

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СИСТЕМНОГО ПРИМЕНЕНИЯ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННО-ПЛАЦЕНТАРНОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЯЖЕЛОЙ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА

В.А. Смирнов¹, С.И. Рябов², М.А. Звягинцева², С.А. Базанович², Я.В. Морозова^{1, 2}, С.М. Радаев¹,
 А.Э. Талыпов¹⁻³, А.А. Гринь¹⁻³

¹ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»; Россия, 129090 Москва, Большая Сухаревская пл., 3;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. акад. Е.И. Чазова» Минздрава России; Россия, 121552 Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а;

³ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Владимир Александрович Смирнов vla_smirnov@mail.ru

Цель исследования – оценить эффективность внутривенного применения криоконсервированных моноклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека (МКПКЧ) в остром периоде контузионной травмы спинного мозга тяжелой степени в отношении двигательных функций задних конечностей и структуры посттравматических кист спинного мозга, используя клинически значимые методы исследования.

Материалы и методы. Исследование выполнено на взрослых крысах-самках линии Sprague–Dawley. Тяжелую контузионную травму спинного мозга моделировали по методу “weight-drop”. Для внутривенного введения использовали криоконсервированный концентрат МКПКЧ, хранившийся ранее в течение 3–4 лет при –196 °С. Двигательную функцию конечностей исследовали в открытом поле, используя шкалу оценки опорно-двигательного аппарата BBB для крыс. Магнитно-резонансное исследование проводили с применением высокопольного магнитно-резонансного томографа ClinScan 7.0 T (Bruker BioSpin, Германия).

Результаты. Внутривенное введение МКПКЧ в 1-е сутки после тяжелой контузионной травмы спинного мозга достоверно улучшает ($p < 0,05$) восстановление двигательной функции задних конечностей (до 40–50 %) по сравнению с контрольной группой. Кроме того, уже начиная с конца 1-й недели после травмы существенно (до 40 %) и достоверно ($p < 0,05$) уменьшается объем посттравматической кисты спинного мозга.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что системное применение криоконсервированных МКПКЧ эффективно способствует восстановлению двигательной функции задних конечностей и обеспечивает уменьшение объема посттравматической кисты спинного мозга, что подтверждает наличие нейропротективного эффекта.

Ключевые слова: травма спинного мозга, клеточная терапия, клетки пуповинно-плацентарной крови, нейропротекция

Для цитирования: Смирнов В.А., Рябов С.И., Звягинцева М.А. и др. Оценка эффективности системного применения моноклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека в остром периоде экспериментальной тяжелой травмы спинного мозга. Нейрохирургия 2023;25(4):20–30. DOI: <https://doi.org/10.17650/1683-3295-2023-25-4-20-30>

Evaluation of human mononuclear umbilical cord blood cells systemic administration efficiency in the acute period of experimental severe spinal cord injury

V.A. Smirnov¹, S.I. Ryabov², M.A. Zvyagintseva², S.A. Bazanovich², Ya.V. Morozova^{1, 2}, S.M. Radaev¹, A.E. Talypov¹⁻³, A.A. Grin¹⁻³

¹N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine, Moscow Healthcare Department; 3 Bolshaya Sukharevskaya Sq., Moscow 129090, Russia;

²E.I. Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Health of Russia; 15a 3rd Cherepkovskaya St., Moscow 121552, Russia;

³N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia

Contacts: Vladimir Aleksandrovich Smirnov vla_smirnov@mail.ru

Aim. To evaluate the efficiency of systemic (intravenous) application of cryopreserved human umbilical cord blood mononuclear cells (HUCBCs) in animal models of acute contusion spinal cord injury for the restoration of hind limb motor function and formation of posttraumatic cysts using clinically significant examination methods.

Materials and methods. Adult female Sprague–Dowley rats were used for the study. Severe acute contusion spinal cord injury model was performed using standard “weight-drop” method. All samples of cryopreserved HUCBCs concentrate were prestored prior to infusion for 3 to 4 years at -196°C . Hind limbs motor function was evaluated using open-field technique and standard BBB testing system. Magnetic resonance scanning was performed using high-field magnetic resonance ClinScan 7.0 T tomography (Bruker BioSpin, Germany).

Results. Intravenous infusions of HUCBCs were performed on day 1 following acute severe spinal cord injury. Motor function assessment demonstrated significant ($p < 0.05$) improvement of hind limbs motor function (up to 40–50 %) comparing to self-healing outcomes. Moreover, by the Day 4 and 5 after severe spinal cord injury, the volume of post-traumatic cystic cavity decreases significantly (up to 40 %) ($p < 0.05$).

Conclusion. The obtained results demonstrated that cryopreserved HUCBCs can be used as an effective source for cell therapy of acute contusion spinal cord injury.

Keywords: spinal cord injury, cell therapy, human umbilical cord blood mononuclear cells

For citation: Smirnov V.A., Ryabov S.I., Zvyagintseva M.A. et al. Evaluation of human mononuclear umbilical cord blood cells systemic administration efficiency in the acute period of experimental severe spinal cord injury. *Neyrokhirurgiya = Russian Journal of Neurosurgery* 2023;25(4):20–30. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1683-3295-2023-25-4-20-30>

ВВЕДЕНИЕ

Травма спинного мозга (ТСМ) является тяжелым повреждением структуры центральной нервной системы, приводящим не только к потере или глубокому нарушению сенсорных, моторных и вегетативных функций организма, но и к возможной смерти пострадавшего или глубокой и чаще всего пожизненной инвалидизации. Частота ТСМ оценивается в 10,4–83 случая на 1 млн человек в год с широкими колебаниями между регионами и странами. Чаще всего ТСМ встречается у молодых людей в возрасте 20–35 лет, т. е. в наиболее трудоспособной и активной группе населения. Поскольку частота благоприятного исхода после ТСМ составляет от 9 до 53 случаев на 1 млн жителей, потеря продуктивных лет жизни имеет огромные экономические и социальные последствия [1, 2].

Тяжесть состояния пострадавших и практически полное отсутствие эффективных патогенетических методов лечения приводят к крайне высокому уровню инвалидизации (до 80–85 % перенесших ТСМ становятся инвалидами I и II групп), что в дальнейшем требует пожизненного лечения в условиях неврологических стационаров и реабилитационных центров [3, 4].

В настоящее время продолжается поиск новых средств лечения ТСМ, позволяющих улучшить состояние функций спинного мозга и восстановить его структуру (либо уменьшить степень его повреждения) после его травматического повреждения. В частности, большой интерес вызывает возможность применения клеточной терапии, которая может быть перспективным методом лечения при повреждениях спинного мозга [5, 6].

Клетки пуповинно-плацентарной крови человека как один из наиболее доступных и эффективных источников клеточного материала многократно успешно применялись в ряде клинических исследований при различных патологиях — кардиологических, сосудистых, печеночных, мышечных, неврологических и психических, включая инсульт, травму спинного и головного мозга, церебральный паралич, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, сердечную и печеночную недостаточность, депрессию, шизофрению и аутизм [7].

Проблемой проведения клинических исследований с применением ТСМ является их зависимость от стандартизированных показателей неврологической функции для регистрации пациентов (что плохо учитывает гетерогенность механизмов развития травматического процесса, локализации, тяжести и генетики пациента), а также оценки эффективности лечения. В целом вероятность выявления 2 идентичных случаев ТСМ у пострадавших людей близка к нулю, что в значительной степени затрудняет оценку эффективности любого вида проводимой терапии вследствие невозможности стандартизации.

В свою очередь, животные модели значительно более стандартизованы, хорошо контролируются, позволяют исследовать возможности лечения ТСМ *in vivo*, что является важным шагом на пути к клиническому применению любого метода терапии. Одна из экспериментальных моделей — контузия (ушиб) спинного мозга, который имитирует наиболее часто встречающуюся форму повреждения спинного мозга у человека [8–10].

Осложненные переломы либо вывихи позвоночного столба приводят к повреждению структур нервной системы, в том числе спинного мозга, что, в свою очередь, формирует очаг ушиба (контузионный очаг) и кровоизлияние в ткань спинного мозга. Аналогичное повреждение спинного мозга у крысы с точки зрения нарушения двигательной активности конечностей и морфологических изменений в спинном мозге наиболее близко к таковому у человека, что позволяет использовать подобную модель для оценки эффективности лечения и может представлять интерес для практической медицины [11].

Во многих доклинических исследованиях было показано, что применение клеточной терапии, и клеток пуповинно-плацентарной крови в частности, способствует восстановлению двигательной функции конечностей. В своей работе мы также обратили внимание на то, что системное применение клеток пуповинно-плацентарной крови обеспечивает достоверное и значительное уменьшение объема посттравматической кисты спинного мозга, неизбежно присутствующей во всех случаях ушиба спинного мозга. Это предполагает наличие у моноклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека (МКПКЧ) нейропротективного действия. Тем не менее ни в одной работе авторы не оценивали корреляцию между функциональными исходами клеточной терапии и динамикой объема посттравматической кисты.

Цель исследования — оценить эффективность внутривенного применения криоконсервированных МКПКЧ в начале острого периода контузионной ТСМ тяжелой степени в отношении двигательных функций задних конечностей и структуры посттравматических кист спинного мозга, используя клинически значимые методы исследования — магнитно-резонансную томографию (МРТ) и оценку неврологического статуса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на взрослых крысах-самках линии Sprague—Dawley с массой тела 230—250 г, содержащихся в индивидуальных клетках в стандартных условиях экспериментально-биологической лаборатории с режимом освещения 12/12 ч, свободным доступом к воде и пище. Животные были получены из Пушкинского животноводческого комплекса — филиала ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН (Пушино, Московская обл., Россия). Все протоколы экспериментов были утверждены в соответствии с этическими и научными рекомендациями Минздрава России (приказ от 19.06.2003 № 267) и Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р 53434—2009, а также правилами содержания и ухода за экспериментальными животными, что согласуется с директивами Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований.

Техника операции и моделирование травмы. Тяжелую контузионную ТСМ моделировали по методу “weight-drop” [12]. Подобная травма не позволяет крысе достичь полного восстановления двигательной активности конечностей путем самовосстановления. После наркотизации животных (внутрибрюшинного введения 5 % раствора кетамина (100 мг/кг) и 2 % раствора ксилазина (20 мг/кг)) проводили ламинэктомию на уровне Th₉-позвонка и фиксировали позвоночник клипсами за остистые отростки позвонков Th₈ и Th₁₀. При кровотечении для качественного гемостаза и уменьшения воздействия на дуральный мешок применяли гемостатическую матрицу Surgiflo с тромбином. Контузионную травму моделировали металлическим стержнем диаметром 2 мм и весом 10 г, вертикально падающим с высоты 25 мм. После контузии мышцы и кожу ушивали наглухо (рис. 1). В течение 7 дней после

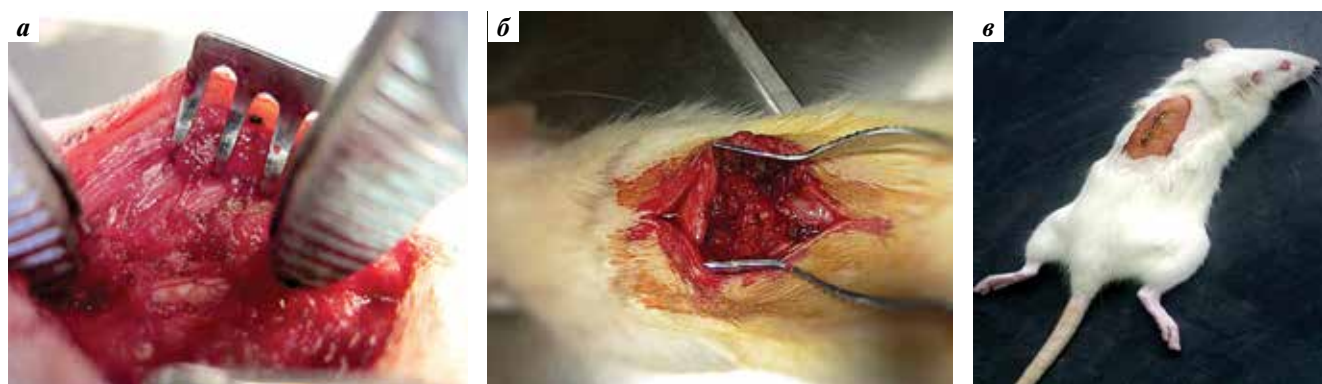


Рис. 1. Этапы моделирования контузионной травмы спинного мозга (ТСМ) у лабораторной крысы: а — вид операционной раны перед нанесением ТСМ: выполнена ламинэктомия Th₉-позвонка, визуализирована дорсальная поверхность спинного мозга; б — вид операционной раны после нанесения ТСМ: визуализируется parenchymatous гематома в структуре спинного мозга; в — крыса после ушивания раны: определяется задняя паралич после нанесения контузионной ТСМ

Fig. 1. Stages of spinal cord contusion (SCC) modeling in a lab rat: а — surgical wound prior to SCC application: laminectomy of the Th₉ vertebra is performed, the dorsal surface of the spinal cord is visualized; б — surgical wound after SCC application: parenchymatous hematoma in the spinal cord structure is visualized; в — rat after wound closure: anterior paraplegia after SCC is observed

операции животные получали антибактериальную терапию — гентамицина сульфат (1 мг/кг массы тела внутримышечно). Цитостатические средства не применяли. В первые 2–5 сут после травмы проводили ручной массаж передней брюшной стенки для опорожнения мочевого пузыря до регресса задержки мочеиспускания [13].

Образцы МКПКЧ. Кριοконсервированный концентрат МКПКЧ, хранившийся в течение 3–4 лет при -196°C (карантинизация образцов и хранение в жидком азоте), был предоставлен специализированным криобанком (ООО «Крио Центр», Москва) на безвозмездной основе. Перед введением клетки размораживали, отмывали от криопротектора и ресуспендировали в физиологическом растворе [14]. Количество живых клеток в образце оценивали перед введением с помощью окраски трипановым синим красителем. При оценке жизнеспособности во всех случаях число живых клеток составляло 93–95 %.

Экспериментальные группы. После нанесения травмы крысы были случайным образом разделены на 3 группы: 1) контрольная группа (самовосстановление) ($n = 7$) — введение 1 мл физиологического раствора в хвостовую вену через сутки после травмы; 2) группа клеточной терапии на 1-е сутки ($n = 6$) — введение 10×10^6 МКПКЧ в 1 мл физиологического раствора в хвостовую вену на 1-е сутки после нанесения ТСМ; 3) группа клеточной терапии на 5-е сутки ($n = 5$) — введение 10×10^6 МКПКЧ в 1 мл физиологического раствора в хвостовую вену на 5-е сутки после нанесения ТСМ.

Оценку эффективности клеточной терапии проводили клинически значимыми методами.

Оценка неврологического статуса. Двигательную функцию конечностей оценивали стандартным методом в открытом поле, используя стандартную шкалу оценки опорно-двигательного аппарата BBB для крыс [15]. Перемещение предварительно приученных к тестированию животных фиксировали визуально и с помощью видеозаписи в открытом поле размером 75×125 см в течение 4 мин с последующей оценкой по 21-балльной шкале, где 0 баллов — полное отсутствие движений задних конечностей, 21 балл — последовательная и координированная походка здорового животного с параллельным расположением лап задних конечностей и постоянной устойчивостью туловища.

Оценку проводили 2 независимых эксперта вслепую (без маркировки номера животного и группы). Тесты выполняли еженедельно в течение 5 нед, начиная с 7-го дня после ТСМ. Координацию движений конечностей также проверяли с помощью теста «сужающаяся дорожка» [16].

Диагностика и оценка повреждений спинного мозга с помощью МРТ. МРТ является «золотым стандартом» изучения структуры мягких тканей и диагностики

повреждения структур центральной нервной системы, в том числе и ТСМ. Всем пациентам, поступающим в стационар с подозрением на наличие осложненной травмы позвоночника, помимо компьютерной томографии для оценки костных структур позвоночного столба, в обязательном порядке выполняют МРТ для оценки структуры спинного мозга, диагностики возможных повреждений спинного мозга и его корешков, травматических повреждений межпозвонковых дисков либо выявления интраканальных кровоизлияний [17]. В большинстве случаев у людей для диагностики повреждений спинного мозга используют аппараты МРТ мощностью от 0,3–0,5 до 3 Тесла. Однако для малых лабораторных животных такая напряженность магнитного поля, а особенно большой диаметр гентри аппарата, не подходят. В аналогичном диагностическом процессе у животных моделей могут применяться сверхвысокопольные МРТ-аппараты с малым гентри.

В данном исследовании МРТ проводили с использованием сверхвысокопольного аппарата ClinScan 7,0 Тесла (Bruker BioSpin, Германия) — специализированного магнитно-резонансного томографа для малых лабораторных животных. Для анализа использовали Т2-взвешенные изображения в аксиальной, сагиттальной и фронтальной плоскостях, которые были получены при следующих параметрах сканирования: TR = 40 мс, TE = 29 мс, базовое разрешение 320×230 , FOV 45×32 мм, угол поворота 15° , толщина среза 0,5 мм. Также ориентировочно в ряде случаев использовали МРТ-миелографию.

Анализ МРТ-изображений и вычисление объема посттравматических кистозных полостей проводили в течение 6 нед после ТСМ в аксиальных, сагиттальных и фронтальных проекциях с помощью специализированных программ просмотра DICOM-изображений RadiAnt DICOM Viewer (Medixant, Польша) и MicroDicom 3.9.5.666 (MicroDicom Ltd., Болгария), широко используемых в клинической практике. На выделенных изображениях оценивали структуру полостей очага ушиба спинного мозга и размер полости с вычислением 3 поперечных радиусов. Посттравматические кисты спинного мозга в подавляющем большинстве случаев имеют форму, близкую к эллипсоиду, что позволяет проводить расчет объема полости с применением стандартной формулы объема эллипсоида:

$$V = \frac{4}{3} \times \pi \times a \times b \times c,$$

где показатели a , b , c — радиусы (полуоси) эллипсоида (рис. 2).

Радиус a являлся половиной длины полости в сагиттальной либо фронтальной проекции, проходящей через эпицентр полости, радиус b — половиной переднезаднего размера полости в сагиттальной проекции, проходящей через эпицентр полости, радиус

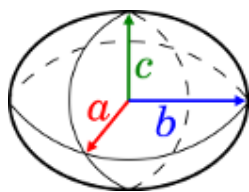


Рис. 2. Радиусы (полуоси) эллипсоида для расчета объема полости

Fig. 2. Ellipsoid radii (semi-axes) for calculation of cavity volume

c — половиной ширины полости во фронтальной или аксиальной проекции, проходящей через эпицентр полости (рис. 3).

Статистический анализ. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Microsoft SPSS Statistics 25.0. Для обработки данных и сравнения результатов в отдельных группах использовали однофакторный дисперсионный анализ

и критерий Ньюмена—Кейлса. Достоверными считали различия при $p < 0,05$. Данный критерий был выбран для сравнения нескольких выборок параметрических данных, также он часто используется для анализа эффективности применения лекарственных средств у различных групп пациентов. Результаты представлены как среднее значение и ошибка среднего ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка динамики двигательных функций. В 1-е сутки после TCM в обеих группах животных отмечалось развитие задней параплегии. Также наблюдалось развитие нарушения функции тазовых органов, преимущественно в виде задержки мочеиспускания, которая регрессировала через 3–5 сут после TCM.

Показано, что у животных, получавших клеточную терапию после TCM, восстановление двигательной

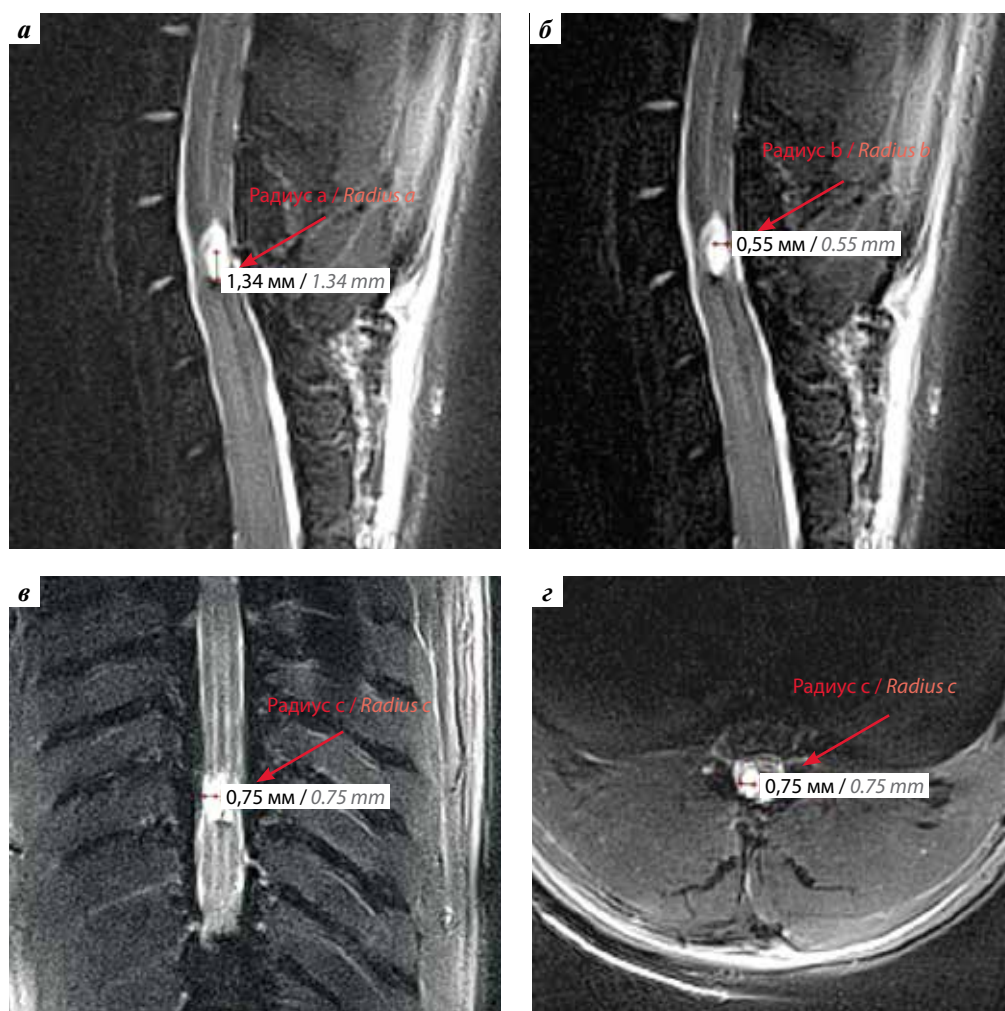


Рис. 3. Расчет объема посттравматической кистозной полости на основании ее размеров, оцениваемых по данным магнитно-резонансных томограмм (томограф ClinScan, Brucker BioSpin, Германия). T2-взвешенные изображения: сагиттальная (а, б), фронтальная (в) и аксиальная (г) проекции, центрированные по посттравматической полости. Радиусы, измеряемые на каждом изображении, отмечены стрелками

Fig. 3. Calculation of posttraumatic cystic cavity volume based on its size determined using magnetic resonance images (ClinScan tomograph, Brucker BioSpin, Germany). T2-weighted images: sagittal (a, б), frontal (в) and axial (г) projections centered on the posttraumatic cavity. Arrows show radii measured on every image

активности задних конечностей происходит быстрее и в значительно более высокой степени, чем в контрольной группе, причем показатели достоверно различаются уже на 2-й неделе после травмы (рис. 4). На 4-й и 5-й неделях после травмы средние баллы BBB в группе самовосстановления составили $4,7 \pm 0,9$ и $5,3 \pm 0,7$ соответственно, т.е. были отмечены слабые движения в 3 суставах — тазобедренном, коленном и голеностопном. В группах животных, которым вводили МКПКЧ, восстановление движений в эти же сроки составило $7,3 \pm 0,6$ и $7,5 \pm 0,6$ балла, что соответствует более экстенсивным движениям в суставах задних конечностей. Таким образом, введение МКПКЧ достоверно ($p < 0,05$) улучшает восстановление двигательной функции задних конечностей (до 40–50 % по сравнению с контрольной группой). Кроме того, достоверных различий между группами проведения клеточной терапии на 1-е и 5-е сутки после ТСМ выявлено не было (см. рис. 4).

Следует отметить, что в тесте «сужающаяся дорожка», при выполнении которого необходимо наличие функции поддержания веса и координации движений передних и задних конечностей у крыс, положительного эффекта клеточной терапии МКПКЧ отмечено не было. Учитывая низкую чувствительность данного

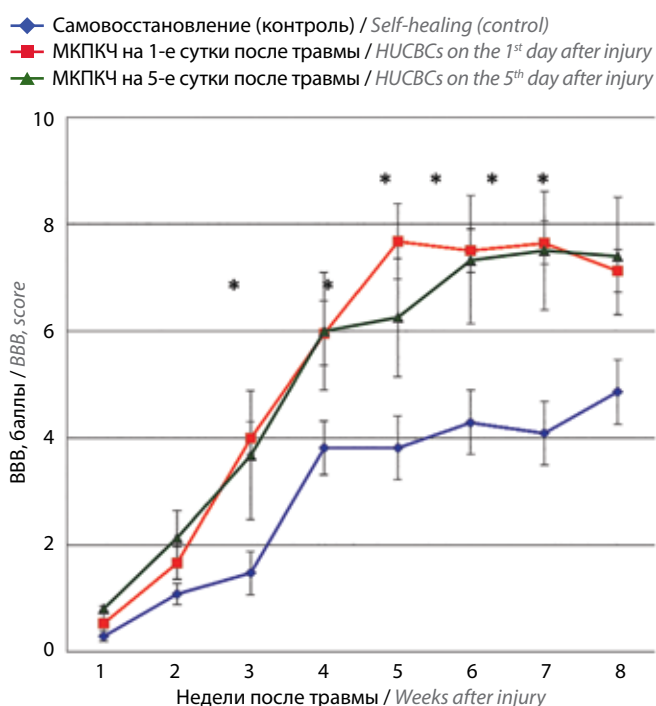


Рис. 4. Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей у крыс после травмы (ушиба) спинного мозга: при самовосстановлении и после клеточной терапии с использованием мононуклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека (МКПКЧ) на 1-е и 5-е сутки. Система оценки BBB в открытом поле. * $p < 0,05$

Fig. 4. Dynamics of recovery of motor activity of the hind limbs in rats after injury (bruising) of the spinal cord: during self-recovery and after cell therapy using human umbilical cord blood mononuclear cells (HUCBCs) on days 1 and 5. BBB scoring system in the open field. * $p < 0.05$

теста (выполнение необходимой активности требует от животного достаточно высокого уровня двигательной активности), грубый двигательный дефицит животных не позволяет достоверно выявить какие-либо различия. В дальнейшей работе данный тест мы не использовали ввиду его неэффективности.

Диагностика и оценка повреждений спинного мозга с помощью МРТ. При выполнении МРТ на 2-е сутки после нанесения травмы наблюдалось формирование интрамедуллярной гематомы в ткани спинного мозга. В последующих исследованиях, проведенных с интервалом в 1 нед, у животных отмечалось продолжающееся формирование контузионного очага и образование посттравматических кистозных полостей (рис. 5). На 4-й и 5-й неделях после травмы на МРТ-изображениях визуализируются типичные патологические изменения в ткани спинного мозга в виде посттравматических кистозных полостей, которые имеют высокую интенсивность на T2-взвешенных изображениях. Такая посттравматическая киста окружена зоной рубцовой ткани, гистологически состоящей из прилегающего непосредственно к кисте более тонкого слоя астроцитов (астроглиальный рубец) и располагающегося более наружно значительно более толстого слоя фиброцитов (фиброзный рубец). Таким образом, к 4–5-й неделям после ТСМ у животных наблюдается формирование полноценной кистозно-глиозно-фиброзной трансформации поврежденных зон спинного мозга. Участки подобной трансформации в значительной степени препятствуют дальнейшей репарации нервной ткани и «запечатывают» зону повреждения, не позволяя проникать внутрь нее многим биологически активным факторам.

Определение объема посттравматической кистозной полости ручным методом расчета на основе T2-взвешенных изображений МРТ на протяжении 6 нед после ТСМ показало, что в группе самовосстановления на 4-й неделе после ТСМ среднее значение объема составило $9,2 \pm 0,9$ мм³, в группе введения МКПКЧ на 1-е сутки — $3,7 \pm 0,4$ мм³, в группе введения МКПКЧ на 5-е сутки — $4,2 \pm 0,8$ мм³. Аналогичный показатель на 5-й неделе составил в контрольной группе $8,5 \pm 0,7$ мм³, в группе клеточной терапии на 1-е сутки — $3,08 \pm 0,3$ мм³, в группе клеточной терапии на 5-е сутки — $3,94 \pm 0,7$ мм³ соответственно (см. таблицу). Также в значительной степени различались максимальные показатели объема контузионного очага: 23,9 мм³ на 2-й неделе после ТСМ в контрольной группе, 8,1 мм³ на 3-й неделе в группе клеточной терапии на 1-е сутки после ТСМ и 6,5 мм³ в группе клеточной терапии на 5-е сутки после ТСМ (см. таблицу).

На примере 15 животных, разделенных на 3 группы, было показано, что введение МКПКЧ на 1-е или 5-е сутки после нанесения ТСМ достоверно уменьшает объем контузионного очага, формируемого в спинном мозге, в 2,6–3,3 раза. Для небольших

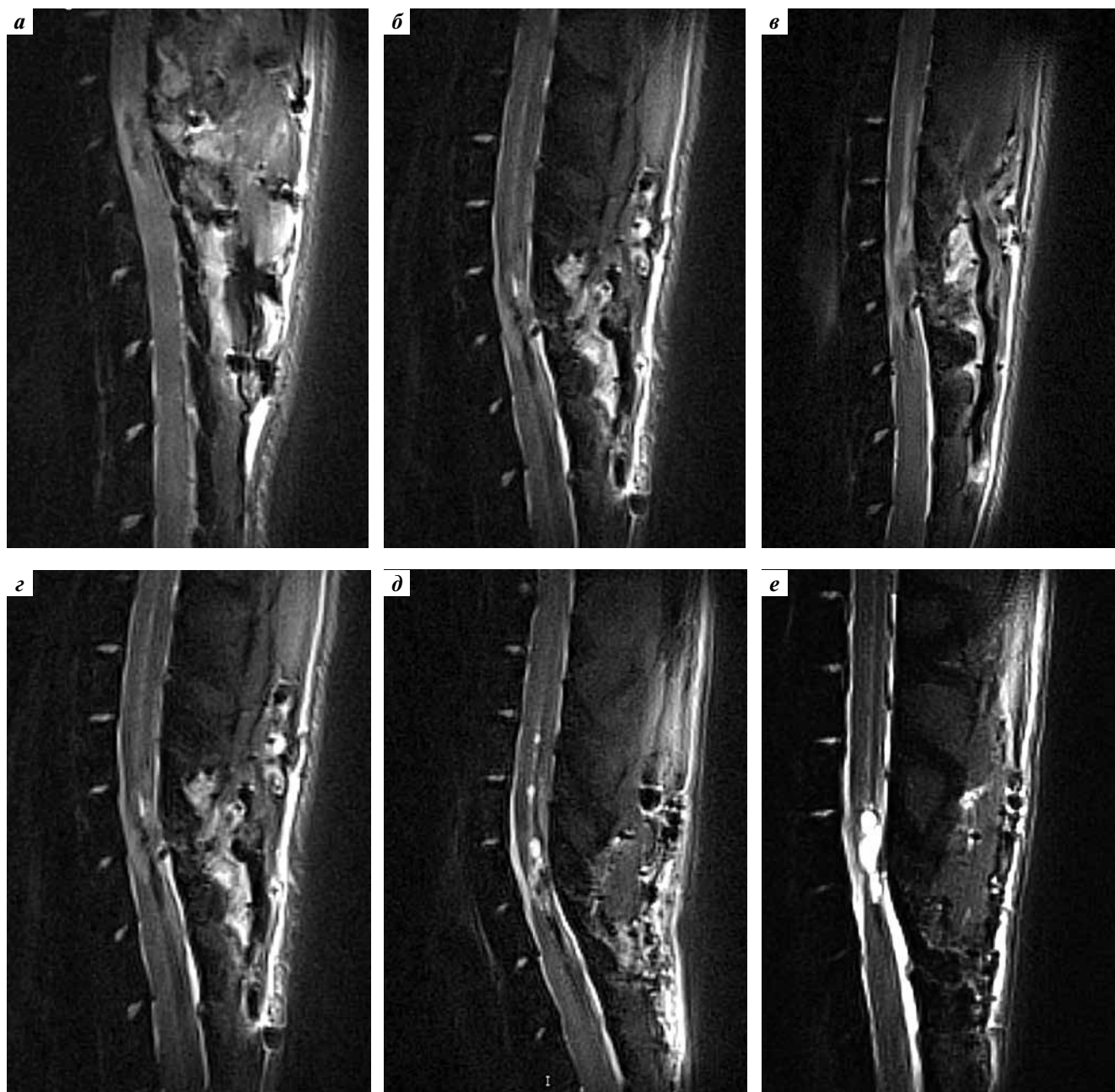


Рис. 5. Динамика изменений структуры спинного мозга после нанесения контузионной травмы спинного мозга у крысы по данным магнитно-резонансных томограмм (сагиттальные срезы, T2-взвешенные изображения): а – 2-е сутки после травмы; б – 1 нед после травмы; в – 2 нед после травмы; г – 3 нед после травмы; д – 4 нед после травмы; е – 5 нед после травмы. В раннем периоде после травмы спинного мозга визуализируется гипоинтенсивный на T2-взвешенных изображениях сигнал, соответствующий parenchymatозной гематоме в ткани спинного мозга (а–в), а также отмечается наличие крови в расширенном центральном канале спинного мозга (а). Слабогиперинтенсивный сигнал в зоне повреждения и вокруг нее соответствует перифокальному отеку (а–г). С течением времени гипоинтенсивный сигнал регрессирует (ретракция сгустков крови и устранение детрита) (г, д), слабогиперинтенсивный сигнал перифокального отека также регрессирует (д). Начинает проявляться гиперинтенсивный сигнал с четкой границей, соответствующий формирующейся посттравматической кистозной полости, заполненной цереброспинальной жидкостью (д, е). Также обращает на себя внимание значительное уменьшение толщины спинного мозга, что является следствием ретракции тканей на фоне формирования кистозно-глиозно-фиброзной трансформации поврежденных зон спинного мозга (д, е)

Fig. 5. Dynamics of changes in the spinal cord after spinal cord contusion in rats per magnetic resonance imaging (sagittal sections, T2-weighted images): а – day 2 after injury; б – 1 week after injury; в – 2 weeks after injury; г – 3 weeks after injury; д – 4 weeks after injury; е – 5 weeks after injury. In the early period after spinal cord injury, hypointense signal is visualized on the T2-weighted images corresponding to parenchymatous hematoma in the spinal cord tissue (а–в), and blood is observed in the extended central canal of the spinal cord (а). Weak hyperintense signal in the injured area and around it corresponds to perifocal edema (а–г). With time, hypointense signal regresses (retraction of blood clots and dendrite elimination) (г, д), weak hyperintense signal of the perifocal edema also regresses (д). Hyperintense signal with a clear boundary appears corresponding to posttraumatic cystic cavity filled with cerebrospinal fluid (д, е). Additionally, significant decrease in spinal cord thickness is observed which is a consequence of tissue retraction during cystic gliotic fibrous transformation of the injured areas of the spinal cord (д, е)

Результаты оценки объема контузионного очага у животных 3 групп ручным методом по данным магнитно-резонансной томографии (МРТ)
Results of manual evaluation of contusion lesion volume in animals of the 3 groups based on magnetic resonance imaging (MRI) data

MPT № MRI No	Объем контузионного очага у животных, мм ³ Contusion lesion volume in animals, mm ³																
	Группа клеточной терапии на 5-е сутки после травмы Cell therapy group on day 5 after injury					Группа клеточной терапии на 1-е сутки после травмы Cell therapy group on day 1 after injury					Контрольная группа (самовосстановление)* Control group (self-recovery)*						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14**	15**	16	18
I	1,6	2,1	2,8	3	2,9	2,7	2,2	2,5	2,1	2,4	3,1	2,4	2,9	1,2	—	2,9	2,2
II	4,5	4	3,2	4,7	4,6	4	3,8	4,1	4,5	5	9,6	6,9	12,3	1,19	—	23,9	14,7
III	5	4,8	6,3	6,5	6,5	8,1	4	4,9	5,4	6,7	18,5	13	19,3	1,9	4,6	19	15,9
IV	4,2	4,5	4	4,4	5,5	4	3,6	3,8	5,2	4,5	12,4	6,1	11,7	1,9	—	14,9	12
V	4	4,1	3,8	4,2	5,3	3,7	2,5	3,3	4,8	4,3	9	6	9,3	1,9	—	11,4	10,4
VI	3,4	3,8	3,8	4,1	4,6	3,3	2,1	2,6	3,3	4,1	8	6,1	7,8	2	—	10,9	9,6
VII	3,8	4	4,7	6,4	—	5,2	4,2	3,2	—	—	12,8	—	12,1	—	—	—	18,6

* Введение физиологического раствора на 1-е сутки после травмы. ** Исключенные животные.

* Injection of physiological solution on day 1 after injury. ** Excluded animals.

размеров спинного мозга крысы этот показатель является значимым. При сравнении экспериментальных групп с введением МКПКЧ на 1-е и 5-е сутки после нанесения травмы была выявлена достоверная однонаправленная динамика, свидетельствующая о более высокой эффективности проведения клеточной терапии на 1-е сутки, однако разница в средних показателях была небольшой (рис. 6).

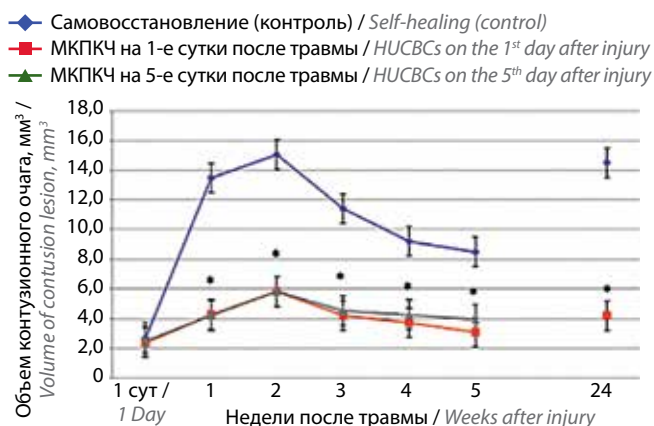


Рис. 6. Динамика объема контузионного очага при контузионной травме спинного мозга тяжелой степени у крыс: в контрольной группе (самовосстановление) и в 2 опытных группах — клеточной терапии на 1-е и 5-е сутки. Отмечается достоверное и значительное уменьшение объема контузионного очага в обеих опытных группах по сравнению с контрольной группой. Между опытными группами достоверных различий выявлено не было. *Достоверные различия, $p < 0,05$

Fig. 6. Dynamics of contusion lesion volume in severe spinal cord contusion injury in rats: in the control group and 2 treatment groups — cell therapy on day 1 and day 5. Significant decrease of the lesion volume in the treatment groups compared to the control group is observed. Between the treatment groups, no significant differences were observed. *Significant differences, $p < 0.05$

Наиболее показательным является конец острого периода травматического процесса, который в случае модели ТСМ у крысы соответствует 4–5-й неделям после травмы. Анализ полученных показателей свидетельствует о том, что клеточная терапия с применением МКПКЧ существенно (до 40 % по сравнению с контрольной группой) и достоверно ($p < 0,05$) способствует уменьшению объема посттравматической кистозной полости у животных моделей контузионной ТСМ тяжелой степени в остром периоде (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ

Лечение травматических повреждений спинного мозга остается клинически и социально значимой нерешенной медицинской проблемой. Все доступные на сегодняшний день методы лечения являются, по сути, паллиативными и направлены на создание условий для самовосстановления спинного мозга. Тем не менее эффективность восстановления поврежденных тканей спинного мозга, как и его функций, крайне низка, и хорошие исходы лечения наблюдаются только в случае относительно негрубого повреждения. При наиболее тяжелых повреждениях (неврологический дефицит на уровне ASIA A или B) в подавляющем большинстве случаев значимого восстановления не происходит.

С учетом этих аспектов значимость разработки новых, более эффективных и направленных в первую очередь на факторы вторичного повреждения спинного мозга методов представляется крайне высокой. Технологии регенеративной терапии, и в частности клеточная терапия, доказали свою эффективность во многих доклинических и ряде клинических исследований.

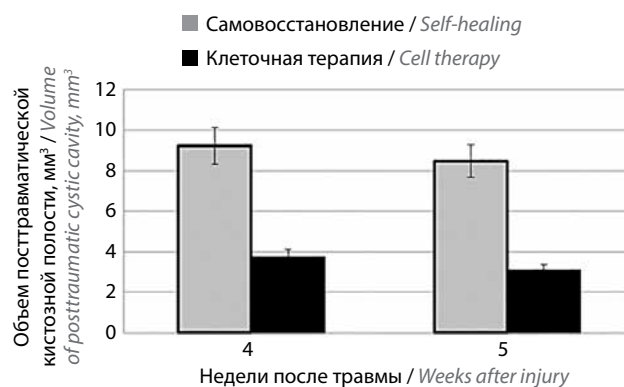


Рис. 7. Объем посттравматической кистозной полости на 4-й и 5-й неделях после травмы при самовосстановлении и после клеточной терапии с использованием мононуклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека (средний показатель по 2 опытным группам). * $p < 0,05$

Fig. 7. Volume of the posttraumatic cystic cavity at weeks 4 and 5 after injury during self-recovery and after cell therapy using mononuclear cells from human umbilical-placental blood (mean value in 2 treatment groups). * $p < 0.05$

Однако в большинстве опубликованных работ авторы концентрируют свои усилия на оценке эффективности регенеративного действия клеток, тогда как нейропротективное действие зачастую остается за кадром.

Это связано с тем, что эффективность воздействия клеточной терапии на восстановление функции или структуры спинного мозга оценивать достаточно просто: для оценки динамики функций спинного мозга существует множество тестов, как объективных, так и более субъективных. Нейропротективное же действие оценить значительно сложнее.

В случае ТСМ одним из параметров, оцениваемых в рамках изучения именно нейропротекции, являются размеры зоны посттравматических изменений спинного мозга. При контузионных повреждениях в отдаленном периоде травмы в структуре спинного мозга неизбежно формируется посттравматическая киста. Эта киста не является неким «дополнительным» образованием, как, например, опухоль. По сути, эта киста начинает существовать непосредственно в момент травмы, но в раннем периоде процесса она заполнена гематомой и/или детритом. В последующем детрит исчезает, вследствие чего киста себя «проявляет». Однако важным моментом является формирование комплексной измененной структуры вокруг кисты. Учитывая сложные взаимоотношения между слоями формирующегося рубца, в данном случае целесообразно говорить о комплексной кистозно-глиозно-фиброзной трансформации поврежденного спинного мозга. Данная структура в значительной степени препятствует восстановлению нормальной структуры нервной ткани. Поэтому потенциальная способность клеточной терапии предотвращать развитие этой трансформации или хотя бы уменьшать ее степень является очень важным фактором.

Известно, что сама травма позвоночного столба является первичным фактором повреждения спинно-

го мозга. При этом с момента травмы начинает действовать комплекс факторов вторичного повреждения спинного мозга, включая отек, инфильтрацию нервной ткани иммунными клетками (нейтрофилами и макрофагами), привлечение макрофагами формирующей фиброзную часть рубца фибробластов, асептический воспалительный ответ, многократное повышение концентрации биологически активных факторов и т.д. Факторы вторичного повреждения действуют на протяжении долгого времени после самой травмы и в значительной степени усугубляют степень повреждения спинного мозга. Следует отметить, что в первые часы и дни после ТСМ нервная ткань, занятая эпицентром ушиба, погибает, тогда как окружающая ткань, занятая зоной перифокального отека, сохраняет жизнеспособность на протяжении некоторого времени. По сути, данный паттерн является аналогом зоны пенумбры при развитии ишемического инсульта головного мозга. Важно учитывать, что нейроны и их аксоны, располагающиеся в этой окружающей эпицентр ушиба зоне, могут выжить при определенных условиях. Именно на них направлено нейропротективное действие клеточной терапии. И косвенным признаком подобной нейропротекции является размер посттравматической кисты спинного мозга. Этот параметр удобен для анализа, так как применение высокоточных методов визуализации (например, высокопольной МРТ) позволяет с высокой степенью достоверности оценить его.

Таким образом, основной целью данной работы было сравнение размеров зоны посттравматических изменений спинного мозга при использовании клеточной терапии и без нее, что позволяет судить о наличии нейропротективного действия у МКПКЧ. Мы применили метод ручного расчета размеров кисты спинного мозга для сравнения животных из опытных и контрольной групп.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что МКПКЧ, введенные внутривенно через 1 либо 5 сут после ТСМ, способствуют восстановлению двигательной функции задних конечностей у животных вплоть до возможности осуществления экстенсивных движений в 3 суставах (голеностопном, коленном и тазобедренном). Часть животных способны поддерживать массу тела в покое, но не при ходьбе, тогда как большинство животных способны передвигаться по поверхности с определенными ограничениями. Улучшение динамики восстановления движений отмечается уже на 2-й неделе после травмы. Однако в течение тех же 2 нед после ТСМ по данным МРТ между 2 группами животных не обнаружено значимых различий в изменениях в структуре спинного мозга, связанных с последующим формированием посттравматических кистозных полостей. На 4-й неделе уровень восстановления движений начинает стабилизироваться, а на МРТ-изображениях просматривается начало формирования типичных посттравматических кист спинного мозга.

Таким образом, введение МКПКЧ на 1-е или 5-е сутки после нанесения ТСМ достоверно уменьшает объем контузионного очага, формируемого в спинном мозге, в 2,6–3,3 раза. Для небольших размеров спинного мозга крысы этот показатель является значимым. При сравнении экспериментальных групп с введением клеток пуповинной крови на 1-е и 5-е сутки после нанесения травмы была выявлена достоверная однонаправленная динамика, свидетельствующая о более высокой эффективности проведения клеточной терапии на 1-е сутки, однако разница в средних показателях была небольшой. В первых 3 исследованиях разницы в объеме очага контузии в обеих группах не было, тогда как в 4-м исследовании разница составила 0,3 мм³. В дальнейшем разница в объеме очага увеличилась до 0,56 и 0,86 мм³ соответственно. Полученные данные подтверждают предположение о том, что нейропротективное действие клеток действительно способствует сохранению волокон спинного мозга и предотвращает вторичное повреждение нейронов и аксонов. На ранних стадиях травматического процесса, когда основное повреждающее действие оказывает накапливающаяся в ткани кровь (очаг гематомии), а сам контузионный очаг находится в стадии формирования, введенные на 1-е либо 5-е сутки клетки только начинают оказывать свое действие. Однако, учитывая достоверные различия между экспериментальными группами, можно говорить о более высокой эффективности клеточной терапии на 1-е сутки после травмы.

Тем не менее необходимо отметить, что, несмотря на явную корреляцию динамики размеров посттравматической кисты спинного мозга и динамики восстановления утраченных функций спинного мозга, значение могут иметь также локализация и структура

самой кисты. При этом мы не можем быть абсолютно уверены в том, что размер кисты действительно все-сторонне отражает функциональный неврологический статус. С другой стороны, корреляция графиков степени восстановления неврологических функций и уменьшения объема посттравматической кисты спинного мозга позволяет с высокой долей вероятности предполагать наличие связи. Однако в будущем необходимо продолжать исследования структуры посттравматических изменений спинного мозга с применением высокотехнологичных методов, таких как высокопольная МРТ 7,0 Тесла. Также в данном случае полезным окажется разработанный нами ранее метод компьютерного анализа структуры посттравматических изменений спинного мозга, применение которого запланировано на следующих этапах исследования. Результаты этого анализа планируется опубликовать отдельной статьей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в исследовании результаты свидетельствуют о том, что криоконсервированные МКПКЧ при однократном системном введении животным моделям ТСМ тяжелой степени способствуют эффективному восстановлению функций спинного мозга и оказывают нейропротективное действие, обеспечивая выживание поврежденных, но не погибших в момент травмы нейронов и их аксонов. Однократное внутривенное введение МКПКЧ в количестве 40–43 млн клеток на 1 кг массы тела реципиента способствует повышению сохранности нервной ткани спинного мозга и обеспечивает более высокий уровень восстановления утраченных функций спинного мозга.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Новоселова И.Н. Этиология и клиническая эпидемиология позвоночно-спинномозговой травмы. Литературный обзор. Российский нейрохирургический журнал им. проф. А.Л. Поленова 2019;11(4):85–92.
Novoselova I.N. Etiology and clinical epidemiology of spinal cord injury. Literature review. Rossiyskiy neyrokhirurgicheskiy zhurnal im. prof. A.L. Polenova = Russian Journal of Neurosurgery 2019;11(4):85–92. (In Russ.).
2. Chan B.C.F., Craven B.C., Furlan J.C. A scoping review on health economics in neurosurgery for acute spine trauma. Neurosurg Focus 2018;44(5):E15. DOI: 10.3171/2018.2.FOCUS17778
3. Гринь А.А. Хирургическое лечение больных с повреждением спинного мозга при сочетанной травме. Автореф. дис. ... докт. мед. наук. Москва, 2007. 320 с.
Grin A.A. Surgical treatment of patients with spinal cord injury with combined trauma. Abstract of dis. ... doctor of medical sciences. Moscow, 2007. 320 p. (In Russ.).
4. Крылов В.В., Гринь А.А., Луцки А.А. и др. Рекомендательный протокол лечения острой осложненной и неосложненной травмы позвоночника у взрослых (Ассоциация нейрохирургов РФ). Часть 3. Журнал «Вопросы нейрохирургии» им. Н.Н. Бурденко» 2015;79(2):97–110. DOI: 10.17116/neiro201579297-110
Krylov V.V., Grin A.A., Lutsyk A.A. et al. An advisory protocol for treatment of acute complicated and uncomplicated spinal cord injury in adults (Association of neurosurgeons of the Russian Federation). Part 3. Zhurnal Voprosy neirokhirurgii im. N.N. Burdenko = Burdenko's Journal of Neurosurgery 2015;79(2):97–110. (In Russ., In Engl.). DOI: 10.17116/neiro201579297-110
5. Ahuja C.S., Nori S., Tetreault L. et al. Traumatic spinal cord injury — repair and regeneration. Neurosurgery 2017;80(3S):9–22. DOI: 10.1093/neuros/nyw080
6. Badhiwala J.H., Ahuja C.S., Fehling M.G. Time is spine: a review of translational advances in spinal cord injury. J Neurosurg Spine 2019;30(1):1–18. DOI: 10.3171/2018.9.SPINE18682
7. Aziz J., Liao G., Adams Z. et al. Systematic review of controlled clinical studies using umbilical cord blood for regenerative therapy: Identifying barriers to assessing efficacy. Cytotherapy 2019;21(11):1112–21. DOI: 10.1016/j.jcyt.2019.08.004

8. Kwon B.K., Oxland T.R., Tetzlaff W. Animal models used in spinal cord regeneration research. *Spine (Phila Pa 1976)* 2002;27(14):1504–10. DOI: 10.1097/00007632-200207150-00005
9. Basso D.M. Behavioral testing after spinal cord injury: congruities, complexities, and controversies. *J Neurotrauma* 2004;21(4):395–404. DOI: 10.1089/089771504323004548
10. Rosenzweig E.S., McDonald W. Rodent models for treatment of spinal cord injury: research trends and progress toward useful repair. *Curr Opin Neurol* 2004;17(2):121–31. DOI: 10.1097/00019052-200404000-00007
11. Metz G.A., Curt A., Meent H. et al. Validation of the weight-drop contusion model in rats: a comparative study of human spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2000;17(1):1–17. DOI: 10.1089/neu.2000.17.1
12. Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device *versus* transection. *Exp Neurol* 1996;139(2):244–56. DOI: 10.1006/exnr.1996.009
13. Ryabov S.I., Zvyagintseva M.A., Pavlovich E.R. et al. Efficiency of transplantation of human placental/umbilical blood cells to rats with severe spinal cord injury. *Bull Exp Biol Med* 2014.157(1):85–8. DOI: 10.1007/s10517-014-2498-9
14. Rubinstein P., Dobrila L., Rosenfield R.E. et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(22):10119–22. DOI: 10.1073/pnas.92.22.10119
15. Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. A Sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 1995;1:1–21. DOI: 10.1089/neu.1995.12.1
16. Lebedev S.V., Timofeyev S.V., Zharkov A.V. et al. Exercise tests and BBB method for evaluation of motor disorders in rats after contusion spinal injury. *Bull Exp Biol Med* 2008;146(4):489–94. DOI: 10.1007/s10517-009-0328-2
17. Freund P., Seif M., Weiskopf N. et al. MRI in traumatic spinal cord injury: from clinical assessment to neuroimaging biomarkers. *Lancet Neurol* 2019;18(12):1123–35. DOI: 10.1016/S1474-4422(19)30138-3

Вклад авторов

В.А. Смирнов: разработка дизайна исследования, хирургия животных, сбор и анализ материала, написание текста статьи, одобрение финального текста статьи;

С.И. Рябов: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста статьи;

М.А. Звягинцева: функциональное тестирование животных, сбор материала, анализ полученных данных;

С.А. Базанович: анализ полученных данных, статистическая обработка полученных данных;

Я.В. Морозова: сбор и анализ материала;

С.М. Радаев: оптимизация клеточной терапии;

А.Э. Талыпов: статистическая обработка полученных данных;

А.А. Гринь: разработка дизайна исследования, одобрение финального текста статьи.

Authors' contribution

V.A. Smirnov: research design development, animal surgery, collection and analysis of material, article writing, approval of the final text of the article;

S.I. Ryabov: research design development, analysis of the data obtained, article writing;

M.A. Zvyagintseva: functional testing of animals, collection of material, analysis of the data obtained;

S.A. Bazanovich: analysis of the data obtained, statistical processing of the data obtained;

Ya.V. Morozova: collection and analysis of material;

S.M. Radaev: optimization of cell therapy;

A.E. Talypov: statistical processing of the data obtained;

A.A. Grin: research design development, approval of the final text of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.А. Смирнов / V.A. Smirnov: <https://orcid.org/0000-0003-4096-1087>

С.И. Рябов / S.I. Ryabov: <https://orcid.org/0000-0001-8674-8551>

М.А. Звягинцева / M.A. Zvyagintseva: <https://orcid.org/0000-0003-3818-7184>

С.А. Базанович / S.A. Bazanovich: <https://orcid.org/0000-0001-5504-8122>

Я.В. Морозова / Ya.V. Morozova: <https://orcid.org/0000-0002-9575-0749>

С.М. Радаев / S.M. Radaev: <https://orcid.org/0000-0003-4441-3299>

А.Э. Талыпов / A.E. Talypov: <https://orcid.org/0000-0002-6789-8164>

А.А. Гринь / A.A. Grin: <https://orcid.org/0000-0003-3515-8329>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Исследование проводилось в рамках клинической апробации. Протоколы экспериментов были утверждены в соответствии с этическими и научными рекомендациями Минздрава России, Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009, правилами содержания и ухода за экспериментальными животными, согласно директивам Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study was conducted as part of a clinical trial. The experimental protocols were approved in accordance with the ethical and scientific recommendations of the Ministry of Health of the Russian Federation, the National Standard of the Russian Federation GOST R 53434-2009, the rules for the maintenance and care of experimental animals, in accordance with the directives of the Council of the European Community 86/609/EEC on the use of animals for experimental research.

Статья поступила: 14.10.2022. **Принята к публикации:** 24.10.2023.

Article received: 14.10.2022. **Accepted for publication:** 24.10.2023.