

ВПЛИВ ІМПЛАНТАЦІЇ ФІБРИНОВОГО МАТРИКСУ, АСОЦІЙОВАНОГО З МЕЗЕНХІМНИМИ СТРОМАЛЬНИМИ КЛІТИНАМИ ВАРТОНОВИХ ДРАГЛІВ, НА ПЕРЕБІГ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ТРАВМИ СПИННОГО МОЗКУ

В.В. МЕДВЕДЄВ¹, Н.П. ОЛЕКСЕНКО², Л.Д. ПІЧКУР², С.А. ВЕРБОВСЬКА², С.І. САВОСЬКО¹, Н.Г. ДРАГУНЦОВА², Ю.А. ЛОНТКОВСЬКИЙ³, В.В. ВАСЛОВИЧ², В.І. ЦИМБАЛЮК^{1,2}

¹ Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, бульвар Тараса Шевченка, 13, Київ, 01601, Україна

² ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», вул. Платона Майбороди, 32, Київ, 04050, Україна

³ КНП «Кам'янець-Подільська міська лікарня» КП МР, вул. Пушкінська, 31, Кам'янець-Подільський, Хмельницька область, 32301, Україна

E-mail: vavo2010@gmail.com, n.oleksenko@gmail.com, l.pichkur@neuro.kiev.ua, verbovskaya-svetlana@ukr.net, savosko_s@ukr.net, natalya.exlab@gmail.com, yulont@ukr.net, greycat312@gmail.com, tsymb777@gmail.com

У роботі досліджено ефективність негайної імплантації фібринового матриксу, асоційованого з мезенхімними стромальними клітинами Вартонових драглів, на моделі травми спинного мозку (ТСМ). Роботу виконано на білих безпородних щурах-самцях (~260 г, 4–5 міс). Модель травми – лівобічний перетин половини спинного мозку на рівні сегментів T_{13} – L_1 . Відновлювальне лікування – негайна трансплантація у зону травми фібринового матриксу людини, асоційованого з мезенхімними стромальними клітинами Вартонових драглів людини (*mesenchymal stromal cells, MSC*, $n = 9$). Референтні групи – ізольована ТСМ (*trauma, Tr*, $n = 7$) та імплантація у зону травми фібринового матриксу людини (*fibrin, Fb*, $n = 6$). Рухову активність і спастичність паретичної кінцівки оцінювали, відповідно, за шкалою BBB і шкалою Ashworth у власних модифікаціях. Морфологічну картину у ділянці травми досліджували у віддаленому періоді з використанням імпрегнації поздовжніх зрізів спинного мозку азотнокислим сріблом. Виявлено, що мезенхімні стромальні клітини Вартонових драглів людини у присутності фібринового матриксу в культурі демонстрували ознаки активної життєдіяльності, росту і здатності до міграції. Інтенсивне збільшення рухової активності паретичної кінцівки у групі Fb обмежувалося першими 2-ма тижнями спостереження, у групі MSC – 3-ма. Впродовж усього експерименту рівень функції у групі MSC поступався рівню групи Fb, однак лише на першому тижні спостереження – достовірно. Через 5 міс показник рухової функції складав $10,4 \pm 1,0$ бала BBB (MSC) і $11,6 \pm 2,0$ бала BBB (Fb), а у групі Tr – $5,9 \pm 1,6$ бала BBB. Тим не менш, значущу різницю значень показника виявили для груп MSC і Tr – через 6 тиж, 3 і 5 міс після

імплантації. Істотну перевагу рівня спастичності у групі Tr над групою MSC виявляли через 6 і 7 тиж та через 5 міс після травми, а перевагу над показником групи Fb – через 7 тиж після травми. Достовірних відмінностей рівня спастичності між групами MSC і Fb протягом усього експерименту не виявлено. Таким чином, негайна імплантація фібринового матриксу у зону травми спинного мозку чинить позитивний вплив на відновлення рухової функції паретичної кінцівки тварини, особливо за наявності мезенхімних стромальних клітин Вартонових драглів людини.

Ключові слова: травма спинного мозку, Вартонові драгли, мезенхімні стромальні клітини, фібриновий матрикс, відновлення рухової функції, спастичність.

Вступ. Відновне лікування травми спинного мозку (ТСМ) – одна із найскладніших проблем сучасної біомедичної науки, перспектива вирішення якої пов'язана із застосуванням методів культурального конструювання складних біоінженерних систем та їх імплантації у пошкоджений спинний мозок. З медичного погляду ТСМ є тяжким ушкодженням нервової системи, що призводить до драматичного погіршення якості життя постраждалих (DeVivo, 2012; Pretz et al, 2016; Savic et al, 2017; DeVivo et al, 2018; Adegeest et al, 2021) унаслідок розвитку незворотних регіонарних порушень рухової сфери і функції життєво важливих органів (Dodd et al, 2022), синдрому спастичності (Skoog, Jakobsson, 2020) і хронічного болю (Bresnahan et al, 2022). Усі ці розлади зумовлені руйнуванням нервових волокон – довгоаксонних низхідних проєкцій головного мозку, що забезпечують довільну іннервацію рухових та вегетативних спинномозкових центрів. Від-

нове лікування ТСМ неможливе без реставрації цих проєкцій, наприклад, засобами тканинної інженерії, що є предметом численних експериментальних досліджень (Liu et al, 2018; Wang et al, 2018; Liu et al, 2019; Zhang et al, 2019; Cizkova et al, 2020; Tashiro et al, 2022; Wang et al, 2022). Найбільш вивченим видом таких втручань при ТСМ є клітинна трансплантація (Muheremu et al, 2016; Lin et al, 2018; Liu et al, 2018; Farid et al, 2021; Tashiro et al, 2022), зокрема, трансплантація мезенхімних прогеніторів (Yousefifard et al, 2019; Bonaventura et al, 2020; Farid et al, 2021; Tashiro et al, 2022). Важливо, що ці клітини як ключовий елемент нейроінженерних втручань при патології нервової системи мають очевидні переваги порівняно з нейрогенними прогеніторами, зокрема можливість забезпечення аутологічності, що запобігає проблемам етичного характеру, гарантує біобезпеку та імунологічну сумісність клітинних трансплантатів (Okudo et al, 2016; Yasuda et al, 2010; Tara et al, 2010; Shakhbasau et al, 2011).

Вважається, що трансплантація у поєднанні з полімерним матриксом потенціє позитивні ефекти мезенхімних прогеніторів (Lv et al, 2021). Фібриновий гель – один із перспективних, легко доступних і потенційно аутологічних аморфних матриксів природного походження (Tatullo et al, 2012), для якого характерна схильність до біодеградації та цитотрактивності. Завдяки природному вмісту низки регуляторних і метаболічних чинників (Amable et al, 2013; Hotwani et al, 2014; Yao et al, 2016), цей матрикс сприяє утриманню у рані, виживанню та інтеграції трансплантованих клітин, уможливує проростання нервових волокон (Muller et al, 1984), що потенціє відновний процес (Litvinov et al, 2005; Cargnello et al, 2011; Robinson et al, 2017; Lu et al, 2014). Крім того, склад факторного оточення клітин, трансплантованих у товщі фібринового матриксу, можна моделювати, наприклад, для підтримання життєздатності прогеніторів або їхнього диференціювання за нейрогенним типом (Carriell et al, 2013; Carriell et al, 2015; Schuh et al, 2015). Усе це свідчить про перспективність біоінженерних засобів на основі фібринового матриксу і мезенхімних прогеніторів.

У даній роботі ми дослідили вплив негайної алотрансплантації мезенхімних стромаль-

них клітин Вартонових драглів людини (mesenchymal stromal cells, MSC), асоційованих з фібриновим матриксом, на відновлення рухової функції паретичної кінцівки після бічного половинного перетину спинного мозку щура у нижньогрудному-верхньопоперековому відділі.

Матеріали і методи. *Експериментальні групи.* Дослідження проведено на 21 білому безродному самці щура з віварію ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» з масою тіла ~260 г, віком 4–5 міс, яких утримували при змінній температурі середовища за природного циркадного світлового циклу зі збалансованим харчуванням комбінованим кормом *ad libitum*.

Сформовано основну експериментальну групу, тваринам якої виконували ТСМ і негайну гомотопічну імплантацію фрагмента фібринового матриксу людини, асоційованого із мезенхімними стромальними клітинами Вартонових драглів людини (mesenchymal stromal cells, MSC, n = 9). Для оцінки впливу відновного втручання сформували дві групи порівняння, результати дослідження рухової функції і спастичності яких детально описано у попередній публікації (Medvediev et al, 2022): 1) ізольована ТСМ (trauma, Tr, n = 7); 2) ТСМ + гомотопічна імплантація у зону травми фрагмента фібринового матриксу людини (fibrin, Fb, n = 6). Наведені кількісні показники експериментальних груп відповідають когортам, залученим у подальший статистичний аналіз, тобто без урахування тварин, які відповідали критеріям вилучення (див. нижче).

Отримання фібринового матриксу. Методику отримання фібринового матриксу описано у попередній публікації (Medvediev et al, 2022). Свіжозабраний зразок крові дорослої людини без клінічних ознак гострої патології двічі центрифугували, доводячи концентрацію тромбоцитів до $\sim 1 \times 10^6$ у 1 мкл, реакцію зсідання крові стимулювали додаванням діоксиду кремнію (Tatullo et al, 2012). Зразки використовували для досліджень *in vivo* та *in vitro*, утримуючи до застосування в ізотонічному розчині натрію хлориду не більше 3–4 год за кімнатної температури.

Суспензійна культура мезенхімних стромальних клітин Вартонових драглів людини. Популяція MSC 2-го пасажу надана відділом генних

технологій Інституту генетичної та регенеративної медицини НАМН України та відділом регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Суспензію клітин змішували з рідким матриксом та запускали процес полімеризації. Концентрація клітин становила $\sim 1 \times 10^6$ у 1 мл, вміст живих клітин – не менше ніж 80 %. Отримані зразки досліджували *in vivo* та *in vitro*, використовували для культивування і трансплантації. Властивості клітин, асоційованих з фібриновим матриксом, вивчали під час двотижневого культивування на середовищі стандартного складу в загальноприйнятих для культивування умовах. Заміну поживного середовища здійснювали кожні 3–4 доби. Спостереження і фотофіксацію живої культури проводили за допомогою інвертованого світлового мікроскопа («Nicon», Японія).

Імуногістохімічна ідентифікація CD105⁺-клітин у культурі мезенхімних стромальних клітин Вартонових драглів людини. Для виявлення CD105⁺-клітин у культурі MSC використовували первинні мишині антитіла («Dako», Данія) у розведенні 1 : 20. Візуалізацію зв'язування здійснювали за допомогою системи HRP/DAB Detection System («Dako», Данія). Препарати занурювали у спеціальне середовище (Faramaunt aqueous mounting medium, «Dako», Данія) і досліджували за допомогою світлового мікроскопа («Микмед», Росія).

Моделювання TCM. Детально протокол моделювання травми описано у попередніх працях (Medvediev et al, 2021; Medvediev et al, 2022). Втручання здійснювали на тлі загально-го знеболювання внутрішньоочеревинним введенням суміші розчинів ксилазину («Biowet», Польща; ~ 15 мг/кг маси тіла) і кетаміну (ПАТ «Фармак», Україна; ~ 70 мг/кг маси тіла) з помірними асептичними заходами. Як і у попередніх дослідженнях (Korach et al, 2017; Abdallah et al, 2021; Medvediev, Abdallah et al, 2021; Medvediev, Savosko et al, 2021; Medvediev et al, 2022), каудальний край грудної клітки глибоко анестезованої тварини визначали пальпаторно, що з огляду на теоретично більшу рухомість останніх пар ребер і без використання додаткових мікрохірургічних чи рентгенологічних засобів візуалізації дає змогу локалізувати ділянку моделювання TCM приблизно, найімо-

вірніше – на рівні хребців T₁₁–T₁₂ або на рівні сегментів спинного мозку T₁₃–L₁. Після виконання ламінектомії за допомогою первинної точкової наскрізної парасагітальної дорзовентральної перфорації спинного мозку формували канал для заведення однієї з бранш офтальмологічних ножиць. Другою браншою охоплювали ліву половину поперечника спинного мозку разом зі стовбурами чутливих корінців і перетинали її у декілька прийомів. Здійснювали сліпий механічний контроль повноти перетину половини поперечника спинного мозку скривленим по ребру офтальмологічним пінцетом, жорстко проходячи його робочим кінцем по внутрішній поверхні каналу хребта у ділянці травми від середини передньої поверхні у бік. Після самовільної зупинки кровотечі та видалення крові з рани шляхом тканинної аспірації у тварин груп Fb і MSC рану спинного мозку виповнювали заздалегідь приготовленим матриксом. Максимальна тривалість експозиції матриксу в кімнатних умовах до моменту трансплантації не перевищувала 3–4 год. У тварин усіх експериментальних груп вікно доступу в канал хребта прикривали фрагментом підшкірної сполучної тканини, м'які тканини та шкіру зашивали двома рядами вузлових швів. Ділянку рани обробляли розчином повідоніоду («Бетадин», EGIS, Угорщина). Для профілактики інфекційних ускладнень у задню шийну ділянку підшкірно вводили розчин біциліну-5 (ВАТ «Київмедпрепарат») у дозі $\sim 0,6$ млн ОД на 1 кг живої маси. Як протизапальну та протинабрякову терапію застосовували внутрішньоочеревинне введення розчину дексаметазону («KRKA», Словенія) у дозі ~ 4 мг на 1 кг живої маси. З метою профілактики офтальмологічних ускладнень очі тварин після операції закапували фізіологічним розчином. У подальшому тварин утримували у пластикових клітках з горизонтальною накривною решіткою по декілька особин.

Визначення рівня рухової функції та спаситичності паретичної кінцівки. Показник функції (ПФ) задньої іпсилатеральної щодо зони травми кінцівки визначали за шкалою, запропонованою D.M. Basso, M.S. Beattie та J.C. Bresnahan (BBB) (Basso et al, 1995), у наших технічних модифікаціях (Medvediev, Ab-

dallah et al, 2021). У рідкісних випадках для розрізнення рівня ПФ у проблематичному проміжку шкали (поміж 16 і 17 балами) використовували власний диференційний критерій (Medvediev, Abdallah et al, 2021). Показник спастичності (ПС) задньої іпсилатеральної щодо зони травми кінцівки оцінювали за адаптованою до експериментальних умов шкалою Ashworth (Dong et al, 2005), у нашій технічній модифікації (Medvediev, Abdallah et al, 2021) на рівні надп'яtkово-гомілкового суглоба з верифікацією стану легкого спастичного парезу (0,5 бала).

Перше визначення ПФ і ПС здійснювали не раніше ніж через 1 тиждень після травми з огляду на етичний регламент роботи з експериментальними тваринами. Усі тестування під час експерименту виконано одним і тим самим експериментатором, умовно засліпленим як щодо індивідуальних ознак усіх прооперованих ним та залучених у цей експеримент тварин, так і щодо попередніх індивідуальних результатів тестування рухової сфери та спастичності. За відсутності впевненості у точному цілому рівні ПФ або ПС досліджуваної тварини зараховували половинне значення показника. З метою деталізації динаміки відновного процесу впродовж 5 місяців експерименту визначали абсолютний тижневий приріст ПФ, приймаючи значення ПС і ПФ одразу після моделювання травми умовно рівними нулю (стан спінального шоку):

$$\{V_{\text{ПФ}}\}_n = \frac{\text{ПФ}_n - \text{ПФ}_{n-1}}{k},$$

де n — кратність спостереження, k — кількість тижнів у оцінюваному часовому інтервалі.

Абсолютний тижневий приріст ПС ($V_{\text{ПС}}$) визначали за алгоритмом, описаним для $V_{\text{ПФ}}$.

Критерії вилучення. До складу експериментальних груп не залучали тварин з дефіцитом рухової функції задньої контралатеральної кінцівки (≤ 14 балів за шкалою BBB) лише в перший термін спостереження або в інші терміни спостереження за умови тривалої маніфестації (група Tr — 2 тварини, група Fb — 3 тварини (Medvediev et al, 2022), група MSC — 1 тварина), а також тварин з виразними ознаками стійкого периферичного парезу (2 тварини групи MSC), тобто із симптоматикою ураження

мотонейронів нижніх кінцівок, які, як відомо (Reugnard et al, 1986), локалізуються у сегментах спинного мозку L_3-L_6 . Випадки виразного іпсилатерального парезу м'язів черевної стінки, тобто надмірно ростралізованого виконання ТСМ (Calguner et al, 2006), спеціально не реєстрували. Поодинокі випадки виведення тварин з міркувань етичного характеру (з ознаками хронічного больового синдрому, іншої неврологічної симптоматики), а також випадки невстановленої загибелі тварин — не наводимо.

Особливості відображення результатів. Результати моніторингу ПФ і ПС сумісно для усх груп наведено за стандартизованою часовою шкалою: щотижнево впродовж перших 2 міс, а також через 3, 4 і 5 місяців після травми. Результати моніторингу ПФ і ПС на момент виведення тварин з експерименту і отримання матеріалу для патоморфологічного дослідження наводили і аналізували для кожної експериментальної групи окремо. У разі тривалості спостереження у тижнях мінімальною одиницею часу вважали 7 діб, у разі тривалості спостереження у місяцях — інтервал між однаковими денними датами двох сусідніх місяців. У групі Fb індивідуальні значення ПФ і ПС усіх тварин через 4 тижні після травми відтворено шляхом інтерполяції як середнє арифметичне від значень двох суміжних часових точок спостереження. У групі MSC значення ПФ і ПС однієї тварини через 3, 4 та 5 місяців від початку експерименту відтворено шляхом екстраполяції значень наприкінці 2-го місяця спостереження через відсутність значущої динаміки ПФ і ПС у ці терміни травматичного процесу (Medvediev, Abdallah et al, 2021; Medvediev, Savosko et al, 2021; Abdallah et al, 2021) і спонтанний характер загибелі тварини, найімовірніше, не пов'язаний з формуванням неврологічних розладів. Асимптотичні відмінності у реальних термінах тестування різних груп виявлено для перших 3 тижнів, а також через 5 тижнів і через 3 місяці після моделювання травми; вони склали 14–29 % від величини відповідного терміну стандартизованої часової шкали представлення результатів. В інші терміни спостереження зазначена різниця не перевищувала 10 %. Оцінюючи статистичну значущість значень $V_{\text{ПФ}}$, $V_{\text{ПС}}$ і результатів порівняльного статистичного аналізу, враховували, що період істотної три-

валої односпрямованої динаміки у межах цього та інших схожих експериментів (Abdallah et al, 2021; Medvediev, Abdallah et al, 2021; Medvediev, Savosko et al, 2021) припадав на перший місяць спостереження.

Порівняльний статистичний аналіз значень ПФ, ПС, $V_{\text{ПФ}}$ і $V_{\text{ПС}}$ у всіх трьох групах проводили до 5-го місяця включно за допомогою програмного пакета Statistica 10.0 з використанням тесту Манна-Уїтні (Mann-Whitney U-Test), тесту Вілкоксона (Wilcoxon Matched Pairs Test) і тесту рангової кореляції Спірмена (Spearman Rank Order Correlations). Усереднені величини представлено як $M \pm \text{SEM}$, де M (mean) – середнє значення величини, SEM (standard error of the mean) – стандартна похибка середнього значення величини. У всіх випадках припущення щодо статистичної значущості отриманого результату вважали вірним, якщо ймовірність нульової гіпотези була меншою ніж 0,05 ($p < 0,05$).

Патогістологічне дослідження. Матеріал для патоморфологічного дослідження у всіх тварин експериментальних груп отримували у віддаленому (Jeong et al, 2021) періоді травми, в момент завершення спостереження: у групі Тг – через ~7 міс (Medvediev et al, 2022), у групі MSC – через 7,5 міс, у групі Fb – через ~9 міс (Medvediev et al, 2022) після травми. З огляду на відсутність суттєвих змін неврологічної симптоматики у віддалений період ТСМ (Burns et al, 2017), різницю у термінах виведення тварин різних груп з експерименту вважали незначущою щодо неврологічного дефіциту і досліджуваних морфологічних особливостей ділянки післятравматичної організації, зокрема щодо наявності нервових волокон у ній. Протокол отримання матеріалу, приготування та дослідження гістологічних препаратів детально описано нами раніше (Medvediev, Abdallah et al, 2021). У короткому викладі – з фіксованої у 10%-вому розчині нейтрального формаліну травмованої ділянки спинного мозку за допомогою мікротома-кріостата (МК-25, СРСР) отримували поздовжні зрізи завтовшки 15 мкм, які забарвлювали методом імпрегнації сріблом (Kolomiytsev et al, 1982), досліджували за допомогою світлооптичного мікроскопа «Ахіофот» («Opton», Німеччина) і фотографували цифровою камерою «Canon 600» («Canon Inc.»,

Тайвань) з використанням комп'ютерного аналізатора САІ-01АВН («Selmi», Україна) та програмного забезпечення «Кappa opto-electronics GmbH» (Німеччина).

Результати. *Властивості комплексу фібринового матриксу з мезенхімними стромальними клітинами Вартонових драглів людини в умовах культивування.* Спостереження *in vitro* виявили, що на відміну від клітин нейтрального фенотипу (Medvediev et al, 2022) для MSC при культивуванні у фібриновому матриксі характерне активніше виселення з території матриксу. Щільна зона росту формувалася впродовж 5 діб культивування, а клітинна популяція впродовж цього терміну не демонструвала ознак деструкції чи некрозу. Клітини поступово збільшувалися у розмірах і набували типової (Hashemitabar et al, 2015) для культивованих мезенхімних прогеніторів форми – полігональної, веретеноподібної, зрідка – сфероїдної (рис. 1, а–в). При цьому в товщі матриксу формувалися складні клітинні мережі (рис. 1, г), і він значною мірою деградував до 7–9-ї доби.

Імуногістохімічна ідентифікація експресії CD105⁺-клітин (одного з маркерів мезенхімних прогеніторів) виявила їх переважне розташування у товщі матриксу та поблизу нього. Натомість у віддаленіших зонах переважали веретеноподібні CD105⁺-клітини з морфологічними ознаками фіброblastів (рис. 1, д, е). У деяких ділянках серед CD105⁺-клітин виявляли ознаки постмітотичної морфології (рис. 1, є, ж).

Загалом дослідження в умовах культивування засвідчило збереження життєздатності інкорпорованих у фібриновий матрикс MSC та їх здатності до міграції.

Вплив імплантації фібринового матриксу, вивченого мезенхімними стромальними клітинами Вартонових драглів людини, на динаміку показника рухової активності паретичної кінцівки щура. У групі Тг через 7 діб після моделювання травми ПФ паретичної кінцівки становив $4,1 \pm 2,0$ бала за шкалою ВВВ і збільшувався впродовж наступних 2 тиж до $6,8 \pm 1,4$ бала, причому впродовж 3-го тижня – статистично значущо ($p = 0,046$ при порівнянні зі значенням наприкінці першого тижня спостереження, тест Вілкоксона, рис. 2). Впродовж наступних 2 тиж значення ПФ змінювалися і наприкінці 5-го тиж досягли мак-

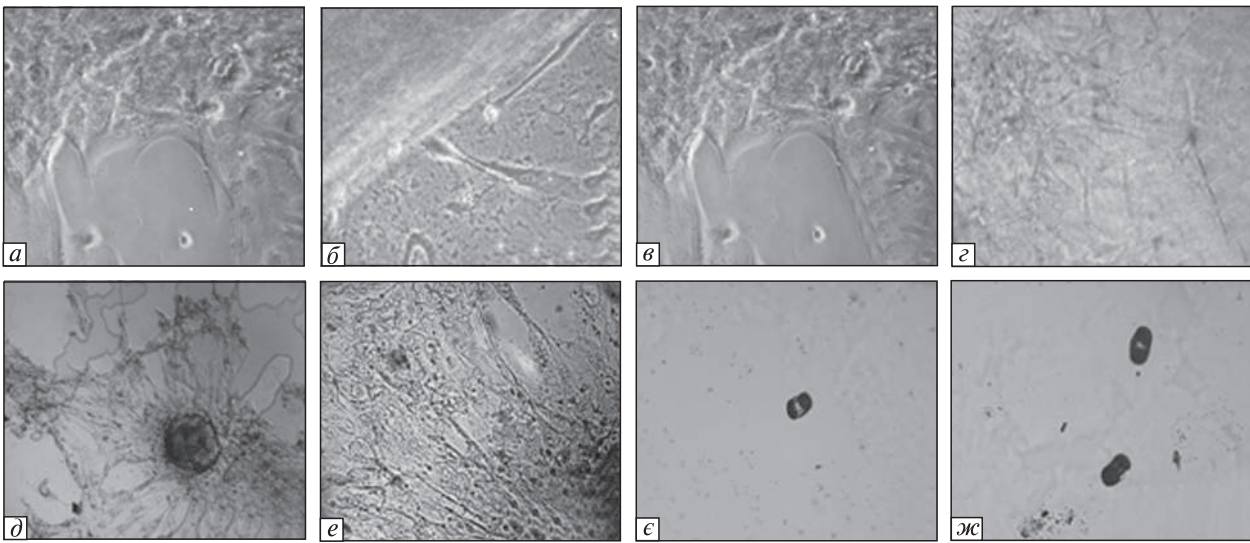


Рис. 1. Культура мезенхімних стромальних клітин Вартонових драглів людини, інкорпорованих у фібриновий матрикс: *a, б, в* – 2-га доба культивування, виселення клітин з матриксу та формування зони росту навколо нього. Живий незабарвлений препарат, $\times 200$; *г* – 5-та доба культивування, формування мережі клітинами всередині матриксу. Живий незабарвлений препарат, $\times 200$; *д* – 10-та доба культивування, зона росту навколо матриксу. Імуногістохімічне виявлення CD105⁺-клітин, $\times 100$; *е* – 10-та доба культивування, зона росту навколо матриксу. Імуногістохімічне виявлення CD105⁺-клітин, $\times 200$; *ж* – 10-та доба культивування, CD105⁺-клітини в зоні росту, $\times 400$

симуму – $7,7 \pm 1,3$ бала за шкалою ВВВ ($p < 0,05$ при порівнянні зі значеннями наприкінці 1-го, 2-го і 4-го тиж спостереження, тест Вілкоксона). Істотні відмінності зі значеннями впродовж перших 2 тиж спостереження зафіксовано також у три наступні терміни спостереження ($p < 0,05$ при порівнянні значень наприкінці 6-го і 1-го тиж, 7-го та 2-го, 8-го і 1-го тиж, тест Вілкоксона), у подальшому до кінця спостереження – не виявляли. Наприкінці 5-го міс ПФ у групі становив $5,9 \pm 1,6$ бала за шкалою ВВВ (рис. 2), наприкінці 7-го міс – $6,0 \pm 1,7$ бала ВВВ.

$V_{\text{ПФ}}$ впродовж першого тижня спостереження у групі Тг становив $4,1 \pm 2,0$ бала/тиждень, зменшувався до абсолютного мінімуму наприкінці першого місяця спостереження ($-1,3 \pm 0,6$ бала/тиждень, $p < 0,05$ при порівнянні з першим тижнем, тест Вілкоксона). Істотну відмінність ($p < 0,05$, Wilcoxon Matched Pairs Test) значення $V_{\text{ПФ}}$ у порівнянні зі значенням першого тижня виявляли для 6-го тиж і для 2–5-го міс спостереження. Значущу відмінність виявляли також при порівнянні значень 5-го і 4-го тиж, значень 6-го тиж і

значень 3-го й 5-го тиж, значень впродовж 3–5-го міс і значення 5-го тиж. Отже, значення $V_{\text{ПФ}}$ впродовж 5-го тиж виявилось другим статистично значущим екстремумом і становило $2,2 \pm 0,6$ бала/тиждень. Усереднене за перші 2 міс і за весь період спостереження (до моменту виведення тварин з експерименту) значення $V_{\text{ПФ}}$ у групі Тг становило відповідно $0,3 \pm 0,2$ та $0,2 \pm 0,1$ бала/тиждень.

У групі Fb через 1 тиж після моделювання травми ПФ становив $6,7 \pm 1,3$ бала ВВВ, істотно не відрізняючись від показника групи Тг ($p > 0,05$, тест Манна-Уїтні, рис. 2). Впродовж наступного тижня відбулося суттєве збільшення ПФ ($p < 0,05$ при порівнянні зі значеннями у попередній термін спостереження, тест Вілкоксона). У подальшому значущих змін ПФ не виявляли: починаючи з 3-го тиж і до кінця експерименту значення ПФ істотно відрізнялися лише від показника наприкінці першого тижня. Важливо зазначити, що для значення ПФ у групі, виміряного наприкінці 9-го міс, виявлено статистично значущу відмінність від показника наприкінці 7-го тиж ($p < 0,05$, тест Вілкоксона) — макси-

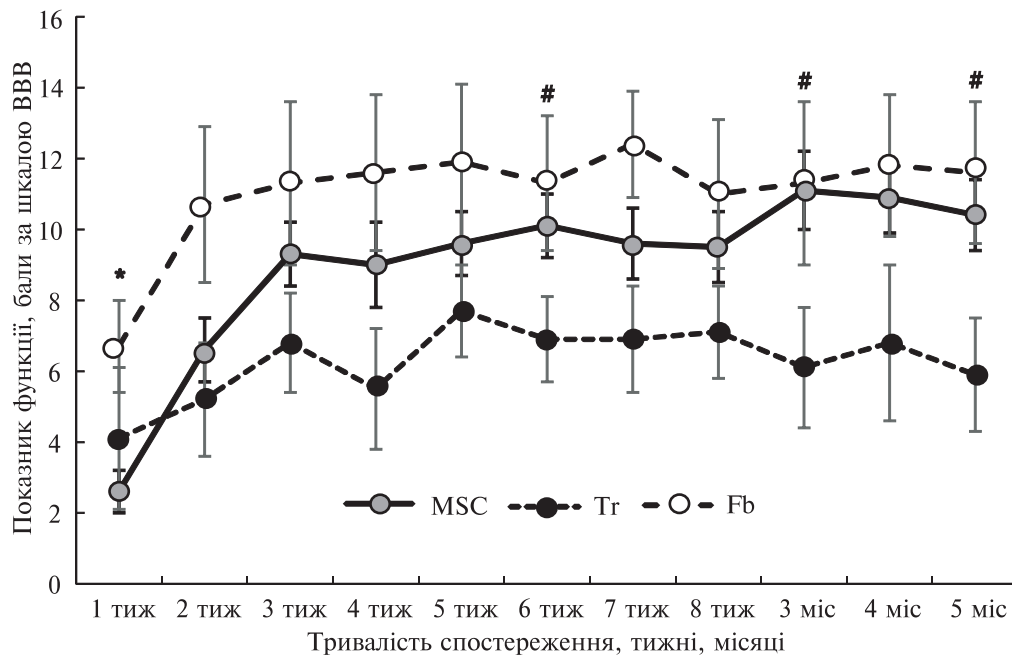


Рис. 2. Динаміка показника функції паретичної кінцівки (ПФ) у тварин експериментальних груп протягом 5-ти міс спостереження. Умовні позначення: * – різниця значень ПФ груп MSC і Fb значуща ($p < 0,05$, тест Манна-Уїтні); # – різниця значень ПФ груп MSC і Tr значуща ($p < 0,05$, тест Манна-Уїтні). Відмінності ПФ груп Fb і Tr впродовж усього експерименту – незначущі ($p > 0,05$, тест Манна-Уїтні)

мального за весь період спостереження у групі, $12,4 \pm 1,5$ бала за шкалою BBB. Це свідчить про істотний регрес ПФ до кінця експерименту: через 9 міс після моделювання травми ПФ становив $10,3 \pm 2,0$ бала за шкалою BBB. У жодний із термінів спостереження статистично значущих відмінностей за ПФ між групами Fb і Tr виявлено не було ($p > 0,05$, тест Манна-Уїтні).

Максимальні значення $V_{\text{ПФ}}$ у групі Fb виявляли впродовж перших 2 тиж – $6,7 \pm 1,3$ і $4,0 \pm 1,0$ бала/тиждень відповідно. Усереднене за перші 2 міс і за весь період спостереження значення $V_{\text{ПФ}}$ у групі становило відповідно $1,4 \pm 0,3$ та $0,8 \pm 0,2$ бала/тиждень, суттєво перевищуючи усереднений за перші 2 міс показник групи Tr. Істотні відмінності від значення на 1-му тижні зафіксували для значень показника в усі наступні терміни спостереження, відмінності від значення на 2-му тиж – для значень на 4–6-му тиж і впродовж 2–5-го міс; також було виявлено суттєву відмінність між значенням показника на 8-му тиж і значенням впродовж 3-го міс спостереження

($p < 0,05$, тест Вілкоксона). Статистично значущі відмінності за $V_{\text{ПФ}}$ між групами Fb і Tr у жодному із термінів спостереження виявлено не було ($p > 0,05$, тест Манна-Уїтні). Усереднене за перші 2 міс і за весь період спостереження (до моменту виведення тварин з експерименту) значення $V_{\text{ПФ}}$ у групі Fb становило відповідно $1,4 \pm 0,3$ та $0,8 \pm 0,2$ бала/тиждень. Усереднені за перші 2 міс значення $V_{\text{ПФ}}$ груп Fb і Tr істотно відрізнялись ($p < 0,05$, тест Манна-Уїтні).

За винятком першого тижня значення ПФ у групі MSC упродовж усього періоду спостереження були близькими до показників групи Fb, відрізняючись неістотно ($p > 0,05$, тест Манна-Уїтні, рис. 2). Через 1 тиж після травми ПФ у групі MSC становив $2,6 \pm 0,6$ бала за шкалою BBB і був статистично значущо меншим порівняно з показником групи Fb ($p = 0,037$) і групи тварин, яким за аналогічних експериментальних умов виконували імплантацію фібринового матриксу, наповненого клітинами неонатального мозку (Medvediev et al, 2022; $p = 0,010$, тест Манна-Уїтні). Водночас,

показник у цей термін спостереження був неістотно меншим, ніж у групі Tg ($p = 0,952$, тест Манна-Уїтні). Істотне збільшення значень ПФ у групі MSC спостерігали протягом перших 3-х тиж експерименту: значущу відмінність від значення ПФ через 1 і 2 тиж виявлено в усі наступні терміни спостереження ($p < 0,05$, тест Вілкоксона). Наприкінці 3-го міс спостереження значення ПФ були максимальними ($11,1 \pm 1,1$ бала за шкалою BBB) і статистично значущо переважали показники, виявлені через 1, 2, 4, 7 і 8 тиж від початку експерименту ($p < 0,05$, тест Вілкоксона). Наприкінці 5-го міс спостереження ПФ становив $10,4 \pm 1,0$ бала за шкалою BBB. Статистично значущу різницю за ПФ між групами MSC і Fb, а також між групою MSC і групою тварин, яким за аналогічних експериментальних умов виконували імплантацію фібринового матриксу, наповненого клітинами неонатального мозку (Medvediev et al, 2022), було виявлено лише через 1 тиж від початку експерименту. Значення ПФ групи MSC відрізнялися від показників групи Tg через 6 тиж і 3 та 5 міс після моделювання травми ($p < 0,05$, тест Манна-Уїтні, рис. 2). З огляду на асимптотичні відхилення термінів тестування між порівнюваними групами впродовж перших 3 тиж і через 3 міс від початку експерименту істотною слід вважати різницю за ПФ між групами MSC і Tg через 6 тиж та 5 міс експерименту.

Максимальні значення $V_{\text{пф}}$ у групі MSC реєстрували протягом перших 3 тиж спостереження ($2,6 \pm 0,6$, $4,0 \pm 0,7$ і $2,6 \pm 0,7$ бала/тиждень відповідно). Значення цього показника у майже всі наступні терміни спостереження були істотно меншими ($p < 0,05$, тест Вілкоксона). Величина $V_{\text{пф}}$ у групі через 5 міс спостереження ($-0,1 \pm 0,1$ бала/тиждень) статистично значущо ($p < 0,05$, тест Вілкоксона) була меншою за значення наприкінці 6-го тиж ($0,4 \pm 0,3$ бала/тиждень) і за значення впродовж 3-го місяця ($0,4 \pm 0,2$ бала/тиждень). Суттєві відмінності за величиною $V_{\text{пф}}$ між групами MSC і Fb, а також між групою MSC і групою тварин, яким за аналогічних експериментальних умов виконували імплантацію фібринового матриксу, наповненого клітинами неонатального мозку (Medvediev et al, 2022), було виявлено лише у 1-й тиж спостереження

($p < 0,05$, тест Манна-Уїтні). Відмітимо, що при порівнянні значень $V_{\text{пф}}$ групи Tg і згаданої групи тварин, яким за аналогічних експериментальних умов виконували імплантацію фібринового матриксу, наповненого клітинами неонатального мозку, істотну різницю виявляли на 3-му міс спостереження (Medvediev et al, 2022). Усереднене за перші 2 міс і за 5 міс спостереження значення $V_{\text{пф}}$ у групі MSC становило відповідно $1,2 \pm 0,1$ і $0,9 \pm 0,1$ бала/тиждень. Усереднені за перші 2 міс значення $V_{\text{пф}}$ груп MSC і Tg відрізнялись істотно ($p < 0,01$, тест Манна-Уїтні).

Вплив імплантації фібринового матриксу, вповненого мезенхімальними стромальними клітинами Вартонових драглів людини, на динаміку показника спастичності паретичної кінцівки щура. Цікавою особливістю динаміки ПС в усіх трьох групах є майже повна відсутність значущих змін упродовж експерименту (рис. 3). Так, у групі Tg через 1 тиж після моделювання травми ПС паретичної кінцівки становив $0,7 \pm 0,1$ бала за шкалою Ashworth, впродовж наступного тижня зафіксували дворазове, але статистично незначуще збільшення показника до максимального серед груп в усі терміни спостереження — $1,4 \pm 0,3$ бала. Другий максимум виявлено наприкінці першого місяця спостереження ($1,4 \pm 0,4$ бала, рис. 3). Істотні відмінності впродовж періоду спостереження виявили лише при порівнянні значення ПС на 8-й ($0,7 \pm 0,2$ бала) і 3-й ($1,2 \pm 0,2$ бала, $p = 0,03$, тест Вілкоксона) тиж. Значення ПС станом на кінець 5-го міс спостереження і на момент виведення тварин з експерименту були однаковими і склали $1,2 \pm 0,3$ бала. Отже, впродовж усього періоду спостереження значення ПС у групі Tg змінювалися здебільшого неістотно, у діапазоні від $0,7 \pm 0,1$ до $1,4 \pm 0,3$ бала (рис. 3).

Значення $V_{\text{пс}}$ впродовж перших 2 тиж у групі Tg були найбільшими ($0,7 \pm 0,1$ і $0,6 \pm 0,3$ бала/тиждень), у подальшому наближались до нульової позначки. Статистично значущу різницю виявлено при порівнянні значень $V_{\text{пс}}$ у 1-й тиж зі значеннями на 5-й та 7-й тиж, при порівнянні значень на 1-му тиж зі значеннями впродовж 2–5-го міс спостереження ($p < 0,05$, тест Вілкоксона), а також при порівнянні значень на 2-му і 8-му тиж ($p < 0,05$, тест Вілкоксона). Усереднене за перші

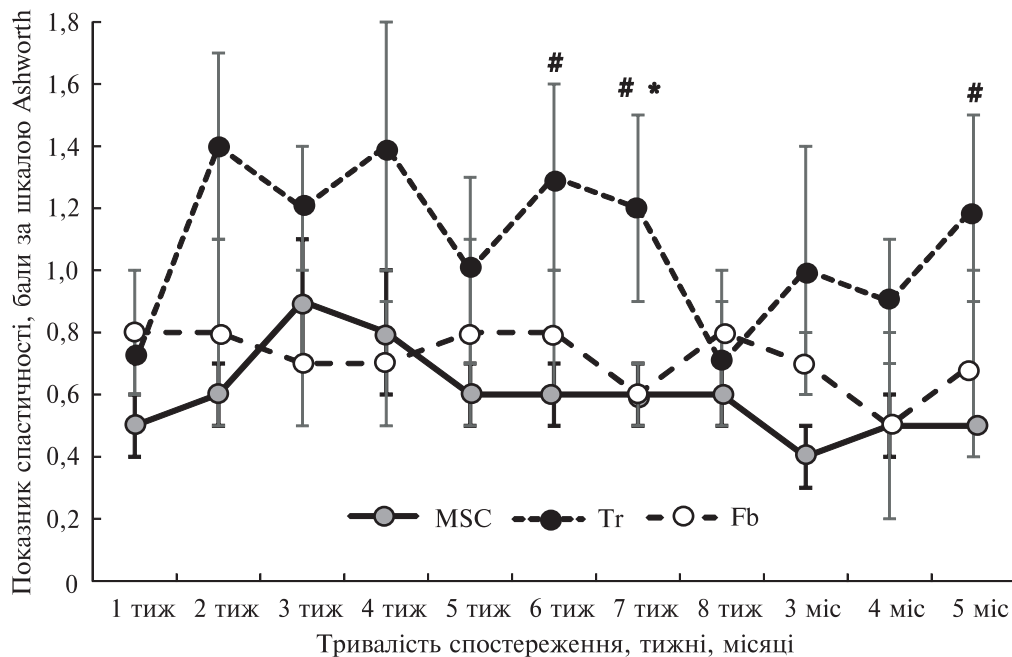


Рис. 3. Динаміка показника спастичності паретичної кінцівки (ПС) у тварин експериментальних груп протягом 5-ти місяців спостереження. Умовні позначення: # – різниця значень ПС груп MSC і Tr значуща ($p < 0,05$; тест Манна-Уїтні); * – різниця значень ПС груп Fb і Tr значуща ($p < 0,05$; тест Манна-Уїтні). Відмінності ПС груп MSC і Fb впродовж усього експерименту – незначущі ($p > 0,05$, тест Манна-Уїтні)

2 міс і за весь період спостереження (до моменту виведення тварин з експерименту) значення $V_{\text{ПС}}$ у групі Tr становило $0,1 \pm 0,0$ бала/тиждень.

У групі Fb істотних змін ПС впродовж усього періоду спостереження не зафіксовано ($p > 0,05$, тест Вілкоксона), значення показника варіювали від $0,8 \pm 0,2$ до $0,5 \pm 0,2$ бала за шкалою Ashworth (рис. 3). Статистично значущу різницю зі значеннями ПС групи Tr виявлено лише через 7 тиж після моделювання травми ($p < 0,05$, тест Манна-Уїтні, рис. 3).

Найбільше значення $V_{\text{ПС}}$ виявили на першому тижні спостереження ($0,8 \pm 0,2$ бала/тиждень), у подальшому величина показника наближалася до нуля. Статистично значущу різницю виявлено при порівнянні значень $V_{\text{ПС}}$ на першому тижні зі значеннями впродовж 3–7-го тиж і 3–5-го міс спостереження ($p < 0,05$, тест Вілкоксона), а також при порівнянні значень $V_{\text{ПС}}$ на 2-му і 4-му міс спостереження. Значущих відмінностей за $V_{\text{ПС}}$ між групами Fb і Tr вродовж 5 міс спостереження не виявили. Усереднене за перші 2 міс і за весь період

спостереження (до моменту виведення тварин з експерименту) значення $V_{\text{ПС}}$ у групі Fb становило $0,1 \pm 0,0$ бала/тиждень. Усереднені за перші 2 міс значення $V_{\text{ПС}}$ груп Fb і Tr істотно не відрізнялися ($p > 0,05$, тест Манна-Уїтні).

Значення ПС у групі MSC вродовж експерименту варіювали від $0,4 \pm 0,1$ до $0,9 \pm 0,2$ бала за шкалою Ashworth (рис. 3), статистично значущу відмінність зареєстровано лише при порівнянні значення через 3 міс і 3 тиж ($p = 0,043$, тест Вілкоксона). Статистично значущих відмінностей за ПС між групами MSC і Fb, а також між групою MSC і групою тварин, яким за аналогічних експериментальних умов виконували імплантацію фібринового матриксу, наповненого клітинами неонатального мозку (Medvediev et al, 2022), упродовж експерименту не виявлено ($p > 0,05$, тест Манна-Уїтні). Вищі значення ПС групи Tr порівняно з показниками групи MSC зареєстрували через 6 і 7 тиж та 5 міс спостереження ($p < 0,05$, тест Манна-Уїтні, рис. 3).

Максимальне значення $V_{\text{ПС}}$ у групі MSC виявляли для першого і третього тижня спосте-

реження ($0,5 \pm 0,1$ та $0,3 \pm 0,2$ бала/тиждень відповідно). Значення цього показника, починаючи з 4-го тиж були істотно нижчі, ніж значення у перший тиждень ($p < 0,05$, тест Вілкоксона). Суттєво меншими щодо значення на 3-му тиж були значення $V_{\text{пс}}$ на 5-му тиж і впродовж 3-го міс ($p < 0,05$, тест Вілкоксона). У жодний із термінів спостереження статистично значущих відмінностей за $V_{\text{пс}}$ між групою MSC та іншими групами не виявлено ($p > 0,05$, тест Вілкоксона). Усереднене значення $V_{\text{пс}}$ у групі MSC за перші 2 міс і за 5 міс спостереження становило $0,1 \pm 0,0$ бала/тиждень. При цьому усереднене за перші 2 міс значення $V_{\text{пф}}$ групи MSC істотно не відрізнялось від аналогічного показника груп Tg і Fb ($p > 0,05$, тест Манна-Уїтні).

На відміну від решти груп середні значення ПФ у групі MSC демонстрували сильну додатну кореляцію з тривалістю спостереження ($r_s = 0,88$; $p < 0,05$, тут і надалі – тест рангової кореляції Спірмена; тут і надалі: у групі MSC досліджували ряд даних у межах 5-ти міс спостереження). При аналізі середніх значень усіх показників у кожній групі виявлено значущу від'ємну кореляцію з тривалістю спостереження для $V_{\text{пф}}$ у групі Fb ($r_s = -0,72$; $p < 0,05$; тут і надалі: у групі Fb досліджували дані станом на 1–8-ий тиж, а також на 3-, 4-, 5-, 6- і умовний 9-ий місяць спостереження) і у групі MSC ($r_s = -0,61$; $p < 0,05$). При аналізі індивідуальних значень ПФ і ПС сильну обернено пропорційну кореляцію у групі Tg зафіксували через 1 і 2 тиж та через 4, 5 і ~7 міс від початку експерименту ($r_s \leq -0,80$; $p < 0,05$; тут і надалі: у групі Tg досліджували дані станом на 1–8-ий тиж, а також на 3-, 4-, 5- і умовний 7-ий міс спостереження), у групі Fb – через 4, 5 і 6 тиж та через 2 і 5 міс від початку експерименту ($r_s \leq -0,85$; $p < 0,05$), а у групі MSC – лише через 3 тиж від початку експерименту ($r_s = -0,898$; $p < 0,05$). При аналізі індивідуальних значень $V_{\text{пф}}$ та $V_{\text{пс}}$ істотну негативну кореляцію у групі Tg виявлено через 1, 6 і 7 тиж та через 3 міс від початку експерименту ($r_s \leq -0,77$; $p < 0,05$), у групі Fb – через 6 тиж і через 5 міс після травми ($r_s \leq -0,88$; $p < 0,05$), а у групі MSC взагалі не виявлено ($p > 0,05$). На відміну від решти груп між середніми значеннями $V_{\text{пф}}$ і $V_{\text{пс}}$ (але не між серед-

німи значеннями ПФ та ПС) у групі MSC виявлено слабку значущу додатну кореляцію ($r_s = 0,61$, $p < 0,05$).

У цілому результати функціональних досліджень засвідчили, що імплантація фібринового матриксу з вмістом MSC і без них позитивно впливала на перебіг відновного процесу після TCM. Для з'ясування ролі MSC у цьому ефекті слід провести додаткові дослідження із залученням більшої кількості експериментальних тварин.

Патогістологічна картина зони ураження спинного мозку та імплантаційного втручання у віддалений період після травми. Картина післятравматичної організації ділянки травми спинного мозку у віддалений період спостереження (рис. 4) свідчить, що для тварин усіх груп характерне істотне зменшення товщини перетнутої половини мозкової речовини ростральніше і каудальніше від фокуса травми. Для тварин групи Tg (рис. 4, Tg, a–в) відзначено заміщення речовини мозку у зоні травми щільним гліо-фіброзним рубцем багаточислової морфології, асоційованим з локально потовщеною оболонкою спинного мозку, яка містила поодинокі нервові волокна. В центральній частині рубця нервові волокна виявити не вдалося. Картина післятравматичної організації на тлі імплантації безклітинного фібринового матриксу (рис. 4, Fb, a–в) істотно відрізнялася від описаної вище насамперед стриманішим розвитком щільних фіброзних компонентів у фокусі травми, ряснішим представництвом нервових волокон, часто поздовжньо орієнтованих, а також наявністю поодиноких нервових волокон у центральній частині рубця. У разі заміщення травматичного дефекту спинного мозку фібриновим матриксом з вмістом MSC (рис. 4, MSC, a–в) констатували формування характерного для ізольованої травми (рис. 4, Tg, a–в) щільного шаруватого, але об'ємнішого сфероїдного рубця – ділянки заміщення імплантату. Однак на відміну від групи Tg у товщі рубцевої тканини між клітинними тяжами виявляли численніші невпорядковано розташовані у полі зору нервові волокна, інколи зі змінним напрямком ходу. Щільність клітинного компонента рубця у групі MSC, як і у групі Tg, була більшою, ніж у групі Fb. Найімовірніше, в усіх описаних випадках нер-

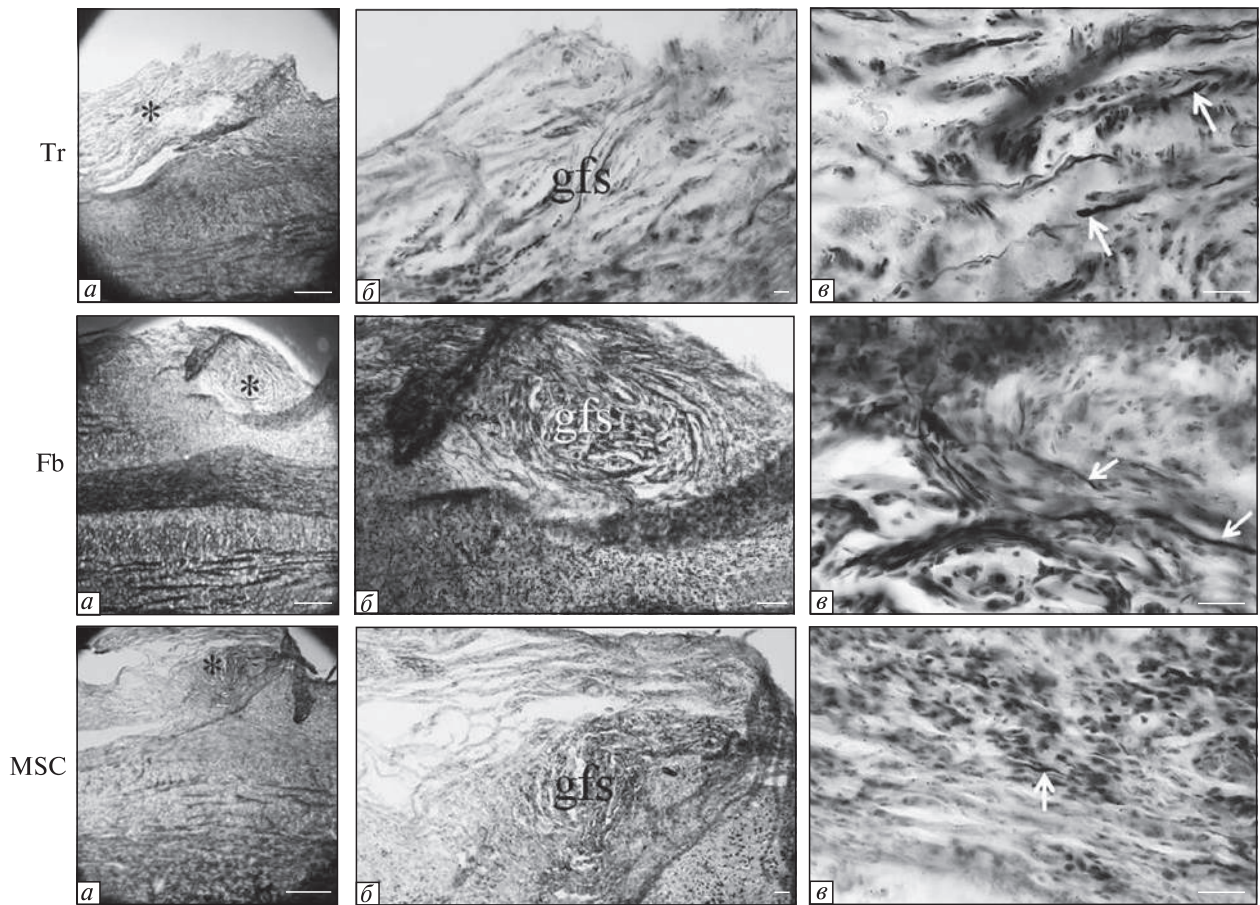


Рис. 4. Ділянка травми спинного мозку на поздовжніх гістологічних зрізах, забарвлених методом імпрегнації азотнокислим сріблом, у віддалений період спостереження. Ймовірні новоутворені мієлінізовані нервові волокна (позначено стрілками) у тварин усіх груп розташовуються у товщі тяжистої, шаруватої гліофіброзної тканини. Умовні позначення: Tr, Fb, MSC – позначення експериментальних груп; * – умовний центр посттравматичного гліо-фіброзного рубця на зрізі; gfs – гліофіброзний рубець (glio-fibrous scar); → – вірогідні нервові волокна. Масштабна смужка *a* – 200 мкм, *б* і *в* – 40 мкм

вові волокна у товщі рубцевої тканини чи поряд з нею слід вважати новоутвореними.

Обговорення. Травма спинного мозку – здебільшого тяжке ураження нервової системи, що істотно погіршує якість і зменшує тривалість життя постраждалих (DeVivo, 2012; Pretz et al, 2016; Savic et al, 2017; DeVivo et al, 2018; Adegeest et al, 2021). Розрахункова глобальна річна захворюваність – близько 1 млн випадків, поширеність – близько 27 млн випадків (GBD 2016 Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury Collaborators, 2019). Причиною характерної клінічної картини ТСМ є ушкодження у ділянці травми довгих нервових волокон, які зв'язують нейронні мережі голов-

ного і спинного мозку. Перебіг тканинних реакцій у ділянці травми регулюється багатьма молекулярними факторами міжклітинної комунікації (Tran et al, 2018; Alizadeh et al, 2019). Слабка автогенна регенерація рухової системи мозку (Steeves, 2015; Khorasanizadeh et al, 2019), найімовірніше, забезпечується перелаштуванням топології нейронних мереж (Blesch, Tuszynski, 2009; Flynn et al, 2011; Brown, Martinez, 2019; Fan et al, 2022); повноцінне розгортання цього процесу гальмується багатьма молекулярними механізмами (Rao, Pearse, 2016; Tran et al, 2018; Swieck et al, 2019; Fan et al, 2022). Численними дослідженнями продемонстрована перспективність розробки засобів активу-

вання і/або оптимізації пластичності нейронних мереж після ТСМ (Liu et al, 2018; Wang et al, 2018; Liu et al, 2019; Zhang et al, 2019; Cizkova et al, 2020; Shah et al, 2020; Wang et al, 2022; Tashiro et al, 2022). Як клітинну складову таких нейроінженерних засобів найінтенсивніше досліджують мезенхімні прогенітори різного походження (Yousefifard et al, 2019; Bonaventura et al, 2020; Farid et al, 2021; Tashiro et al, 2022). Їх трансплантація без супутніх полімерних риштувань поліпшує функцію задніх кінцівок щура на моделі забиття чи стиснення спинного мозку у середньому на 20 % від обсягу функції інтактною задньою кінцівкою (Oliveri et al, 2014). Одним із найчастіше використовуваних з дослідницькою і лікувальною метою видів MSC є мезенхімні прогенітори кістково-мозкового походження і жирової тканини, рідше – попередники мононуклеарів крові (Okudo et al, 2016; Yasuda et al, 2010; Tara et al, 2010; Shakhbasau et al, 2011). Обмежена кількість праць присвячена дослідженню відновних властивостей MSC, отриманих із сполучної тканини пуповини – Вартонових драглів (Abbaszadeh et al, 2020; Stefańska et al, 2020; Main et al, 2021). Відомо, що ці MSC володіють широким спектром диференціювання, нижчою туморогенністю та імуногеністю порівняно з MSC кістково-мозкового і жирового походження (Joerger-Messerli et al, 2016), що робить їх перспективними для застосування у регенеративній медицині. Однак нині їхній нейрогенний потенціал не досліджено (Wang et al, 2020). Популяція досліджуваних у цій роботі MSC складалася переважно із CD-105⁺-клітин – мітотично активних, здатних до міграції і формування складних клітинних мереж у товщі фібринового матриксу.

Позитивний ефект трансплантованих мезенхімних прогеніторів при ТСМ пов'язують з патотропним хомінгом (Oliveri et al, 2014), рідкісним *in vivo* явищем нейрогенного трансдиференціювання в нейрони та клітини глії (Oliveri et al, 2014; Huang et al, 2015; Dennie et al, 2016), здатністю до злиття з клітинами реципієнтної тканини (Noiseux et al, 2006), мікровезикулярним (Xin et al, 2014; Karantalis et al, 2015; Rohde et al, 2019; Yin et al, 2019; Cizkova et al, 2020), факторним (Oliveri et al, 2014) чи контактним (Oliveri et al, 2014; Ka-

rantalis et al, 2015) впливом, а також із позитивним впливом на перебіг запального процесу у зоні травми (Pang et al, 2022) і рубцювання (Pang et al, 2021), що в цілому зумовлює позитивний вплив на регенерацію ушкоджених нервових волокон спинного мозку (Lin et al, 2018). Імовірно, більшість цих ефектів можуть потенціюватися у разі трансплантації MSC у комплексі із матриксами (Lv et al, 2021).

У нашій роботі ефективність негайної імплантації фібринового матриксу з інкорпорованими MSC досліджено на моделі бічного половинного перетину спинного мозку дорослих щурів-самців з використанням аналізу динаміки рівня рухової функції і спастичності паретичної кінцівки, оціненого за допомогою шкал BBB і Ashworth. Результати дослідження дають підставу пов'язати позитивний ефект апробованого двокомпонентного засобу відновного лікування саме з впливом фібринового матриксу на перебіг травми і регенераційних реакцій, а статистично значуща різниця за ПФ між групами Tr та MSC, але не між групами Tr і Fb, найімовірніше, не має істотного патофізіологічного підґрунтя. Цим отримані нами дані відрізняються від результатів нечисленних схожих досліджень. Наприклад, негайне заповнення одноміліметрової ділянки повного перетину спинного мозку дорослих щурів-самців (лінія Sprague-Dawley) на рівні хребця T₁₀ фібриновим гелем з інкорпорованими алогенними клітинами – «ектомезенхімними» похідними нервового гребня, спричиняло статистично значуще збільшення рухової функції задніх кінцівок до майже 7 балів за шкалою BBB наприкінці 3-го місяця спостереження порівняно з 2,5 балами у тварин з нелікованою травмою та 5 балами у тварин, яким імплантували лише фібриновий матрикс (Liu et al, 2013). Між показниками рухової функції тварин з імплантацією фібринового матриксу і тварин, яким не виконували жодних відновних втручань, різниця також була статистично значущою. P.J. Johnson та співавтори (2010) не виявили статистично значущого позитивного впливу імплантації фібринового матриксу в ділянку дорзального половинного перетину спинного мозку дорослого щура на рівні T₉, проведеної через 2 або 4 тиж після моделювання травми (Johnson

et al, 2010). Однак автори не підтвердили це цифровими даними, що зменшує значення цього твердження на тлі відомого з попередніх праць факту швидкого і практично повного відновлення рухової функції задніх кінцівок щура після такого виду травми за відсутності будь-яких відновних втручань (Majczynski, Slawinska, 2007).

На тлі іншої моделі TCM – забиття спинного мозку дорослих шурів-самиць (лінія Wistar) на рівні хребця T₈ – виявлено істотний позитивний вплив алогенних мезенхімних прогеніторів жирової клітковини, нанесених на дорзальну поверхню травмованої ділянки спинного мозку у складі фібринового середовища Tissucol через 2 тиж після моделювання травми (Mukhamedshina et al, 2018). Використання цього відновного засобу зумовлювало майже дворазове збільшення рухової функції на 74-ту добу від початку експерименту порівняно з аналогічним використанням безклітинного середовища Tissucol (17,1 ± 3,1 та 6,7 ± 2,5 бала за шкалою BBB; Mukhamedshina et al, 2018). На схожій моделі TCM дорослих шурів-самиць (лінія Sprague-Dawley) на рівні хребця T₁₀ мезенхімні прогенітори, отримані із кісткового мозку стегнової та великогомілкової кісток самиці щура, у середовищі фібринового матриксу імплантували у зону видалення післяконтузійного рубця спинного мозку через 60 днів після травми (Rodríguez-Barrera et al, 2020). За таких умов ефективність клітинної трансплантації була статистично значущою, однак невеликою. Різниця із групою порівняння через 60 днів після повторного втручання становила близько 1,7 бала за шкалою BBB. Гостра імплантація нейральних чи олігодендротарних прогеніторів, отриманих із мезенхімних клітин жирової клітковини щура, у вогнище забиття спинного мозку дорослих шурів-самиць (лінія Wistar) у складі фібринового середовища створювала умови для їхнього гліогенного диференціювання (Chandrababu et al, 2021). На жаль, у цьому дослідженні функціональний корелят такого ефекту не вивчали.

Як уже зазначалося нами у попередній публікації (Medvediev et al, 2022), імовірним механізмом позитивного впливу негайної імплантації фібринового матриксу у ділянку лацераційної TCM на перебіг відновного процесу

слід вважати ранній антигеморагічний ефект, пов'язане із цим обмеження контакту речовини мозку з елементами імунної системи і, як наслідок, – зменшення запального процесу та вторинного ушкодження.

У цьому контексті слід зазначити, що MSC у цілому зменшують запальний процес (Pang et al, 2022), а MSC Вартонових драглів людини здатні продукувати протизапальні цитокіни, зокрема трансформувальний фактор росту-β (TGF-β) та інтерлейкін-35, які впливають на метаболізм T-клітин, зменшуючи негативні наслідки запалення у зоні травми (Wang et al, 2020). Пориста структура фібринового матриксу сприяє проникненню цих регуляторів у сусідні тканини реципієнта (Weisel et al, 2018).

Однак значення ПФ у групі MSC через 1 тиж після відновного втручання було меншим порівняно не лише з групою Fb, а і з групою тварин, яким за аналогічних умов імплантували фрагменти фібринового матриксу, виповненого клітинами неонатального головного мозку щура (Medvediev et al, 2022). Це наводить на думку про неоднозначність впливу MSC на ранні посттравматичні процеси, зокрема у спинному мозку та за наявності фібринового матриксу – не менш потужного джерела регуляторних факторів, принаймні тромбоцитарного походження (Amable et al, 2013; Hotwani et al, 2014; Yao et al, 2016). Ці чинники теоретично можуть не лише впливати на перебіг локальних запальних реакцій, змінюючи ефекти секретому MSC в умовах, характерних для нашого експерименту, а і стимулювати проліферацію попередників олігодендроглії, чинити нейропротекторний та пронейропластичний вплив (Medvediev et al, 2022). Очевидно, що пряма реалізація таких ефектів регуляторами імплантованого фібринового матриксу істотно обмежена у часі.

Таким чином, негайна імплантація у вогнище TCM фібринового матриксу з інкорпорованими MSC сприяє активації механізмів післятравматичної регенерації. В основі такого ефекту, ймовірно, лежить взаємодія між біологічними факторами фібринового матриксу та MSC і клітинами та волокнами травмованого спинного мозку.

Проведене дослідження має низку типових для такого класу робіт технічних обмежень. На-

приклад, варіабельність неврологічного дефіциту після моделювання бічного половинного перетину спинного мозку у тварин однієї генеалогічної лінії за однакових умов утримання, на нашу думку, слід пов'язувати насамперед із варіабельністю судинного русла спинного мозку (Tveten, 1976; Cao et al, 2015; Mazensky et al, 2017; Li et al, 2020), тому механічна травма спинного мозку доповнюється у різних тварин ішемічним і геморагічним ураженням різного ступеня тяжкості. У зв'язку із прагненням уберегти задні серединні судини спинного мозку, зокрема задню серединну артерію, яка за даними деяких джерел (Paxinos, 2015; Mazensky et al, 2017) наявна у щурів, одноманітне серединне розташування одного із країв рани спинного мозку технічно неможливе. Індивідуальні топографо-анатомічні особливості ділянки травми (вроджені та сформовані під час виконання доступу), малий розмір об'єкта хірургічного втручання та інші техніко-хірургічні обставини є додатковими чинниками варіатизації обсягу первинного і вторинного ушкодження спинного мозку.

Крім того, шкала BBB, використана нами у дослідженні, була запропонована як інструмент визначення дефіциту рухової функції задніх кінцівок щура після двобічного ушкодження спинного мозку (Basso et al, 1995). Однак цю шкалу використовують також для оцінки неврологічного дефіциту при однобічних ушкодженнях спинного мозку (Medvediev et al, 2022). У таких умовах верифікаційний потенціал шкали, на нашу думку, обмежений (Abdallah et al, 2021; Medvediev, Abdallah et al, 2021; Medvediev, Savosko et al, 2021; Medvediev et al, 2022), що пов'язано зі складністю застосування більшості критеріїв шкали – позиціювання стопи подошвою вниз (plantar placement), підтримання кінцівкою маси відповідного квадрату тіла (weight support), координація локомоторних рухів передніх і задніх кінцівок (forelimb-hindlimb coordination), відрив великого пальця (toe clearance) та позиціювання стопи на поверхні локомоції (raw position) під час крокового циклу, а також транслатеральна локомоторна стабільність тулуба (trunk instability) та утримання хвоста над поверхнею локомоції. Очевидно, що негативні наслідки цього методологічного недоліку значною мі-

рою компенсуються дотриманням однакових умов застосування шкали в усіх експериментальних групах і не мають впливати на висновки щодо значущості апробованого методу відновного лікування.

Задля усунення неспроможності шкали Ashworth верифікувати стан слабкого спастичного парезу ми використали оригінальні визначники цього стану (Abdallah et al, 2021; Medvediev, Abdallah et al, 2021; Medvediev, Savosko et al, 2021; Medvediev et al, 2022). Попри це інформативність технічно складнішого альтернативного інструменту визначення спастичності – електронейроміографії також обмежена (Abdallah et al, 2021; Medvediev, Abdallah et al, 2021; Medvediev, Savosko et al, 2021; Medvediev et al, 2022).

З огляду на усі перелічені моменти, а також беручи до уваги межі значень ПФ у експериментальних групах і величину різниці ПФ у досліджуваних і референтній групі, можна вважати отримані у цій роботі дані вповні достовірними.

Підсумовуючи, відмітимо, що MSC Вартовних драглів людини, інкорпоровані у фібриновий матрикс, демонструють культуральні ознаки активної життєдіяльності, росту і зберігають здатність до міграції. Інтенсивне збільшення рівня рухової функції паретичної кінцівки у групі Fb обмежувалося першими 2-ма тиж спостереження, у групі MSC – 3-ма тиж. Впродовж усього експерименту рівень рухової функції паретичної кінцівки у групі MSC був меншим за такий у групі Fb, однак лише у перший тиждень спостереження статистично значущо. Через 5 міс показник рухової функції становив $10,4 \pm 1,0$ бала за шкалою BBB у групі MSC, $11,6 \pm 2,0$ бала – у групі Fb, $5,9 \pm 1,6$ бала – у групі Tg. Статистично значущу різницю виявлено між показниками груп MSC і Tg через 6 тиж та 5 міс після імплантації. Істотне переважання рівня спастичності зареєстровано у групі Tg порівняно з групою MSC через 6 та 7 тиж і через 5 міс після травми, а порівняно з групою Fb – через 7 тиж. Статистично значущих відмінностей за рівнем спастичності між групами MSC і Fb впродовж усього експерименту не виявлено.

Отже, негайна імплантація фібринового матриксу у зону травми спинного мозку позитив-

но впливає на відновлення рухової функції паретичної кінцівки тварини, особливо за наявності мезенхімних стромальних клітин Вартонових драглів людини.

Дотримання етичних стандартів. Під час виконання роботи дотримувалися принципів біоетики, гуманного поводження з тваринами, регламентованими Директивою Ради ЄС 86/609/ЕЕС «Про наближення законів, підзаконних та адміністративних положень держав-членів про захист тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей» (1986), Європейською Конвенцією про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей (1986) та Законом України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006). Дослідження схвалене Комісією з біоетики при Інституті нейрохірургії імені акад. А.П. Ромоданова НАМН України (протокол № 30 від 11.04.2019).

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ у державному, комерційному або некомерційному секторах.

INFLUENCE OF FIBRIN MATRIX
IMPLANTATION ASSOCIATED
WITH MESENCHYMAL WHARTON'S JELLY
STROMAL CELLS ON THE COURSE
OF EXPERIMENTAL SPINAL CORD INJURY

V.V. Medvediev, N.P. Oleksenko, L.D. Pichkur,
S.A. Verbovska, S.I. Savosko, N.G. Draguntsova,
Yu.A. Lontkovskiy, V.V. Vaslovych, V.I. Tsymbalyuk

Bogomolets National Medical University,
13, Tarasa Shevchenka Blv, Kyiv, 01601, Ukraine
SI «Romodanov Neurosurgery Institute, National
Academy of Medical Sciences of Ukraine»,
32, Platona Mayborody Str., Kyiv, 04050, Ukraine
Kamyranets-Podilsky city state hospital,
31, Pushkins'ka St., Kamianets-Podilskiy,
Khmelnitskiy Oblast', 32301, Ukraine

E-mail: vavo2010@gmail.com, n.oleksenko@gmail.com,
l.pichkur@neuro.kiev.ua, verbovska-svetlana@ukr.net,
savosko_s@ukr.net, natalya.exlab@gmail.com,
yulont@ukr.net, greycat312@gmail.com,
tsymb777@gmail.com

The effectiveness of immediate implantation of the fibrin matrix associated with mesenchymal stromal cells

of Wharton's jelly was investigated in a spinal cord injury (SCI) model. The study was conducted using white adult outbred male rats (~260 g, 4–5 months old). The trauma model is a left-sided section of a half of the spinal cord at the level of T₁₃–L₁ segments. The rehabilitation involved the immediate transplantation of the human fibrin matrix associated with mesenchymal stromal cells of human Wharton's jelly (mesenchymal stromal cells, MSC, n = 9) into the injury area. The reference groups had the isolated SCI (trauma, Tr, n = 7) and the implantation of the human fibrin matrix (fibrin, Fb, n = 6) in the area of injury. The motor activity and spasticity of the paretic limb were evaluated on the BBB scale and the Ashworth scale in our own modifications, respectively. The morphological picture in the area of injury was studied in the remote period using the impregnation of longitudinal sections of the spinal cord with silver nitrate. Mesenchymal stromal cells of human Wharton's jelly in the presence of fibrin matrix showed the signs of active vitality, growth, and migratory potential in the culture. The intense increase in the motor activity of the paretic limb in the Fb group was limited to the first 2 weeks of follow-up, in the MSC group – 3 weeks of follow-up. Throughout the experiment, the level of function in the MSC group was inferior to the level of the Fb group, but only in the first week of observation it was significant. Five months later, the index of motor function was 10.4 ± 1.0 points of BBB (MSC) and 11.6 ± 2.0 points of BBB (Fb), and in the group Tr – 5.9 ± 1.6 points of BBB. However, a significant difference in the values of the indicator was found for the MSC and Tr groups – 6 weeks, 3 and 5 months after the implantation. A significant advantage of the level of spasticity in the Tr group over the MSC group was found 6 and 7 weeks and 5 months after the injury, and an advantage over the Fb group – 7 weeks after injury. No significant differences in the level of spasticity between the MSC and Fb groups were found throughout the experiment. Immediate fibrin matrix implantation to the spinal cord injury area has a positive effect on the restoration of motor function of the paretic limb of the animal, especially in the presence of mesenchymal stromal cells of human Wharton's jelly.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Abbaszadeh H, Ghorbani F, Derakhshani M et al (2020) Regenerative potential of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: A new horizon of stem cell therapy. *J Cell Physiol* 235(12):9230–9240. <https://doi.org/10.1002/jcp.29810>.
- Abdallah I, Medvediev V, Draguntsova N et al (2021) Dependence of the restorative effect of macroporous poly(N-[2-Hydroxypropyl]-methacrylamide hydrogel on the severity of experimental lacerative spinal cord

- injury. USMJYJ127(4):8–21. <https://mmj.nmuofficial.com/index.php/journal/article/view/840>.
- Adegeest CY, van Gent JAN, Stolwijk-Swüste JM, Post MWM, Vandertop WP, Öner FC, Peul WC, Wengel PVT (2021) Influence of severity and level of injury on the occurrence of complications during the subacute and chronic stage of traumatic spinal cord injury: a systematic review. *J Neurosurg Spine* 36(4):632–652. <https://doi.org/10.3171/2021.7.SPINE21537>.
- Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S (2019) Traumatic spinal cord injury: an overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms. *Front Neurol* 10:282. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00282>.
- Allahbakhshi ME, Taband MR (2015) Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells and their differentiation into Pdx-1+ cells. *J Biomed Sci Engineering* 08(11):780–788. <https://doi.org/10.4236/jbise.2015.811074>.
- Amable PR, Carias RBV, Teixeira MVT et al (2013) Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther* 4(3):67. <https://doi.org/10.1186/scrt218>.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 12(1):1–21. <https://doi.org/10.1089/neu.1995.12.1>.
- Blesch A, Tuszynski MH (2009) Spinal cord injury: plasticity, regeneration and the challenge of translational drug development. *Trends Neurosci* 32(1):41–47. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.09.008>.
- Bonaventura G, Incontro S, Iemmolo R et al (2020) Dental mesenchymal stem cells and neuro-regeneration: A focus on spinal cord injury. *Cell Tissue Res* 379(3):421–428. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03109-4>.
- Bresnahan JJ, Scoblionko BR, Zorn D et al (2022) The demographics of pain after spinal cord injury: a survey of our model system. *Spinal Cord Ser Cases* 8(1):14. <https://doi.org/10.1038/s41394-022-00482-1>.
- Brown A, Martinez M (2019) From cortex to cord: motor circuit plasticity after spinal cord injury. *Neural Regen Res* 14(12):2054–2062. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.262572>.
- Burns AS, Marino RJ, Kalsi-Ryan S et al (2017) Type and timing of rehabilitation following acute and subacute spinal cord injury: A systematic review. *Global spine journal* 7(3 Suppl):175S-194S. <https://doi.org/10.1177/2192568217703084>.
- Calguner E, Erdogan D, Elmas C et al (2006) Innervation of the rat anterior abdominal wall as shown by modified Sihler's stain. *Med Princ Pract* 15(2):98–101. <https://doi.org/10.1159/000090911>.
- Cao Y, Wu T, Yuan Z et al (2015) Three-dimensional imaging of microvasculature in the rat spinal cord following injury. *Sci Rep* 5:12643. <https://doi.org/10.1038/srep12643>.
- Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Mol Biol Rev* 75(1):50–83. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10>.
- Carriel V, Garrido-Gomez J, Hernandez-Cortes P et al (2013) Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *J Neural Eng* 10(2):026022. <https://doi.org/10.1088/1741-2560/10/2/026022>.
- Carriel V, Scionti G, Campos F et al (2015) In vitro characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute. *J Tissue Eng Regen Med* 11(5):1412–1426. <https://doi.org/10.1002/term.2039>.
- Chan BCF, Craven BC, Furlan JC (2018) A scoping review on health economics in neurosurgery for acute spine trauma. *Neurosurg Focus* 44(5):E15. <https://doi.org/10.3171/2018.2>.
- Chandrababu K, Sreelatha HV, Sudhadevi T et al (2021) *In vivo* neural tissue engineering using adipose-derived mesenchymal stem cells and fibrin matrix. *J Spinal Cord Med* 2021 Jun 1:1–15. <https://doi.org/10.1080/10790268.2021.1930369>.
- Cizkova D, Murgoci AN, Cubinkova V (2020) Spinal cord injury: animal models, imaging tools and the treatment strategies. *Neurochem Res* 45(1):134–143. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02800-w>.
- Dennie D, Louboutin JP, Strayer DS (2016) Migration of bone marrow progenitor cells in the adult brain of rats and rabbits. *World J Stem Cells* 8(4):136–157. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v8.i4.136>.
- DeVivo MJ (2012) Epidemiology of traumatic spinal cord injury: trends and future implications. *Spinal Cord* 50(5):365–372. <https://doi.org/10.1038/sc.2011.178>.
- DeVivo MJ, Savic G, Frankel HL et al (2018) Comparison of statistical methods for calculating life expectancy after spinal cord injury. *Spinal Cord* 56(7):666–673. <https://doi.org/10.1038/s41393-018-0067-1>.
- Dodd W, Motwani K, Small C et al (2022) Spinal cord injury and neurogenic lower urinary tract dysfunction: what do we know and where are we going? *J Mens Health* 18(1):24. <https://doi.org/10.31083/j.jomh1801024>.
- Dong HW, Wang LH, Zhang M et al (2005) Decreased dynorphin A (1-17) in the spinal cord of spastic rats after the compressive injury. *Brain Res Bull* 67(3):189–195. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.06.026>.
- Fan B, Wei Z, Feng S (2022) Progression in translational research on spinal cord injury based on

- microenvironment imbalance. *Bone Res* 10(1):35. <https://doi.org/10.1038/s41413-022-00199-9>.
- Farid MF, S Abouelela Y, Rizk H (2021) Stem cell treatment trials of spinal cord injuries in animals. *Auton Neurosci* 238:102932. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2021.102932>.
- Flynn JR, Graham BA, Galea MP et al (2011) The role of propriospinal interneurons in recovery from spinal cord injury. *Neuropharmacology* 60(5):809–822. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.016>.
- GBD 2016 Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury Collaborators (2019) Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet Neurol* 18(1):56–87. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30415-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30415-0).
- Hotwani K, Sharma K (2014) Platelet rich fibrin – a novel acumen into regenerative endodontic therapy. *Restor Dent Endod* 39(1):1–6. <https://doi.org/10.5395/rde.2014.39.1.1>.
- Huang B, Li G, Jiang XH (2015) Fate determination in mesenchymal stem cells: a perspective from histone-modifying enzymes. *Stem Cell Res Ther* 6(1):35. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0018-0>.
- Jeong HJ, Yun Y, Lee SJ et al (2021) Biomaterials and strategies for repairing spinal cord lesions. *Neurochemistry International* 144:104973. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.104973>.
- Joerger-Messerli MS, Marx C, Oppliger B et al. (2016) Mesenchymal stem cells from Wharton's jelly and amniotic fluid. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 31:30-44. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2015.07.006.
- Johnson PJ, Parker SR, Sakiyama-Elbert SE (2010) Fibrin-based tissue engineering scaffolds enhance neural fiber sprouting and delay the accumulation of reactive astrocytes at the lesion in a subacute model of spinal cord injury. *J Biomed Mater Res A* 92(1):152–163. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32343>.
- Karantalos V, Hare JM (2015) Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ Res* 116(8):1413–1430. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303614>.
- Khorasanizadeh M, Yousefifard M, Eskian M et al (2019) Neurological recovery following traumatic spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. *J Neurosurg Spine* 15:1–17. <https://doi.org/10.3171/2018.10.SPINE18802>.
- Kolomyitsev AK, Chaykovskiy YuB, Tereshchenko TL (1981) Bystryy metod impregnatsii azotnokislym serebrom elementov perifericheskoy nervnoy sistemy, prigodnyy dlya perafinovykh i tselloidinovykh srezov. *Arkh Anat* 81(8):93–96. Russian.
- Kopach O, Medvediev V, Krotov V et al (2017) Opposite, bidirectional shifts in excitation and inhibition in specific types of dorsal horn interneurons are associated with spasticity and pain post-SCI. *Sci Rep* 7(1):5884. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06049-7>.
- Li JA, Zhao CF, Li SJ et al (2018) Modified insulin-like growth factor 1 containing collagen-binding domain for nerve regeneration. *Neural Regen Res* 13(2):298–303. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.226400>.
- Li P, Xu Y, Cao Y et al (2020) 3D Digital Anatomic Angioarchitecture of the rat spinal cord: A synchrotron radiation micro-CT study. *Front Neuroanat* 14:41. <https://doi.org/10.3389/fnana.2020.00041>.
- Lin L, Lin H, Bai S et al (2018) Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) improved functional recovery of spinal cord injury partly by promoting axonal regeneration. *Neurochem* 115:80–84. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.02.007>.
- Litvinov RI, Gorkun OV, Owen SF et al (2005) Polymerization of fibrin: specificity, strength, and stability of knob-hole interactions studied at the single-molecule level. *Blood* 106(9):2944–2951. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-2039>.
- Liu J, Chen Q, Zhang Z et al (2013) Fibrin scaffolds containing ectomesenchymal stem cells enhance behavioral and histological improvement in a rat model of spinal cord injury. *Cells Tissues Organs* 198(1):35–46. <https://doi.org/10.1159/000351665>.
- Liu S, Schackel T, Weidner N, Puttagunta R (2018) Biomaterial-supported cell transplantation treatments for spinal cord injury: challenges and perspectives. *Front Cell Neurosci* 11:430. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00430>.
- Liu S, Xie YY, Wang B (2019) Role and prospects of regenerative biomaterials in the repair of spinal cord injury. *Neural Regen Res* 14(8):1352–1363. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.253512>.
- Lu P, Grahman L, Wang Y et al (2014) Promotion of survival and differentiation of neural stem cells with fibrin and growth factor cocktails after severe spinal cord injury. *J Vis Exp* 89:e50641. <https://doi.org/10.3791/50641>.
- Lv B, Zhang X, Yuan J et al (2021) Biomaterial-supported MSC transplantation enhances cell-cell communication for spinal cord injury. *Stem Cell Res Ther* 12(1):36. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02090-y>.
- Main BJ, Maffulli N, Valk JA et al (2021) Umbilical cord-derived Wharton's jelly for regenerative medicine applications: A systematic review. *Pharmaceuticals (Basel)* 14(11):1090. <https://doi.org/10.3390/ph14111090>.
- Majczynski H, Slawinska U (2007) Locomotor recovery after thoracic spinal cord lesions in cats, rats and humans. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 67(3):235–257.
- Mazensky D, Flesarova S, Sulla I (2017) Arterial blo-

- od supply to the spinal cord in animal models of spinal cord injury. A review. *Anat Rec (Hoboken)* 300(12):2091–2106. <https://doi.org/10.1002/ar.23694/>.
- Medvediev VV, Abdallah IM, Draguntsova NG et al (2021) Model of spinal cord lateral hemi-excision at the lower thoracic level for the tasks of reconstructive and experimental neurosurgery. *Ukr Neurosurg J* 27(3):33–35. <http://theunj.org/article/view/234154>.
- Medvediev VV, Oleksenko NP, Pichkur LD et al (2022) Effect of implantation of a fibrin matrix associated with neonatal brain cells on the course of an experimental spinal cord injury. *Cytol Genet* 56:125–138. <https://doi.org/10.3103/S0095452722020086>.
- Medvediev VV, Savosko SI, Abdallah IM et al (2021) The efficacy of immediate implantation of macroporous poly(N-[2-hydroxypropyl]-methacrylamide) hydrogel after laceration spinal cord injury in young rats. *Int J Morphol [Internet]*. 2021;39(6):1749–1757. Available from: http://www.intjmorphol.com/abstract/?art_id=8375.
- Merritt CH, Taylor MA, Yelton CJ et al (2019) Economic impact of traumatic spinal cord injuries in the United States. *Neuroimmunol Neuroinflamm* 6:9. <https://doi.org/10.20517/2347-8659.2019.15>.
- Muheremu A, Peng J, Ao Q (2016) Stem cell based therapies for spinal cord injury. *Tissue Cell* 48(4):328–333. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.05.008>.
- Mukhamedshina YO, Akhmetzyanova ER, Kostennikov AA et al (2018) Adipose-derived mesenchymal stem cell application combined with fibrin matrix promotes structural and functional recovery following spinal cord injury in rats. *Front Pharmacol* 9:343. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00343>.
- Muller MF, Ris I, Ferry JD (1984) Electron microscopy of fine fibrin clots and fine and coarse fibrin films. Observations of fibers in cross-section and in deformed states. *J Mol Biol* 174(2):369–384. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(84\)90343-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(84)90343-7).
- Noiseux N, Gneccchi M, Lopez-Illasaca M et al (2006) Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther* 14(6):840–850. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.05.016>.
- Oliveri RS, Bello S, Biering-Suuren F (2014) Mesenchymal stem cells improve locomotor recovery in traumatic spinal cord injury: systematic review with meta-analyses of rat models. *Neurobiol Dis* 62:338–353. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.10.014>.
- Okudo E, Hayashi D, Yaguchi T et al (2016) Differentiation of rat adipose tissue-derived stem cells into neuron-like cells by valproic acid, a histone deacetylase inhibitor. *Exp Anim* 65(1):45–51. <https://doi.org/10.1538/expanim.15-0038>.
- Pang QM, Chen SY, Fu SP et al (2022) Regulatory Role of mesenchymal stem cells on secondary inflammation in spinal cord injury. *J Inflamm Res* 15:573–593. <https://doi.org/10.2147/JIR.S349572>.
- Pang QM, Chen SY, Xu QJ et al (2021) Neuroinflammation and scarring after spinal cord injury: Therapeutic roles of MSCs on inflammation and glial scar. *Front Immunol* 12:751021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.751021>.
- Paxinos G, editor. *The rat nervous system*. 4th ed., London: Elsevier; 2015. Scremin OU. Chapter 31, Cerebral Vascular System; p. 985–1011.
- Peyronnard JM, Charron LF, Lavoie J et al (1986) Motor, sympathetic and sensory innervation of rat skeletal muscles. *Brain Res* 373(1–2):288–302. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90343-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90343-4).
- Pretz CR, Kozlowski AJ, Chen Y et al (2016) Trajectories of life satisfaction after spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 97(10):1706–1713. <https://doi.org/10.1016/j.apmr.2016.04.022>.
- Rao SN, Pearse DD (2016) Regulating axonal responses to injury: the intersection between signaling pathways involved in axon myelination and the inhibition of axon regeneration. *Front Mol Neurosci* 9:33. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00033>.
- Robinson J, Lu P (2017) Optimization of trophic support for stem cell graft in sites of spinal cord injury. *Exp Neurol* 291:87–97. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.02.007>.
- Rodríguez-Barrera R, Flores-Romero A, Buzoianu-Anguiano V et al (2020) Use of a combination strategy to improve morphological and functional recovery in rats with chronic spinal cord injury. *Front Neurol* 11:189. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00189>.
- Rohde E, Pachler K, Gimona M (2019) Manufacturing and characterization of extracellular vesicles from umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for clinical testing. *Cytotherapy* 21(6):581–592. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.12.006>.
- Savic G, DeVivo MJ, Frankel HL et al (2017) Long-term survival after traumatic spinal cord injury: a 70-year British study. *Spinal Cord* 55(7):651–658. <https://doi.org/10.1038/sc.2017.23>.
- Shakhbasau NV, Petyovka SM, Kosmacheva AV et al (2011) Neurogenic induction of human mesenchymal stem cells in fibrin 3D matrix. *Bull Exp Biol Med* 150(4):547–550. <https://doi.org/10.1007/s10517-011-1186-2>.
- Schuh CM, Morton TJ, Banerjee A et al (2015) Activation of schwann cell-like cells on aligned fibrinopoly (lactic-co-glycolic acid) structures: a novel construct for application in peripheral nerve regeneration. *Cells Tissues Organs* 200(5):287–299. <https://doi.org/10.1159/000437091>.

- Shah M, Peterson C, Yilmaz E (2020) Current advancements in the management of spinal cord injury: a comprehensive review of literature. *Surg Neurol Int* 11:2. https://doi.org/10.25259/SNI_568_2019.
- Skoog B, Jakobsson KE (2020) Prevalence of spasticity and below-level neuropathic pain related to spinal cord injury level and damage to the lower spinal segments. *J Rehabil Med Clin Commun* 3:1000039. <https://doi.org/10.2340/20030711-1000039>.
- Steeves JD (2015) Bench to bedside: challenges of clinical translation. *Prog Brain Res* 218:227–239. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2014.12.008>.
- Stefańska K, Ożegowska K, Hutchings G et al (2020) Human Wharton's jelly-cellular specificity, stemness potency, animal models, and current application in human clinical trials. *J Clin Med* 9(4):1102. <https://doi.org/10.3390/jcm9041102>.
- Swieck K, Conta-Steencken A, Middleton FA et al (2019) Effect of lesion proximity on the regenerative response of long descending propriospinal neurons after spinal transection injury. *BMC Neurosci* 20(1):10. <https://doi.org/10.1186/s12868-019-0491-y>.
- Tara S, Krishnan LK (2015) Bioengineered fibri-based niche to direct outgrowth of circulating progenitors into neuron-like cells for potential use in cellular therapy. *J Neural Eng* 12(3):036011. <https://doi.org/10.1088/1741-2560/12/3/036011>.
- Tashiro S, Nakamura M, Okano H (2022) Regenerative rehabilitation and stem cell therapy targeting chronic spinal cord injury: A review of preclinical studies. *Cells* 11(4):685. <https://doi.org/10.3390/cells11040685>.
- Tatullo M, Marrelli M, Cassetta M et al (2012) Platelet rich fibrin (P.R.F.) in reconstructive surgery of atrophied maxillary bones: Clinical and histological evaluations. *Int J Med Sci* 9:872–880. <https://doi.org/10.7150/ijms.5119>.
- Tatullo M, Marrelli M, Cassetta M et al (2012) Platelet rich fibrin (P.R.F.) in reconstructive surgery of atrophied maxillary bones: Clinical and histological evaluations. *Int J Med Sci* 9:872–880. <https://doi.org/10.7150/ijms.5119>.
- Tran AP, Warren PM, Silver J et al (2018) The biology of regeneration failure and success after spinal cord injury. *Physiol Rev* 98(2):881–917. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2017>.
- Tveten L (1976) Spinal cord vascularity. IV. The spinal cord arteries in the rat. *Acta Radiol Diagn (Stockh)* 17(4):385–398. <https://doi.org/10.1177/028418517601700401>.
- Wang AYL, Loh CYY, Shen HH et al. (2020) Human Wharton's jelly mesenchymal stem cell-mediated sciatic nerve recovery is associated with the upregulation of regulatory T cells. *Int J Mol Sci* 21(17):6310. <https://doi.org/10.3390/ijms21176310>.
- Wang Y, Lv HQ, Chao X et al (2022) Multimodal therapy strategies based on hydrogels for the repair of spinal cord injury. *Mil Med Res* 9(1):16. <https://doi.org/10.1186/s40779-022-00376-1>.
- Wang Y, Tan H, Hui X (2018) Biomaterial scaffolds in regenerative therapy of the central nervous system. *Biomed Res Int* 2018:784890.1 <https://doi.org/10.1155/2018/7848901>.
- Weisel JW, Litviniv RI (2017) Fibrin Formation, Structure and Properties. *Subcell Biochem* 82:405–456. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49674-0_13.
- Xin H, Li Y, Chopp M (2014) Exosomes/miRNAs as mediating cell-based therapy of stroke. *Front Cell Neurosci* 8:377. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00377>.
- Yao S, Liu X, Yu S et al (2016) Co-effects of matrix low elasticity and aligned topography on stem cell neurogenic differentiation and rapid neurite outgrowth. *Nanoscale* 8(19):10252–10265. <https://doi.org/10.1039/c6nr01169a>.
- Yasuda H, Kuroda S, Shichinohe H (2010) Effect of biodegradable fibrin scaffold on survival, migration and differentiation of transplanted bone marrow stromal cells after cortical injury in rats. *J Neurosurg* 112(2):336–344. <https://doi.org/10.3171/2009.2.JNS08495>.
- Yin K, Wang S, Zhao RC (2019) Exosomes from mesenchymal stem/stromal cells: a new therapeutic paradigm. *Biomark Res* 7:8. <https://doi.org/10.1186/s40364-019-0159-x>.
- Yousefifard M, Nasser Maleki S, Askarian-Amiri S et al (2019) A combination of mesenchymal stem cells and scaffolds promotes motor functional recovery in spinal cord injury: A systematic review and meta-analysis. *J Neurosurg Spine* 32(2):269–284. <https://doi.org/10.3171/2019.8.SPINE19201>.
- Zhang Q, Shi B, Ding J (2019) Polymer scaffolds facilitate spinal cord injury repair. *Acta Biomater* 88:57–77. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.01.056>.

Надійшла в редакцію 02.06.22
Після доопрацювання 28.07.22
Прийнята до друку 18.01.23