

**ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОМБИНИРОВАННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ  
ТРАНСПЛАНТАТОВ ПРИ ОСТРОЙ ТРАВМЕ СПИННОГО МОЗГА  
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

С.П. Миронов<sup>1</sup>, Г.А. Степанов<sup>1</sup>, Г.Т. Сухих<sup>2</sup>, И.Г. Гришин<sup>1</sup>, В.В. Троценко<sup>1</sup>,  
А.И. Крупаткин<sup>1</sup>, Д.О. Карпенко<sup>1</sup>, А.Ю. Моргунов<sup>1</sup>, М.А. Александрова<sup>3</sup>,  
М. Марей<sup>2</sup>, Р.А. Полтавцева<sup>2</sup>, А.В. Ревущин<sup>3</sup>, О.В. Подгорный<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова,  
<sup>2</sup>Центр акушерства, гинекологии и перинатологии РАМН, <sup>3</sup>Институт биологии развития РАН, Москва

---

*С целью изучения возможностей восстановления функции поврежденного спинного мозга впервые проведены эксперименты на 65 крысах по подбору комбинированного биологического трансплантата, способствующего оптимальной васкуляризации и восполнению дефицита нервной ткани после дозированного ушиба спинного мозга. Показано, что для стимуляции компенсаторно-восстановительных процессов в травмированном спинном мозге взрослых крыс наиболее приемлемы комбинированные трансплантаты с использованием васкуляризованного сальника по Голдсмиту и/или аллоаорты (повернутой адвентицией к спинному мозгу) с одновременным введением нейральных стволовых клеток.*

*In order to study the potentiality of spinal cord reconstruction the experimental work (65 rats) on the selection of the combined biologic graft for stimulation of optimum vascularization, elimination of nerve tissue deficit, restoration of neurologic function and survival rate of animals after dosed contusion of spinal cord was performed. In experimental group (41 rats) suspension of cultured neural stem cells was administered. Control group included 24 animals. For stimulation of compensative restorative processes in the injured spinal cord of adult rats combined grafts with use of either vascularized omentum by Goldsmith or allooorta (adventitia turned to the spinal cord) with simultaneous of neural stem cells are the most appropriate.*

---

Необходимость разработки методов восстановления (даже частичного) утраченной в результате травмы функции спинного мозга не вызывает сомнений. Эта проблема имеет чрезвычайно важное не только медицинское, но и социально-экономическое значение. Над ее решением многие годы работают как медики, так и специалисты смежных областей (биологии, физиологии). Однако существенного прогресса пока не достигнуто. Нервная ткань головного и спинного мозга человека обладает слабым репаративным потенциалом, поэтому лечение больных с тяжелыми травматическими повреждениями центральной нервной системы во многих случаях не дает желаемого результата [3, 4, 10, 17].

При осложненной травме позвоночника нейрохирурги и травматологи, стремясь как можно быстрее устранить внешнюю механическую причину компрессии спинного мозга (удаление костных фрагментов, стабилизация позвоночного столба), не всегда учитывают степень его повреждения. Весьма часто удается удалить механический фактор сдавления, снять компрессию спинного мозга, стабилизировать позвоночник и восстановить проводниковую функцию неповрежденных волокон [4, 10, 17, 18]. Однако даже в этих случаях травма, нанесенная спинному мозгу, нередко приводит к выра-

женному нарушению спинального кровообращения. И хотя анатомическая целостность спинного мозга частично сохраняется, нарушение спинального кровообращения, ишемия и гибель нервной ткани в зоне травмы влекут за собой рубцевание спинного мозга, развитие его травматической болезни. В подобной ситуации только восстановление нарушенного кровообращения не обеспечивает даже частичного восстановления функции спинного мозга.

В ЦИТО начиная с 1995 г. проводятся экспериментально-клинические исследования, целью которых является разработка микрохирургических операций по восстановлению кровообращения и репаративной функции спинного мозга при тяжелой спинальной травме [5–9, 12–15, 18, 19]. На первом этапе были разработаны микрососудистые операции, направленные на реваскуляризацию поврежденного участка спинного мозга, в том числе с использованием сегмента большого сальника на сосудистой ноже [9, 14]. Однако одного восстановления циркуляторного компонента в поврежденном участке спинного мозга оказалось явно недостаточно при дефиците нервной ткани и ее рубцевании.

При тяжелой травме спинного мозга нужно стремиться не только восстановить прерванное кровообращение, но и восполнить дефицит нейро-

нов. Кроме того, следует учитывать, что рубцовые и дегенеративные изменения спинного мозга приводят к образованию значительного дефекта между центральным и периферическими концами его поврежденного участка. Этот дефект необходимо заполнить нейронеуральным трансплантатом. Исследования А.А. Коржа и соавт. [4] показали, что процесс дегенерации спинного мозга после травмы на определенном этапе прекращается и изменения в мозге через 1,5 года и через 35 лет после его перерыва практически идентичны. В связи с этим создание комбинированного биологического трансплантата, способного обеспечить компенсацию кровообращения и восполнить дефицит медуллярной ткани, открыло бы перспективу успешного выполнения операций по восстановлению спинного мозга в отдаленном периоде после травмы.

Введение в рубцовую ткань между концами спинного мозга эмбриональных и фетальных тканей не приводит к желаемому результату — в этой области формируются кисты. Последние десятилетия ознаменовались бурным развитием в сфере биотехнологий, основанных на трансплантации различных типов клеток (нативных и измененных с помощью генной инженерии) для восполнения дефицита медуллярной ткани [1–3, 11, 16, 19, 21]. Наиболее перспективным направлением в настоящее время считается использование нейральных стволовых клеток [19]. Эмбриональные и фетальные нейральные стволовые клетки количественно наращивают, сохраняют *in vitro* и затем используют для трансплантации.

Известно, что для регенерации клеток периферической нервной системы необходимы направляющие пути в виде шванновских клеток. С учетом этого нами предложен принципиально новый способ восполнения дефекта спинного мозга, который заключается в использовании в качестве «направляющего трансплантата» кровеносного сосуда — артерии или вены [14]. При этом сосудистый трансплантат может служить «футляром» для других биологических трансплантатов, в частности для суспензированных эмбриональных и фетальных клеток.

Целью данного исследования было изучить в эксперименте эффективность применения комбинированных биологических трансплантатов для восстановления травмированного спинного мозга. Такой трансплантат должен обеспечивать восстановление кровообращения и восполнение дефицита медуллярной ткани в поврежденном участке. Поэтому в его состав должны входить как компоненты, способствующие неоваскуляризации, так и субстанции, активизирующие аксоногенез. Используя различные по составу и конструкции биологические комбинированные трансплантаты, необходимо было выбрать среди них оптимальные варианты, обеспечивающие наилучшую реваскуляризацию и создающие благоприятные условия для аксоногенеза.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

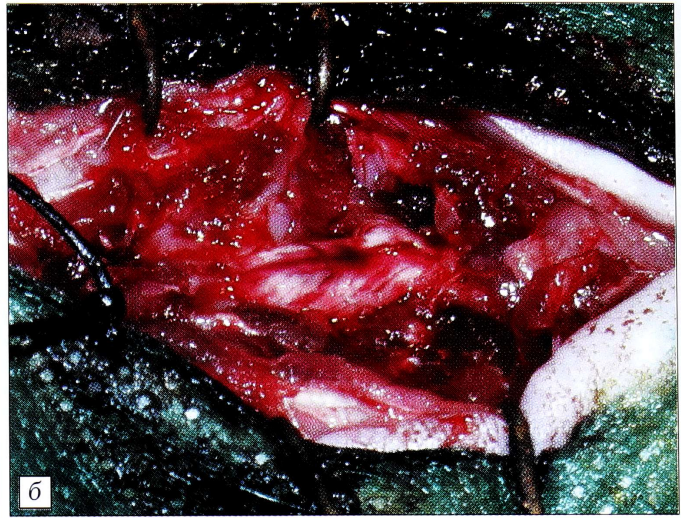
Эксперименты проведены на белых лабораторных крысах Вистар массой 250–300 г. В качестве составляющих комбинированного биологического трансплантата использованы: большой сальник по Голдсмиту, коллагеновая пленка, аллотрансплантаты аорты и периферических нервов (межреберного и седалищного). Выполнены следующие серии опытов: 1-я — отработка модели дозированной травмы (30 опытов); 2-я — пластика поврежденного участка спинного мозга биологическими трансплантатами без нейральных (прогениторных) стволовых клеток — НСК (13); 3-я — пластика биологическими трансплантатами с НСК (41); 4-я — контрольные эксперименты (24).

**Техника операции.** Под внутривентральным каллипсоловым (2%) наркозом выполняли ламинэктомию в области Т8–9 позвонков. Затем воспроизвели дозированный ушиб тканей спинного мозга грузом 10 г с высоты 6,5 и 12 см. Сразу же после нанесения травмы наблюдался отек медуллярной ткани, при этом в 3% случаев повреждалась мягкая мозговая оболочка и в 2% — задняя спинальная артерия (рис. 1). Схема применения комбинированных биологических трансплантатов представлена на рис. 2. НСК мозга человека (3-я серия опытов) транспортировали непосредственно после нанесения травмы. Клетки вводили в количестве 600 тыс. в объеме 3 мкл билатерально на расстоянии 5 мм от эпикентра травмы на глубину 2 мм. Иммуносупрессию экспериментальным животным не проводили.

Для трансплантации использовали суспензию культивированных НСК мозга человека. Ткани мозга были получены от 9-недельных плодов (медицинские аборты). Диссоциированные клетки культивировали в ростовой среде NPBM с добавлением основного фактора роста фибробластов и эпидермального фактора роста. В такой культуре примерно через неделю клетки образовывали агрегаты шарообразной формы (нейросферы). Через четыре пассажа с общим сроком культивирования 12–16 сут клетки использовали для трансплантации. Чтобы обеспечить визуализацию клеток после трансплантации, окрашивали их ядерным люминесцентным красителем — бисбензимином.

В послеоперационном периоде за животными велось динамическое наблюдение. Особое внимание обращалось на динамику восстановления движений, чувствительности, вегетативных функций.

Первые 30 опытов были поисковыми. Их целью было выяснить, какие модели экспериментов наиболее адекватны задачам исследования, прежде всего в плане выживаемости животных, так как операции на спинном мозге весьма травматичны. Высокая летальность среди подопытных крыс в ранние сроки вынудила нас отказаться от операций, при которых происходит тяжелое трав-



**Рис. 1.** Воспроизведение травмы спинного мозга в эксперименте.

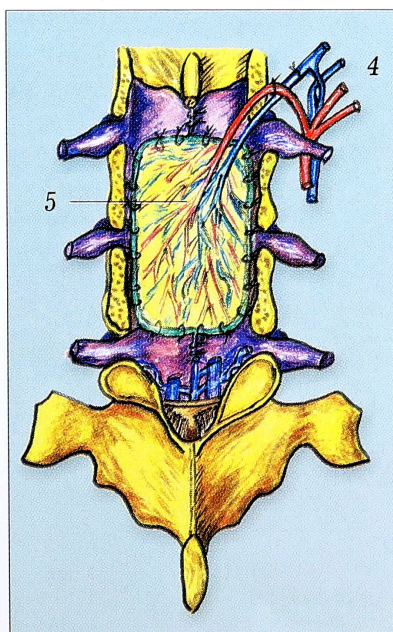
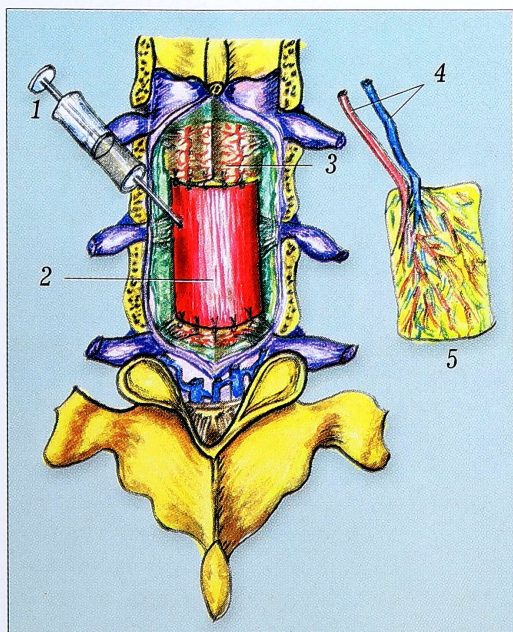
а, б — интраоперационная съемка: а — спинной мозг до нанесения травмы; б — после нанесения дозированной травмы (определяются острый посттравматический отек мозговой ткани, кровоизлияние, повреждение задней спинальной артерии);

в — макропрепарат спинного мозга (после фиксации параформальдегидом) через 7 дней (вверху) и на 8-й неделе (внизу) после травмы.

мирование спинного мозга с образованием его дефекта. Особенно травматичными оказались эксперименты с использованием сосудистого трансплантата в виде «сосудистой манжеты».

Были выбраны следующие наиболее перспективные с позиций выживаемости животных и исходов операций комбинированные биологические трансплантаты: 1) сосудистый аллотрансплантат + аутосальник по методике Голдсмита; 2) то же +

НСК; 3) сосудистый трансплантат + НСК; 4) коллагеновая пленка + сальник по Голдсмит + НСК; 5) седалищный нерв + коллагеновая пленка + НСК. Контролем служили следующие группы: трансплантация только сальника по методике Голдсмита (2 эксперимента), использование только коллагеновой пленки (2), только сосудистого трансплантата (2), ушиб спинного мозга без пластики (6), только прокол спинного мозга инъекционной иг-



**Рис. 2.** Схема применения комбинированного биологического трансплантата при травме спинного мозга.

- 1 — шприц с суспензией нейральных (прогениторных) стволовых клеток;
- 2 — сосудистый трансплантат (аллоартерия);
- 3 — спинной мозг;
- 4 — сосудистая питающая ножка трансплантата сальника;
- 5 — трансплантат большого сальника на сосудистой ножке.

(рисунок В.В. Троценко) —

лой (6), прокол спинного мозга с введением стерильного физиологического раствора (6).

В Институте биологии развития РАН, куда отправляли выживших крыс для гистологического исследования травмированного участка спинного мозга, животных перфузировали транскардиально 4% раствором параформальдегида на фосфатном буфере. После фиксации выделяли спинной мозг в области операции. Полученный материал резали на замораживающем микротоме. Часть срезов окрашивали крезильовым фиолетовым, гематоксилином и эозином, суданом черным. Для окрашивания другой части срезов с целью выявления стволовых клеток использовали первичные антитела: anti Human nuclei (Chemicon 1:50), anti Human nestin (Chemicon 1:30), anti GFAP (DAKO, 1:250), anti B-tubulin III (Abcam 1:200), anti vimentin (NeoMarkers 1:100). Вторичные антитела были мечены флуоресцентными красителями Texas red и Cy-2. Препараты изучали на люминесцентном микроскопе «Opton-3». Результаты гистологического исследования сопоставляли с данными клинических наблюдений.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

В указанных выше пяти группах, где использовались отобранные в качестве наиболее перспективных биологические трансплантаты, отмечены высокий процент выживаемости животных и раннее восстановление двигательной функции, чувствительности, диуреза. У крыс, проживших 15 дней и более, частично восстановились чувствительность, опорность задних лап, самостоятельный диурез. После 20-х суток наблюдалось полное восстановление диуреза, чувствительности, движений и опорности задних лап. Движения задних лап при перемещении животного приобретали координированный характер, возрастала мышечная сила, исчезала «патологическая походка», хромота. Животные, прожившие более 4 нед (а их число в рассматриваемых группах превышало 20%), ничем не отличались от не оперированных здоровых крыс. Приведем данные по группам:

1) *сосудистый трансплантат + сальник по Гольдсмиту*. Из 13 животных выжили 5 с частичным восстановлением двигательной функции с 27-го дня после операции;

2) *сосудистый трансплантат + сальник + НСК*. Из 5 экспериментальных животных этой группы выжили с явным восстановлением основных функций 2, выведенные из опыта соответственно на 18-й и 31-й день;

3) *сосудистый трансплантат + НСК*. Из 13 крыс выжили с восстановлением основных функций 6, выведены из опыта в сроки от 4 до 115 сут;

4) *коллагеновая пленка + аутосальник по Гольдсмиту + НСК*. Из 15 животных выжили с восстановлением основных функций 8, выведены из опыта в сроки от 18 до 61 дня;

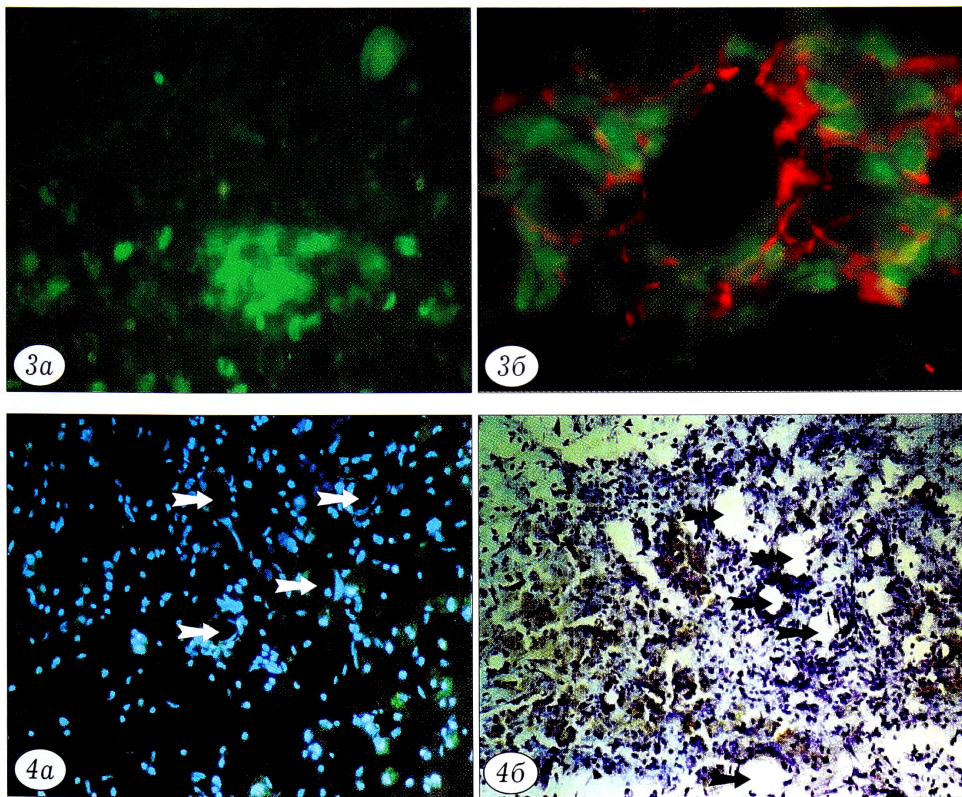
5) *коллагеновая пленка + седалищный нерв + НСК*. Из 8 животных выжили с восстановлением основных функций 5, выведены из опыта в сроки от 2 до 55 сут.

При применении комбинированных биологических трансплантатов, в состав которых входили васкуляризированный сальник по Гольдсмиту и/или аллоаорта в сочетании с НСК, восстановление движений, чувствительности на задних лапах и самостоятельного диуреза отмечалось в сроки от 2 до 12 нед. В контрольных группах животных (без трансплантации НСК) послеоперационная летальность составила в среднем 93%. У выживших крыс восстановление двигательной функции (только частичное) и самостоятельного диуреза происходило в поздние сроки после операции (начиная с 4-й недели).

При иммуногистохимическом исследовании фетальные стволовые клетки в местах их введения обнаруживались у всех экспериментальных животных (за исключением одного) вплоть до 115-х суток. По окраске антителами на Human nuclei выявлена обширная миграция клеток из области введения (рис. 3, а). Множество клеток экспрессировали нестин — маркерный белок стволовых клеток — вплоть до 35-х суток после трансплантации (рис. 3, б). Стволовые клетки имели длинные отростки, которые проникали в ткань спинного мозга реципиента. НСК человека активно мигрировали по волокнам и сосудам спинного мозга реципиента. В местах расположения трансплантатов клеток отмечалась усиленная васкуляризация (рис. 4), формирование кист и глиального барьера отсутствовало.

В контрольных экспериментах с проколом спинного мозга инъекционной иглой без нанесения дополнительной травмы и введения физиологического раствора нарушения функций задних лап и тазовых органов в послеоперационном периоде у животных не наблюдалось. В серии контрольных опытов с введением в спинной мозг микродоз физиологического раствора, аналогичных объему вводимых НСК, при гистологическом исследовании область введения препарата практически не определялась. Не было отмечено глиальной реакции и развития цист. Ткань спинного мозга выглядела нормальной. Выявлялась лишь незначительная лимфоцитарная реакция в области повреждения кровеносных сосудов. Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что травма при инъекции физиологического раствора (контроль по отношению к введению стволовых клеток) не приводит к значительному поражению ткани спинного мозга.

Что касается экспериментов с аллотрансплантацией аорты, то, как показал морфологический анализ, она хорошо сохранялась на поврежденном участке спинного мозга и не провоцировала формирования соединительнотканых рубцов, даже при обширных травмах спинного мозга.



**Рис. 3.** Нейральные стволовые клетки человека после введения в область травмы спинного мозга (30-е сутки после введения). Ядра НСК светло-зеленого цвета.

*a* — миграция НСК в области введения. Окраска антителами на Human nuclei. Люминесцентная микроскопия, ув. 200; *b* — НСК человека в области сосуда. Окраска антителами — нестин человека (красный) и Human nuclei (зеленый). Люминесцентная микроскопия, ув. 400.

**Рис. 4.** Рост сосудов (стрелки) в ткани травмированного спинного мозга крыс в области введения нейральных стволовых клеток человека.

*a* — окраска НСК бисбензидом. Люминесцентная микроскопия, ув. 60; *b* — окраска НСК гематоксилином и эозином, ув. 60.

Таким образом, проведенное исследование позволяет заключить, что для стимуляции компенсаторно-восстановительных процессов в травмированном спинном мозге взрослых крыс наиболее приемлемы комбинированные трансплантаты с использованием васкуляризированного сальника по Голдсмиту и/или аллоаорты с одновременным введением нейральных (прогениторных) стволовых клеток, способных длительно продуцировать нейротрофические факторы [20].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова М.А., Сабурова И.Н., Корочкин Л.И. и др. //Известия АН, серия биологическая. — 2001. — N 6. — С. 656-665.
2. Александрова М.А., Полтавцева Р.А., Ревизиц А.В. и др. //От современной фундаментальной биологии — к наукоемким технологиям: Труды конф. — Пущино, 2002. — С. 46.
3. Басков А.В., Шевелев И.Н., Яриков Д.Е. и др. //Нейрохирургия. — 1998. — N 1. — С. 17-19.
4. Корж А.А., Зяблов В.И., Филиппенко В.А. //Ортопед. травматол. — 1987. — N 2. — С. 70-73.
5. Миронов С.П., Степанов Г.А., Гришин И.Г. и др. //Вестн. травматол. ортопед. — 2003. — N 2. — С. 15-19.
6. Миронов С.П., Степанов Г.А., Гришин И.Г. и др. //Съезд травматологов-ортопедов России, 7-й. — Новосибирск, 2002. — С. 259.
7. Михайлов А.Ю., Хохриков Г.И. //Науч.-практ. конф. SICOT, 13-я. — СПб, 2002. — С. 171.
8. Нацвлишвили З.Г., Степанов Г.А., Морозов А.К., Михайлов А.Ю. //Там же. — С. 96.
9. Нацвлишвили З.Г., Степанов Г.А., Морозов А.К. //Первая учредительная науч.-практ. конф. межрегиональной общественной медицинской организации «Спинальный мозг». — М., 2002. — С. 26-27.
10. Полищук Н.Е., Корж А.А., Фищенко В.Я. Повреждения позвоночника и спинного мозга (механизмы, клиника, диагностика, лечение). — Киев, 2001.
11. Рабинович С.С., Селедцов В.И., Повещенко О.В. и др. //Клинические аспекты клеточной и тканевой терапии: Материалы 2-й межрегиональной науч.-практ. конф. — Омск, 2000. — С. 10-12.
12. Степанов Г.А., Шапошников Ю.Г., Гришин И.Г. и др. //Вестн. травматол. ортопед. — 1998. — N 4. — С. 12-16.
13. Степанов Г.А., Гришин И.Г., Морозов А.К. и др. //Там же. — 2000. — N 2. — С. 40-44.
14. Способ пластики дефекта спинного мозга сосудистым трансплантатом с биологическими тканями /Г.А. Степанов, И.Г. Гришин, Д.О. Карпенко. — Решение о выдаче пат. от 18.04.03. Заявка № 2002 110 424/14.
15. Степанов Г.А., Карпенко Д.О., Александрова М.А. и др. //Бюл. exper. биол. — 2003. — Т. 135, N 24. — С. 466-470.
16. Сухих Г.Е., Малайцев В.В. //Бюл. exper. биол. — 2001. — N 2. — С. 43-55.
17. Чичунов А.С., Корж Н.А., Костицкий М.М., Колей Л.И. //Ортопед. травматол. — 1987. — N 2. — С. 1-6.
18. Шапошников Ю.Г., Степанов Г.А., Гришин И.Г. и др. //Вестн. травматол. ортопед. — 1998. — N 2. — С. 23-27.
19. Aleksandrova M.A., Poltavtseva R.A., Revishchin A.V. et al. //Symp. on therapeutic applications of human stem and precursor cells, 2nd. — Hannover, 2002. — P. 6-8.
20. Lu P., Jones L.L., Snyder E.L., Tyszynski M.N. //Exp. Neurology. — 2003. — Vol. 181. — P. 115-129.
21. Woolsey D. et al. //Exp. Med. Surg. — 1994. — N 2. — С. 93-102.