

УДК 616-089.843:611-018.46:591.481.1:616-001

Гридіна Н.Я., Серкіз О.В., Золотоверх О.М., Нахаба О.О.,  
Величко О.М., Веселова О.І.

### Експериментальна модель аутотрансплантації клітин кісткового мозку при локальній механічній травмі головного мозку

Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, м. Київ

**Вступ.** Сьогодні актуальними є дослідження ефективності трансплантації стовбурових клітин, зокрема, клітин строми кісткового мозку (КСКМ), здатних диференціюватись у нервові клітини та відновлювати пошкоджені тканини ЦНС [1–5]. В популяцію КСКМ входять ретикулоцити, адипоцити, остеобласти, макрофаги та ендотеліоцити. До стовбурових клітин кісткового мозку відносять колонієутворюючі одиниці фібробластів та мезенхімальні стовбурові клітини.

Ефективність трансплантації КСКМ широко вивчають як в експерименті, так і в клінічних умовах. Їх застосування для лікування пошкодження ЦНС ефективно при механічній травмі головного та спинного мозку, ішемічному ураженні головного мозку, демієлінізуючих захворюваннях. Експерименти з трансплантації КСКМ проводять переважно з використанням алогенних стовбурових клітин, після спрямування їх розвитку за нейрогенним типом в умовах культивування. Трансплантація КСКМ з виключенням етапу попереднього культивування може значно прискорити вплив трансплантатів на репарацію пошкоджених тканин головного мозку. Дія прогеніторів найбільш ефективна у ранніх стадіях травматичного процесу, в подальшому її ефективність значно зменшується. Такий підхід запобігає утворенню гліально-сполучнотканинних рубців, що утворюються в тканинах головного мозку внаслідок травматичного пошкодження.

Аутотрансплантація КСКМ має значні переваги у порівнянні з використанням донорських алогенних матеріалів, оскільки вона є маловитратною процедурою, не потребує часу на пошук донорів та їх підбір за показниками гістосумісності, визначення носійства вірусних агентів. При цьому виключається застереження морально-етичного характеру.

Для дослідження впливу аутотрансплантатів на перебіг травматичного процесу зручно використовувати модель локального травматичного пошкодження головного мозку, яка характеризується простотою виконання, високою відтворюваністю, низьким рівнем варіативності морфологічних та функціональних корелятивів травми та смертності тварин. Подібна модель з деякими відмінностями описана в літературі [6].

В літературі немає повідомлень про методи прижиттєвого отримання тканини кісткового мозку для аутотрансплантації. Існуючі моделі [1–5] в експерименті не можуть бути використані для визначення ефективності аутотрансплантації клітин кісткового мозку в експерименті. Як правило, КСКМ у гризунів отримують з кісткового мозку діафіза стегнової кістки. Для отримання необхідної кількості кісткового мозку тварини забивають, видаляють стегнову кістку, розчавлюють її та вимивають вміст діафіза.

Мета дослідження — розробка моделі прижиттєвого відбору достатньої кількості кісткового мозку для його негайної аутотрансплантації у зону травми головного мозку.

Дослідження здійснене у 15 білих безпородних самців щурів віком 6 міс. Всі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до існуючих норм біоетики Європейської конвенції про захист хребетних тварин. Для загального знеболювання внутрішньоочеревинно вводили суміш розчинів ксилазину (10 мг/кг маси тіла «Sedazin», Biowet, Польща) і кетаміну (70 мг/кг маси тіла, «Calypsol», Gedeon Richter, Угорщина). При необхідності подовження наркозу досягали шляхом додаткового внутрішньоочеревинного введення розчину кетаміну.

Травму головного мозку у ділянці лівої лобово-парієтальної ділянки кори наносили за допомогою високооборотного стоматологічного бора. Тварин фіксували на операційному столі черевцем вниз звичним методом. Попередньо поголену і змочену розчином антисептика шкіру на поверхні голови розсікали вздовж середньої лінії, довжина розрізу 2,5–3 см. Апоневроз відшаровували від поверхні кістки. У проекції зазначеної ділянки черепа накладали фрезований отвір високооборотним стоматологічним бором (10000 об./хв) з голівкоподібною фрезою. Відразу після перфорації кістки фрезу занурювали на глибину 5 мм від зовнішньої поверхні кістки і утримували в такому положенні за такої самої частоти обертів протягом 3 с. Після припинення венозної кровотечі рану прикривали стерильною салфеткою.

В лівій стегновій ділянці після гоління та оброблення розчином йоду проводили лінійний розріз шкіри вздовж осі стегнової кістки, яку визначали пальпаторно. На відрізку довжиною 5 см розсікали поверхневі м'язи в ділянці їх фіксації до стегнової кістки. Обережно скелетували її латеральну поверхню, без переходу на ділянку заднього ребра та медіальну поверхню, оскільки саме у цих ділянках розташований судинно-нервовий пучок. Незначна кровотеча припинялася мимовільно. На поверхні стегнової кістки вздовж її осі накладали 4 фрезові отвори до діафізарної частини, які одразу з'єднували один з одним, формуючи жолобоподібне вікно у порожнину діафіза.

За допомогою стоматологічної лопатки видаляли необхідну кількість кісткового мозку разом з трабекулами кістки, вкритими ретикулярною сполучнотканинною вистилкою. Розміри кісткових трабекул не перевищували 1 мм. Життєздатність клітин кісткового мозку аналізували шляхом використання барвника трипанового синього.

За допомогою зігнутого по ребру офтальмологічного пінцета фрагменти отриманого кісткового мозку об'ємом 2–3 мм<sup>3</sup> негайно вводили через сформований

фрезований отвір глибиною 2 мм у ділянку травматичного пошкодження кори.

М'язи та шкіру над оперованою стегною кісткою закривали двома рядами вузлових швів, при цьому простір, що утворився між апоневрозом та дермою, обробляли порошком стрептоциду. Обидві ділянки обробляли розчином антисептиків.

Проводили антибактеріальну терапію шляхом внутрішньом'язового введення водного розчину біциліну-3. Тварин після оперативних втручань утримували у приміщенні при температурі повітря +30°C до повного виходу їх з наркозу.

Впровадження розробленого методу негайної прижиттєвої аутотрансплантації КСКМ щурів дозволяє проводити подальші морфологічні, біохімічні, біофізичні дослідження, а також вивчати поведінкові реакції дослідних тварин у різні строки після аутотрансплантації з метою дослідження механізмів відновлення порушених функцій ЦНС. Летальність тварин протягом експерименту не перевищувала 15%. Кількість нежиттєздатних клітин в аутотрансплантах КСКМ не перевищувала 10–20%.

Запропонований метод прижиттєвого відбору та аутотрансплантації КСКМ в зону травматичного пошкодження головного мозку має ряд переваг у порівнянні з існуючими моделями.

1. Можливість прижиттєвого відбору КСКМ у щурів.

2. Можливість негайної аутотрансплантації КСКМ в зону пошкодження головного мозку щурів.

3. Доступність та легка відтворюваність, низька смертність тварин.

Це дозволяє використовувати метод для вивчення ефективності аутотрансплантації КСКМ у різні строки після ураження головного мозку.

## Список літератури

1. Крик В.М. Вплив трансплантації клітин кісткового мозку молодих донорів на функцію імунної системи у мишей різного віку в різні терміни після опромінення / В.М. Крик // Пробл. старения и долголетия. — 2008. — Т.17, №3. — С.271–278.
2. Цымбалюк В.И. Сравнительная оценка результатов трансплантации криоконсервированных эмбриональных нервных клеток и клеток стромы костного мозга, индуцированных в нейробласты, в область экспериментального эпилептического очага / В.И. Цымбалюк, О.В. Кочин // Укр. нейрохірург. журн. — 2005. — №4. — С.85–89.
3. Получение нейробластов из клеток стромы костного мозга и их клиническое применение при некоторых заболеваниях нервной системы / В.А. Яворская, Н.П. Волошина, В.В. Хвисюк [и др.] // Укр. нейрохірург. журн. — 2006. — №4. — С.89–95.
4. Eglitis M.A. Hematopoietic cells differentiate into microglia and macroglia in the brains of adult mice / M.A. Eglitis, E. Mezey // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — V.94. — P.4080–4085.
5. Sanchez-Ramos J. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro / J. Sanchez-Ramos, S. Song, F. Cardozo-Pelaez [et al.] // Experim. Neurol. — 2000. — V.164, N2. — P.247–258.
6. Пат. 57314 Україна, МПК 7 А61В17/00, А 61К35/12. Спосіб моделювання відкритої проникаючої дозованої черепно-мозкової травми у експериментальних тварин / А.П. Енглезі, Ю.П. Верхоглядюв, О.Г. Хохлов, Ю.Д. Тітов; заявник і патентовласник ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А.П. Ромоданова НАМН України». — №2002086425; заявл. 01.08.02; опубл. 16.06.03.Бюл. №6.

Одержано 16.04.09

*Гридіна Н.Я., Серкіз О.В., Золотоверх О.М., Нахаба О.О., Величко О.М., Веселова О.І.*

**Експериментальна модель аутотрансплантації клітин кісткового мозку при локальній механічній травмі головного мозку**

Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, м. Київ

Представлена модель аутотрансплантації клітин кісткового мозку в пошкоджену зону головного мозку щурів, придатна для проведення морфологічних, біохімічних, поведінкових та інших досліджень у лабораторних тварин. Актуальність розробки експериментальної моделі полягає у можливості прижиттєвого відбору клітин кісткового мозку та одночасної негайної трансплантації в уражені тканини головного мозку без проміжного етапу культивування клітин.

**Ключові слова:** клітини строми кісткового мозку, прижиттєве отримання кісткового мозку, аутотрансплантація, модель механічної травми головного мозку.

*Гридина Н.Я., Серкиз О.В., Золотоверх А.М., Нахаба А.А., Величко О.Н., Веселова О.И.*

**Экспериментальная модель аутотрансплантации клеток костного мозга при локальной механической травме головного мозга**

Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, г. Киев

Представлена модель аутотрансплантації кліток костного мозгу в зону травми головного мозгу крыс, которую можно применить для проведения морфологических, биохимических, поведенческих и других исследований у лабораторных животных. Актуальность создания экспериментальной модели состоит в возможности прижизненного отбора клеток костного мозга и трансплантации в поврежденные участки головного мозга без этапа культивирования.

**Ключевые слова:** клетки стромы костного мозга, прижизненное получение костного мозга, аутотрансплантация, модель механической травмы головного мозга.

*Gridina N.Ya., Serkiz O.V., Zolotoverkh A.M., Nakhaba A.A., Velichko O.N., Veselova O.I.*

**The experimental model of bone marrow cells autotransplantation at local mechanical brain trauma**

Institute of neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev

The model of bone marrow cells autotransplantation in area of brain trauma of rats that can be used for morphological, biochemical, behavioral and other researches providing on laboratory animals is submitted. The actuality of experimental model creation consists in opportunity of a lifetime fence of bone marrow cells and their transplantation into brain damaged areas without previous cultivation.

**Key words:** bone marrow stromal cells, lifetime reception of bone marrow, autotransplantation, model of brain mechanical trauma.

**Коментар**

**до статті Гридіної Н.Я. і співавторів «Експериментальна модель аутотрансплантації клітин кісткового мозку при локальній механічній травмі головного мозку»**

Пошук ефективних методів лікування черепно-мозкової травми (ЧМТ) є актуальним питанням сучасної нейротравматології. Одним з можливих напрямків лікування травматичного ураження мозку може бути клітинна терапія — метод, що передбачає той чи інший різновид трансплантації живих клітин з лікувальною метою.

Автори пропонують експериментальну модель ауто-трансплантації клітин кісткового мозку для лікування відкритого поранення головного мозку в експерименті. Слід зауважити, що термін «модель», як правило, застосовують щодо відтворення патологічних станів. У такій ситуації йдеться про пропозицію нового способу лікування на моделі відкритого проникаючого поранення головного мозку. Простіше було б назвати матеріал як «Аутотрансплантація клітин кісткового мозку при локальній механічній травмі головного мозку».

Наведений спосіб лікування, який гіпотетично може мати позитивний лікувальний ефект в експерименті, проте, результатів оцінки лікувального потенціалу методу немає. Автори лише констатують, що розроблений метод «дозволяє проводити подальші морфологічні, біохімічні, біофізичні дослідження, а також вивчати поведінкові реакції дослідних тварин у різні строки після ауто-трансплантації з метою дослідження механізмів відновлення порушених функцій ЦНС». На наш погляд, у спеціалізованому нейрохірургічному виданні слід публікувати не наукові гіпотези, що є неперевіреними, а готові результати дослідження впливу пропонованого методу на перебіг ЧМТ в експерименті, що дозволить прогнозувати його терапевтичні перспективи.

*В.В. Білошицький, канд. мед. наук,  
лікар-нейрохірург відділення нейротравми  
Інституту нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України*