



СРАВНЕНИЕ КЛИНИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНТРАОПЕРАЦИОННОЙ И КОМБИНИРОВАННОЙ ФУЗОГЕН-ТЕРАПИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

М. В. Лебенштейн-Гумовски¹, А. В. Жарченко¹,

Т. С.-М. Расуева¹, Д. А. Ковалев², А. М. Жиров², А. А. Шатохин¹

¹ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России;
Россия, 355000 Ставрополь, ул. Мира, 310;

²ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора;
Россия, 355035 Ставрополь, ул. Советская, 13–15;

РЕЗЮМЕ. Травма спинного мозга, приводящая к стойкому неврологическому дефициту, в настоящее время относится к неизлечимым патологиям. Однако активные исследования в этой области позволили определить основные направления поисков лечения спинномозговой травмы. Так, принципиально отличающимся и новым является использование веществ, способствующих первичному слиянию клеточных мембран, так называемых фузогенов. В статье приведены результаты сравнения двух схем разработанной авторами фузоген-терапии — с интраоперационным введением составного фузогена, и в комбинации с внутривенным введением раствора простого фузогена.

ЦЕЛЬ: сравнение клинического эффекта двух схем экспериментальной фузоген-терапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: кролики калифорнийской породы, самки 2,5 кг, N=25. Всем животным моделировали травму спинного мозга с его полным поперечным пересечением. Первой группе (N=10) в диастаз вводили конъюгат ПЭГ-хитозана, второй группе (N=10), помимо введения в диастаз конъюгата ПЭГ-хитозана выполняли внутривенное введение 20 % раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ). Третья группа (N=5) не получала фузогены, и была контрольной. Оценивали двигательную, тазовые функции и чувствительность по шкалам неврологического дефицита для экспериментальных животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ: в группе с комбинированным применением фузогенов происходило ускоренное восстановление функций спинного мозга, по сравнению со схемой, подразумевающей только интраоперационное введение, а итоговые показатели неврологического дефицита достигали больших значений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: интраоперационное введение фузогена в комбинации с внутривенным введением ускоряет процесс восстановления функций спинного мозга после его полного поперечного пересечения в эксперименте, и показывает лучшие результаты по конечным значениям неврологического дефицита.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: спинальная травма, травма спинного мозга, полиэтиленгликоль, ПЭГ, хитозан, Нейро-ПЭГ

Для цитирования: Лебенштейн-Гумовски М. В., Жарченко А. В., Расуева Т. С.-М., Ковалев Д. А., Жиров А. М., Шатохин А. А. Сравнение клинической эффективности интраоперационной и комбинированной фузоген-терапии для лечения травмы спинного мозга в эксперименте. Российский нейрохирургический журнал им. проф. А. Л. Поленова. 2023;15(2):60–65. DOI 10.56618/2071-2693_2023_15_2_60.

COMPARISON OF CLINICAL EFFECTIVENESS OF INTRAOPERATIVE AND COMBINED FUSOGEN THERAPY FOR THE TREATMENT OF SPINAL CORD INJURY IN EXPERIMENT

M. V. Lebenstein-Gumovski¹, T. S.-M. Rasueva¹, A. V. Zharchenko¹, D. A. Kovalev², A. M. Zhirov², A. A. Shatohkin¹

¹Stavropol State Medical University, Ministry of Health of Russia, 310 Mira St., Stavropol 355000, Russia;

²Stavropol Research Institute for Plaque Control, 13–15 Sovetskaya St., Stavropol 355035, Russia;

ABSTRACT. Severe spinal cord injury, leading to a persistent neurological deficit, is currently classified as an incurable pathology. However, active research in this area has made it possible to determine the main directions of the search for the treatment of spinal cord injury. So, fundamentally different and new is the use of substances that promote the primary fusion of cell membranes, the so-called fusogens. The article presents the results of comparing two schemes of fusogen therapy developed by the authors — with intraoperative administration of a compound fusogen, and in combination with intravenous administration of a simple fusogen solution. Objective: to compare the clinical effect of two schemes of experimental fusogen therapy.

METHODS: California rabbits, females 2.5 kg, N=25. All animals were modeled with a spinal cord injury with its complete transverse intersection. The first group (N=10) received PEG-chitosan conjugate into the diastasis, the second group (N=10), in addition to the introduction of PEG-chitosan conjugate into the diastasis, received intravenous injection of

20 % polyethylene glycol solution. The third group (N=5) did not receive fusogens and was the control group. Motor, pelvic functions, and sensitivity were assessed using neurological deficit scales for experimental animals.

RESULTS: in the group with the combined use of fusogens, there was an accelerated recovery of spinal cord functions, compared with the regimen, which implies only intraoperative administration, and the final indicators of neurological deficit reached high values.

CONCLUSION: intraoperative administration of fusogen in combination with intravenous administration accelerates the process of recovery of spinal cord functions after its complete transection in the experiment, and shows the best results in the final values of neurological deficit.

KEYWORDS: spinal injury, spinal cord injury, polyethylene glycol, PEG, chitosan, Neuro-PEG

For citation: Lebenstein-Gumovski M.V., Zharchenko A.V., Rasueva T.S.-M., Kovalev D.A., Zhironov A.M., Shatokhin A.A. Comparison of clinical effectiveness of intraoperative and combined fusogen therapy for the treatment of spinal cord injury in experiment. *Rossiiskii neirokhirurgicheskii zhurnal imeni professora A.L. Polenova.* 2023;15(2):12–12. DOI 10.56618/2071–2693_2023_15_2_60.

Введение. Нарушение морфологической целостности спинного мозга при тяжёлой спинномозговой травме, а также протекающие в очаге патоморфологические процессы делают репарацию и регенерацию аксонов невозможными [1]. При этом аксональный рост в центральной нервной системе также возможен, как и в периферических нейронах, но активная пролиферация олигодендроцитов наравне с эффектом эксайтотоксичности препятствует этому процессу. Если ранее основной поиск решения проблемы спинальной травмы был сконцентрирован на попытках коррекции этих процессов, то в последнее время перспективным направлением является изучение веществ провоцирующих первичное склеивание аксональных мембран — фузогенов [2–7].

В данной статье рассмотрен клинический эффект однократного интраоперационного применения соединений на основе полиэтиленгликоля и хитозана, а также сравнение его с комбинированной фузоген-терапией в эксперименте у животных после травмы спинного мозга.

Цель работы — сравнить клиническую картину у группы кроликов с полным поперечным пересечением спинного мозга, после однократного интраоперационного введения фузоген-герметика, с группой кроликов полным поперечным пересечением спинного мозга, получающих комбинированную фузоген-терапию в послеоперационном периоде.

Материалы и методы. В качестве исследуемого вещества применяли конъюгат хитозана с полиэтиленгликолем. В качестве животной модели использованы кролики (N=25) средней массой 2,5 кг, самки. Животным вводили в качестве премедикации атропина сульфат и дроперидол, и наркотизировали инъекцией Телазола и Рометара (1:4). Выполняли классический доступ к позвоночным дужкам на уровне T8-T10, проводили ламинэктомию дужки T9 позвонка. После продольного вскрытия твёрдой мозговой оболочки (ТМО) в субдуральное пространство вводился гибкий шпатель, приподнимающий спинной мозг. Лезвием скальпеля (№ 15) поперечно пересекали спинной мозг так, чтобы лезвие скальпеля упиралось в шпатель, что обеспечивало полное пересечение спинного мозга и протекцию ТМО. В группе № 1 и № 2 (N=10, N=10)

животным в место травмы вводили фузоген-герметик на основе полиэтиленгликоля и хитозана, животным из группы № 3 (N=5) в место повреждения вводили раствор хлорида натрия 0,9 %. ТМО герметизировали, рану послойно ушивали.

Кроликам, согласно Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях [8], создавали условия достаточной анальгезии и седации, световой режим ночь-день, предоставляли свободный доступ к воде и регулировали питание и обеспечивали комфортный температурный режим.

У всех животных до операции отмечали полный объём движений во всех конечностях, сохранность болевой и температурной чувствительности, нормальные дефекацию и мочеиспускание. После операции выявляли нижний парапарез, нарушения чувствительности и тазовых функций.

Животным из опытной группы № 2 вводили внутривенно 20 % раствор полиэтиленгликоля с молекулярной массой 400кДа, в объёме 5 мл сразу после операции и далее 1 раз в день в краевую вену уха в течение всего эксперимента. Животные из опытной группы № 1 и из контрольной группы инъекции полиэтиленгликоля не получали.

Двигательную активность, чувствительность и тазовые функции исследовали по шкале для экспериментальных животных Basso Beattie Bresnahan (BBB) с модификацией для кроликов, со включением оценки чувствительности и тазовых функций (рис. 1) [9]. Исследование проводили ежедневно, полученные баллы суммировали, рассчитывали среднее арифметическое, по результатам формировали графики для каждой группы.

Для статистической оценки результатов использовался критерий Краскела-Уоллиса, являющийся непараметрическим аналогом однофакторного ANOVA для оценки достоверности результатов, а также критерий Манна-Уитни для анализа результатов между парными группами. Для оценки корреляции результатов между разными группами использовался коэффициент корреляции Спирмана.

Длительность эксперимента — 40 дней после операции.

Модифицированная шкала Basso Beattie Bresnahan (BBB)		конечности в передвижении.		контакте и при отрыве.	
Оценка критерия	Баллы			<i>Чувствительность</i>	
Двигательная активность					
Отсутствие движений	1	Обширные движения всех трех суставов. Без использования конечности в передвижении.	8	Отсутствие реакции на раздражения иглой на дистальных и проксимальных участках кожи задних конечностей.	0
Небольшое движение в одном суставе	2	Подошвенное размещение лапы без поддержки веса. Попытки использовать конечность при ходьбе.	9	Звуковая реакция (писк, крик) в ответ на болевое раздражение и/или попытка убрать раздражитель или уйти от него, при этом без движения в конечности	1
Разгибательное движение в одном суставе	3	Подошвенное размещение лапы с опорой на вес при стоянии.	10	Попытка одёрнуть конечность	2
Умеренное движение в одном суставе и незначительное движение в другом суставе. Без использования конечности в передвижении.	3	Периодические подошвенные шаги с опорой на вес; нет координации, выраженная атаксия.	11	Активное сопротивление в ответ на раздражитель	3
Разгибательное движение в двух суставах. Без использования конечности в передвижении.	4	Частые или последовательные подошвенные шаги с опорой на вес и отсутствие координации	12	Тазовые функции	
Лёгкое движение в трёх суставах. Без использования конечности в передвижении.	5	Частые или последовательные подошвенные шаги с опорой на вес и случайная координация	13	Наличие регулярного диуреза, отсутствие переполнения мочевого пузыря	1
Небольшие движения в двух суставах и обширные движения в третьем. Без использования конечности в передвижении.	6	Частые или последовательные подошвенные шаги с опорой на вес с <i>достаточной координацией передвижения</i>	14	Наличие регулярной дефекации. Умеренное наполнение кишечника (пальпаторно), сохранность моторики кишечника (аускультативно).	1
Обширные движения в двух суставах и легкие движения в третьем. Без использования	7	Постоянный подошвенный шаг и постоянная координация во время продвижения конечности вперед; преобладающее положение лап параллельное или внутреннее при начальном	15	Отсутствие дефекации/мочеиспускания	0
				ИТОГО (МАХ)	20

Рисунок 1. Модифицированная шкала Basso Beattie Bresnahan (BBB), для определения неврологического дефицита у экспериментальных животных.

Figure 1. Modified Basso Beattie Bresnahan scale (BBBs) for control neurological deficit in experimental animals.

Результаты. В течение всего эксперимента у животных из контрольной группы не отмечалось изменения параметров двигательной активности, чувствительности, функций тазовых органов. В период с 1-х по 3-и сутки у контрольной группы развились нарушения тазовых функций по центральному типу, требующие принудительных мер разрешения. Смерть животных из контрольной группы отмечалась на 2-е, 5-е, 11-е сутки, чаще всего с явлениями переполнения мочевого пузыря, разрыва мочеточников, ишемии кишечника. У кроликов из обеих опытных групп со 2-х суток отмечали положительную динамику в виде появления поверхностной чувствительности в проксимальных отделах задних конечностей. Уже на 3-е сутки после операции, у одного животного группы № 2 обнаруживались слабые движения задними лапами, при отсутствии активного отталкивания. На 10-ые сутки, у 4-х животных из группы № 1, и у 7-ми из группы № 2 имелась возможность сопротивляться противодействию. В период с 14-го по 20-й день у кроликов обеих опытных групп фиксировали частичное возвраще-

ние моторной функции и болевой чувствительности. У животных появилась возможность самостоятельно передвигаться используя задние конечности. Тазовые нарушения отсутствовали. Дальнейшее прогрессирование клинической картины в обеих опытных группах было не одинаковым. Так, в группе № 2 наблюдалась ускоренная динамика регресса неврологического дефицита. Динамика изменений отображена на графике (рис. 2).

Корреляция данных между 1-ой, 2-ой и контрольной группами была рассчитана путем вычисления коэффициента Спирмана. В результате расчетов, было выявлено значение коэффициента равное 0,909843, благодаря чему можно судить о достоверности высокой положительной зависимости между клиническим результатом и позитивным эффектом комбинированной терапии с внутривенным введением ПЭГ (степень зависимости стремится к 1).

Средние значения баллов по шкале BBB во всем послеоперационном периоде с планками среднего отклонения выражались в репрезентативной столбчатой диаграмме (рис. 3).

Локомоция, чувствительность и тазовые функции по модифицированной шкале BBB

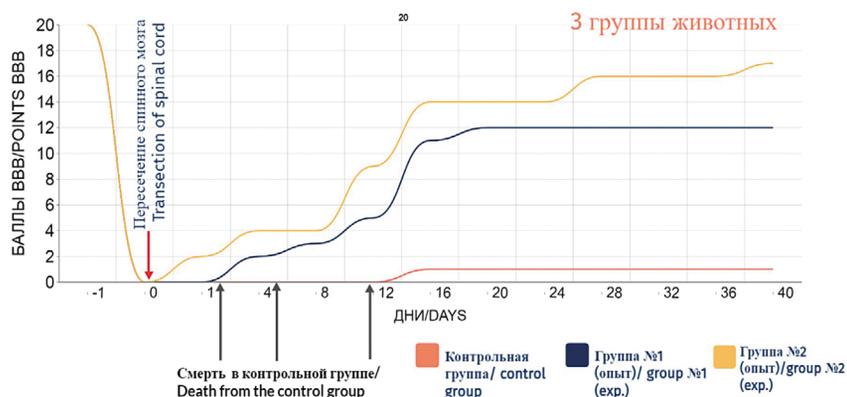


Рисунок 2. Локомоция, чувствительность и тазовые функции по модифицированной шкале BBB.

Figure 2. Locomotion, sensitivity and pelvis functions on a modified scale BBB.

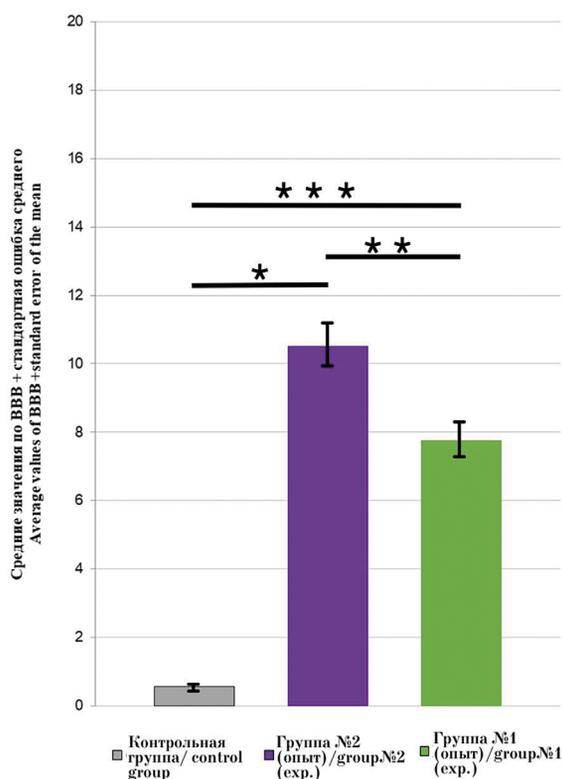


Рисунок 3. Средние значения баллов по модифицированной шкале BBB + стандартная ошибка среднего (SEM). Репрезентативная диаграмма отображает итоговые показатели неврологического дефицита выраженные в средних значениях оценённые по модифицированной шкале BBB в группах 1, 2 и контрольной.

* $p < 0.001$ ($p = 0.000244$) — существенная разница,

** $p < 0.001$ ($p = 0.000013$) — существенная разница,

*** $p < 0.001$ ($p = 0.000007$) — существенная разница.

Figure 3. Average values of BBB+standart error of mean(SEM).

The representative chart displays the final indicators of neurological deficit expressed as average values estimated according to the modified BBB scale in groups 1, 2 and control.

* $p < 0.001$ ($p = 0.000244$) — significant difference.

** $p < 0.001$ ($p = 0.000013$) — significant difference,

*** $p < 0.001$ ($p = 0.000007$) — significant difference.

Баллы критерия Краскела-Уоллиса показали статистически значимые различия между 2-ой группой (комбинированная терапия), 1-ой группой получавшей только фузоген-герметик интраоперационно и контрольной группой. Вычисления производили, опираясь на клинический результат, рассчитанный по шкале BBB за все дни после операции. Данные полученные при расчете корреляции позволяют выявить положительную тенденцию роста показателей по шкале BBB в группе с комбинацией послеоперационного внутривенного введения раствора ПЭГ. Значения достоверно отличались от контроля при $p < 0,001$ ($p = 0,000007$ для 3-х опытных групп, $p = 0,000244$ для сравнения 2-ой и контрольной групп и $p = 0,000013$ для сравнения 1-ой и 2-ой опытных групп).

Гистологическое исследование не производилось, так как эксперимент не подразумевал выведение животных из опыта, и предусматривал только клинические наблюдения.

Обсуждение. Возможности восстановления функций спинного мозга изучены недостаточно, и исследование новых способов репарации нервной ткани является перспективным направлением. В работах Xi Lu и соавт. [7], и ряда других исследователей, изучение и использование фузогенов, как веществ, способствующих слиянию аксональных мембран, показывает подобные клинические результаты. При этом данные полученные в экспериментах с использованием клеточных матриц, коллагеновых трансплантатов и стволовых клеток менее убедительны [6]. Включение в зону травмы новых структур менее физиологично, чем создание оптимальных условий для репаративных процессов в месте травмы, и снижение эффектов вторичного повреждения. Аксон любого нейрона ex vivo способен к росту в случае его повреждения, путём валлеровской регенерации, образования колбы роста. Однако in vivo решающим фактором является микроокружение аксона и процессы, протекающие в месте повреждения. Явления эксайтотоксичности, возникающие сразу после травмы и нарастающие во времени обуславливают вто-

ричные повреждения, приводящие к отёку нервной ткани, грубым нарушениям гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), повышению фибробластной и макрофагальной активности. Место травмы претерпевает глиально-фиброзную трансформацию, которая препятствует аксональному росту. Такой каскад процессов с первых секунд создаёт неблагоприятную среду для регенерации, в том числе с использованием нейротрансплантатов.

Фузогены вводимые в место повреждения тормозят каскад цитотоксичности. Эффект восстановления аксонов, под действием фузогенов происходит не по типу валлеровской регенерации, а по типу репарации путём мембранного склеивания разрушенных частей аксона [3]. Причём эффект мембранного слияния происходит крайне быстро. В исследовании Kim C.Y., измерения моторного вызванного потенциала (МВП) показали, что у животных, которым в место травмы спинного мозга вводили ПЭГ, наблюдалось увеличение амплитуды МВП (в среднем 0,081 против 0,156 мВ) уже через 1 час после травмы [10]. Однако, учитывая нарушение ГЭБ, а также локальные ишемические процессы, а также наличие ликвороциркуляции, поддерживать в месте травмы достаточную концентрацию фузогена необходимо, но весьма сложно. При этом имеются сведения, что длительное воздействие на нервную ткань чистого полиэтиленгликоля нежелательно [11]. В нашем исследовании, для интраоперационного введения в место пересечения спинного мозга применена авторская комбинация фузогенов на основе фотосшитого хитозана и полиэтиленгликоля (Нейро-ПЭГ). Применение в группе № 2 раствора ПЭГ для внутривенного введения, мы рассматриваем как фузоген-терапию, способствующую постоянному поддержанию низких доз основного фузоген-субстрата в месте травмы посредством микроциркуляции. Данные, полученные в ходе исследования позволяют утверждать, что имеется корреляция между инфузионной фузоген-терапией в послеоперационном периоде и ускоренным регрессом неврологического дефицита (рис. 2–3). В пользу этого говорят и ранние проявления двигательной активности у кроликов из группы № 2.

Выводы. Выполненное исследование показывает прямую зависимость функциональных изменений спинного мозга после его травмы и интраоперационного введения фузоген-герметика на основе ПЭГ и хитозана. Однако последующая внутривенная инфузионная терапия раствором ПЭГ в послеопера-

ционном периоде существенно улучшила процессы функционального восстановления в экспериментальной группе животных. Клинические показатели двигательной и чувствительной активности напрямую зависели от применения комбинации интраоперационного введения фузоген-герметика и послеоперационной фузоген-терапии. Вероятно, полученный эффект обусловлен пролонгированием действия фузогенов на место травмы через кровоток, посредством микроциркуляции. Данное явление требует дальнейшего морфологического изучения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. **Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки. **Financing.** The study was performed without external funding.

Соблюдение правил биоэтики. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО СтГМУ Минздрава России 12.03.2020 г. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. **Compliance with the rules of bioethics.** The study protocol was approved by the Local Ethics Committee of the Stavropol State Medical University of the Ministry of Health of Russia on 12.03.2020. The study was performed in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for research and other scientific purposes.

ORCID авторов / ORCID of authors:

Лебенштейн-Гумовски Михаил Владимирович/
Lebenstein-Gumovski Michael Vladimirovich
<https://orcid.org/0000-0002-9413-3167>

Жарченко Александр Валерьевич/
Zharchenko Alexander Valerievich
<https://orcid.org/0000-0002-1237-2114>

Расуева Танзила Саид-Магомедовна/
Rasueva Tanzila Said-Magomedovna
<https://orcid.org/0000-0001-9858-2616>

Ковалёв Дмитрий Анатольевич/
Kovalev Dmitrii Anatolievich
<https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>

Жиров Андрей Михайлович/
Zhirov Andrey Mikhailovich
<https://orcid.org/0000-0002-7698-7361>

Шатохин Антон Андреевич/
hatohkin Anton Andreevich
<https://orcid.org/0000-0002-4951-8228>

Литература/References

1. Zhang Y, Yang S, Liu C, Han X, Gu X, Zhou S. Deciphering glial scar after spinal cord injury. *Burns Trauma*. 2021 Nov 8;9: tkab035. <https://doi.org/10.1093/burnst/tkab035>. PMID: 34761050; PMCID: PMC 8576268.
2. Zhou K, Sansur CA, Xu H, Jia X. The Temporal Pattern, Flux, and Function of Autophagy in Spinal Cord Injury. *Int J Mol Sci*. 2017 Feb 21;18(2):466. <https://doi.org/10.3390/ijms18020466>. PMID: 28230791; PMCID: PMC 5343998.

3. Canavero S. HEAVEN: The head anastomosis venture Project outline for the first human head transplantation with spinal linkage (GEMINI) Surg. Neurol. Int. 2013; 4: S335–342.
4. Kouhzaei S, Rad I, Mousavidoust S, Mobasheri H. Protective effect of low molecular weight polyethylene glycol on the repair of experimentally damaged neural membranes in rat's spinal cord. Neurol Res. 2013; 35(4):415–423. <https://doi.org/10.1179/1743132812Y.0000000133>
5. Kim C.Y., Sikkema W.K.A., Kim J., et al. Effect of Graphene Nanoribbons (TexasPEG) on locomotor function recovery in a rat model of lumbar spinal cord transection. Neural Regen Res. 2018;13(8):1440–1446. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.235301>
6. Moore D.L., Blackmore M. G., Hu Y., et al. KLF family members regulate intrinsic axon regeneration ability. Science 2009;326(5950):298–301. <https://doi.org/10.1126/science.1175737>
7. Lu X, Perera TH, Aria AB, Callahan LAS. Polyethylene glycol in spinal cord injury repair: a critical review. J Exp Pharmacol. 2018;10:37–49. Published 2018 Jul 27. <https://doi.org/10.2147/JEPS.148944>
8. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes, European Treaty Series — No. 123 Strasbourg, 18.III.1986.
9. Basso D.M., Beattie M. S., Bresnahan J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. J. Neurotrauma — 1995; 12:1:21.
10. Kim C. Y. PEG-assisted reconstruction of the cervical spinal cord in rats: effects on motor conduction at 1 h. Spinal Cord. 2016;54(10):910–912. <https://doi.org/10.1038/sc.2016.72>
11. Ren X, Kim CY, Canavero S. Bridging the gap: Spinal cord fusion as a treatment of chronic spinal cord injury. Surg Neurol Int. 2019;10:51. <https://doi.org/10.25259/SNI-19-2019>