

УДК: 616.832-001 : 616.71-003.93

С.К. Акишулаков (д.м.н.), Т.Т. Керимбаев (д.м.н.), В.Г. Алейников

АО «Национальный центр нейрохирургии», г. Астана, Казахстан

ОБЗОР МЕТОДОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРОВОДИМОСТИ ТРАВМИРОВАННОГО УЧАСТКА СПИННОГО МОЗГА СОЧЕТАНИЕМ КОМБИНИРОВАННЫХ ПУТЕЙ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕННОГО УЧАСТКА И СТИМУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ АКСОНОВ

Регенерация аксонов центральной нервной системы ингибируется множеством механизмов в организме человека. Несмотря на то, что использование нейротрофических факторов способствовало аксональной регенерации во многих экспериментальных работах на животных, недостаточная активация внутренних регенеративных программ нейронов и внеклеточные ингибиторы регенерации ограничивают эффективность доставки нейротрофических факторов для анатомической и функциональной регенерации спинного мозга после травмы. Таким образом факторы усиливающие рост аксонов необходимо комбинировать с другими методами регенеративной терапии для использования максимального потенциала аксональной регенерации. Кроме того, концентрация и время высвобождения нейротрофических факторов должно быть контролируемым для достижения биологически активной концентрации, для того чтобы регулировать аксональный рост и не допустить нежелательные эффекты чрезмерной концентрации факторов роста. В статье мы рассмотрим эффективность сочетанной терапии для улучшения аксональной регенерации и изучим прогресс в стимулировании аксонального роста в поврежденном участке спинного мозга используя данные методы.

Ключевые слова: нейротропные факторы, генная терапия, аксональная регенерация, травма спинного мозга, клеточная трансплантация

Введение

Актуальность восстановления функции спинного мозга обусловлена ростом в последние годы частоты и тяжести осложненных травм позвоночника. Высокие показатели смертности и инвалидизация среди этих больных, дорогостоящее лечение и реабилитация приводят к экономическому ущербу и требуют поиска новых данных о возможностях восстановления утраченной функции спинного мозга после его повреждения [1].

Несмотря на огромный научный прогресс за последнее десятилетие в теоретических вопросах восстановления функции поврежденного спинного мозга и получение положительных экспериментальных результатов на животных, их практическое использование в клинике практически отсутствует.

Исследования инвиво и инвитро проводимые последние годы определили основные проблемы, которые должны быть решены для улучшения аксональной регенерации центральной нервной системы у взрослых млекопитающих. Существует достаточно доказательств того, что ингибиторы аксонального роста имеют большое значение в создании неблагоприятной среды для регенерации [1, 2]. Реактивное воспаление и реакция глиальной ткани на травму приводит к созданию неблагоприятной среды для аксональной регенерации [3, 4, 5]. Нейроны и клетки глии погибшие во время травмы не могут быть полностью замещены из собственного пула стволовых клеток обуславливая дегенерацию спинного мозга с образованием ликворных кист,

что требует создание субстрата для роста аксонов через очаг повреждения.

Ни одно экспериментальное исследование не может учесть все эти факторы и будет иметь ограниченный эффект на улучшение аксонального роста. Во время регенерации и роста аксонов в поврежденной периферической нервной системы множество механизмов взаимодействуют для эффективного и контролируемого аксонального роста. Физиологические механизмы обуславливающие направление роста аксонов и способствующие росту внеклеточных матрикс взаимодействуют в придании направленности роста аксонов. К тому же сами нейроны имеют высокую способность к аксональному росту исходя из морфологического статуса [6, 7].

Вышеуказанные примеры неэффективности односложного подхода к лечению травмы спинного мозга определяют необходимость воздействия на более чем один фактор в преодолении преград для аксонального роста. Полученные результаты позволяют шире использовать хирургические операции по реконструкции спинного мозга в клинической практике и, возможно, улучшить результаты лечения.

Обзор методик регенерации спинного мозга

В литературе описано множество экспериментальных данных по возможности восстановления двигательных и чувствительных функций поврежденного спинного мозга. У крыс аксоны центральной нервной системы обладают способностью к регенерации, у человека эта способность подавляется множеством физиологических меха-



низмов, а также, вследствие большого расстояния до рецепторов мишеней, необходимого для прорастания аксонов. Большое количество аксонов в спинном мозге позволяет восстановить ряд утраченных функций даже при повреждении более 90% аксонов. В экспериментах у кошек после повреждения аксонов спинного мозга происходило восстановление утраченных движений, даже при условии сохранности 5-10% от нормального числа аксонов. Подтверждения частичного восстановления движений при повреждениях, оставляющих интактной узкую полосу белого вещества спинного мозга у человека также имеются в литературе. Таким образом, для восстановления утраченных функций требуется регенерация лишь небольшой части аксонов.

Важность среды для успешной регенерации спинного мозга впервые была обозначена в работе Aguayo и коллег, показавших что нейроны головного и спинного мозга дают аксональный рост в имплантированный трансплантат периферического нерва [1, 2]. Как известно аксоны успешно регенерируют в периферических нервах, из чего следует что анастомоз поврежденного аксона ЦНС и периферического нерва является основным направлением для регенерации. Для успешной регенерации необходимо в этом случае решить ряд проблем, которые заключаются в тормозящей роли ферментов глиальных клеток на рост аксонов. В неповрежденной ЦНС аксоны находятся в контакте с астроцитами и олигодендроцитами. После повреждения происходит выделение многочисленных ферментов клеточных мембран и стимулируется избыточное деление астроцитов и образование глиального рубца, разрушение миелина, деление и миграция микроглии и предшественников олигодендроцитов. Поэтому очаг повреждения содержит четыре главных клеточных типа: астроциты, олигодендроциты, предшественники олигодендроцитов и микроглию. К сожалению, все эти клетки могут ингибировать аксональный рост [1, 2, 3].

Другим успешным использованием трансплантационной технологии стала пересадка эмбриональной ткани, а также культивированных нейробластов. Пересаженные эмбриобласты характеризуются высоким потенциалом роста и в ряде случаев приводят к восстановлению утраченных функций. Установлено, что пересаженные клетки приживаются, дифференцируются и растут, сохраняются в течение практически всей жизни реципиента и вступают в тесную функциональную и морфологическую связь с нервной системой хозяина [3, 4]. Растущие аксоны длинных трактов регенерируют в эмбриональный трансплантат и формируют связи с ним, но они не прорастают сквозь эмбриональные клетки в дистальный отрезок спинного мозга. В данном случае эмбриональный трансплантат действует как промежуточный коллектор: аксоны хозяина устанавливают связи с нейронами трансплантата, а последние

в свою очередь с помощью собственных растущих аксонов на некотором расстоянии формируют новые синапсы [4]. Рассматривают и другие механизмы действия трансплантата на мозг реципиента: выделение нейротрофических ростковых факторов, секреция нейрогормонов и нейротрансмиттеров, использование трансплантата в качестве матрицы для прорастания нейритов, реципрокная иннервация и интеграция трансплантата в собственные проводящие пути спинного мозга реципиента [5]. Факторы роста аксонов – это группа пептидов, механизм их действия опосредован через стимуляцию синтеза нуклеиновых кислот и индукцию соответствующих генов. Ростковые факторы стимулируют регенерацию нейронов и пролиферацию глиальных клеток. Практически все клетки спинного мозга имеют рецепторы к факторам роста и все они экспрессируются каждый в определенное время онтогенеза, а также при повреждениях спинного мозга. Активация регенераторного процесса в зоне травмы мозга возможна при пересадке в нее растущей эмбриональной ткани, где имеется полный набор факторов роста и морфогенетических индукторов [6, 7]. В качестве продуцентов факторов роста нервной ткани для пересадки в спинной мозг используются многие отделы эмбрионального мозга, неокортекс, нейроны симпатической цепочки, нервные ганглии кишечника, генно-модифицированные на секрецию GNF фибробласты, ткани опухоли – феохромоцитомы. Как источник миелина трансплантат в области травмы может миелинизировать демиелинизированные волокна, проходящие через травмированный участок, или изменить окружение непересеченных волокон, но потерявших возможность проведения импульса, позволяя им восстановить функции: имеются данные в защиту и против этого предположения [8, 9, 10].

Эти исследования стимулировали поиск клеточной или бесклеточной матрицы, которая может имитировать свойства периферических нервов в качестве трансплантата или даже обеспечить более лучшую среду. Клеточные трансплантаты, состоящие из фибробластов, стромальных клеток костного мозга, шванновских клеток, клеток ольфакторной ямки, стволовых клеток и эмбриональной ткани, это те субстраты которые были протестированы в этом контексте cells [10, 11, 12, 13, 14, 15]. Тем не менее один только клеточный трансплантат не показал эффективности без факторов роста. Исследования показали, что у животных с выключенными факторами роста, процесс регенерации останавливается [16, 17]. Шванновские клетки регулируют экспрессию фактора роста нервов, вырабатываемого головным мозгом нейротрофического фактора, нейротрофического фактора глии, и чисто нейротрофического фактора выражающейся в увеличении количества факторов в дистальном отделе аксонов. После реиннервации количество нейротрофических фак-

торов уменьшается declines [18, 19]. Существуют достоверные данные о том, что фактор роста нервов и факторы роста вырабатываемые в головном мозге активируются в разные фазы травмы нервной системы [20, 21]. Таким образом необходимо учитывать экспрессию различных нейротрофических факторов во временном контексте.

После травмы пространственное и временное распределение нейротрофических факторов обуславливает направленный рост аксонов. Они вызывают каскад реакций направленных на регенерацию аксонов в поврежденной ткани [22]. Наибольшее число факторов вырабатываются когда активируется на концевой части аксона, таким образом регенерация и рост происходят только в области повреждения [23, 24]. Необходимо создать большую концентрацию факторов на всем протяжении трансплантата, который не входит в зону воспаления. Для решения этой проблемы используют мезенхимальные клетки костного мозга и генн НТ-3. В данных исследованиях показана возможность химически стимулировать и ингибировать аксональный рост и регулировать направление роста аксонов. Использование трансплантатов пористой основой инbibированных мезенхимальными клетками еще больше способствует направленному росту аксонов [25, 26].

Комплексное воздействие на травматический процесс в спинном мозге с целью восстановления функции должно включать следующие компоненты:

- нейропротекция с целью стабилизировать уцелевшие структуры и предотвратить волну вторичного повреждения, при наличии грубого анатомического повреждения спинного мозга объединение его поврежденных участков с помощью трансплантата;
- стимуляция роста аксонов путем введения нейротрофических факторов путем системной или локальной инфузии к месту повреждения спинного мозга;
- изменение глиального окружения с использованием антител, генной терапии, трансплантационных методик [27].

Заключение

За последние два десятилетия, стало ясно, что отсутствие регенерации аксонов в ЦНС млеко-

питающих связано с несколькими тормозящими регенерацию механизмами. Сложность травмы спинного мозга и многочисленные факторы, влияющие на регенерацию обуславливают обособленность комбинированных методов стимуляции регенерации, и последние исследования успешно продемонстрировали, что эффективность нейротрофических факторов может быть усилена, если факторы роста применяются в сочетании с другими способами лечения, и наоборот. Развитие экспериментальной медицины столь стремительно, что можно ожидать еще большего прогресса в получении массивного роста аксонов в ближайшие десятилетия. Если даже удастся перенести экспериментальные результаты на людей, маловероятно, что будет получено прорастание по всей длине спинного мозга. Поэтому у пациентов с шейным уровнем травмы может иметь место возвращение некоторых функций верхних конечностей без улучшения в нижних конечностях. При поражении поясничного утолщения и конуса спинного мозга, вероятно, можно будет добиться улучшения функции тазовых органов и вегетативно-трофической иннервации. Тем не менее, эксперименты по изучению воздействия нескольких методов стимуляции в естественных условиях являются трудоемкими и требуют большого количества элементов контроля, для того чтобы проверить каждую отдельную методику и возможную комбинацию этих методов. Кроме того, взаимодействие различных методов стимуляции может не только изменить соотношение доз-реакция каждого вида лечения, но и привести к негативным последствиям и функциональной деградации аксонов. Лучшее понимание механизмов каждого отдельного метода стимуляции регенерации и как можно более адресное воздействие терапевтических методов может улучшить результаты лечения и избежать неблагоприятных последствий. Нерешенные вопросы регенерации остаются, но эмпирические данные нескольких экспериментальных исследований предполагают, что улучшение результатов возможно с использованием нескольких методик стимуляции реиннервации, и обуславливает дальнейшее направление исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5:146–156.
2. Xie F, Zheng B. White matter inhibitors in CNS axon regeneration failure. *Exp Neurol.* 2008;209:302–312.
3. Bethea JR, Dietrich WD. Targeting the host inflammatory response in traumatic spinal cord injury. *Curr Opin Neurol.* 2002;15:355–360. [PubMed]
4. Fitch MT, Silver J. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol.* 2008;209:294–301.
5. Popovich P, McTigue D. Damage control in the nervous system: beware the immune system in spinal cord injury. *Nat Med.* 2009;15:736–737.
6. Blackmore MG, Moore DL, Smith RP, Goldberg JL, Bixby JL, Lemmon VP. High content screening



of cortical neurons identifies novel regulators of axon growth. *Mol Cell Neurosci.* 2010;44:43–54.

7. Moore DL, Blackmore MG, Hu Y, Kaestner KH, Bixby JL, Lemmon VP, Goldberg JL. KLF family members regulate intrinsic axon regeneration ability. *Science.* 2009;326:298–301.

8. David S, Aguayo AJ. Axonal elongation into peripheral nervous system “bridges” after central nervous system injury in adult rats. *Science.* 1981;214:931–933.

9. Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ. Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature.* 1980;284:264–265.

10. Ankeny DP, McTigue DM, Jakeman LB. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. *Exp Neurol.* 2004;190:17–31

11. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widemalk J, El Manira A, Prockop DJ, Olson L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:2199–2204.

12. Tuszynski MH, Gabriel K, Gage FH, Suhr S, Meyer S, Rosetti A. Nerve growth factor delivery by gene transfer induces differential outgrowth of sensory, motor, and noradrenergic neurites after adult spinal cord injury. *Exp Neurol.* 1996;137:157–173.

13. Ramon-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avila J. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron.* 2000;25:425–435. [PubMed]

14. Richter MW, Roskams AJ. Olfactory ensheathing cell transplantation following spinal cord injury: hype or hope? *Exp Neurol.* 2008;209:353–367.

15. Lepore AC, Fischer I. Lineage-restricted neural precursors survive, migrate, and differentiate following transplantation into the injured adult spinal cord. *Exp Neurol.* 2005;194:230–242.

16. English AW, Meador W, Carrasco DI. Neurotrophin-4/5 is required for the early growth of regenerating axons in peripheral nerves. *Eur J Neurosci.* 2005;21:2624–2634.

17. Geremia NM, Pettersson LM, Hasmatali JC, Hryciw T, Danielsen N, Schreyer DJ, Verge VM. Endogenous BDNF regulates induction of intrinsic neuronal growth programs in injured sensory neurons. *Exp Neurol.* 2010;223:128–142.

18. Funakoshi H, Frisen J, Barbany G, Timmusk T, Zachrisson O, Verge VM, Persson H. Differential ex-

pression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol.* 1993;123:455–465.

19. Naveilhan P, ElShamy WM, Ernfors P. Differential regulation of mRNAs for GDNF and its receptors Ret and GDNFR alpha after sciatic nerve lesion in the mouse. *Eur J Neurosci.* 1997;9:1450–1460.

20. Kuo HS, Tsai MJ, Huang MC, Chiu CW, Tsai CY, Lee MJ, Huang WC, Lin YL, Kuo WC, Cheng H. Acid fibroblast growth factor and peripheral nerve grafts regulate Th2 cytokine expression, macrophage activation, polyamine synthesis, and neurotrophin expression in transected rat spinal cords. *J Neurosci.* 2011;31:4137–4147.

21. Meyer M, Matsuoka I, Wetmore C, Olson L, Thoenen H. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J Cell Biol.* 1992;119:45–54.

22. Neet KE, Campenot RB. Receptor binding, internalization, and retrograde transport of neurotrophic factors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 2001;58:1021–1035.

23. Kimpinski K, Campenot RB, Mearow K. Effects of the neurotrophins nerve growth factor, neurotrophin-3, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on neurite growth from adult sensory neurons in compartmented cultures. *Journal of neurobiology.* 1997;33:395–410.

24. Zhou FQ, Snider WD. Intracellular control of developmental and regenerative axon growth. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences.* 2006;361:1575–1592.

25. Prang P, Muller R, Eljaouhari A, Heckmann K, Kunz W, Weber T, Faber C, Vroemen M, Bogdahn U, Weidner N. The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels. *Biomaterials.* 2006;27:3560–3569.

26. Stokols S, Sakamoto J, Breckon C, Holt T, Weiss J, Tuszynski MH. Templated agarose scaffolds support linear axonal regeneration. *Tissue Eng.* 2006;12:2777–2787.

27. И. Н. Шевелев, А. В. Басков, Д. Е. Яриков, И. А. Борщенко. Восстановление функции спинного мозга: современные возможности и перспективы исследования. *Журнал Вопросы нейрохирургии, №3, 2000.*



ТҮЙІНДЕМЕ

С.К. Акшулаков (м.ғ.д.), Т.Т. Керимбаев (м.ғ.д.), В.Г. Алейников

«Ұлттық нейрохирургия орталығы» АҚ, Астана қ., Қазақстан

ЖҰЛЫННЫҢ ЖАРАҚАТТАЛҒАН БӨЛІГІНІҢ ҚАЛПЫНА КЕЛТІРУДЕГІ АКСОНДАР РЕГЕНЕРАЦИЯСЫ СТИМУЛЯЦИЯСЫ ЖӘНЕ ЗАҚЫМДАЛҒАН БӨЛІКТІ ҚАЛПЫНА КЕЛТІРУДІҢ ОРТАҚ ЖОЛДАРЫМЕН БІРІКТІРУ

Орталық жүйке жүйесі аксондарының регенерациясы адам ағзасындағы көптеген механизмдермен ингибируется. Нейротрофикалық факторларды қолдануға қарамастан, жануарларға жүргізілген көптеген тәжірибелік жұмыстарда аксондық регенерациядағы нейрон бағдарламаларының ішкі регенеративті белсенділіктің жеткіліксіздігі және жасушадан тыс регенерация ингибиторлары жарақаттан кейінгі жұлынның анатомиялық және функционалдық регенерациясы үшін нейротрофикалық факторларды жеткізу тиімділігін шектеуге себепші болды. Осыған байланысты, аксондардың өсуін тездететін факторларды аксондық регенерация басымдылығын барынша пайдалану үшін регенеративті терапияның басқа да

әдістерімен араластыру маңызды. Бұдан басқа, нейротрофикалық факторлардың концентрациясы және босатылу уақыты биологиялық белсенді концентрация жетістігі, бұл аксондық өсуді және өсу факторлары концентрациясының шектен тыс керексіз тиімділігін реттеу үшін бақылануы тиіс. Мақалада біз аксондық регенерацияны жақсарту үшін аралас терапияның тиімділігін қарастырамыз және аталған әдісті қолдана отырып жұлынның зақымдалған аймағындағы аксондық өсу ынталандыру прогресін зерттейміз.

Негізгі сөздер: нейротроптық факторлар, гендік терапия, аксональді регенерация, жұлын жарақаты, жасушалы трансплантация.

SUMMARY

S.K. Akshulakov (D.Med.Sci.), T.T. Kerimbayev (D.Med.Sci.), V.G. Aleinikov,

JSC «National Centre for Neurosurgery», Astana, Kazakhstan

REVIEW THE RATIONALE FOR COMBINED TREATMENTS IN AXONAL REGENERATION AND SUMMARIZE SOME RECENT PROGRESS IN PROMOTING AXONAL REGENERATION IN THE SPINAL CORD INJURY

Axonal regeneration is inhibited by a different mechanisms in the adult central nervous system. While neurotrophic factors have been shown to stimulate axonal growth in numerous animal models of nervous system injury, a lack of suitable growth substrates, an insufficient activation of neuron-intrinsic regenerative programs and extracellular inhibitors of regeneration

limit the efficacy of neurotrophic factor delivery for anatomical and functional recovery after spinal cord injury. We will review the rationale for combinatorial treatments in axonal regeneration and summarize some recent progress in promoting axonal regeneration in the injured CNS using such approaches.