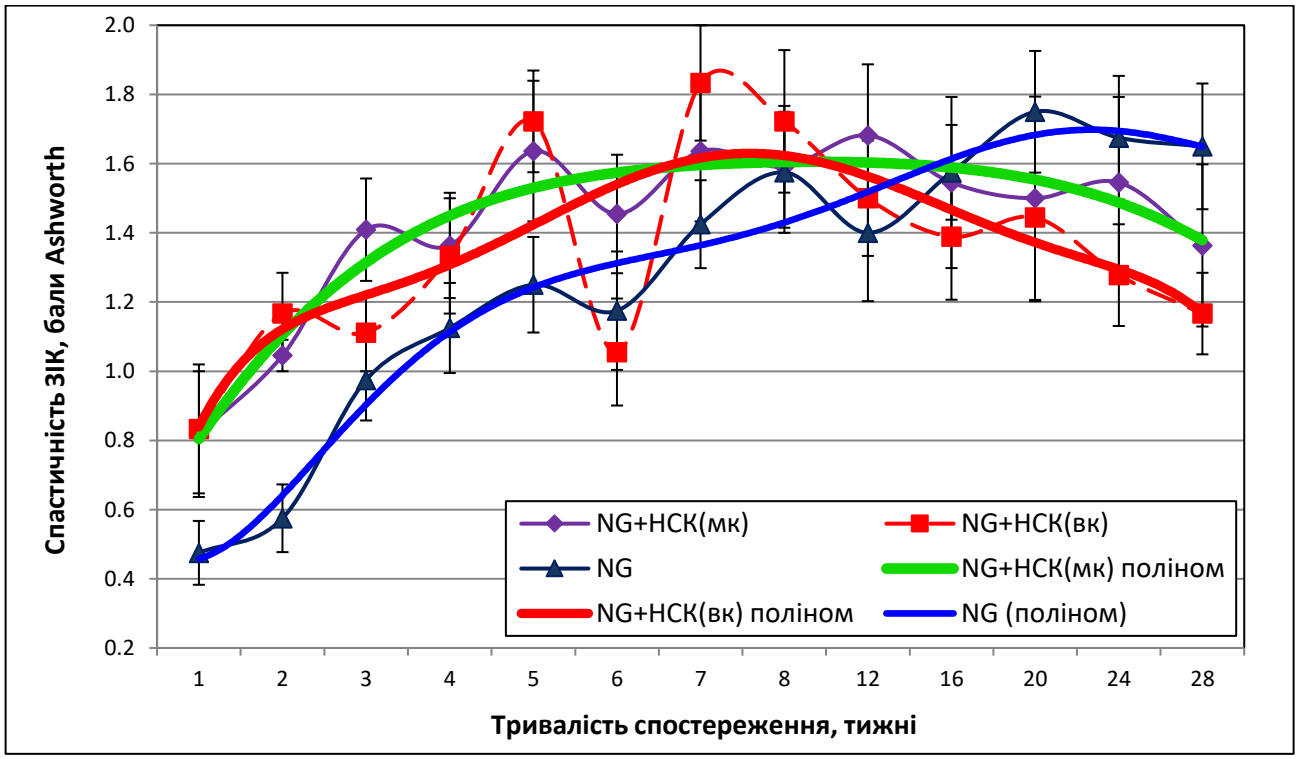


Рис. 6 — Схема динаміки рухової функції паретичної кінцівки у тварин зазначених експериментальних груп упродовж загального періоду спостереження згідно із стандартизованою часовою шкалою. Поліномальна апроксимація даних (*міра полінома — 4*)



а



б

Рис. 7 а, б — Динаміка спастичності паретичної кінцівки у тварин зазначених експериментальних груп упродовж загального періоду спостереження згідно із стандартизованою часовою шкалою. Поліномальна апроксимація даних (*міра поліному — 6*)

Імплантація у зону травми макропористого гідрогелю, асоційованого з ксеногенними НСК, збільшує ранній нейропротекторний вплив матриксу, зменшує інтенсивність і подовжує тривалість раннього відновлення рухової функції ЗІК, нівелює регрес ПФ ЗІК на початку 2-го місяця травматичного процесу, збільшує приріст ПФ ЗІК протягом 3–5-го місяців. Станом на 28-ий тиждень ПФ ЗІК у групі "**NG+НСК**" становив (13,1±0,9), тоді як у групі "**NG**" — (8,4±0,9) (*p=0,0005*), у групі "**ЛПП**" — (1,6±0,5) бала ВВВ (*p<0,0001*).

Ксенотрансплантація НСК у комплексі з макропористим гідрогелем — менш виразно змінює перебіг синдрому спастичності, створює передумови для його полегшення у віддаленому періоді спінальної травми. Достовірну різницю значень ПС ЗІК між групами "**NG+НСК**" і "**ЛПП**" виявлено на 1–2-му, 6–7-му та 16–28-му тижні, між групами "**NG+НСК**" і "**NG**" — на 1–2-му та 5-му тижні. ПС ЗІК групи "**NG+НСК**" значущо переважав показник групи "**NG**" і "**ЛПП**" протягом 1–2-го тижня спостереження; ПС ЗІК групи "**ЛПП**" переважав показник групи "**NG+НСК**" протягом 6-7-го тижня та 5–8-го місяця експерименту. Станом на 28-ий тиждень спостереження ПС ЗІК групи "**NG+НСК**" складав (1,3±0,1) бала Ashworth, групи "**NG**" — (1,7±0,2) бала, групи "**ЛПП**" — (2,5±0,4) бала.

Обмеження спонтанної локомоторної активності тварини підгрупи "**NG+НСК$_{мк}$**" (**мк** — *"малі клітки"*) пришвидшує формування посттравматичної спастичності, сповільнює відновлення рухової функції паретичної кінцівки протягом 1-го місяця, скорочує тривалість відновлення рухової функції у віддаленому періоді травми. Станом на 28-ий тиждень спостереження ПФ ЗІК у підгрупі "**NG+НСК$_{мк}$**" складав (12,6±1,4) бала ВВВ, у підгрупі "**NG+НСК$_{вк}$**" (**вк** — *"великі клітки"*) — (13,7±0,8) бала ВВВ. ПС ЗІК на цьому ж терміні спостереження в підгрупі "**NG+НСК$_{мк}$**" склав (1,4±0,2) бала Ashworth, у підгрупі "**NG+НСК$_{вк}$**" — (1,2±0,1) бала (*рис. 7 б*). Достовірну різницю значень ПС ЗІК між підгрупою "**NG+НСК$_{вк}$**" і групою "**NG**" виявлено на 2-му і 5-му тижні, між підгрупою "**NG+НСК$_{мк}$**" і групою "**NG**" — на 2-му тижні, між підгрупами "**NG+НСК$_{вк}$**" і "**NG+НСК$_{мк}$**" — впродовж загального періоду спостереження не виявлено.

Ксенотрансплантація СККМ у комплексі з макропористим гідрогелем подовжує в часі, проте зменшує інтенсивність приросту ПФ ЗІК у гострому та ранньому періоді травми, пролонговує фазу суттєвого збільшення ПФ ЗІК до 6-го місяця включно. Статистично значуще збільшення ПФ ЗІК у групі спостерігали протягом 1–2-го, 4–5-го та 8–24-го тижнів; станом на 28-ий тиждень ПФ ЗІК у групі складав (11,0±1,5) бала ВВВ. Достовірну різницю значень ПФ ЗІК між групами "**NG+СККМ**" і "**ЛПП**" виявлено протягом 1–28-го тижня; максимальну, проте не значущу перевагу значення ПФ ЗІК групи "**NG+СККМ**" над показником групи "**NG**", виявлено на 24-му тижні (*p=0,055*).

Ксенотрансплантація СККМ у комплексі з макропористим гідрогелем не приводить до значущих змін рівня спастичності в порівнянні з ізольованою імплантацією гідрогеля, суттєво змінює динаміку ПС ЗІК. Станом на 28-ий тиждень експерименту ПС ЗІК у групі "**NG+СККМ**" складав (1,7±0,3), суттєву різницю з показником групи "**ЛПП**" виявлено на 7-му добу та на 7–8-му і 16-му тижнях, максимальну, однак недостовірну різницю зі значеннями групи "**NG**", — на 12-му

тижні спостереження (*p=0,059*). Динаміка ПС ЗІК у групах "**NG**" і "**NG+СККМ**" однотипна, різнилася відсутністю достовірного приросту протягом 3-го тижня, наявністю значущого приросту протягом 3–4-го місяця (*"**NG+СККМ**"*).

Ксенотрансплантація СКНГ у комплексі з макропористим гідрогелем суттєво змінює динаміку відновлення рухової функції паретичної кінцівки: статистично значуще збільшення ПФ ЗІК спостерігали протягом 1–2-го, 5-го, 8-го тижнів та 3-го місяця експерименту, зменшення — протягом 6–7-го місяця.

Ефективність втручання суттєво залежить від еквістатевості донора (*миші–самці*) та реципієнта (*щури–самці, щури–самиці*). Суттєве збільшення ПФ ЗІК у підгрупі "**NG+СКНГ**♂" виявлено на 2-му, 4–5-му тижнях та впродовж 3-го місяця, у підгрупі "**NG+СКНГ**♀" — на 2-му, 7–8-му тижнях. У підгрупі "**NG+СКНГ**♀" протягом 5-го місяця спостерігали значуще зменшення ПФ ЗІК. Станом на 28-ий тиждень ПФ ЗІК у групі "**NG+СКНГ**" складав (9,7±1,6) бала, у підгрупі "**NG+СКНГ**♂" — (11,0±2,2) бала, у підгрупі "**NG+СКНГ**♀" — (8,4±2,5) бала BBB.

Значущу різницю ПФ ЗІК між групами "**NG+СКНГ**" та "**ЛПП**" виявляли протягом 1–28-го тижня. Максимальну, однак недостовірну різницю між групами "**NG+СКНГ**" і "**NG**" на користь першої виявлено на 12-му тижні (*p=0,097*). Суттєву різницю між ПФ ЗІК підгрупи "**NG+СКНГ**♂" і групи "**NG**" виявлено на 1–2-му та 5–16-му тижнях, між ПФ ЗІК підгруп "**NG+СКНГ**♂" і "**NG+СКНГ**♀" — на 1–6-му тижні. Значущу різницю між ПФ ЗІК підгрупи "**NG+СКНГ**♀" та групи "**NG**" упродовж експерименту не виявлено, її максимальні значення характерні для 3–4-го тижня спостереження.

Ксенотрансплантація СКНГ у комплексі з макропористим гідрогелем не призводить до значущих змін рівня спастичності в порівнянні з ізольованою імплантацією гідрогелю, суттєво змінює динаміку ПС ЗІК з тенденцією до погіршення перебігу у віддаленому періоді травми за умов різностатевості донора та реципієнта (*рис. 8*). ПС ЗІК станом на 28-ий тиждень експерименту у групі "**NG+СКНГ**" складав (1,6±0,3) бала, у підгрупі "**NG+СКНГ**♂" — (1,6±0,5) бала, у підгрупі "**NG+СКНГ**♀" — (1,7±0,3) бала Ashworth. Статистично значущу різницю між значеннями ПС ЗІК у групах "**ЛПП**" і "**NG+СКНГ**" виявлено на 2-му, 4–7-му та 20-му тижнях; максимальну, однак недостовірну різницю ПС ЗІК між групами "**NG**" і "**NG+СКНГ**" виявляли на 7-му добу спостереження. Різниця між значеннями ПС ЗІК підгрупи "**NG+СКНГ**♂" та групи "**NG**", а також підгруп "**NG+СКНГ**♂" і "**NG+СКНГ**♀" була суттєвою протягом 1–2-го тижня, різниця між ПС ЗІК підгруп "**NG+СКНГ**♂" та "**NG+СКНГ**♀" — недостовірна, максимальна протягом 3-го місяця, сягає 0,83 бала Ashworth (*p=0,124*). Динаміка ПС ЗІК у групі "**NG+СКНГ**♂" різниться від групи "**NG**" наявністю достовірного приросту протягом 3-го, 7-го тижня, 4-го та 5-го місяця.

Помірний перебіг посттравматичної спастичності й краще відновлення рухової функції у підгрупі "**NG+СКНГ**♂" протягом 1–2-го та 3-го місяця, на нашу думку, пов'язані з відновним впливом СКНГ на перебіг спінальної травми та регенераційного процесу, його відсутність у підгрупі "**NG+СКНГ**♀" ми пояснюємо елімінуючим впливом на трансплантовані клітини з боку реципієнта — тварини протилежної статі (*'sex-mismatched transplantation'*) [Popli R. et al., 2014].

Механізмом такого впливу є формування імунної відповіді на другорядні антигени гістосумісності, кодовані в Y та X-хромосомах (*'minor histocompatibility antigens'*) [Spierings E., 2014]. Оскільки пік збільшення рівня спастичності у тварин підгрупи "**NG+СКНГ♀**" припадає на 6–8-ий тиждень спостереження, можлива наявність інших механізмів обмеження позитивного ефекту трансплантаційного втручання.

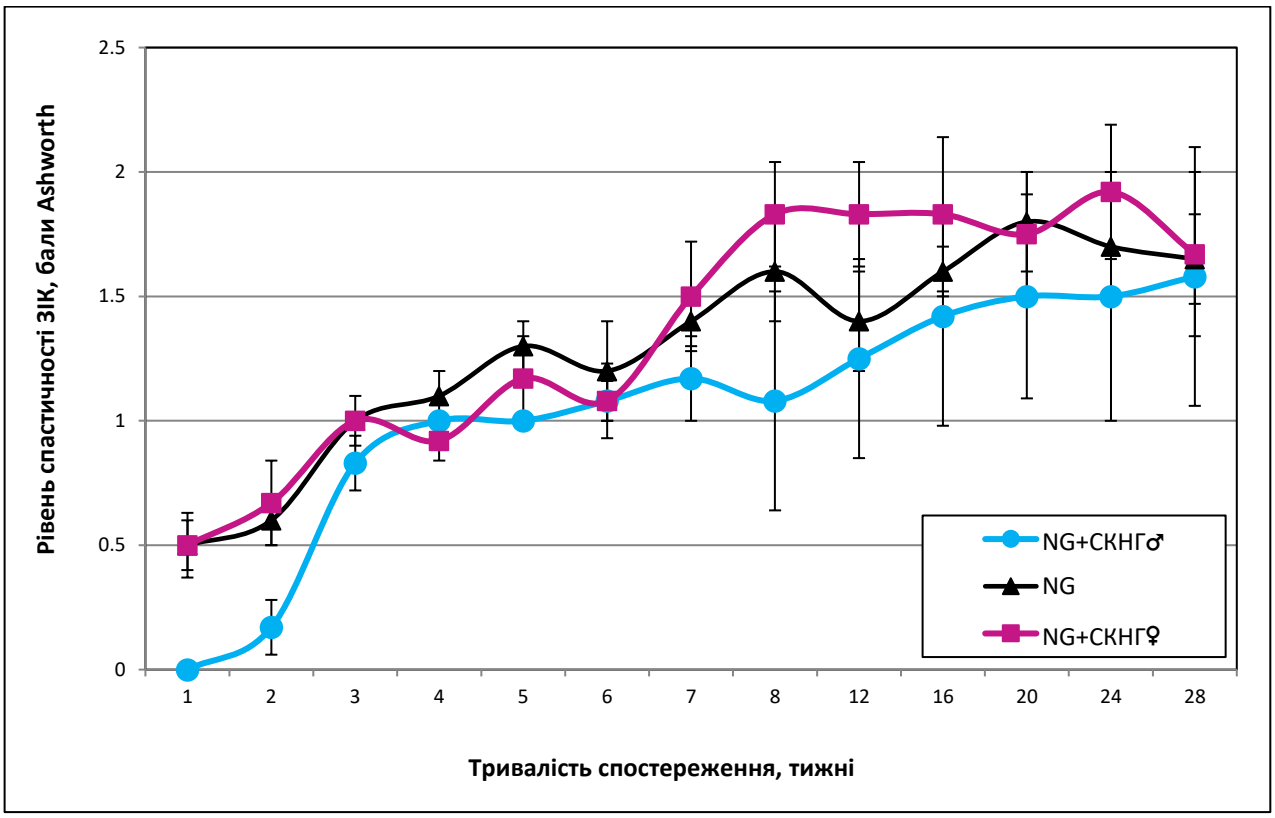


Рис. 8 — Схема динаміки рівня спастичності паретичної кінцівки (ЗІК) у тварин зазначених експериментальних груп упродовж загального періоду спостереження згідно із стандартизованою часовою шкалою

Процес відновлення функції мозочку та вірогідне зменшення мозочкової гіпотонії залежать від реалізації убіквіторних нейропластичних реакцій. Виходячи з цього факту, динаміка нівелювання мозочкової гіпотонії повинна в загальних рисах відповідати динаміці саме тих компонентів м'язового тонусу при спінальній травмі, які залежать від супраспінальної інервації мотонейронів спинного мозку, налагоджуваній шляхом пластичного перелаштування нейрональної мережі рухової системи. Це обумовлює використання критерію паралельності кривих динаміки м'язового тонусу при спінальній травмі та мозочкової гіпотонії для оцінки патофізіології спастичності (*рис. 9*).

Аналіз даних імуногістохімічного дослідження зони імплантації гідрогелевого матриксу у комплексі зі ствбуровами клітинами (*рис. 10, 11*) засвідчив тривале виживання та ймовірне нейрональне диференціювання НСК, меншою мірою СККМ та СКНГ, формування в товщі матриксу потужних розростань нервових волокон

реципієнтного спинного мозку, слабке залучення астроцитарної глії до організації зони імплантації.

Імплантація в зону травми спинного мозку тунельованого ксероматрикса на основі хітозану ("**ХІТΩ**") пригнічує відновний процес, потенціює спастичність; збільшення ПФ ЗІК та зменшення ПС ЗІК виявляли лише у віддаленому періоді, що нагадує особливості динаміки клінічної картини, виявлені для тварин групи "**CΘRP$_{ALIEN}$**".

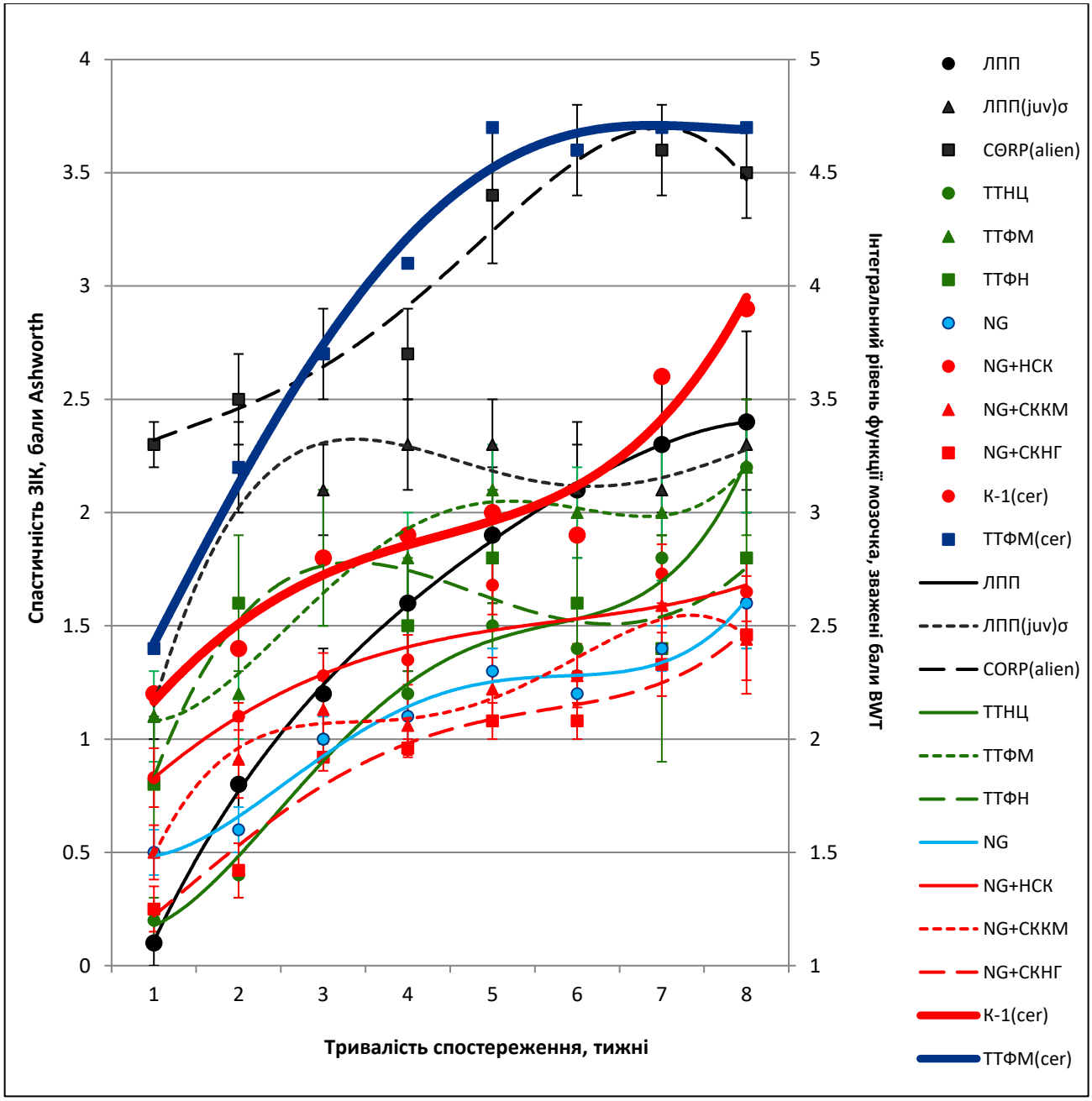


Рис. 9 — Порівняння динаміки спастичності паретичної кінцівки у тварин зазначених експериментальних груп і рівня мозочкової гіпотонії (*зважені бали BWT*). Поліномальна апроксимація даних, міра поліному — 4; поліномальні лінії тренду груп "**К-1$_{CER}$**" та "**ТТФМ$_{CER}$**" більшої товщини, червоного та темно-синього кольору відповідно

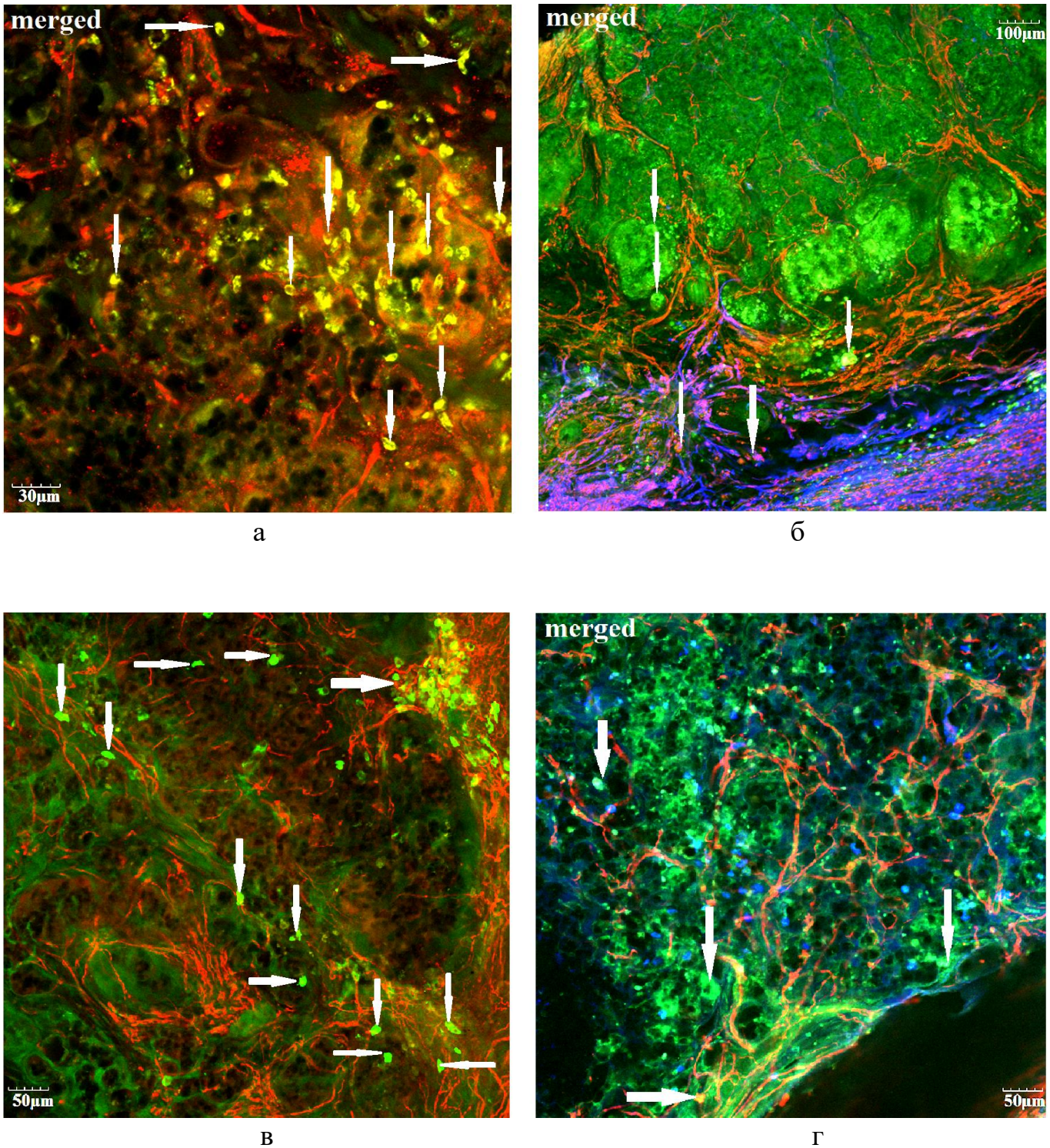


Рис. 10 — Мікрофотографії центральної (а, в, г) та прилеглої до спинного мозку (б) зони імплантованого макропористого гідрогелю, асоційованого з нейрогенними стовбуровими клітинами (а, б) та стовбуровими клітинами кісткового мозку (в, г), на 28-му тижні спостереження; ***а, в*** — конфокальне співставлення картини експресії білка зеленої флюорисценції (GFP; *зелений колір*) і βIII-тубуліну (*червоний колір*); ***б, г*** — конфокальне співставлення картини експресії GFP (*зелений колір*), βIII-тубуліну (*червоний колір*) і гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP, *синій колір*). Стрілками позначено клітини, які коекспресують GFP та βIII-тубулін — нейрональні нащадки трансплантованих прогеніторів

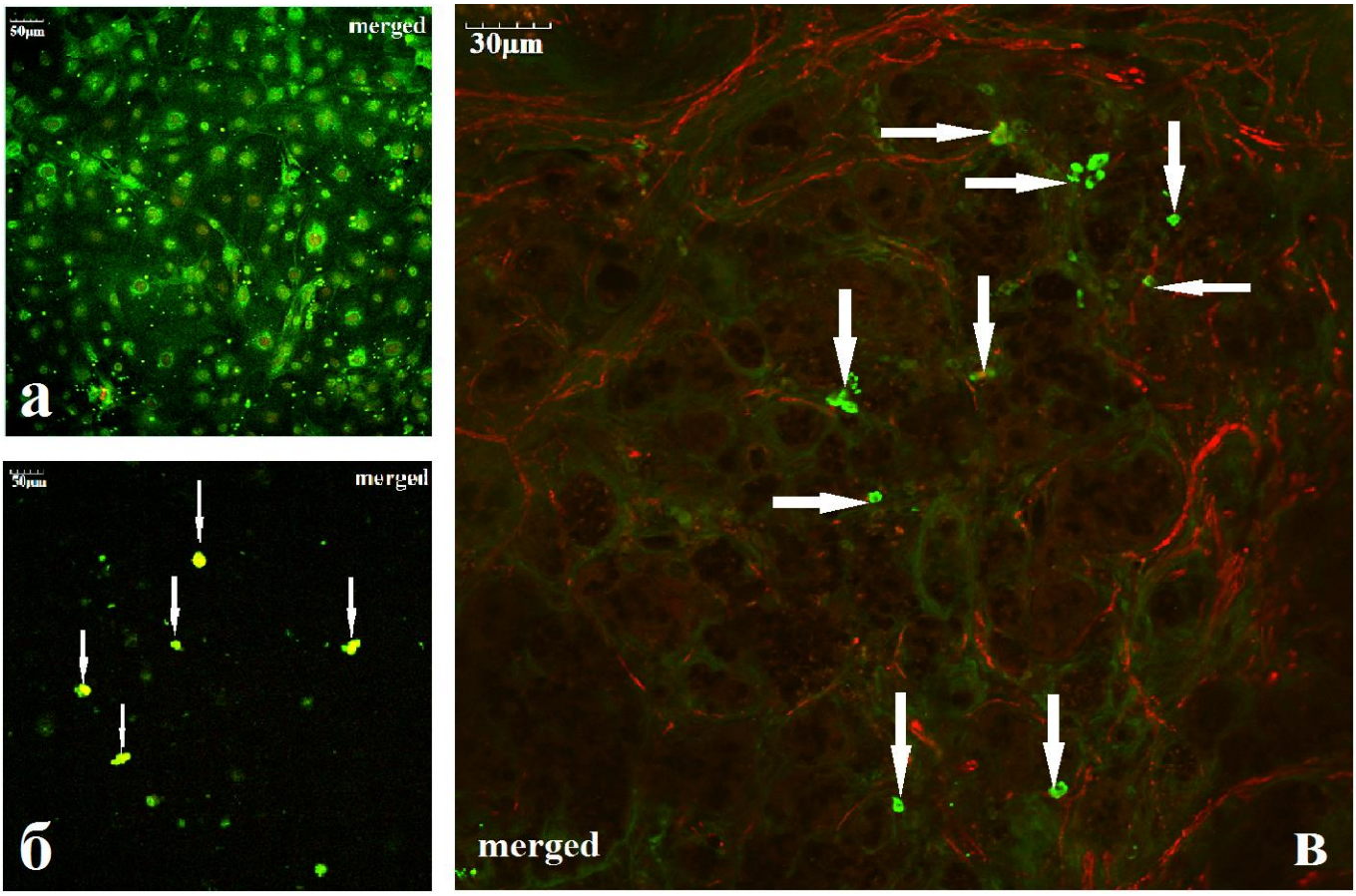


Рис. 11 — Імуногістохімічна картина експресії GFP (*зелений колір*) та βIII-тубуліну (*червоний колір*) у культурі СКНГ (а), у товщі фрагменту макропористого гідрогелю через 10 діб сумісного культивування з СКНГ (б) та через 28 тижнів після імплантації у зону половинного перетину спинного мозку щура (в). Стрілками позначено клітини, що коекспресують обидва протеїни — нейрональні нащадки трансплантованих прогеніторів

Порівняльний аналіз індивідуальних значень ПФ та ПС ЗІК упродовж експерименту та на кожному з термінів спостереження свідчить про переважання від'ємної кореляції між ними. Репаративно-відновний процес суттєво видозмінює вид кореляції між ПФ та ПС ЗІК, на нашу думку, шляхом збільшення елементної бази еферентної ланки рухової системи, контрольованої супраспінальними впливами.

У динаміці спостереження характерна відсутність кореляції між середніми значеннями ПФ та ПС ЗІК для групи "**ТТФМ**", слабка додатна кореляція для групи "**ЛПП**", помірна додатна кореляція для групи "**ТТФН**", сильна від'ємна кореляція для групи "**ТТНЦ**", сильна додатна кореляція для груп "**NG**", "**NG+НСК**", "**NG+СККМ**", "**NG+СКНГ**". За умов комплексного представлення даних моніторингу ПФ та ПС ЗІК в експериментальних групах (*рис. 12*), тенденція до від’ємної кореляції між цими двома показниками зберігається лише на значному масштабі розгляду.

На нашу думку, наявність від'ємної кореляції між значеннями ПФ та ПС ЗІК у

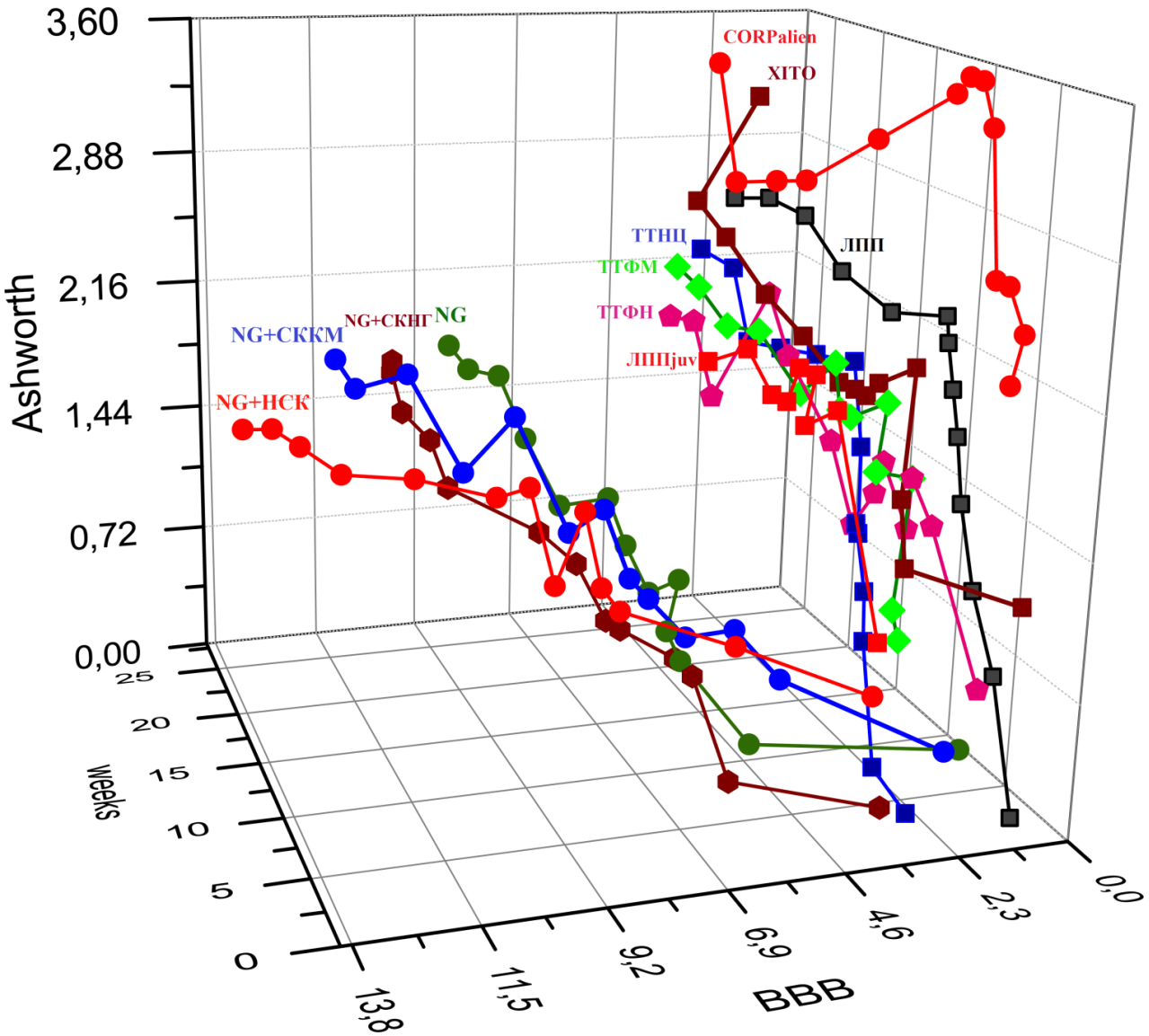


Рис. 12 — Сумісне представлення динаміки рухової функції (*горизонтальна вісь, BBB*) та спастичності (*вертикальна вісь, Ashworth*) паретичної кінцівки у тварин зазначених експериментальних груп упродовж загального періоду спостереження згідно із стандартизованою часовою шкалою (*тижні, weeks*)

динаміці спостереження свідчить про незмінність кількості мотонейронів та відповідних рухових одиниць, задіяних у реалізації мотивованої рухової функції кінцівки ("**СΘRP$_{ALIEN}$**"); наявність додатної кореляції або відсутність кореляції свідчить про зміни в часі кількості охоплених супраспінальними впливами мотонейронів, що інервують м'язи паретичної кінцівки.

У групі "**ЛППП**" додатна кореляція між ПФ та ПС ЗІК протягом першого місяця спостереження, ймовірно, обумовлена складністю диференціювання довільного та мимовільного (*спастичного*) компонентів м'язевого тонусу у діапазоні низьких значень ПФ ЗІК. У подальшому між значеннями ПФ та ПС ЗІК у групі "**ЛППП**" встановлюється від'ємна кореляція, отже кількість рухових одиниць, що функціонують, слід вважати сталою.

У групі "**ТТНЦ**" характер від'ємної кореляції між значеннями ПФ та ПС ЗІК свідчить про відновлення супраспінальних впливів на деякі денервовані мотонейрони і їх поступову деконструкцію, ймовірно, внаслідок організації зони ЛПП.

У групі "**ТТФН**" і найбільш виразно у групі "**ТТФМ**" слабкість кореляції між ПФ та ПС ЗІК на тлі відсутності динаміки обох показників свідчить про поступове зменшення кількості активних мотонейронів, що інервують м'язи паретичної кінцівки.

У групах "**NG**" "**NG+НСК**", "**NG+СККМ**", "**NG+СКНГ**" додатна кореляція між ПФ та ПС ЗІК свідчить про поступове відновлення супраспінальної інервації рухових одиниць паретичної кінцівки на тлі тимчасового проспастичного ефекту регенеруючих серотонін- і нарадренергічних волокон, опосередкованого через відповідні форми рецепторів на поверхні мотонейронів.

Слід зазначити, що використання шкали Ashworth в умовах низьких значень ПФ ЗІК (*2–5 бала ВВВ*) недостатнє для диференціювання залежного від кіркових впливів та спастичного компонентів тонусу паретичних м'язів.

Водночас, для діапазону високих значень ПФ ЗІК (*більше ніж 10 балів ВВВ*) характерні гіперметричні прояви спінальної дизрефлексії, для виявленя яких нами запропоновано пробу з використанням тракції тварини за хвостовий кінець при звичному квадрипедальному позиціюванні на горизонтальній поверхні.

Враховуючи фазність перебігу травми спинного мозку [Полищук Н.Е. и др., 2001; Слинько Є.І., 2005], суттєві відмінності патофізіології її періодів [Цымбалюк В.И., Медведев В.В., 2010; Dray C. et al., 2009; Ng M.T. et al., 2011; Moghaddam A. et al., 2015; Siebert J.R. et al., 2015; Tsintou M. et al., 2015; Garcia E. et al., 2016; Kjell J., Olson L., 2016], важливу роль у визначенні механізмів позитивного ефекту відновного втручання, на нашу думку, відіграє з'ясування часових особливостей його впливу на інтегральні клінічні показники стану спинного мозку — рухової функції та рівня спастичності паретичних кінцівок. Визначення періоду найбільш інтенсивного приросту ПФ дозволяє розглядати механізми позитивного ефекту відновного лікування через призму ключових патофізіологічних реакцій, характерних для окресленого часового відрізку. Аналіз $\mathbf{V_{ПФ}}$, $\mathbf{a_{ПФ}}$, $\mathbf{V_{ПС}}$ та $\mathbf{a_{ПС}}$ (*рис. 13*) свідчить про суттєві відмінності динаміки рівня функції та спастичності у всіх експериментальних групах, патофізіологічна інтерпретація яких потребує додаткових досліджень та широкого залучення існуючих літературних даних.

Загалом, отримані результати свідчать, що рівень посттравматичної спастичності суттєво залежить від наявності тривалої компресії спинного мозку, супутньої глутаматергічної чи ГАМК-ергічної стимуляції мотонейронів нижче рівня ураження, інтенсивності локального запального процесу, результативності відновно-репараційних реакцій на тлі нейроінженерних втручань, а також від змін активності у нейрональній мережі драглистої речовини.

Отримані дані дозволяють сформулювати теоретичні висновки та практичні рекомендації щодо покращення результатів відновного нейрохірургічного лікування травми спинного мозку.

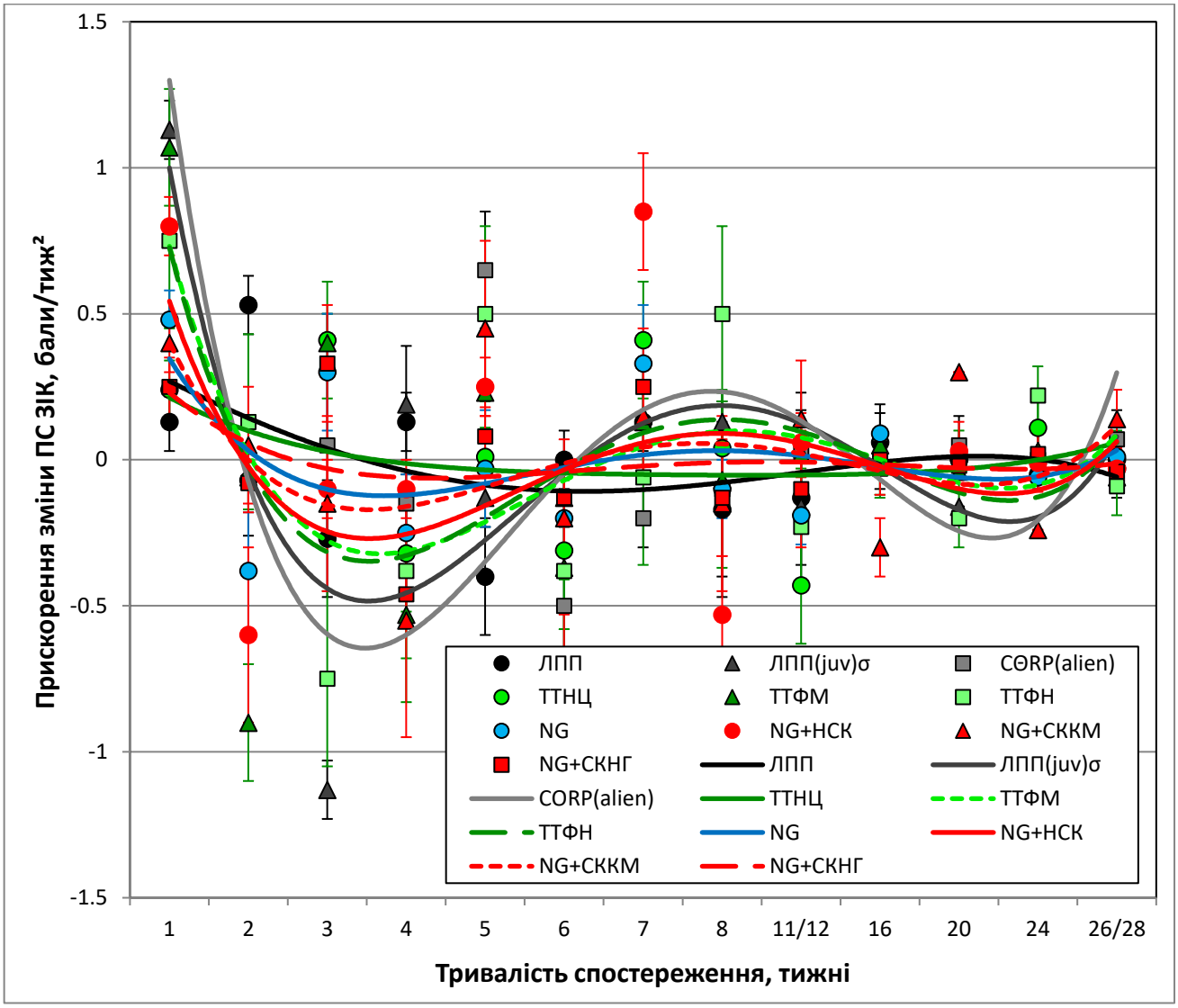


Рис. 13 — Поліномальна апроксимація динаміка середніх значень **апс** у експериментальних групах впродовж загального періоду спостереження (*згідно зі стандартизованою часовою шкалою*; *міра полінома — 4*)

ВИСНОВКИ

1. Розроблена та впроваджена модель відкритого проникного ураження спинного мозку з тривалою його компресією стороннім тілом задовільно відтворює клінічну картину цього виду травми. Персистенція стороннього тіла в зоні половинного перетину спинного мозку унеможливлює відновлення рухової функції паретичної кінцівки, потенціює спастичність (*до (3,6±0,2) бала Ashworth*). Поступове усунення компресії спинного мозку у віддаленому періоді травми внаслідок зміни геометрії стороннього тіла супроводжується збільшенням рухової активності та зменшенням спастичності паретичної кінцівки.
2. Травма спинного мозку в молодому віці характеризується кращим відновленням рухової функції паретичної кінцівки у порівнянні з дорослими

тваринами, супроводжується швидким збільшенням спастичності протягом перших двох тижнів, тривалим періодом стабілізації і зменшенням у віддаленому періоді до значення суттєво нижчого, ніж у тварин дрослого віку.

3. На рівні прояву посттравматичної спастичності наявне суттєве збільшення стимуляційного впливу на збуджувальні інтернейрони драглистої речовини спинного мозку, зменшення — на гальмівні інтернейрони. Враховуючи наявність мережевих зв'язків між нейронами драглистої речовини та мотонейронами, в умовах спінальної травми можлива реалізація спільного патогенетичного механізму спастичності та больового синдрому — тривалого збільшення збуджувальної активності у спінальних мережах ноцицептивної системи.

4. У речовині спинного мозку каудальніше рівня його половинного перетину виявлено зменшення рівня мРНК триптофан-гідроксилази–2 (*іпсилатерально*), везикулярного переносника моноамінів Slc18a2 (*контрлатерально*), субодиниці AMPA-рецептора глутамату Gria3 (*білатерально*). Зазначені зміни не корелюють з рівнем рухової функції та спастичності іпсилатеральної та контрлатеральної кінцівки.

5. Розроблена та впроваджена модель мозочкової гіпотонії задовільно відтворює дефіцит збуджувального супраспінального впливу на мотонейрони спинного мозку без супутнього формування спастичності, дозволяє вивчати механізми відновлення м'язового тонусу, що залежать від нейропластичних перебудов топології нейрональної мережі рухової системи.

6. Протягом першого місяця трансплантація тканини фетального мозочка потенціює спастичність, зрілої нюхової цибулини — пригнічує, що корелює з медіаторною специфікою нащадків нейрогенних клітин цих двох зон інтактного мозку. Починаючи з 2-го місяця для зазначених видів тканинної трансплантації характерна стабілізація спастичності на рівні значень контрольної групи (*(1,8–2,6) бала Ashworth*).

7. Трансплантація тканини нюхової цибулини суттєво потенцією розвиток тяжкого больового синдрому у віддаленому періоді травми, трансплантація тканини фкетального мозочка — зменшує. Це, на нашу думку, пов'язано з глутаматергічним екзайтотоксичним впливом на сенситизовані нейрони драглистої речовини тканини фетального мозочку і протилежним ГАМК-ергічним впливом тканини нюхової цибулини на вказані нейрони.

8. Ксенотрансплантація нейрогенних стовбурових клітин у поєднанні з макропористим гідрогелем забезпечує відновлення рухової функції паретичної кінцівки до рівня ~13 балів за шкалою BBB (*перевищуючи контрольні значення у 6 разів*), помірно підвищує мимовільний тонус м'язів паретичної кінцівки протягом 1–2-го тижня, починаючи з 3–4-го місяця виявляє антиспастичний ефект. Обмеження спонтанної локомоторної активності за цих умов погіршує відновлення рухової функції та пришвидшує розвиток спастичності паретичної кінцівки.

9. Ксенотрансплантація стовбурових клітин кісткового мозку в поєднанні з макропористим гідрогелем зменшує швидкість, однак суттєво подовжує приріст рухової функції паретичної кінцівки, чинить помірний антиспастичний ефект.

10. Ксенотрансплантація стовбурових клітин нервового гребеня у поєднанні з макропористим гідрогелем потенціює відновлення рухової функції протягом 1–5-го місяців, не призводить до значних змін рівня спастичності. Невідповідність статі донора та реципієнта стовбурових клітин погіршує відновлення рухової функції, посилює маніфестацію спастичності.
11. У товщі імплантованого в поєднанні зі стовбуровими клітинами гідрогелю формуються потужні розростання нервових волокон реципієнтного спинного мозку, у тому числі з морфологією, характерною для аксонів серотонінергічних нейронів. Трансплантовані клітини зберігаються у товщі гідрогелю протягом щонайменше 7 міс, диференціюючись за "нейрональним фенотипом".
12. У динаміці спостереження для відтвореного виду спінальної травми характерною є слабка додатна кореляція між середніми значеннями функції та спастичності, від'ємна кореляція — на тлі компресії спинного мозку стороннім тілом та трансплантації тканини нюхової цибулини, додатна кореляція — на тлі трансплантації стовбурових клітин у поєднанні макропористим гідрогелем, відсутність кореляції — на тлі трансплантації тканини фетального мозочка.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. На підставі отриманих даних обгрунтовано доцільність усунення травматичної компресії спинного мозку у віддаленому періоді спінальної травми.
2. З метою покращення результатів відновного лікування травми спинного мозку патогенетично обгрунтованим є використання трансплантації у зону ураження макропористого гідрогелю у поєднанні зі стовбуровими клітинами кісткового мозку та нервового гребеня за умови дотримання еквістатевості донора і реципієнта трансплантованих клітин.
3. Для покращення результатів відновного нейроінженерного лікування травми спинного мозку патогенетично обгрунтованим є залучення засобів фізичної реабілітації, зокрема ранньої мобілізації паретичної кінцівки в межах рухових патернів, звичних для довільної просторової локомоції організму.
4. З метою зменшення проявів посттравматичної спастичності доцільним є застосування трансплантації ГАМК-продукуючих клітин у комплексі з іншими засобами тканинної інженерії.
5. Зважаючи на суттєву роль ноцицептивного апарату у формуванні посттравматичної спастичності, зменшення больової аферентації спинного мозку є важливим додатковим засобом відновного лікування спінальної травми.
6. Клінічне впровадження апробованих у дослідженні новітніх видів тканинної інженерії сприятиме покращенню результатів лікування спінальної травми, виявлені особливості патогенезу та перебігу спастичності є перспективними щодо прогнозування та лікування цього ускладнення травми спинного мозку.
7. Рекомендувати використання моделі закритої травми спинного мозку щура (патент України на корисну модель №92522 від 26.08.2014) та синдрому мозочкової гіпотонії (патент України на корисну модель №99511 від 10.06.2015).

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Цымбалюк ВИ, Семенова ВМ, Медведев ВВ. Биология обволакивающих обонятельных глиоцитов *in vivo* и *in vitro*. Клеточные культуры: Информационный бюллетень. 2008;23:12-23.
(*Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, написанні тексту, підготовці статті до друку*)
2. Цымбалюк ВИ, Семенова ВМ, Медведев ВВ. Потенциальная эффективность обволакивающих обонятельных глиоцитов в восстановительном лечении поражений спинного мозга и периферических нервов. Клеточные культуры: Информационный бюллетень. 2009;24:34-40.
(*Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, написанні тексту і підготовці статті до друку*)
3. Цимбалюк ВІ, Семенова ВМ, Сенчик ЮЮ, Медведєв ВВ. Патоморфологічні характеристики моделі дозованого травматичного ушкодження півкулі мозочку в експерименті. Український нейрохірургічний журнал. 2010;1:24-9.
(*Особистий внесок здобувача полягає у розробці дизайну дослідження, участі у проведенні оперативних втручань, узагальненні результатів, підготовці статті до друку*)
4. Цымбалюк ВИ, Медведев ВВ. Спинной мозг. Элегия надежды: монография. Винница: Нова Книга; 2010. 944 с.
(*Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, написанні тексту, формуванні ілюстративного матеріалу, підготовці монографії до друку*)
5. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ. Нейрогенні стовбурові клітини у неврології та нейрохірургії. Журнал НАМН України. 2011;17(1):76-80.
(*Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, написанні тексту і підготовці статті до друку*)
6. Цимбалюк ВІ, Лісяний МІ, Гнєдкова ІО, Любич ЛД, Сенчик ЮЮ, Медведєв ВВ. Дослідження імунних реакцій при моделюванні дозованого травматичного пошкодження півкулі мозочка у щурів та трансплантації алогенних НСК-вмісних тканин. Імунологія та алергологія: Наука і практика. 2012;1:3-15.
(*Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, участі у оперативних втручаннях, узагальненні отриманих результатів, написанні вступної частини статті, обговоренні висновків, підготовці статті до друку*)
7. Семенова ВМ, Любич ЛД, Стайно ЛП, Медведев ВВ, Егорова ДМ. Сравнительное изучение способности к дифференцировке культивируемых нейральных стволовых клеток из ольфакторной луковицы человека. Клеточные культуры: Информационный бюллетень. 2013;29:23-35.
(*Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, вилученні матеріалу для культуральних досліджень, узагальненні отриманих результатів, форматуванні ілюстративного матеріалу, написанні вступної частини, фрагментів основної частини та обговорення, підготовці статті до друку*)

8. Цимбалюк ВІ, Лісяний МІ, Семенова ВМ, Медведєв ВВ, Любич ЛД, Сенчик ЮЮ, Васлович ВВ, Молотковець ВЮ. Вплив різних видів нейротрансплантації на перебіг травми мозочка у щурів. Журнал НАМН України. 2013;19(2):171-83.
(*Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, участі у оперативних втручаннях, узагальненні отриманих результатів, написанні основних частин статті, підготовці статті до друку*)
9. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Сенчик ЮЮ. Вплив тканинної нейротрансплантації на відновлення тонусу скелетних м'язів при механічній травмі мозочка в експерименті. Клітинна та органна трансплантологія. 2013;1:74-86.
(*Особистий внесок здобувача полягає у розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, участі у оперативних втручаннях, узагальненні отриманих результатів, написанні і підготовці статті до друку*)
10. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Сенчик ЮЮ. Стан клітинної та гуморальної ланок імунної системи у тварин із м'язовою гіпотонією на тлі експериментального травматичного ураженням мозочка. Наука і практика. 2013;1:59-69.
(*Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети, розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, участі у оперативних втручаннях, узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку*)
11. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Сенчик ЮЮ. Ce.re.bellum, або мозочок: монографія. Вінниця: Нова Книга; 2013. 272 с.
(*Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, участі у оперативних втручаннях, узагальненні отриманих даних, формуванні ілюстративного матеріалу, підготовці монографії до друку*)
12. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Семенова ВМ, Гридіна НЯ, Сенчик ЮЮ, Величко ОМ, та ін. Модель пересічення половини поперечника спинного мозку. Частина І. Технічні, патоморфологічні та клініко-експериментальні особливості. Український нейрохірургічний журнал. 2016;2:18-27.
(*Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети, розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, моніторингу функції паретичної кінцівки, узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку*)
13. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Гридіна НЯ, Сенчик ЮЮ, Сулій ЛМ, Татарчук ММ, та ін. Модель поперечного пересічення половини спинного мозку. Частина ІІ. Стан нервово-м'язового апарату, синдром посттравматичної спастичності та хронічний больовий синдром. Український нейрохірургічний журнал. 2016;3:9-17.
(*Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети, розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, моніторингу функції та спастичності паретичної кінцівки, регіонарного больового синдрому, участі в електронейроміографічному дослідженні, узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку*)
14. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Семенова ВМ, Гридіна НЯ, Ямінський ЮЯ, Сенчик ЮЮ, та ін. Клініко-морфологічні особливості моделі відкритої проникної травми спинного мозку з тривалим перебуванням стороннього тіла у хребтовому каналі. Український нейрохірургічний журнал. 2016;4:16-25.

(*Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети, розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, моніторингу функції та спастичності паретичної кінцівки, регіонарного больового синдрому, участі в електронейроміографічному дослідженні, узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку*)

15. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Семенова ВМ, Гридіна НЯ, Ямінський ЮЯ, Сенчик ЮЮ, та ін. Тривала персистенція біосумісного стороннього тіла у хребтовому каналі за відкритої проникної травми спинного мозку: клініко–експериментальні та патоморфологічні особливості. Клінічна Хірургія. 2016;8:64-9.

(*Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети, розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, моніторингу функції паретичної кінцівки, узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку*)

16. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Гридіна НЯ, Сенчик ЮЮ, Татарчук ММ, Драгунцова НГ, та ін. Модель відкритої проникної травми спинного мозку з тривалою персистенцією біосумісного стороннього тіла у каналі хребта. Синдром посттравматичної спастичності. Клінічна Хірургія. 2016;10:67-71.

(*Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети, розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, моніторингу функції та спастичності паретичної кінцівки, регіонарного больового синдрому, участі у електронейроміографічному дослідженні, узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку*)

17. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Сенчик ЮЮ, Гридіна НЯ, Драгунцова НГ, Дичко СМ. Вплив трансплантації тканини нюхової цибулини на перебіг регенераційного процесу при травмі спинного мозку в експерименті. Український неврологічний журнал. 2016;3:59-65.

(*Особистий внесок здобувача полягає у розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, моніторингу функції паретичної кінцівки, узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку*)

18. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Сенчик ЮЮ, Гридіна НЯ, Татарчук ММ, Драгунцова НГ, та ін. Вплив трансплантації тканини нюхової цибулини на перебіг синдрому спастичності та хронічного больового синдрому при травмі спинного мозку в експерименті. Український неврологічний журнал. 2016;4:59-66.

(*Особистий внесок здобувача полягає у розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, моніторингу спастичності паретичної кінцівки, регіонарного больового синдрому, участі у електронейроміографічному дослідженні, узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку*)

19. Козявкін ВІ, Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Рибачук ОА, Драгунцова НГ. Вплив обмеження спонтанної локомоторної активності на перебіг синдрому спастичності за умови експериментальної травми спинного мозку та імплантації матриксу NeuroGel™, асоційованого з нейрогенними стовбуровими клітинами. Буковинський медичний вісник. 2016;20(4):83-9.

(*Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети, розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, моніторингу функції та спастичності паретичної кінцівки, регіонарного больового синдрому, узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку*)

20. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Сенчик ЮЮ, Драгунцова НГ, Дичко СМ. Вплив трансплантації тканини фетальної нирки на перебіг регенераційного процесу при травмі спинного мозку в експерименті. Наука і практика. 2016;1–2:104-15.

(*Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети, розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, моніторингу функції паретичної кінцівки, участі у електронейроміографічному дослідженні, узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку*)

21. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Рибачук ОА, Козявкін ВІ, Драгунцова НГ. Вплив імплантації NeuroGel™ у асоціації з ксеногенними стовбуровими клітинами кісткового мозку на відновлення рухової функції задньої кінцівки щура після спінальної травми. Міжнародний неврологічний журнал. 2016;6:13-9.

(*Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети, розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, моніторингу функції паретичної кінцівки, узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку*)

22. Медведєв ВВ. Варіативність кореляції рівня функції та спастичності паретичної кінцівки за різного перебігу відновного процесу на моделі спінальної травми. Шпитальна Хірургія. 2016;4:21-6.

23. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Рибачук ОА, Козявкін ВІ, Драгунцова НГ. Вплив імплантації NeuroGel™ у асоціації з ксеногенними стовбуровими клітинами кісткового мозку на динаміку синдрому спастичності після спінальної травми в експерименті. Міжнародний неврологічний журнал. 2016;7:20-6.

(*Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети, розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, моніторингу рівня спастичності паретичної кінцівки, узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку*)

24. Медведєв ВВ, Сенчик ЮЮ, Драгунцова НГ, Дичко СМ, Цимбалюк ВІ. Вплив трансплантації тканини фетального мозочка на відновлення локомоторної функції задньої кінцівки при травмі спинного мозку у щура. Клітинна та органна трансплантологія. 2016;4(2):168-74.

(*Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети, розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, моніторингу функції паретичної кінцівки, узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку*)

25. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Рибачук ОА, Козявкін ВІ, Драгунцова НГ, Нестеренко ДГ. Вплив ксенотрансплантації нейрогенних стовбурових клітин у комплексі з тканинним матриксом NeuroGel™ на відновлення рухової функції спинного мозку щура після експериментальної спінальної травми. Клінічна Хірургія. 2017;1:64-6.

(*Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети, розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, моніторингу функції паретичної кінцівки, узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку*)

26. Медведєв ВВ. Вплив нейротрансплантації різних типів алогенних тканин на відновлення рухової функції після експериментальної травми спинного мозку. Український нейрохірургічний журнал. 2017;1:11-23.

27. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Васильєв РГ, Рибачук ОА, Козявкін ВІ, Драгунцова НГ. Вплив імплантації NeuroGel у поєднанні з ксеногенними стовбуровими клітинами нервового гребня на відновлення рухової функції задніх кінцівок щура після травми спинного мозку. Український неврологічний журнал. 2017;1:65-71.

(*Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети, розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, моніторингу функції паретичної кінцівки, узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку*)

28. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Рибачук ОА, Козявкін ВІ, Драгунцова НГ. Вплив ксенотрансплантації нейрогенних стовбурових клітин у комплексі з тканинним матриксом NeuroGel™ на перебіг синдрому посттравматичної спастичності в експерименті. Клінічна Хірургія. 2017;3:44-7.

(*Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети, розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, моніторингу рівня спастичності паретичної кінцівки, узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку*)

29. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Васильєва ІГ, Козявкін ВІ, Галанта ОС, Цюбко ОІ, та ін. Вплив експериментальної спінальної травми на тканинну експресію мРНК деяких елементів медіаторних систем спинного мозку. Клінічна Хірургія. 2017;4:69-73.

(*Особистий внесок здобувача полягає у розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, моніторингу функції та спастичності паретичної кінцівки, вилученні матеріалу для молекулярно-генетичного дослідження, узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку*)

30. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Васильєв РГ, Рибачук ОА, Козявкін ВІ, Драгунцова НГ. Вплив імплантації NeuroGel™ у поєднанні з ксеногенними стовбуровими клітинами нервового гребня на перебіг синдрому спастичності після експериментальної травми спинного мозку. Міжнародний неврологічний журнал. 2017;1:12-7.

(*Особистий внесок здобувача полягає у розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, моніторингу рівня спастичності паретичної кінцівки, узагальненні результатів, написанні і підготовці статті до друку*)

31. Медведєв ВВ. Вплив нейротрансплантації різних типів алогенних тканин на перебіг синдрому спастичності та хронічного больового синдрому при

експериментальній травмі спинного мозку. Український нейрохірургічний журнал. 2017;2:11-21.

32. Медведєв ВВ. Особливості кореляції рівня функції та спастичності паретичної кінцівки за різних видів тканинної нейротрансплантації на моделі спінальної травми. Шпитальна Хірургія. 2017;1:51-6.

33. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Сенчик ЮЮ; ДУ "Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України", патентовласник. Спосіб лікування забиття гемісфери мозочка шляхом трансплантації фетальної нервової тканини (мозочка). Патент України на корисну модель №92562. 2014 серп. 26.

(*Особистий внесок здобувача полягає у вивченні патентоспроможності розробки, участі у формуванні формули винаходу, написанні патенту*)

34. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Сенчик ЮЮ; ДУ "Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України", патентовласник. Спосіб лікування забиття мозочка шляхом трансплантації тканини нюхової цибулини. Патент України на корисну модель №92523. 2014 серп. 26.

(*Особистий внесок здобувача полягає у вивченні патентоспроможності розробки, участі у формуванні формули винаходу, написанні патенту*)

35. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Сенчик ЮЮ; ДУ "Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України", патентовласник. Спосіб лікування забиття мозочка шляхом трансплантації тканини фетальної нирки. Патент України на корисну модель №92519. 2014 серп. 26.

(*Особистий внесок здобувача полягає у вивченні патентоспроможності розробки, участі у формуванні формули винаходу, написанні патенту*)

36. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Сенчик ЮЮ, Молотковець ВЮ; ДУ "Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України", патентовласник. Спосіб забору тканини кісткового мозку із стегнової кістки експериментальних тварин. Патент України на корисну модель №92521. 2014 серп. 26.

(*Особистий внесок здобувача полягає у вивченні патентоспроможності розробки, участі у формуванні формули винаходу, написанні патенту*)

37. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Сенчик ЮЮ, Молотковець ВЮ; ДУ "Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України", патентовласник. Спосіб моделювання травми спинного мозку щура шляхом половинного його розрізу у нижньогрудному відділі. Патент України на корисну модель №92522. 2014 серп. 26.

(*Особистий внесок здобувача полягає у вивченні патентоспроможності розробки, участі у формуванні формули винаходу, написанні патенту*)

38. Хохлов ОГ, Медведєв ВВ, Дмитерко ІП, Молотковець ВЮ; ДУ "Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України", патентовласник. Спосіб моделювання відкритої проникаючої дозованої спино-мозкової травми у експериментальних тварин. Патент України на корисну модель №92561. 2014 серп. 26.

(*Особистий внесок здобувача полягає у вивченні патентоспроможності розробки, участі у формуванні формули винаходу, написанні патенту*)

39. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Сенчик ЮЮ, Молотковець ВЮ; ДУ "Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України", патентовласник. Спосіб

повного перетину спинного мозку щура у верхньокрижовому відділі. Патент України на корисну модель №92520. 2014 серп. 26.
(*Особистий внесок здобувача полягає у вивченні патентоспроможності розробки, участі у формуванні формули винаходу, написанні патенту*)
40. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ, Сенчик ЮЮ; ДУ "Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України", патентовласник. Спосіб моделювання синдрому мозочкової гіпотонії у експериментальних тварин. Патент на корисну модель №99511. 2015 черв. 10.
(*Особистий внесок здобувача полягає у вивченні патентоспроможності розробки, участі у формуванні формули винаходу, написанні патенту*)
41. Семенова ВМ, Медведев ВВ, Стайно ЛП. Исследование мультипотентных свойств нейроклеток субвентрикулярной зоны эмбрионального мозга в условиях культивирования. Матеріали конференції «Новые криобиотехнологии для решения фундаментальных и прикладных проблем медицины»; 2008 лист. 26-28; Україна, Харків: Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Проблемы криобиологии. 2008;18(3):325-7.
(*Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, написанні фрагментів тексту і підготовці роботи до друку*)
42. Цимбалюк ВІ, Семенова ВМ, Сенчик ЮЮ, Медведєв ВВ. Патоморфологічні характеристики моделі дозованого травматичного ушкодження півкулі мозочку в експерименті. Матеріали наук.-практ. конф. нейрохірургів України за участю НДІ нейрохірургії ім. М.Н. Бурденка РАМН "Проблеми реконструктивної та відновної нейрохірургії"; 2010 жовт. 7-8; АР Крим, Партеніт. Київ: Українська Асоціація Нейрохірургів; 2010, с. 65.
(*Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, участі у оперативних втручаннях, узагальненні результатів*)
43. Цимбалюк ВІ, Лісяний МІ, Семенова ВМ, Медведєв ВВ, Любич ЛД, Васлович ВВ, та ін. Вплив трансплантації фетальної нервової тканини та трансплантації тканини нюхової цибулини зрілого мозку на перебіг травми мозочка в експерименті. В: Сборник научных трудов II Всеукраинской научн.-практ. конф. с межд. участием «Вейновские чтения в Украине»; 2012 трав. 23-24; Киев. Киев: Украинская ассоциация по изучению боли; 2012. с. 36-7.
(*Особистий внесок здобувача полягає в участі у оперативних втручаннях, узагальненні отриманих результатів, підготовці тез до друку*)
44. Семенова ВМ, Цимбалюк ВІ, Сенчик ЮЮ, Медведєв ВВ. Експериментально-морфологічне дослідження впливу нейротрансплантації на перебіг травматичного пошкодження гемісфери мозочка щурів. В: Конференція нейрохірургів України. Тези доповідей; 2012 вер 26-27; Київ. Київ: Українська Асоціація Нейрохірургів; 2012. с. 32.
(*Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, участі у оперативних втручаннях, узагальненні результатів, підготовці тез до друку*)
45. Gridina N, Zolotoverkh A, Velychko O, Medvedjev V, Semenova V, Vaslovych V, et al. Use of the bone mesenchymal cells transplantation at the experimental traumatic brain injury and local cerebral ischemia. In: Program Book of 15 th World Congress of

Neurosurgery «One World, One Neurosurgery»; 2013 Sep 8-13; Seoul, Korea. Seoul: World Federation of Neurosurgical Societies; 2013, FA2028, p. 207.
(*Особистий внесок здобувача полягає у вилученні матеріалу для трансплантаційних втручань, підготовці тез до друку*)
46. Копач ОВ, Медведєв ВВ, Хомула ЄВ, Кротов ВВ, Войтенко НВ. Зміни спонтанної електричної активності нейронів драглистої речовини спинного мозку щура при синдромі післятравматичної спастичності. В: Матеріали VI Конгресу Українського товариства нейронаук; 2014 Черв 4-8; Київ. Київ: Українське товариство нейронаук; 2014, с. 75-6.
(*Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, моделюванні травми спиного мозку, моніторингу функції та спастичності, участі в електронейроміографічному дослідженні, узагальненні результатів, підготовці тез до друку*)
47. Цимбалюк ВІ, Медведєв ВВ. Біоінженерія під кутом зору нейрохірургії: сьогодення і виклики майбутнього. В: Матеріали V Міжнародного медичного форуму, ІІІ Міжнародного науково-практичного конгресу «Впровадження сучасних досягнень медичної науки в практику охорони здоров'я України», семінар "Регенеративна медицина: інновації та перспективи"; 2014 Жовт 14-16; Київ. Київ: МОЗ України, НАМН Украни, НМАПО ім. П.Л. Шупика; 2014, с. 15.
(*Особистий внесок здобувача полягає у вивченні літературних даних, написанні та підготовці тез до друку*)
48. Медведєв ВВ, Васильєв РГ, Рибачук ОА, Кротов ВВ, Нестеренко ДГ, Савицька НО, та ін. Вплив імплантації фрагментів гідрогелю NeuroGel™ сумісно з клітинними елементами культури стовбурових клітин нервового гребня на відновлення функцій спинного мозку в експерименті. В: Смоланка ВВ, укладач. Матеріали XIV міжнародної науково-практичної студентської конференції «Науковий потенціал молоді — прогрес медицини майбутнього»; 2016 квіт 20-23; Ужгород. Ужгород: Ужгородський національний університет; 2016, с. 147-8.
(*Особистий внесок здобувача полягає у розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, моніторингу функції паретичної кінцівки, написанні і підготовці тез до друку*)
49. Медведєв ВВ, Рибачук ОА, Кротов ВВ, Нестеренко ДГ, Савицька НО, Лазаренко ЮА, та ін. Вплив імплантації фрагментів гідрогелю NeuroGel™ сумісно з клітинними елементами культури нейральних стовбурових клітин на відновлення функцій спинного мозку в експерименті. В: Матеріали V Ювілейного міжнародного медичного конгресу "Впровадження сучасних досягнень медичної науки у практику охорони здоров'я України", семінар "Інноваційні напрямки в генетичній та регенеративній медицині"; 2016 квіт 19-21; Київ. Київ: МОЗ України, НАМН Украни, НМАПО ім. П.Л. Шупика; 2016, с. 132.
(*Особистий внесок здобувача полягає у розробці дизайну дослідження, вивченні літературних даних, проведенні оперативних втручань, моніторингу функції паретичної кінцівки, написанні і підготовці тез до друку*)
50. Kozakevych RB, Petriv TI, Medvediev VV, Rybachuk OA, Vasyliev RG, Zienkiewicz-Strzalka M. Development of chitosan/gelatin-based scaffolds for nerve tissue

engineering. In: Materials of the Neurology and rehabilitation international symposium "Peripheral nerve reconstruction after severe injures"; 2016 may 19-21; Kyiv. Kyiv: National Bogomoletz Medical University; 2016. c. 19-20.
(*Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети дослідження, узагальненні результатів, написанні та підготовці тез до друку*)
51. Kozakevych RB, Bolbukh YuM, Tertykh VA, Petriv TI, Medvediev VV, Rybachuk OA, et al. Development of chitosan/carbon nanotubes composites for neural tissue engineering. In: Proceedings of Ukrainian conference with international participation "Chemistry, Physics and Technology of Surface", Workshop "Nanostructured biocompatible / bioactive materials"; 2016 May 17-18; Kyiv. Kyiv: Chuiko Institute of Surface Chemistry of NAS Ukraine; 2016. p. 172.
(*Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні мети дослідження, узагальнені результатів, підготовці тез до друку*)
52. Медведєв ВВ. Вплив деяких видів традиційної нейротрансплантації на перебіг експериментальної травми спинного мозку. В: Науково-практична конференція нейрохірургів України з міжнародною участю «Травматичні ушкодження центральної та периферичної нервової системи». Кам'янець-Подільський, Програма, Тези доповідей; 2016 вер 15-16; Кам'янець-Подільський, Україна. Київ: Українська Асоціація Нейрохірургів; 2016. с. 81.

АНОТАЦІЯ

Медведєв В.В. Спастичність при травмі спинного мозку: патогенетичні механізми та шляхи нейрохірургічної корекції засобами тканинної інженерії (експериментальне дослідження). — Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук зі спеціальності 14.01.05 — нейрохірургія. Державна установа «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», Київ, 2017 р.

У дисертації на підставі проведеного комплексного дослідження представлено теоретичне узагальнення та новий підхід до вирішення наукової проблеми патогенезу спастичності та відновного лікування травми спинного мозку. Дослідження виконано на білих безпородних щурах різного віку і статі (*n=287; 23 експериментальні групи*). У якості моделі травми спинного мозку використано лівобічний половинний його перетин у нижньогрудному відділі. Усі відновні нейроінженерні втручання виконано відразу після моделювання травми у зоні ураження спинного мозку. Проведено клініко-експериментальні (*шкала BBB, шкала Ashworth*), електрофізіологічні, культуральні, молекулярно-генетичні, імунологічні, патоморфологічні і математико–статистичні дослідження. Установлено, що компресія спинного мозку стороннім тілом суттєво погіршує перебіг спінальної травми, унеможливлює відновлення рухової функції, потенціює спастичність. Поступове усунення компресії спинного мозку у віддаленому періоді травми супроводжується збільшенням рухової активності та зменшенням спастичності

паретичної кінцівки. На рівні прояву посттравматичної спастичності наявне суттєве збільшення стимуляційного впливу на збуджувальні інтернейрони драглистої речовини спинного мозку, зменшення — на гальмівні інтернейрони. В умовах спінальної травми можлива реалізація спільного патогенетичного механізму спастичності та больового синдрому. У речовині спинного мозку каудальніше рівня його половинного перетину виявлено зменшення рівня мРНК триптофан-гідроксилази–2 (*іпсилатерально*), везикулярного переносника моноамінів Slc18a2 (*контрлатерально*), субодиниці AMPA-рецептора глутамату Gria3 (*білатерально*). Зазначені зміни не корелюють з рівнем рухової функції та спастичності іпсилатеральної та контрлатеральної кінцівки. Протягом першого місяця трансплантація тканини фетального мозочка потенціює спастичність, зрілої нюхової цибулини — пригнічує, що корелює з медіаторною специфікою нащадків нейрогенних клітин цих двох зон інтактного мозку. Трансплантація тканини нюхової цибулини суттєво потенцією розвиток тяжкого больового синдрому у віддаленому періоді травми, трансплантація тканини фкетального мозочка — зменшує. Ксенотрансплантація нейрогенних стовбурових клітин, стовбурових клітин кісткового мозку і стовбурових клітин нервового гребеня у поєднанні з макропористим гідрогелем забезпечує відновлення рухової функції паретичної кінцівки в середньому до рівня 11 балів за шкалою BBB (*перевищуючи контрольні значення у 5 разів*), помірно підвищує мимовільний тонус м'язів паретичної кінцівки протягом 1–2-го тижня, починаючи з 3–4-го місяця виявляє антиспастичний ефект. Обмеження спонтанної локомоторної активності за цих умов погіршує відновлення рухової функції та пришвидшує розвиток спастичності паретичної кінцівки. У товщі імплантованого в поєднанні зі стовбуровими клітинами гідрогелю формуються потужні розростання нервових волокон реципієнтного спинного мозку. Трансплантовані клітини зберігаються у товщі гідрогелю протягом щонайменше 7 міс, диференціюючись за "нейрональним фенотипом". У динаміці спостереження для відтвореного виду спінальної травми та використаних нейроінженерних втручань переважає додатна кореляція між середніми значеннями функції та спастичності. Клінічне впровадження апробованих у дослідженні новітніх видів тканинної інженерії сприятиме покращенню результатів лікування спінальної травми та її наслідків. Виявлені патогенетичні закономірності перебігу посттравматичної спастичності є перспективними щодо прогнозування та лікування цього ускладнення травми спинного мозку.

Ключові слова: Травма спинного мозку, спастичність, тканинна інженерія, відновна нейрохірургія.

SUMMARY

Medvediev V.V. Spastisity after spinal cord injury: pathogenetic mechanisms and ways of neurosurgical correction by means of tissue engineering (experimental study). — Qualifying scientific work copyrighted as a manuscript.

Dissertation for obtaining scientific degree of Doctors of medical sciences on specialty 14.01.05 — neurosurgery. State Institution "Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov NAMS of Ukraine", Kyiv, 2017.

On the basis of a comprehensive study the dissertation presents the theoretical generalization and a new approach to solving scientific problem of spasticity pathogenesis and restorative treatment of spinal cord injury.

The research has been conducted over albino outbred rats of different age and sex (n=287; 23 experimental groups), model of injury — left-side spinal cord hemisection at T_{11} level. The research proposes a model of spinal cord compression by the biologically compatible foreign body, model of temporary cerebellar hypotonia. The author has examined as regenerative neuro-engineered interventions three types of immediate tissue transplantation into the injury zone, 2 different proregenerative matrix implantation, three types of transplantation of macroporous hydrogel matrix (NeuroGel), associated with stem cells. The behavioral (*BBB-scale*), clinical (*Ashworth-scale*), electrophysiological, cellular electrophysiological, tissue culturing, molecular, immunological, pathomorphological, mathematical and statistical research has been conducted.

Compression of the spinal cord by biologically compatible foreign body significantly worsens the course of the regeneration process; during the first 8 weeks the ipsilateral hind limb function indicator (*IHL FI*) in animals of the group is the lowest one — 1,30±0,94 points of the BBB-scale; during the 3rd–4th month BI LFI veraciously increases till 2,35±0,95 points of the BBB-scale, which is likely due to the change in the form of a foreign body and its utilization, decrease of the pressure on the spinal cord. At the 24th week of the observation BI LFI was 2,35±0,95 points of the BBB-scale. Reducing the spinal cord compression even at the late period of injury significantly improves the efficiency of the regeneration process.

Spasticity is associated with the dorsal horn hyperexcitability resulting from an increase in excitation and disinhibition occurring in two respective types of sensory interneurons. In the tonic-firing inhibitory lamina II interneurons, glutamatergic drive was reduced while glycinergic inhibition was potentiated. In contrast, excitatory drive was boosted to the adapting-firing excitatory lamina II interneurons while GABA-ergic and glycinergic inhibition was reduced. Thus, increased activity of excitatory interneurons coupled with the reduced excitability of inhibitory interneurons post-SCI could provide a common mechanism for chronic pain and spasticity after spinal cord injury.

Expression of the matrix RNA (mRNA) proteins Gria1-4, Slc18a2, Slc32a1, Dbh, Tph2, Ptf1a in a lumbo-sacral rat spinal cord matter in 6 weeks after injury was investigated using a PCR method in a real time. Low expression of the tryptophan-hydroxylase 2 (Tph2) and dopamine-β-hydroxylase (Dbh) mRNA was noted in tissue of the intact spinal cord. A spinal cord trauma causes essential lowering of the Tph2 mRNA expression — homolaterally, and of transmembrane carrier of monoamines Slc18a2 — contralaterally, while in the receptor of glutamate Gria3 subunit — bilaterally. Lateralization is not confirmed by immediate comparison of results of contralateral halves of a spinal cord. Lateralized laminectomy without a spinal cord trauma causes significant bilateral raising of the Gria2 expression in a spinal cord tissue. The data obtained do not correlate with the function indices and spasticity changes of posterior extremities.

The maximum value of the IHL FI after transplantation has been observed at the level of (3,6±0,5) points BBB). Significant differences between the IHL FI values of the groups TOBT, TFCT and TFKT have not been observed during the experiment. A common feature of the dynamics of the three experimental groups is prevalence of IHL FI values over the control during the first few weeks and lack of progression during further period of observation. The increase ($p<0.05$) of spasticity index was recorded in the control groupe during the period of 1^{st}-2^{nd} and 5^{th} months, in the groupe TOBT — during the period of 1^{st}–2^{nd} and 6^{th} month, in the groupe TFCT — during the 3^{rd} week, in the groupe TFKT — during the 2^{nd} week. At the 7^{th} day rate of spasticity in the TFCT and TFKT reached 1 point of Ashworth scale, in the TOBT and control groupe — was at 0 point. Within 2^{nd}–4^{th} weeks noted a high (TFCT, TFKT), intermediate (*control groupe*) and low (TOBT) level of spasticity. The level of spasticity in the groups TFCT and TFKT exceeded ($p<0.05$) the indicator of control groupe during the 1^{st}–3^{rd} and 1^{st}–2^{nd} weeks, respectively. The level of spasticity in the group TOBT conceded ($p<0.05$) values of the control group (*2^{nd} week*), TFCT (*1^{st}–6^{th} week*) and TFKT (*1^{st}–3^{rd} week*). At the 24^{th} week of observation level of spasticity in experimental groups was 2.6±0.4 (*control groupe*), 2.2±0.2 (TOBT), 2.1±0.3 (TFCT) and 1.9±0.3 (TFKT). In 59 % of the animals in the groupe TOBT noted early debut of spasticity with flexion-adduction installation in hip and knee and peripheral paresis (hypotonia/atony) at the ankle joint. Similar spastic installation was noted in 40 % of the animals in the groupe TFCT (*for 2^{nd} month*) and 25 % of the animals in the groupe TFKT (*during 1^{st}–2^{nd} week*). In the control group signs of severe neurogenic pain in the remote period was found in 19 % of animals, in the group TOBT — in 27 %, in the groupe TFCT — in 6 % (*1 animal*), in the groupe TFKT — was not observed. In general, approved types of neurotransplantation exert significant influence on the course of spasticity syndrome; the mechanisms of influence related to the cellular structure, angiogenic and immunogenic properties of the grafts.

Neural stem cells, bone marrow stem cells and neural crest stem cells xenotransplantation in association with macroporous hydrogel matrix provide recovery of motor function of paretic limb to a level ~ 13 points, exceeding the reference value by 4 times, it provides for a tendency towards potentiation of the NeuroGel positive impact on the course of the spinal cord injury, efficiency of this influence significantly depends on the sex of recipient and donor organism. Restriction of spontaneous locomotor activity slows paretic limb motor function recovery during 1^{st} month, reduces the duration of significant recovery in the late period of injury, accelerates the formation of stable spasticity syndrome

In the stratum of matrix, implanted in association with stem cells, strong prolifirations of fibers of recipient spinal cord are being formed, including varicose axon branches; transplanted cells are stored for at least 7 months and differentiated by neuronal phenotype.

In the dynamics of observation most experimental groups, except foreign body implantation and olfactory bulb tissue transplantation, are characterized by the absence or positive correlation between the mean values of function and spasticity.

The practical significance of the results. To significantly improve the recovery process after spinal cord injury and reduce spasticity it is desirable to use transplantation

of the clinically available stem cells of bone marrow stroma and derivatives of neural crest as well as GABA-producing cells in combination with macroporous hydrogel matrix providing equisexuality of a donor and a recipient of transplanted cells, involving physical rehabilitation in the context of the gradual mobilization of organic paretic limbs and excluding pain afferentiation of spinal cord.

The clinical translation of the data obtained and introduction of the proven means of regenerative tissue neuro-engineering can significantly improve outcomes of spinal cord injury treatment.

Key words: spinal cord injury, spacticity, tissue engineering, regenerative neurosurgery.

АННОТАЦИЯ

Медведев В.В. Спастичность при травме спинного мозга: патогенетические механизмы и пути нейрохирургической коррекции средствами тканевой инженерии (*экспериментальное исследование*). — Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.05 — нейрохирургия. Государственное учреждение «Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины», Киев, 2016 г.

Исследование выполнено на белых беспородных крысах разного возраста и пола (*n=287; 23 экспериментальные группы*). В качестве модели травмы спинного мозга использовано левостороннее половинное пересечение в нижнегрудном отделе. Восстановительные нейроинженерные вмешательства выполняли немедленно после моделирования травмы, в зоне повреждения спинного мозга. Проведено ряд клинико-экспериментальных (*шкала BBB, шкала Ashworth*), лабораторных и инструментальных исследований. Уменьшение компрессии спинного мозга инородным телом в отдаленном периоде сопровождается увеличением двигательной функции и уменьшением спастичности паретической конечности. На уровне проявления посттравматической спастичности отмечали существенное увеличение стимулирующего влияния на возбуждающие нейроны студенистого вещества, уменьшение — на тормозные интернейрони. Ниже уровня травмы в веществе спинного мозга наблюдали уменьшение уровня мРНК триптофан-гидроксилазы–2 (*ипсилатерально*), везикулярного переносчика моноаминов Slc18a2 (*контрлатерально*), субъединицы AMPA-рецептора глутамата Gria3 (*билатерально*). В течении первого месяца трансплантация ткани фетального мозжечка потенцирует спастичность, зрелой обонятельной луковицы — угнетает, что коррелирует с медиаторной спецификой потомков нейрогенных клеток этих двох зон интактного мозга. Ксенотрансплантация нейрогенных стволовых клеток, стволовых клеток стромы костного мозга или нервного гребня, ассоциированных с макропористым гидрогелем, обуславливает восстановление двигательной функции паретической конечности в среднем на уровне 11 баллов шкалы BBB (*перевишая контрольные значения в 5 раз*), проявляет умеренный антиспастический эффект.

Ограничение спонтанной локомоторной активности или несоответствие пола донора и реципиента стволовых клеток в этих экспериментальных условиях ухудшает восстановление функции, ускоряет развитие спастичности. Трансплантированные клетки сохраняются в толще матрикса в течении не менее 7 мес., дифференцируются по нейрональному фенотипу. В динамике наблюдения для большинства экспериментальных групп характерна положительная корреляция между средними значениями функции и спастичности.

Ключевые слова: травма спинного мозга, спастичность, тканевая инженерия, восстановительная нейрохирургия.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ПСП	—	гальмівний постсинаптичний потенціал
ЗПСП	—	збуджуючий постсинаптичний потенціал
ГАМК	—	γ-аміномасляна кислота
ЛПП	—	лівобічний половинний перетин [*спинного мозку*]
мРНК	—	матрична рибонуклеїнова кислота
НСК	—	нейрогенна стовбурова клітина
ПЛР	—	полімеразна ланцюгова реакція
ПС ЗІК	—	показник спастичності задньої іпсилатеральної [*щодо місця травми*] кінцівки за шкалою Ashworth
ПФ ЗІК	—	показник функції задньої іпсилатеральної [*щодо місця травми*] кінцівки за шкалою BBB
$ПФ_{CER}$	—	показник функції статокоординаторної сфери тварини за шкалою BWT
СККМ	—	стовбурові клітини кісткового мозку
СКНГ	—	стовбурові клітини нервового гребня
ТТНЦ	—	трансплантація тканини нюхової цибулини
ТТФМ	—	трансплантація тканини фетального мозочка
ТТФН	—	трансплантація тканини фетальної нирки
AMPA (α-amino-3-hidroxy-5-metyl-4-osoxazole-propionat)	—	селективний агоніст однойменного типу глутаматних рецепторів
BBB (Basso–Beattie–Bresnahan)	—	шкала для оцінки дефіциту рухової функції задньої кінцівки щура
BWT (beam walking test)	—	тест "ходьби по бруску"
CER (cerebellum)	—	мозочок
$CΘRP_{ALIEN}$ (corpus alienum)	—	стороннє тіло; експериментальна група
GFP (green fluorescense protein)	—	зелений флюорисцентний білок
Gria (glutamate receptor, ionotropic, AMPA type)	—	тип глутаматних рецепторів
NG (NeuroGel)	—	макропористий гідрогель