

**Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Российский национальный
исследовательский медицинский университет имени
Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения
Российской Федерации**

На правах рукописи

Воронова Анастасия Денисовна

**Обкладочные и нейральные стволовые/прогениторные клетки
обонятельной слизистой оболочки млекопитающих в
экспериментальной терапии посттравматических повреждений
спинного мозга**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научные руководители

Академик РАН, д.м.н., профессор В.П. Чехонин,

к.б.н. О.В. Степанова

Москва 2020

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Травмы спинного мозга: их причины, частота и механизмы	12
1.1.1. Причины, частота и клиническое значение травм спинного мозга	12
1.1.2. Патологические процессы, развивающиеся в результате травм спинного мозга	13
1.1.3. Посттравматические кисты спинного мозга	17
1.2. Диагностика травм спинного мозга	18
1.3. Лечение травм спинного мозга	20
1.5. Клеточная терапия травм спинного мозга	25
1.6. Клетки обонятельной области слизистой оболочки носа как потенциальный источник клеток для терапии травм спинного мозга	34
1.6.1. Строение обонятельной области слизистой оболочки носа млекопитающих	36
1.6.2. Нейральные стволовые/прогениторные клетки обонятельной области слизистой оболочки носа в терапии травм спинного мозга	40
1.6.3. Обкладочные клетки обонятельной области слизистой оболочки носа в терапии травм спинного мозга	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	47
2.1. Реактивы и расходные материалы	47
2.2. Экспериментальные животные	48
2.3. Получение ткани обонятельной слизистой оболочки носа человека и крыс	49
2.4. Разработка протоколов получения обкладочных клеток обонятельной слизистой оболочки носа человека и крыс	50
2.5. Разработка протоколов получения нейральных стволовых/прогениторных клеток обонятельной слизистой оболочки носа человека и крыс	50
2.6. Иммуноцитохимический анализ	51
2.7. Моделирование посттравматических кист спинного мозга	52
2.8. Магнитно-резонансная томография (МРТ)	52
2.9. Оценка динамики восстановления двигательной активности задних конечностей крыс с помощью теста BBB	53
2.10. Трансплантация клеточного препарата в спинной мозг	57
2.11. Выявление трансплантированных клеток в спинном мозге	60
2.12. Статистическая обработка данных	62
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	63
3.1. Разработка оптимальных протоколов получения и культивирования обкладочных клеток обонятельной слизистой оболочки носа крыс и человека	63
3.2. Разработка оптимальных протоколов получения и культивирования нейральных стволовых/прогениторных клеток обонятельной слизистой оболочки носа крыс и человека	68
3.3. Моделирование экспериментальных посттравматических кист спинного мозга	72

3.4. Изучение терапевтического эффекта обкладочных клеток крыс и человека при посттравматических кистах спинного мозга	73
3.4.1. Оценка восстановления двигательной активности задних конечностей при трансплантации обкладочных клеток крыс и человека	74
3.4.2. Оценка изменения размеров посттравматических кист при трансплантации обкладочных клеток обонятельной слизистой оболочки носа крыс и человека	81
3.4.3. Выявление обкладочных клеток человека и крыс после трансплантации в посттравматические кисты спинного мозга	86
3.5. Изучение терапевтического эффекта нейральных стволовых/прогениторных клеток крыс и человека при посттравматических кистах спинного мозга	90
3.5.1. Оценка восстановления двигательной активности задних конечностей при трансплантации НСПК крыс и человека	90
3.5.2. Оценка изменения размеров посттравматических кист при трансплантации НСПК обонятельной слизистой оболочки носа крыс и человека	94
1.5.3. Выявление НСПК после трансплантации в посттравматические кисты спинного мозга	96
3.6. Изучение терапевтического эффекта комбинации обкладочных клеток и нейральных стволовых/прогениторных клеток человека и крыс на экспериментальные кисты спинного мозга крыс	97
3.6.1. Оценка восстановления двигательной активности задних конечностей при трансплантации комбинации обкладочных клеток и НСПК крыс и человека	98
3.6.2. Оценка изменения размеров посттравматических кист при трансплантации комбинации обкладочных и нейральных стволовых/прогениторных клеток человека и крыс на экспериментальные кисты спинного мозга крыс	102
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЯ	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	115
ВЫВОДЫ	117
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	119

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Травмы спинного мозга являются одной из основных причин инвалидизации населения. Ежегодно в мире диагностируется до 500 тысяч новых случаев травматических повреждений спинного мозга, а у каждого третьего из пострадавших в спинном мозге образуются кисты (Seki T. et al., 2008; Bomfield C.M. et al, 2010). Основными клиническими проявлениями заболевания являются параличи и нарушения чувствительности и функции органов малого таза. Эти симптомы, как правило, неуклонно прогрессируют (Svircev J.N. et al., 2010; NINDS, 2019). Применяемые на сегодняшний день методы лечения посттравматических кист практически мало эффективны (Donovan W.H. et al., 1982; Schaan M. et al., 2001). В связи с этим, актуальной задачей является поиск новых подходов к лечению посттравматических кист спинного мозга.

Наиболее перспективным направлением в лечении посттравматических повреждений спинного мозга является клеточная терапия (Pearse D.D. et al., 2006). В экспериментальных работах и ряде клинических испытаний в качестве клеточного препарата для терапии травм спинного мозга были изучены различные типы клеток: эмбриональные стволовые, индуцированные плюрипотентные стволовые, мезенхимальные стволовые, шванновские, нейральные стволовые/прогениторные, обкладочные клетки и другие (Sun T. et al., 2013; Kanno H. et al., 2014; Gazdic M. et al., 2018; Nakhjavan-Shahraki B. et al., 2018; Yao R. et al., 2018; Gomes E.D. et al., 2018; Cofano F. et al., 2019; Csobonyeiva M. et al., 2019). В последние годы большое количество исследований в этой области посвящено обкладочным клеткам и нейральным стволовым/прогениторным клеткам, полученным из обонятельной области слизистой оболочки носа.

Обонятельная область слизистой оболочки носа рассматривается как уникальный источник получения клеток для терапии последствий травм спинного мозга. Эта ткань является частью периферической нервной системы,

в которой регенеративные процессы происходят в течение всей жизни млекопитающих (Schwob J.E., 2002). Обонятельная слизистая оболочка состоит из двух слоев: обонятельного эпителия и подлежащей собственной пластинки. Большой интерес для исследователей представляют нейральные столовые/прогениторные клетки (НСПК) и обкладочные клетки. НСПК находятся в обонятельном эпителии и дифференцируются во все клетки этой ткани, в том числе, обонятельные нейроны. Обкладочные клетки локализуются в собственной пластинке слизистой оболочки и охватывают многочисленные немиелинизированные аксоны обонятельных нейронов подобно шванновским клеткам, осуществляют их трофическую и опорную поддержку (Borgmann-Winter K. et al., 2015). В экспериментах *in vitro* продемонстрировано, что обкладочные клетки секретируют большое разнообразие нейротрофических факторов (Chuah M.I. et al., 1999; Woodhall E. et al., 2001; Yan H. et al., 2001; Vincent L.J. et al., 2005), которые способствуют нейропротекции, астроглиозу, регенерации и миелинизации аксонов, ангиогенезу и нейропластичности (Franklin R.J. et al., 1996; Imaizumi T. et al., 1998; Sasaki M. et al., 2004), а НСПК способны дифференцироваться в нейроны, астроциты и олигодендроциты.

НСПК и обкладочные клетки, полученные из слизистой оболочки обонятельной зоны носа у пациентов с травмой спинного мозга, после наращивания в культуре могут быть трансплантированы тому же пациенту в качестве аутологичного и тканеспецифичного препарата, а биопсия этой ткани является технически доступной и безопасной процедурой для пациентов, так как не приводит к нарушению обоняния (Borgmann-Winter K. et al., 2015). Эти преимущества использования клеток обонятельной слизистой оболочки носа позволяют обойти ряд сложнейших биотехнологических и этических проблем.

Степень разработанности темы исследования

Эффективность трансплантации клеток обонятельной области слизистой оболочки носа в ткань спинного мозга активно изучается с начала XXI века. В исследованиях *in vivo* показано, что эти клетки способны

выживать в спинном мозге после трансплантации до 60 дней (Mayeur A. et al., 2013), обладают повышенной миграционной способностью по сравнению с обкладочными клетками из обонятельных луковиц (Richter N.W. et al., 2005), могут способствовать уменьшению площади повреждения и ремиелинизации аксонов (Richter N.W. et al., 2005), а также восстановлению моторных и сенсорных функций конечностей (Iwatsuki K. et al., 2008; Yamamoto M. et al., 2009; Aoki M. et al., 2010; Amemori T. et al., 2010; Gorrie C.A. et al., 2010; Tharion G. et al., 2011). В ряде единичных клинических испытаний с использованием аутологичных обкладочных клеток были показаны их безопасность и улучшение сенсорных и моторных функций конечностей (Feron F. et al., 2005; Mackay-Sim A. et al., 2010; Tabakow P. et al., 2013; Wang et al., 2016).

Установлено, что трансплантированные НСПК мигрируют, интегрируются в спинной мозг хозяина, оказывают нейропротективные эффекты на аксоны нейронов спинного мозга, способствуя их регенерации (Xiao M. et al, 2005; Xiao M. et al, 2007). Трансплантация этих клеток оказывает значительные эффекты на восстановление двигательных функций конечностей, способствует уменьшению зоны травматического повреждения и активации посттравматической ремиелинизации (Лебедев С.В. и др., 2010; Muniswami D.M. et al., 2017). Положительные данные при трансплантации обкладочных клеток и НСПК обонятельной зоны слизистой оболочки носа были получены в острую, подострую и хроническую фазы повреждения спинного мозга, однако практически нет данных о применении этих клеток при посттравматических кистах. Кроме того, нет единых и воспроизводимых протоколов получения этих клеток.

Цель исследования – получить обогащенные культуры обкладочных клеток и нейральных стволовых/прогениторных клеток из обонятельной слизистой оболочки носа крыс и человека и оценить эффективность их применения в экспериментальной терапии посттравматических повреждений спинного мозга.

Задачи исследования:

1. Разработать и оптимизировать протоколы получения и культивирования обкладочных клеток и нейральных стволовых/прогениторных клеток из обонятельной области слизистой оболочки носа крыс и человека.
2. Оценить терапевтический эффект клеточных препаратов крыс и человека, состоящих из обкладочных клеток, нейральных стволовых/прогениторных клеток и их комбинации, при экспериментальных посттравматических повреждениях спинного мозга с помощью определения параметров двигательной активности задних конечностей крыс.
3. Изучить терапевтический эффект клеточных препаратов крыс и человека, состоящих из обкладочных клеток, нейральных стволовых/прогениторных клеток и их комбинации, при экспериментальных кистах спинного мозга с помощью анализа объемов кист методом магнитно-резонансной томографии.
4. Выявить обкладочные клетки и нейральные стволовые/прогениторные клетки обонятельной слизистой оболочки носа крыс и человека после трансплантации в посттравматические кисты спинного мозга с помощью метки PKN26.

Объект и предмет исследования – клетки обонятельной области слизистой оболочки носа крыс и человека; разработка оптимальных протоколов получения обогащенных культур обкладочных клеток и нейральных стволовых/прогениторных клеток; моделирование посттравматических кист спинного мозга на крысах; изучение эффективности трансплантации полученных клеточных препаратов по результатам МРТ анализа объема кист и тестов для оценки показателей двигательной активности задних конечностей.

Теоретической и методологической базой диссертации являются научные работы отечественных и зарубежных авторов в области изучения физиологических, гистологических и молекулярно-биологических процессов при травматических повреждениях спинного мозга, механизмов регенерации,

а также методические разработки в области клеточных технологий для получения нейральных стволовых/прогениторных и обкладочных клеток из обонятельной области слизистой оболочки носа и моделирования травматических повреждений спинного мозга.

Информационной базой исследования являются научные статьи, опубликованные в рецензируемых журналах, монографии, материалы конференций соответствующей научной тематики.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология согласно пунктам 2, 6, 7.

Научная новизна

Разработаны оптимальные протоколы получения обогащенных культур обкладочных и нейральных стволовых/прогениторных клеток из обонятельной зоны слизистой оболочки крыс и человека для трансплантации в спинной мозг. Впервые показано, что культивирование в селективной среде с добавлением гидрокортизона позволяет получить культуры с 97%-м содержанием GFAP/p75NTR⁺-положительных обкладочных клеток на 3-4-м пассажах.

Впервые показано, что трансплантированные в посттравматические кисты спинного мозга обкладочные клетки крыс и человека способствуют улучшению динамики двигательной активности задних конечностей крыс в течение 4 недель после трансплантации.

Впервые показано, что при трансплантации обкладочных клеток в посттравматические кисты спинного мозга через 4 недели происходит достоверное уменьшение их объема по данным магнитно-резонансной томографии, а у 10% животных, которым были трансплантированы обкладочные клетки, наблюдали полное исчезновение кист.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Разработанные оптимальные протоколы получения обкладочных и нейральных стволовых/прогениторных клеток крыс и человека создают теоретическую основу разработки клеточных препаратов для лечения пациентов с травматическими повреждениями спинного мозга, в том числе, с посттравматическими кистами. Эти протоколы могут быть применены для получения клеток из обонятельной слизистой оболочки пациента с травмой спинного мозга и после наращивания в культуре в короткие сроки трансплантированы этому пациенту в качестве аутологичного препарата. Получение достаточного для трансплантации количества обкладочных клеток и нейральных стволовых/прогениторных клеток из обонятельной слизистой оболочки позволяет избежать ряда проблем, связанных с трудностями получения этих клеток из нервной ткани головного мозга и необходимостью применения индуцированных плюрипотентных клеток.

Положительная динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс и уменьшение размеров кист по данным МРТ при трансплантации обкладочных клеток свидетельствует об активации регенеративных процессов в спинном мозге после трансплантации. Выявленные положительные эффекты трансплантации обкладочных клеток обонятельной области слизистой оболочки носа в спинной мозг крыс открывают перспективы для проведения доклинических и клинических испытаний. Полученные результаты служат основой для дальнейшего изучения регенеративного потенциала этих клеток в комбинации с различными нейрорегенеративными и нейропротективными факторами, другими типами клеток и скэффолдами.

Методология и методы исследования

Данное исследование было выполнено согласно поставленной цели с использованием комплекса методов работы с культурами клеток (получение и культивирование первичных культур клеток млекопитающих, субкультивирование адгезивных и суспензионных культур клеток),

гистологических методов (приготовление и иммуноцитохимическое окрашивание срезов спинного мозга), моделирования посттравматических кист спинного мозга, трансплантации клеточных препаратов в смоделированные кисты спинного мозга, физиологического тестирования (метод ВВВ), магнитно-резонансной томографии и методов статистического анализа полученных результатов.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработаны оригинальные оптимальные протоколы получения обкладочных и нейральных стволовых/прогениторных клеток из обонятельной зоны слизистой оболочки носа человека и крыс для клеточной терапии экспериментальных посттравматических повреждений спинного мозга.
2. Трансплантация обкладочных клеток крыс и человека в экспериментальные посттравматические кисты спинного мозга улучшает параметры двигательной активности задних конечностей крыс в течение 4 недель наблюдений.
3. Трансплантация клеточных препаратов в спинной мозг при хроническом посттравматическом повреждении без сформированных кист не оказывает положительного эффекта.
4. Трансплантация обкладочных клеток крыс и человека в посттравматические кисты спинного мозга способствует достоверному уменьшению их объемов через 4 недели, а также полному исчезновению у 10% животных.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность результатов обоснована использованием современных методов исследования, достаточным объемом данных для каждой экспериментальной группы, воспроизводимостью результатов, корректным применением статистических методов, критическим анализом полученных результатов в сопоставлении с актуальными литературными данными.

Результаты проведенных исследований доложены на III Всероссийской научной конференции молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 14-16

сентября 2016), IX Международном конгрессе «Биотехнологии: состояние и перспективы развития» (Москва, 20-22 февраля 2017), III Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 15-18 ноября 2017 года), 11th International Conference on Tissue Engineering & Regenerative Medicine (Рим, 18-20 октября 2018), Международном конгрессе «Биотехнологии: состояние и перспективы развития» (Москва, 25-27 февраля 2019), IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 20-23 ноября 2019), на VII Молодежной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 12-15 октября 2020).

Личное участие автора заключалось в планировании всех этапов диссертационной работы, проведении экспериментов, анализе полученных результатов, их статистической обработке, интерпретации, подготовке публикаций.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 18 научных работ, в том числе 8 статей в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук. Получен 1 патент на изобретение.

Внедрение результатов работы. Основные результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры онкологии, радиотерапии и пластической хирургии ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России.

Структура и объем работы. Диссертационная работа содержит: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, их обсуждение, заключение, выводы и список литературы, который включает работы на русском (18) и иностранном (244) языках. Диссертация изложена на 141 страницах машинописного текста и содержит 17 таблиц и 35 рисунков.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Травмы спинного мозга: их причины, частота и механизмы

1.1.1. Причины, частота и клиническое значение травм спинного мозга

Спинной мозг является важнейшей частью центральной нервной системы, так как отвечает за осуществление моторных, сенсорных и вегетативных функций организма. Травмы спинного мозга приводят к полной или частичной потере данных функций в частях тела ниже уровня повреждения. Лечение травм спинного мозга является одной из главных задач современной медицины и нейробиологии, так как во многих странах мира повреждения спинного мозга занимают лидирующие позиции среди всех причин инвалидизации населения. На сегодняшний день более, чем 20 миллионов человек живут с последствиями травм спинного мозга (Collaborators, 2019), и ежегодно количество пострадавших увеличивается в среднем на 350 000 человек (WHO, 2013). Только в России каждый год регистрируется около 8000 новых случаев (Морозов И.Н. и др., 2011). Несмотря на стремительное развитие медицины, уровень смертности пациентов с травмами спинного мозга по-прежнему остается на высоком уровне. В первые несколько дней после травмы уровень смертности составляет 4-17%, при этом всего в первый год умирает до 3,8% пациентов, во второй - 1,6% и около 1,2% каждый последующий год (Krause J.S. et al., 1997).

Чаще всего к травмам спинного мозга приводят падения (37%), дорожно-транспортные происшествия (29% случаев), насильственные акты (15%), спортивные травмы (10-17%), природные катаклизмы и др. (Nulle A., 2017). Во многих странах увеличение числа случаев травм связано с такими причинами, как вождение транспортного средства в состоянии алкогольного или наркотического опьянения, участие в боевых действиях и занятия экстремальными видами спорта (WHO, 2013). При этом, последствия травм зависят от большого количества факторов, таких как, например, тяжесть

травмы, отдел спинного мозга, на уровне которого произошло повреждение, возраст пострадавшего, а также его индивидуальные особенности (Tariacco M. et al., 1992; Hastings B.M. et al., 2015). Очень часто травмы спинного мозга приводят к параличам конечностей, при этом пациенты с неполной тетраплегией составляют 30,1%, с полной параплегией — 25,6%, с полной тетраплегией — 20,4%, с неполной параплегией — 18,5% (van Middendorf J.J., 2011). Травмы спинного мозга приводят к тяжелейшим нарушениям моторных, сенсорных функций. К наиболее серьезным последствиям травм относят нарушение работы желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой, дыхательной и мочеполовой системы. Кроме того, большинство пациентов с повреждениями спинного мозга страдают от хронических болей (WHO, 2013).

Таким образом, широкая распространенность и высокая летальность от последствий травм спинного мозга свидетельствует о том, что лечение травматических повреждений спинного мозга является крайне важной задачей.

1.1.2. Патологические процессы, развивающиеся в результате травм спинного мозга

Патологические процессы, которые развиваются при травмах спинного мозга, можно разделить на первичные и вторичные. Первичное повреждение происходит непосредственно в момент механического воздействия на спинной мозг в результате контузии или продолжительной компрессии спинного мозга (van Middendorf J.J., 2011). В момент травмы наблюдается массовая гибель нервных клеток, повреждение сосудов и нарушение гемато-спинномозгового барьера в области повреждения, что приводит к ионному дисбалансу, отекам и ишемии (Alizadeh A., 2019). Локальное первичное повреждение ткани спинного мозга инициирует различные клеточные и внеклеточные сигнальные пути, запускающие через несколько часов после травмы процессы вторичного повреждения (Orr M.B. et al., 2017). Во

вторичном повреждении различают острую фазу (несколько часов – 48 часов), подострую (48 часов – несколько недель) и хроническую (месяцы – годы) (Kim Y.H. et al., 2017) (рис. 1).

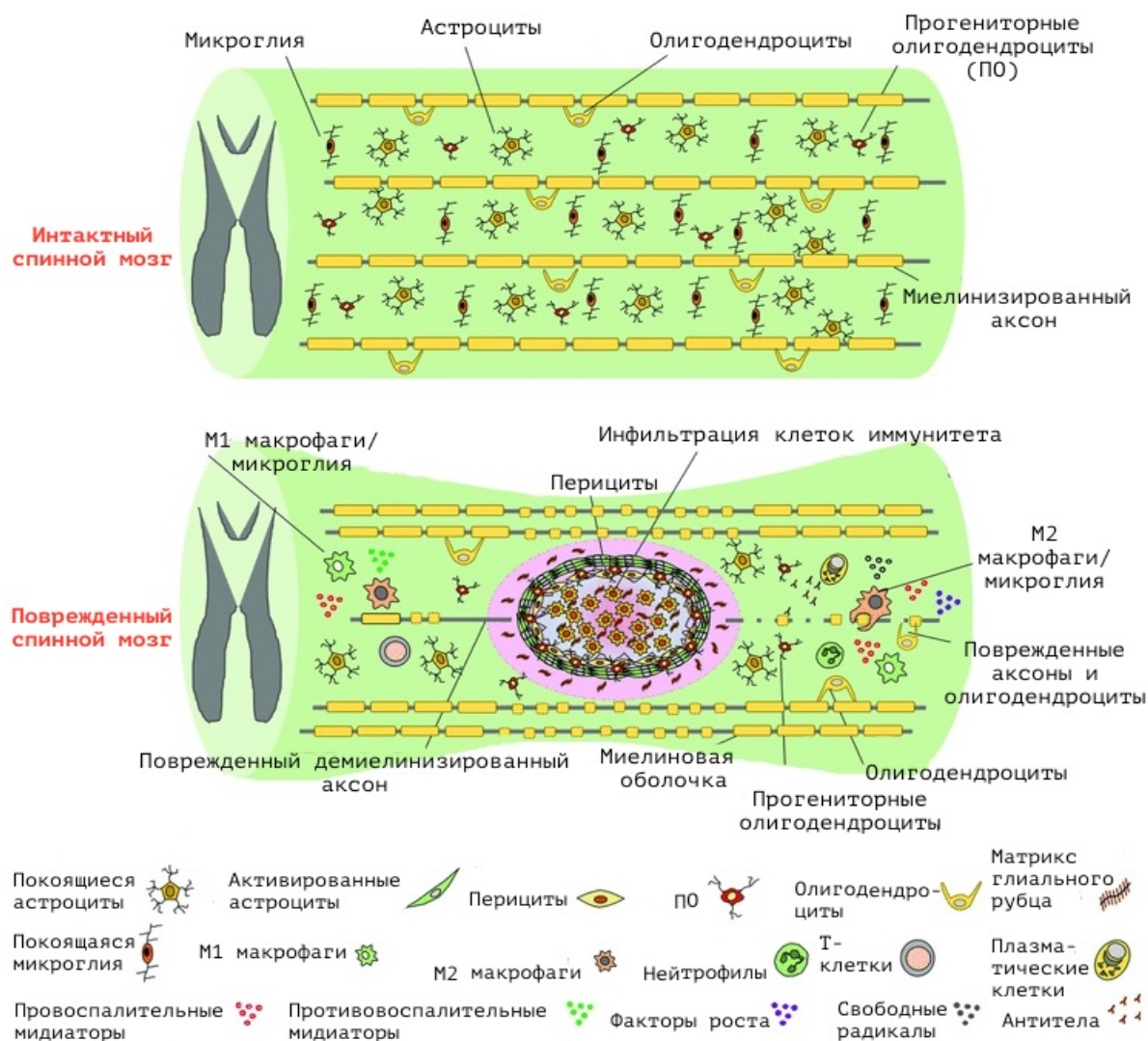


Рисунок 1. Патолофизиологические процессы, происходящие при повреждении спинного мозга. Сравнительная схема строения здорового и поврежденного спинного мозга (по Alizadeh A., 2019, в модификации). На нижнем изображении отображены все основные процессы, которые происходят после повреждения спинного мозга.

В острой фазе значительно увеличивается проницаемость гемато-спинномозгового барьера (Anwar M.A. et al., 2016), а также происходит

активация резидентных астроцитов и микроглии (Alizadeh A., 201). В норме неповрежденный спинной мозг считается иммунопривилегированным органом, что означает отсутствие выраженных иммунных реакций в ответ на антигены (Sachin P. et al., 2015). Однако при нарушении целостности сосудов спинного мозга в результате травмы в область повреждения начинается активная миграция макрофагов, нейтрофилов и лимфоцитов, что запускает воспалительный ответ (Anwar M.A. et al., 2016). Острый воспалительный ответ приводит к массовой гибели клеток глии и нейронов, демиелинизации и дегенерации аксонов (Alizadeh A., 2019). Активация резидентной микроглии способствует высвобождению таких цитокинов, как фактор некроза опухоли- α (Tumor necrosis factor - α , TNF- α), интерлейкин- 1β (Interleukin- 1β , IL- 1β), интерлейкин-6 (Interleukin-6, IL-6), (Rothwell N. et al., 1997; Pan J.Z. et al., 2002; Pineau I. et al., 2007), хемокинов (Mantovani A. et al., 2004), NO-синтаз (Matsui T. et al., 2010), активных форм кислорода, глутамата (Barger S.W. et al., 2007) и протеаз (Shields D.C. et al., 2000), которые являются цитотоксичными для нервной ткани и также приводят к гибели клеток и некрозу (Anwar M.A. et al., 2016). В результате в зоне повреждения развивается ишемия, которая сохраняется от нескольких дней до нескольких недель после травмы.

Во время подострой фазы в спинной мозг мигрируют Т- и В-лимфоциты. Активация Т-лимфоцитов происходит в ответ на презентацию антигена макрофагами и клетками микроглии (Jones T.B., 2014). При этом CD4⁺ Т-клетки продуцируют цитокины, которые стимулируют выработку В-лимфоцитами антител и активируют фагоциты (Alizadeh A., 2019). В-лимфоциты продуцируют аутоантитела к поврежденной ткани спинного мозга, которые усиливают процессы воспаления (Ankeny D.P. et al., 2010), что приводит к дегенерации тканей, массовой гибели олигодендроцитов, и, как следствие, демиелинизации аксонов. Кроме того, во время подострой фазы происходит пролиферация и миграция резидентных астроцитов, фибробластов, предшественников олигодендроцитов и перицитов (Goritz C. et al., 2011), которые способствуют образованию рубца. Рубец и связанный с ним

матрикс окружают очаг повреждения, создавая клеточную и биохимическую зону. В сформированном рубце выделяют внутренний слой, который состоит преимущественно из фибробластов, и окружающий его слой глиальных клеток (Bradbury E.J. et al., 2019). Фибробласты синтезируют фибронектин, коллаген и ламинин в межклеточное пространство спинного мозга (Creeg J.M. et al., 2014), которые препятствуют регенерации аксонов после травмы. В ответ на процессы повреждения спинного мозга в астроцитах происходят выраженные изменения в экспрессии генов, наблюдается гипертрофия, и в некоторых случаях пролиферация (Di Prospero N.A. et al., 1997; Faulkner J.R., 2004). Атипичное увеличение астроцитов вокруг зоны повреждения называется астроглиоз. Это явление сопровождается быстрым синтезом промежуточных филаментов, таких как кислый глиальный фибриллярный белок (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP), виментин и нестин (Gallo V. et al., 2014). Кроме того, наблюдается избыточная секреция компонентов внеклеточного матрикса, таких как тенасцины, коллаген IV типа и протеогликаны хондроитинсульфата, которые образуют глиальный рубец на месте повреждения (Gallo V. et al., 2014). Известными в настоящее время факторами, ответственными за образование глиальных рубцов при травмах спинного мозга, являются фактор роста опухоли - β (Tumor Grow Factor – β , TGF- β) (Kohta M. et al., 2009), интерферон- γ (Interferon - γ , INF- γ) (Di Prospero N.A. et al., 1997) и другие. Формирование рубца одновременно оказывает как отрицательное, так и положительное воздействие на окружающие ткани спинного мозга в процессе восстановления. Рубец ингибирует регенерацию, прорастание аксонов и дифференцировку нейтральных клеток в подострой и хронической фазах, однако выполняет также защитную функцию, так как создает физический барьер, ограничивая распространение нейровоспаления из очага повреждения в здоровую ткань спинного мозга, а астроциты, формирующие рубец, могут осуществлять локальную трофическую поддержку и способствовать прорастанию новых сосудов (Garcia E. et al., 2017). В том числе, M2-подобные макрофаги и регуляторные Т- и В-клетки

продуцируют факторы роста и про-регенеративные цитокины, такие как интерлекин-10 (Interleukin-10, IL-10), которые способствуют восстановлению тканей и заживлению ран (Cherry J.D. et al., 2014).

Таким образом, когда в подострой фазе стихает острый воспалительный ответ, начинают развиваться компенсаторные реакции, обеспечивающие естественную регенерацию нервной ткани, в том числе, ремиелинизацию и рост аксонов, неоваскуляризацию и изменение в составе внеклеточного матрикса. Однако параллельно в хронической фазе повреждения спинного мозга продолжают такие дегенеративные процессы, как демиелинизация аксонов, апоптоз, также завершаются процессы формирования рубца, отделяющего очаг повреждения от здоровых тканей спинного мозга, и кистозных полостей (Oyinbo C.A., 2011).

1.1.3. Посттравматические кисты спинного мозга

Образование кист спинного мозга в результате травмы носит название посттравматическая сирингомиелия (Cramer J.D., 2014; Mohrman A.E. et al., 2016). Термин «сирингомиелия» был впервые введен французским врачом Оливье Д'Анжером в 1827 году и переводится с греческого как «трубка». Первые данные о сирингомиелии были получены при анатомических вскрытиях и описывались как дегенеративные изменения спинного мозга, вследствие которых в нем образуются полости (Ushewokunze S. et al., 2010). Хотя точный патогенез посттравматических кист спинного мозга неизвестен, на основе клинических (Squire M.V. et al., 1994) и экспериментальных исследований (Seki T. et al. 2008) предполагается, что основными причинами их формирования являются апоптоз клеток и некроз тканей спинного мозга в результате травмы, эксайтотоксичность (гибель нервных клеток под воздействием накопления нейромедиаторов), формирование рубцов и др., вследствие чего происходит нарушение динамики циркуляции и давления спинномозговой жидкости. Поврежденные клетки спинного мозга со временем удаляются макрофагами, и наступает санация травматического

очага с образованием мелких кистозных полостей в спинном мозге, которые впоследствии могут сливаться в более крупные (Борщенко И., 2017). Посттравматические кисты спинного мозга заполнены цереброспинальной жидкостью с содержанием дебриса и на хронической стадии окружены капсулой из глии (Yeo S. et al., 2017). По различным оценкам, заболеваемость сирингомиелией среди пациентов с повреждениями спинного мозга варьируется в широких пределах: от 1% до 64%. В среднем примерно у 25-30% в результате травм в спинном мозге происходит образование кист (Seki T. Et al., 2008; Bomfield C.M. et al, 2010). В случае отсутствия лечения кисты могут увеличиваться в размерах, сдавливая при этом спинной мозг и препятствуя проведению нервных импульсов и регенерации нервной ткани спинного мозга. Основными симптомами при данной патологии являются нарушение сенсорных, моторных функций и работы мочевого пузыря и кишечника (Svircev J.N. et al., 2010; NINDS, 2015).

1.2. Диагностика травм спинного мозга

Для того, чтобы подобрать подходящее лечение, необходима своевременная и точная диагностика повреждения спинного мозга. Огромную роль в постановке диагноза играет первичный осмотр пациента, который позволяет определять локализацию повреждения, а также оценивать степень тяжести травмы (American Spinal Injury Association, 2012). В 1969 году для определения выраженности нарушения сенсорных и моторных функций спинного мозга H.L. Frankel была предложена шкала, которая получила признание неврологов и активно применялась до 1982 года (Frankel H.L., 1969). Однако главным ее недостатком было отсутствие стандартизации данных клинического осмотра и таким образом ее объективности. Учитывая это, шкала Франкеля была модифицирована Американской ассоциацией спинальной травмы (ASIA), и в настоящее время мировым сообществом для классификации тяжести травмы принята 5-балльная (от А до Е) шкала ASIA (American Spinal Injury Association, 2012). ASIA рекомендует определять

уровень повреждения по самому нижнему сегменту с сохранившейся функцией конечностей. Таким образом, категория А включает пациентов, у которых отсутствуют двигательные и сенсорные функции в крестцовых сегментах S4-S5; к В относят пациентов, у которых сохранена чувствительность, но отсутствует двигательная функция в сегментах ниже неврологического уровня, включая S4-S5; к категории С относит пациентов, у которых более, чем половина ключевых (рекомендованных для тестирования) мышц сохраняет силу менее 3 баллов. В противном случае больного относят к категории D. К категории Е относят больных с травмой спинного мозга без какого-либо неврологического дефицита по результатам оценочных тестов.

Для визуализации травм спинного мозга наиболее предпочтительным по сравнению с другими методами является магнитно-резонансная томография (МРТ). Обычно зона повреждения спинного мозга на МРТ имеет форму веретена, содержит очаг кровоизлияния и окружена ореолом, создаваемым отеком (Flander A.E. et al., 2009). В диагностике всех видов кист МРТ имеет решающее значение, так как только с ее помощью можно определить наличие кисты даже небольшого размера и проследить динамику их роста. На снимках МРТ кисты выглядят как светлые округлые области (Kim M.S. et al., 2009). Пациентам рекомендуется проходить МРТ-обследование в ранние сроки после травмы спинного мозга, так как ранняя диагностика позволяет более точно спрогнозировать течение заболевания и назначить подходящую терапию (Demaerel P., 2006; Parizel P.M. et al., 2010; Bozzo A. et al., 2011). Также на данный момент исследуются новые методы визуализации на магнитно-резонансном томографе, такие как диффузно-взвешенная и диффузионно-тензорная визуализация. Эти подходы являются многообещающими не только для диагностики, но и для прогнозирования, так как они могут обеспечить более детальную визуализацию повреждения, чем обычная МРТ (Lammertse D. et al., 2007; Vargas M.I. et al., 2008; Tsichiya L. et al., 2011).

Целостность и функцию аксонов в спинном мозге также можно определить с помощью электрофизиологических тестов. Наиболее часто применяется метод исследования вызванных потенциалов. Данный подход основан на регистрации реакций на внешние стимулы (слуховые, зрительные и соматосенсорные), что позволяет оценить состояние проводящих нервных путей глубокой чувствительности (вибрационная чувствительность, чувство давления, мышечно-суставное чувство) и изучить функциональное состояние вегетативной нервной системы. Эти инструменты особенно ценны для пациентов, которые не могут принимать непосредственное участие в физическом осмотре. Основываясь на задержке и амплитуде вызванного ответа, можно оценить степень повреждения и спрогнозировать дальнейшее развитие процессов посттравматического повреждения (Jacobs S.R. et al., 1995; Curt A. et al., 1998; Curt A. et al., 1999).

Относительно новым подходом для определения степени повреждения спинного мозга является оценка концентрации биомаркеров в спинномозговой жидкости (Pouw M.H. et al., 2009). Например, группой авторов было показано, что содержание в ликворе ряда биомаркеров достоверно коррелируют с тяжестью неврологического дефицита, оцениваемого с помощью международных стандартов у пациентов с травмами спинного мозга (Kwon B.K. et al., 2010). Кроме того, авторы утверждают, что показатели концентрации биомаркеров имеют более корреляционную связь с неврологическими исходами по сравнению с оценками по шкале ASIA.

1.3. Лечение травм спинного мозга

Прогнозирование исхода повреждения спинного мозга обычно проводится примерно через 72 часа после травмы с использованием шкалы ASIA, когда спадает отечность спинного мозга (Waters R.L., et al., 1994; Fehlings M.G. et al., 2013), после чего пациенту может быть назначено лечение. Лечение пациентов в острой фазе направлено, в первую очередь, на предотвращение дальнейшего повреждения и дегенерации спинного мозга

(van Middendorf J.J. et al., 2011). Зачастую врачи вынуждены прибегать к хирургическому вмешательству для того, чтобы удалить фрагменты костей или каких-либо инородных предметов, для устранения грыжи межпозвоночных дисков, для стабилизации позвоночника и декомпрессии спинного мозга (Garcia E. et al., 2017). При лечении хронических повреждений спинного мозга основной акцент делается на устранение или замедление таких характерных патофизиологических процессов, как образование глиальных рубцов, демиелинизация и астроглиоз, а в случае образования кист обычно выполняют шунтирующие операции и операции по восстановлению ликвородинамики на уровне травмы (Слынько Е.И. и др., 2013). Среди хирургических подходов к лечению посттравматических кист спинного мозга наиболее часто применяется прямое дренирование кистозной полости, которое направлено на уменьшение симптомов давления на спинной мозг и восстановление нормального оттока спинномозговой жидкости (Ushewokunze S. et al., 2010).

Медикаментозные методы лечения травм спинного мозга, как правило, направлены на устранение болевого синдрома, на контроль мышечных спазмов, улучшение работы половой функции, органов выделения и кишечника (Garcia E. et al., 2017), а также поддержание нейропротективных эффектов после повреждения (Kwon B.K. et al., 2011) и качества жизни пациентов после хирургического вмешательства. Для этих целей наиболее часто применяются как наркотические, так и неопиодные препараты с анальгетической активностью, нестероидные противовоспалительные препараты, миорелаксанты, парацетамол (Widerstrom-Noga E.G. et al., 2003). Однако, данные препараты оказываются неэффективными в случае необходимости постоянного обезболивания при нейропатической боли, кроме того, они могут вызывать побочные эффекты на работу желудочно-кишечного тракта, мочевого пузыря и оказывать токсическое воздействие на печень (Donovan W.H. et al., 1982). Большую популярность для лечения хронических болей имеет применение малых доз антидепрессантов (Spinal Cord Injury

Rehabilitation Evidence, 2008), однако их использование часто вызывает такие побочные эффекты, как сонливость, потеря координации движений, повышение артериального давления, задержка мочи и т. д., а в результате прекращения приема данных препаратов у пациентов может развиваться синдром отмены, сопровождающийся состоянием тревоги, психомоторного возбуждения, могут наблюдаться судороги и возобновляться боли (Баринов А.Н., 2011). Большое количество современных доклинических и клинических исследований посвящено изучению эффективности различных препаратов в терапии травм спинного мозга, однако было показано, что большинство из них являются специфическими для острой и подострой фаз повреждения (Garcia E. et al., 2017).

Несмотря на то, что хирургические и медикаментозные подходы к терапии травм спинного мозга являются общепринятыми, эти методы лечения, к сожалению, не позволяют добиться полного выздоровления пациентов, так как не способствуют регенерации нервной ткани после повреждения, и в большинстве случаев наблюдается повторное разрастание рубца из клеток глии и последующее образование полостей (Schaan M. et al., 2001), а без поддерживающей медикаментозной терапии симптомы и боли возвращаются вновь. В связи с отсутствием эффективности стандартных методов лечения травм спинного мозга необходим поиск альтернативных методов лечения.

1.4. Экспериментальные исследования по разработке методов лечения травм спинного мозга

В многочисленных экспериментальных исследованиях по лечению травм спинного мозга на разных стадиях повреждения были отработаны хирургические способы лечения (Lu P. et al., 2012; Sakiyama-Elbert S. et al., 2012; Suzuki H. et al., 2015; Garcia E. et al., 2017), изучена терапевтическая эффективность различных лекарственных препаратов, многие из которых после проведения доклинических испытаний были введены в клиническую практику. Для проведения экспериментальных исследований и доклинических

испытаний определенных методов лечения или препаратов необходимо использование экспериментальных животных (Cheriyen T. et al., 2014). В качестве экспериментальных животных могут применяться различные виды млекопитающих, такие как крысы, мыши, кролики, кошки, собаки и приматы (Zhang N. et al., 2014; Kwon B.K. et al., 2015; Nardone R, 2017). При этом оптимальная модель должна быть максимально приближена по анатомическому строению и патофизиологическим процессам, происходящим у человека, быть финансово выгодной и воспроизводимой. Поэтому в качестве объекта для моделирования травм спинного мозга чаще всего используются именно крысы, поскольку такие модели являются мало затратными с финансовой точки зрения и хорошо воспроизводимыми. Кроме того, патологические процессы, развивающиеся после травмы у крыс, очень схожи с таковыми у человека (в том числе образование кистозных полостей, глиального рубца, реконструкция внеклеточного матрикса) (Alizadeh A., 2019). Однако при экстраполяции полученных результатов на человека необходимо учитывать то, что объекты значительно различаются по размерам, способности к регенерации, а также молекулярно-генетическим особенностям. Применение крупных животных, таких как свиней или приматов, позволяет воссоздать более приближенную к человеку модель, однако их стоимость гораздо превышает затраты на лабораторных грызунов, и существуют определенные требования и сложности, связанные с содержанием таких животных (Nardone R. et al., 2017). Кроме того, даже использование крупных животных не позволяет точно смоделировать патологические процессы, происходящие в организме человека. Тем не менее, в том случае, если на грызунах были получены положительные результаты, на промежуточных этапах доклинических исследований необходимо подтверждение этих данных в исследовании на более крупных животных, и только после этого можно переходить к клиническим испытаниям.

Распространенными типами повреждения при моделировании являются компрессионная, контузионная травма, рассечение спинного мозга и ишемия

(затруднение кровотока) (Choo A.M. et al., 2009; Cheriyan T. et al., 2014; Losey P. et al., 2014). Так как в клинической практике чаще всего встречаются случаи закрытых травм спинного мозга, обычно на крысах моделируют компрессионные (Constantini S. et al., 1994; Beattie M.S. et al., 1997; Basso D.M. et al., 1996) и контузионные травмы (Tarlov I.M. et al., 1953; Rivlin A.S. et al., 1978; Joshi M. et al., 2002). Травмы средней тяжести наносят, чтобы смоделировать повреждение, при котором происходит демиелинизация аксонов и антероградная дегенерация дистального нерва (Grber H. et al., 2008). При более тяжелых повреждениях могут развиваться неврома и глиальные рубцы. Примерно в 30% случаев возникает посттравматическая сирингомиелия (Marcol W. et al., 2012). Также часто в исследованиях используется модель гемисекции (частичного рассечения спинного мозга), которая позволяет сравнивать поврежденные и здоровые нервные волокна у одного и того же животного, изучать неврологические нарушения, а также двигательные функции и их восстановление на разных уровнях спинного мозга (Kwon B.K. et al., 2002). Как было показано в многочисленных исследованиях, восстановление функции спинного мозга у крыс при этом происходит в течение первых 3 недель после травмы (You S.W. et al., 2003; Onifer S.M. et al., 2007), что связано как с компенсаторными способностями и активной регенерацией поврежденных аксонов, так и с обратимостью дисфункции спинного мозга при частичном повреждении (Li L.S. et al., 2017). Модель полного рассечения спинного мозга представляет собой диссоциацию между каудальным и ростральным сегментами спинного мозга. При этом запускается каскад сложных патофизиологических процессов, которые ингибируют потенциальную регенерацию аксонов и приводят к образованию глиального рубца. Эта модель обычно используется в работах по изучению эффективности тканевой инженерии (Lukovic D. et al., 2015), она хорошо воспроизводима и описана у различных животных, включая крыс, мышей, кошек, собак и приматов (Heimberger R.F. et al., 2005).

Основным критерием оценки адекватности модели является выявление морфологических изменений (регенерации аксонов, миелинизации, васкуляризации, оценка плотности глиальных рубцов и реакций воспалительного ответа) с использованием гистологических методов. Вспомогательные критерии включают диагностику с помощью МРТ и функциональную оценку на основе электромиографии. Также применяются тесты для оценки двигательной активности задних конечностей крыс с использованием 21-балльной шкалы Basso, Beattie, and Bresnahan (тест BBB), проводится регистрация соматосенсорного потенциала (Basso D.M. et al., 1996), тесты на динамическую нагрузку (Pertici V. et al., 2014) и поведенческие тесты.

После того, как при моделировании повреждения спинного мозга удастся добиться высокой воспроизводимости, можно приступить к изучению эффективности интересующего метода лечения травмы спинного мозга. К сожалению, многие хирургические и медикаментозные методы оказываются неэффективными еще на стадии доклинических испытаний, так как они не позволяют решить проблему регенерации ткани после повреждения, с связи с чем активно развивающимся направлением в этой области является клеточная терапия.

1.5. Клеточная терапия травм спинного мозга

Клеточная терапия рассматривается в качестве многообещающей стратегии для лечения травм спинного мозга, так как она может способствовать регенерации нейронов, замещению утраченных нервных клеток, а также оказывать нейропротективный эффект после повреждения ткани (Perase D.D. et al., 2006; Воронова и др., 2016). Первые положительные результаты о возможности регенерации спинного мозга взрослых млекопитающих после трансплантации были опубликованы еще в 1980 группой Aguayo в журнале «Nature» (Richardson P.M. et al., 1980). В данном исследовании показано, что трансплантация периферического нерва в

поврежденный участок спинного мозга способствует регенерации нейронов ЦНС у крыс. А в работе Reier P.J. и Bregman B.S. в 1986 году (Bregman B.S. et al., 1986) показано, что трансплантат фетального спинного мозга оказывал положительные эффекты на выживаемость нейронов ЦНС и на рост их аксонов у новорожденных крыс.

В течение последних двух десятилетий в многочисленных экспериментальных исследованиях и в ряде клинических испытаний было изучено влияние различных типов клеток, полученных из разных источников, на заживление травм спинного мозга. В зависимости от источника получения клеток, выделяют три различных типа трансплантации: ксено-, алло- и аутооттрансплантацию (Anderson A.J. et al., 2011). Ксенотрансплантация – это трансплантация тканей от доноров одного вида реципиенту совершенно другого вида (например, от животного к человеку). Под аллотрансплантацией подразумевается трансплантация, при которой донор и хозяин принадлежат к одному и тому же виду (от человека к человеку). При аутооттрансплантации пациенту вводят его собственные клетки.

Важнейшими критериями клеточного препарата являются его безопасность и терапевтическая эффективность. После трансплантации могут появляться такие побочные эффекты, как образование тератом, что является результатом неконтролируемой клеточной пролиферации трансплантированных стволовых клеток (Ray S. et al., 2006; Shiras A. et al., 2007). Кроме того, в ответ на алло- или ксеногенный препарат часто возникает иммунологическая реакция организма, в связи с чем может понадобиться иммуносупрессивная терапия. Однако, применение иммунодепрессантов при клеточной терапии травм спинного мозга имеет побочные эффекты, как, например, негативное воздействие на процессы восстановления двигательных функций (Yuosefifard M. et al., 2016). Таким образом, наиболее предпочтительными для трансплантации считаются аутологичные клетки. При создании клеточного препарата необходимо соблюдать протоколы

получения, культивирования, криоконсервации, хранения клеток, проводить окончательное тестирование клеток, особенно в том случае, если проводилась их генетическая модификация (Тихомирова А.В. и др., 2018).

Наиболее изученными в терапии травм спинного мозга являются эмбриональные стволовые (ЭСК), индуцированные плюрипотентные стволовые (иПСК), мезенхимальные стволовые (МСК), шванновские клетки, обкладочные клетки обонятельных луковиц и др. (Gazdic M. et al., 2018; Cofano F. et al., 2019; Csobonyeiva M. et al., 2019; Kanno H. et al., 2014; Nakhjavan-Shahraki B. et al., 2018; Yao R. et al., 2018; Gomes E.D. et al., 2018; Sun T. et al., 2013) (рис. 2).

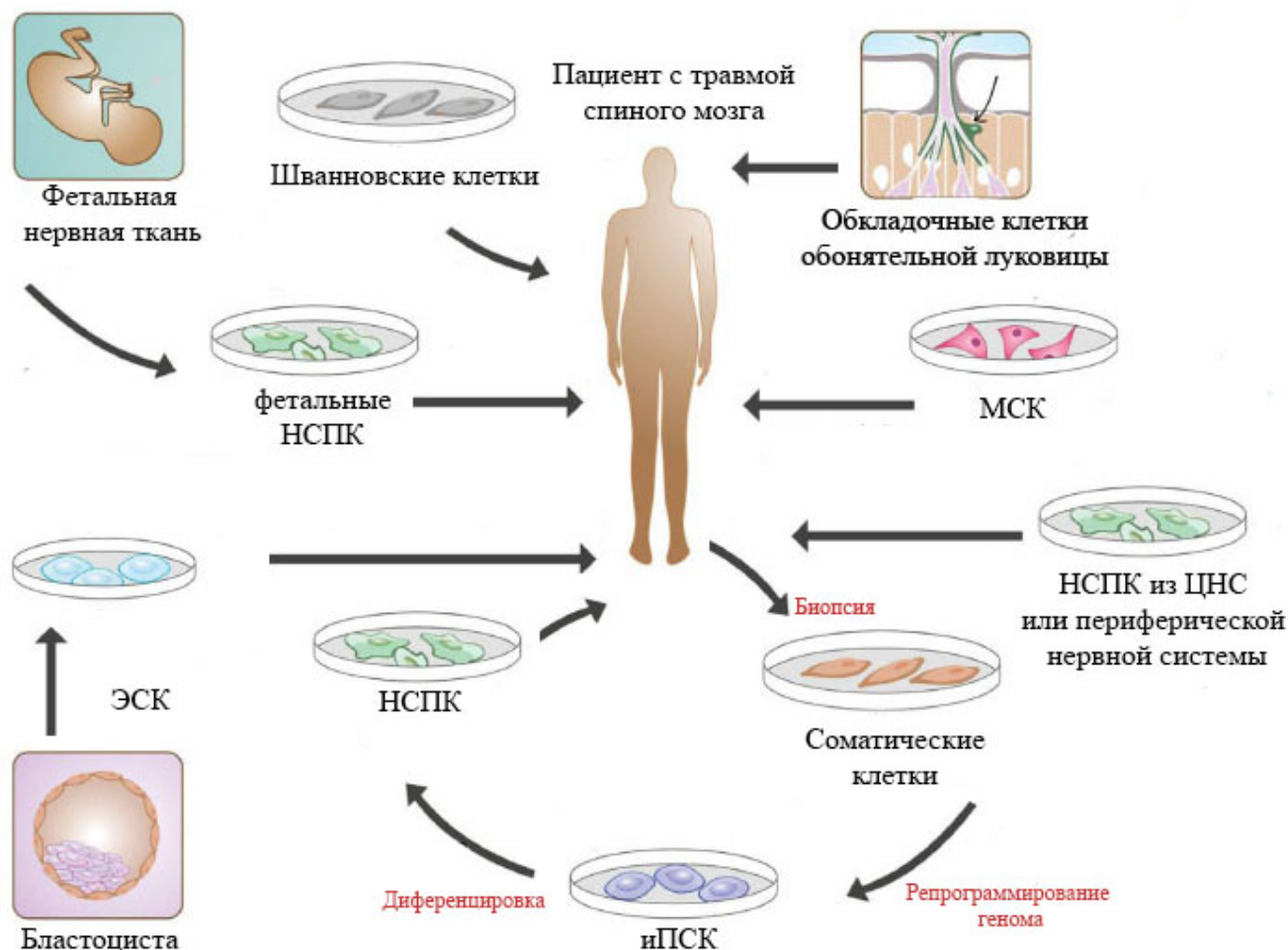


Рисунок 2. Схема, отражающая пути применения различных типов клеток в клеточной терапии травм спинного мозга: МСК из различных источников, иПСК, ЭСК, обкладочные клетки обонятельных луковиц и др. (по Gazdic M. et al., 2018, в модификации).

Эмбриональные стволовые клетки

Эмбриональные стволовые клетки – это клетки, которые получают из внутренней клеточной массы эмбриона на ранних стадиях его развития (Blair K. et al., 2011), чаще всего на стадии предимплантации или бластоцисты (Thomson J.A. et al., 1998). По сравнению со стволовыми клетками взрослого организма, ЭСК являются плюрипотентными и способны дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых листков и, в конечном счете, могут генерировать все типы клеток организма (Puri M.C. et al., 2012). В многочисленных экспериментальных работах по трансплантации ЭСК в спинной мозг было показано, что трансплантация данных клеток может способствовать восстановлению двигательных функций и регенерации аксонов у грызунов (Li J. et al., et al., 2013). Однако, по ряду причин ЭСК не могут быть рекомендованы для широкого клинического применения. Во-первых, во многих странах существуют биоэтические и религиозные ограничения, связанные с применением ЭСК. Во-вторых, трансплантация ЭСК может спровоцировать у взрослого организма реакцию отторжения трансплантата, в связи с необходимо применение иммунодепрессантов (Taylor C.J. et al., 2011). Кроме того, ЭСК обладают высоким потенциалом к образованию тератом, что связано с неконтролируемой пролиферацией этих клеток. Таким образом, перед трансплантацией ЭСК должны быть предварительно дифференцированы. Существуют протоколы для дифференцировки ЭСК в предшественники нейронов (Zhang S.C. et al., 2001; Tropepe et al., 2001; Reubinoff B.E. et al., 2001; Carpenter M.K. et al., 2001; Wichterle H. Et al., 2002; Wada T. et al., 2009) и клеток глии (Brustle O. et al., 1999; Nistor G.I. et al., 2005). Показано, что при трансплантации предифференцированных ЭСК в поврежденный спинной мозг крысы, данные клетки дифференцировались в нейроны и олигодендроглию, а также способствовали частичному функциональному восстановлению и выживаемости нейронов (McDonald J.W. et al., 1999; Keirstead H.S. et al., 2005; Sharp J. et al., 2010). Однако, в связи с тем, что существуют высокие риски,

связанные с вероятностью развития опухолей, использование ЭСК не является безопасным. Кроме того, не решены биотические проблемы получения и применения этих клеток.

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки получают из соматических клеток путем генетических модификаций, которые активируют экспрессию главных транскрипционных факторов: SOX2 ((sex- determining region Y)-box2), Klf4 (Kruppel-like factor), Oct3/4 (Octamer-binding transcription factor 3/4) и C-Myc (Sakewski R. et al., 2013; Nishikawa S. et al, 2008; Park I.H. et al., 2008), и запускают переход клеток в мультипотентное состояние, подобное эмбриональным стволовым клеткам. Этот метод был разработан К. Takahashi и S. Yamanaka в 2006 году на фибробластах мышей, и изначально иПСК получали с помощью ретровирусной трансфекции 24 транскрипционных факторов. На данный момент для доставки репрограммирующих факторов используются ретровирусы, лентивирусы, векторы на основе аденовирусов, вируса Сендай, плазмиды, а также современные альтернативные методы с применением искусственных хромосом, мРНК, рекомбинантных репрограммирующих белков, смесей («коктейлей») низкомолекулярных соединений (Волкова Н.С. и др., 2016). Главным преимуществом использования в регенеративной медицине иПСК по сравнению с применением ЭСК является то, что их получение связано с меньшим количеством этических проблем и меньшим риском иммунологического отторжения у пациента, если для перепрограммирования используются аутологичные клетки (Li J. et al., 2013).

В многочисленных экспериментальных исследованиях с использованием иПСК были получены обнадеживающие результаты по регенерации спинного мозга после повреждения. Показано, что при трансплантации в поврежденный спинной мозг мышей иПСК человека,

предифференцированных в нейральные стволовые/прогениторные клетки (НСПК), трансплантированные клетки выживают, способствуют регенерации аксонов и образуют синапсы с нейронами спинного мозга реципиента (Nori S. et al., 2011; Fujimoto et al., 2012). В другом исследовании (Kobayashi Y. et al., 2012) было показано, что трансплантация НСПК, полученных из иПСК человека, способствует восстановлению утраченных функций спинного мозга у мышей за счет дифференцировки трансплантированных клеток в нейроны (52%), астроциты (31%) и олигодендроциты (26%) (Lee-Kubli C.A. et al., 2015). Однако широкое использование иПСК в клинической практике пока ограничивается рядом проблем, основной из которых является риск образования тератом в организме. В частности, применение классического способа получения иПСК с помощью ретровирусных конструкций может приводить к генетической нестабильности клеток. Современные методы также имеют серьезные недостатки, связанные с очень низкой эффективностью перепрограммирования и вероятностью повреждения клеток, или, в случае использования «коктейля», сложностью и многоступенчатостью технологии (Волкова Н.С. и др., 2016).

Мезенхимальные стволовые клетки

Мезенхимальные стволовые клетки – это мультипотентные клетки, способные к самообновлению, которые впервые были обнаружены в костном мозге (Prockop D.J. et al., 1997; Friedenstein A.J. et al., 1974). На сегодняшний день МСК получают также из жировой ткани, амниотической жидкости, плаценты, пуповинной крови и из некоторых эмбриональных органов, включая печень и селезенку. МСК обладают значительными преимуществами, которые позволяют считать их перспективными для изучения эффективности терапии травм спинного мозга. Во-первых, *in vitro* и *in vivo* они синтезируют ряд цитокинов, которые стимулируют и поддерживают рост нейронов, таких как нейротрофический фактор мозга (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) и фактор роста нервов (Nerve growth factor, NGF), а также фактор роста

эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor, VEGF) — сигнальный белок, вырабатываемый клетками для стимулирования ангиогенеза (Hsieh J.Y. et al., 2013). Кроме того, наращивание большого количества клеток для трансплантации возможно в относительно короткие сроки: процедура получения МСК и их криоконсервации является достаточно простой, а клетки сохраняют свой регенеративный потенциал после размораживания с минимальными потерями (Li J. et al., 2013). В экспериментальных исследованиях по изучению эффективности МСК в клеточной терапии спинного мозга показано, что их трансплантация может способствовать ремиелинизации и росту аксонов (Malgieri A. et al., 2010) и то, что эти клетки способны синтезировать в зоне поражения компоненты внеклеточного матрикса, такие как ламинин, фибронектин и коллаген, которые способствуют уменьшению площади повреждения (Malgieri A. et al., 2010). Несмотря на обнадеживающие результаты, полученные в экспериментах на животных, в клинических испытаниях МСК оказалась неэффективной; кроме того, у пациентов были выявлены побочные эффекты (Ichim T.E. et al., 2010; Kishk N.A. et al., 2010; Bhanot Y. Et al., 2011), такие как, например, нейропатическая боль. Таким образом, безопасность применения МСК требует дальнейшего изучения, так как для применения в клинической практике развитие нежелательных явлений в результате трансплантации клеток должно быть минимальным.

Клетки нервной системы

К клеткам нервной системы, которые активно изучаются в экспериментах по терапии травм спинного мозга, относятся шванновские клетки, нейральные стволовые/прогениторные клетки (НСПК) центральной нервной системы и обкладочные клетки обонятельной луковицы. шванновские клетки осуществляют миелинизацию аксонов в периферической нервной системе, обеспечивая трофическую и опорную функции, а также ремиелинизацию аксонов нейронов после повреждения (Rath E. et al., 1995;

Triolo D. et al., 2006). Кроме того, шванновские клетки секретируют компоненты внеклеточного матрикса (Tabesh H. et al., 2009) и нейротрофические факторы, такие как BDNF, NGF, нейротрофин-3 (Neurotrophin-3, NT-3), (Dey I. et al., 2013; Godinho N. et al., 2013) и нейротрофический фактор роста глиальных клеток (Glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF) (Iannotti C. et al., 2004). Эти клетки были активно изучены в экспериментальных исследованиях по трансплантации в поврежденный спинной мозг. Шванновские клетки были впервые трансплантированы научной группой I.D. Duncan в 1981 году в спинной мозг крыс (Tetzlaff W. et al., 2011), и с тех пор эффективность применения данных клеток была изучена на различных моделях повреждения спинного мозга. В ряде экспериментальных исследований показано, что шванновские клетки могут способствовать поддержанию целостности нервной ткани после повреждения и выживаемости нервных клеток, способствовать росту моторных и сенсорных аксонов и ремиелинизации аксонов ЦНС. Однако далеко не во всех работах удалось получить позитивные и обнадеживающие результаты (Sharp K.G. et al., 2012; Agudo M. et al., 2008). Кроме того, с использованием шванновских клеток было проведено несколько клинических испытаний (Guest J. et al., 2013; Li J. et al., 2013; Anderson K.D. et al., 2017), в которых была показана безопасность этих клеток для пациентов, однако значительных улучшений не наблюдалось. Отсутствие выраженных эффектов может быть связано с тем, что в исследованиях принимали участие пациенты с тяжелыми повреждениями спинного мозга, в связи с чем на восстановление утраченных функций могло уйти больше времени. Таким образом, вопрос об эффективности шванновских клеток в терапии травм спинного мозга остается открытым.

Нейральные стволовые/прогениторные клетки (НСПК) – это стволовые клетки, которые способны дифференцироваться в клетки глии и зрелые нейроны, они присутствуют в нервной системе как на стадии пренатального

развития, так и во взрослом организме (Gage F.H. et al., 2000). Данные клетки локализуются в центральной нервной системе в желудочках мозга, зубчатой извилине гиппокампа и центральном канале спинного мозга (Sabelstrom H. et al., 2014; Gregoire C.A. et al., 2015), а также присутствуют в периферической нервной системе (Czaja K. et al., 2012). НСПК впервые были получены из полосатого тела взрослых мышей исследователями в 1992 году Reynolds B.A. и Weiss S., которые продемонстрировали их способность дифференцироваться в зрелые нейроны и астроциты (Reynolds B.A. et al., 1992). Для проведения экспериментальных исследований по регенерации спинного мозга после повреждения обычно используют полученные *in vitro* нейросферы – сферические структуры, которые образуются из нейральных стволовых и прогениторных клеток при помещении в бессывороточную среду и имеют гетерогенный состав, так как НСПК в составе нейросфер могут интенсивно дифференцироваться в направлении образования нейронов, астроцитов и олигодендроцитов (Bez A. et al., 2003). Известно, что трансплантированные в спинной мозг НСПК секретируют большое количество способствующих росту и выживаемости нервных клеток факторов, таких как BDNF, CNTF, GDNF, NGF, фактор роста инсулина-1 (IGF-1) и т.д. (Hawryluk G.W. et al., 2012). В экспериментальных работах по трансплантации НСПК в спинной мозг было показано, что эти клетки обладают нейропротективным эффектом (Emgard M. et al., 2014; Sankavaram S.R. et al., 2019), способны *in vivo* дифференцироваться в олигодендроциты (Emgard M. et al., 2014; Sankavaram S.R. et al., 2019), нейроны (Lu P. et al., 2012), усиливают миелинизацию аксонов и улучшают моторные и сенсорные функции спинного мозга (Hofstetter C.P. et al., 2005; Lu P. et al., 2012; Sankavaram S.R. et al., 2019). Важным преимуществом применения НСПК является их безопасность, которая была показана как в экспериментах на крысах (Emgard M. et al., 2014), так и в клинических испытаниях (Piltti K.M. et al., 2013). Интересно отметить, что существуют исследования, в которых было показано, что трансплантированные НСПК могут интегрироваться в спинной мозг реципиента, дифференцируясь в

функциональные нейроны и образуя синапсы с нейронами спинного мозга хозяина (Lu P. et al., 2012; Bonner J.F. et al. 2011; Ben-Hur T. et al., 2010). На сегодняшний день таких работ немного, таким образом, вопрос об интеграции трансплантированных НСПК остается открытым и требует дальнейшего изучения.

В обонятельных луковицах головного мозга содержатся так называемые обкладочные клетки (Doucette R. et al., 1991), эффективность которых была изучена в многочисленных экспериментальных исследованиях по терапии травм спинного мозга. Показано, что трансплантация обкладочных клеток обонятельных луковиц способствует ремиелинизации поврежденных и демиелинизированных аксонов спинного мозга (Franklin R.J. et al., 1996; Imaizumi T. et al., 1998; Sasaki M. et al., 2004), восстановлению двигательных функций и чувствительности (Takeoka A. et al., 2011; Li B.C. et al., 2012), однако этих данных недостаточно, чтобы применять их для лечения пациентов с травмами спинного мозга. Кроме того, по техническим причинам обонятельные луковицы человека не могут быть рекомендованы в качестве оптимального источника для получения обкладочных клеток для аутологичной или аллогенной трансплантации пациентам.

В результате применения перечисленных типов клеток были получены некоторые положительные результаты, но на сегодняшний день накоплено недостаточно данных о безопасности и эффективности их применения в клинической практике. Таким образом, поиск оптимального клеточного препарата для лечения спинного мозга является актуальной задачей современной науки. Еще одним потенциальным источником клеток для терапии травм спинного мозга является обонятельная область слизистой оболочки носа млекопитающих.

1.6. Клетки обонятельной области слизистой оболочки носа как потенциальный источник клеток для терапии травм спинного мозга

Обонятельная область слизистой оболочки носа (обонятельная выстилка) млекопитающих обладает рядом преимуществ по сравнению с другими источниками для получения клеток для клеточной терапии травм спинного мозга. Во-первых, обонятельная слизистая оболочка является частью периферической нервной системы, в которой регенеративные процессы происходят в течение всей жизни млекопитающих (James E. et al., 2002). Во-вторых, обонятельная выстилка является источником сразу нескольких типов клеток для клеточной терапии: нейтральных стволовых/прогениторных клеток (НСПК), обкладочных клеток и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) (Borgmann-Winter K. et al., 2015). В-третьих, процедура получения ткани обонятельной слизистой оболочки носа технически доступна и безопасна для пациентов. Показано, что процедура интраназальной эндоскопии, которая обычно используется для получения биопсии обонятельной выстилки, технически доступна и не приводит к нарушению обоняния или каким-либо другим побочным эффектам у пациентов (Yao R. et al., 2018). С точки зрения персонализированной медицины обонятельная выстилка может быть оптимальным источником аутологичных и тканеспецифичных клеток, так как клетки могут быть получены от пациента с травмой спинного мозга, и после наращивания в культуре трансплантированы тому же самому пациенту. Таким образом использование клеток обонятельной зоны слизистой оболочки носа позволяет избежать ряда технологических и биоэтических проблем, возникновения реакции «трансплантат против хозяина» и риска возникновения тератомного эффекта.

1.6.1. Строение обонятельной области слизистой оболочки носа млекопитающих

Обонятельная область слизистой оболочки носа (*regio olfactoria tunicae mucosae nasi*) имеет эктодермальное происхождение и развивается из двух обонятельных плакод (утолщений передней части эктодермы головы) (Cuschieri A. et al., 1975). Ткань взрослого организма расположена в верхней трети носовой перегородки и занимает верхнюю и отчасти среднюю носовую раковины. Обонятельная выстилка состоит из обонятельного эпителия (*epithelium olfactorium*) и собственной пластинки (*lamina propria*) (Быков В.Л., 1997). Обонятельный эпителий млекопитающих является однослойным многорядным призматическим и состоит из трех слоев — апикального, промежуточного и базального (Borgmann-Winter K. et al., 2015) (рис. 3).



Рисунок 3. Строение (слева) и клеточный состав (справа) обонятельной области слизистой оболочки носа млекопитающих. Апикальный слой состоит из поддерживающих клеток, в промежуточном слое находятся зрелые и незрелые нейроны; в базальном слое содержатся шаровидные и горизонтальные базальные клетки. Базальный слой отделен от собственной пластинки базальной пластинкой. Собственная пластинка содержит МСК и обкладочные клетки. (по Borgmann-Winter K. et al., 2015, в модификации).

В апикальном слое находятся поддерживающие клетки, которые имеют высокопризматическую форму и многочисленные микроворсинки. Эти клетки формируют эпителиальный пласт обонятельного эпителия. В промежуточном слое содержатся рецепторные обонятельные нейросенсорные клетки. Их дендриты содержат на конце расширение (обонятельную булаву), от которого параллельно поверхности эпителия отходят длинные неподвижные обонятельные реснички, в мембране которых находятся рецепторы пахучих веществ. Аксоны обонятельных нейронов образуют обонятельные пути в обонятельные луковицы головного мозга (рис. 4).

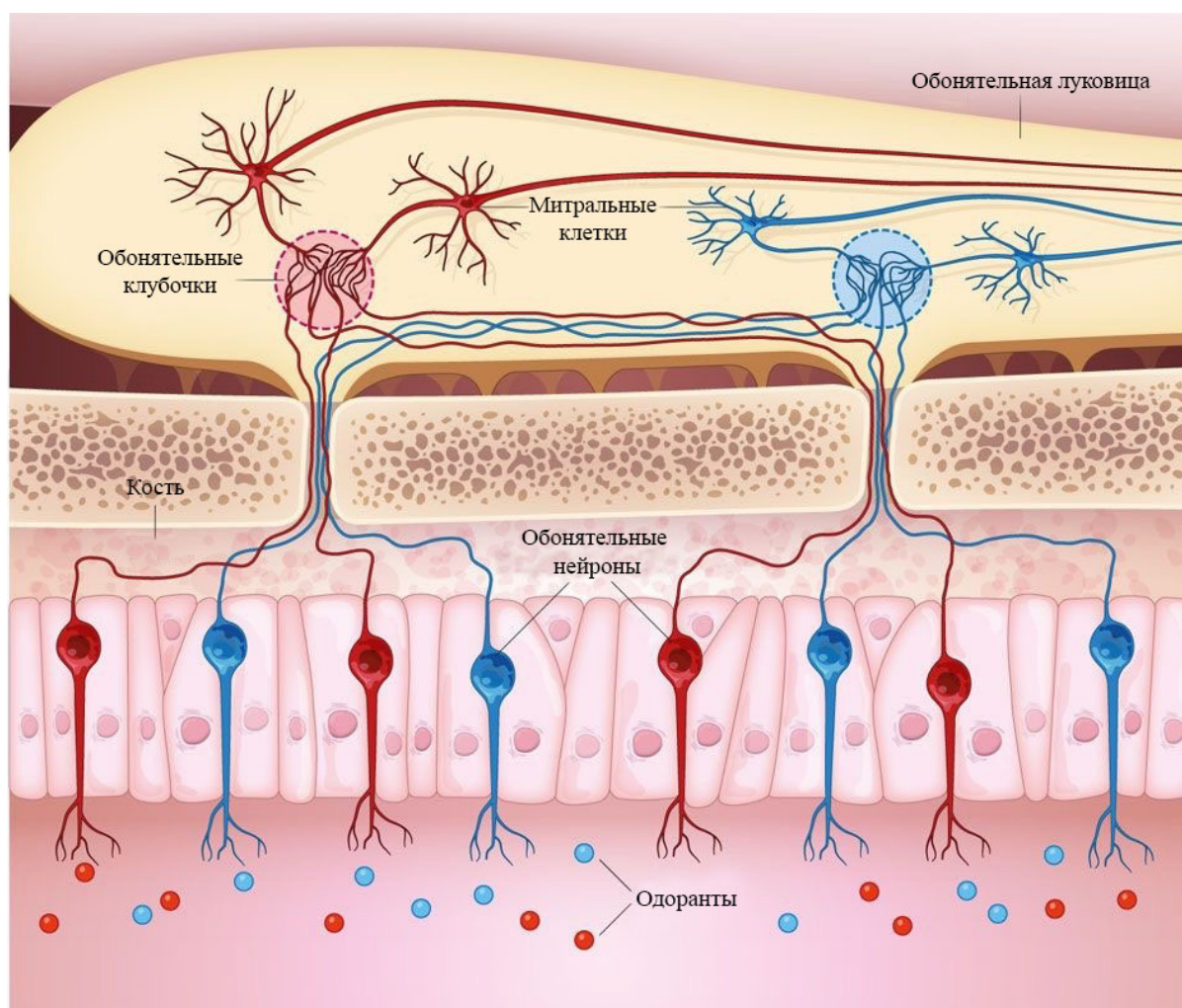


Рисунок 4. Схема передачи обонятельного нервного сигнала от обонятельных нейронов нейронам обонятельных луковиц. Различные одоранты (пахучие вещества) активируют обонятельные нейроны (разные типы одорантов обозначены разными цветами). По аксонам обонятельных нейронов возбуждение передается нейронам обонятельных луковиц, называемым митральными клетками. Каждая митральная клетка получает сигнал примерно

от 1000 обонятельных нейронов, то есть происходит конвергенция сигнала на разветвлениях апикального дендрита одной митральной клетки. Группа дендритов митральных клеток вместе с терминалями обонятельных нейронов образуют сферические структуры, называемые обонятельными клубочками, Аксоны митральных клеток образуют обонятельный тракт и передают сигнал обонятельным центрам высшего порядка (по Urban N. et al., 2012, в модификации).

В базальном слое обонятельного эпителия содержатся мультипотентные НСПК, которые способны дифференцироваться во все типы клеток обонятельного эпителия, в том числе, в зрелые нейроны и в глиальные клетки. Эти клетки отличаются экспрессией таких маркеров, как *sox2* (ключевой фактор транскрипции стволовых клеток, играющий важную роль в самообновлении и поддержании этих клеток), *рах6* (транскрипционный фактор, участвующий в развитии нервной системы), *нестин* (белок промежуточных филаментов VI типа, характер для клеток, находящихся на стадии ранней нейральной дифференцировки), *Musashi* (играет важную роль в развитии нервной ткани) (Chen J.H. et al., 2015; Gomez-Lopez S. et al., 2011). НСПК представлены горизонтальными и шаровидными базальными клетками. Горизонтальные базальные клетки находятся непосредственно на базальной пластинке, являются покоеющимися клетками (медленно делящимися) (Muniswami D.M. et al., 2017), имеют уплощенную форму и экспрессируют цитокератины-5 и -14. Глобулярные базальные клетки имеют сферическую форму, являются митотически активными, не экспрессируют цитокератины и находятся в поверхностном по отношению к горизонтальным базальным клеткам слое (Borgmann-Winter K. et al., 2015). Таким образом, принято считать, что глобулярные клетки являются предшественниками, а горизонтальные клетки – стволовыми (Mackay-Sim A. et al., 2012).

Под базальным слоем обонятельного эпителия находится собственная пластинка, которая отделена от него базальной пластинкой. Собственная пластинка образована соединительной тканью и содержит концевые отделы обонятельных (боуменовых) желез, выделяющих слизистый секрет на

поверхность обонятельного эпителия, где он омывает реснички и растворяет пахучие вещества (Быков В.Л., 1997). В собственной пластинке проходят пучки аксонов рецепторных клеток (обонятельные нити), которые выходят из обонятельного эпителия и направляются в обонятельную луковицу (рис. 4). В lamina propria также содержатся обкладочные клетки, которые охватывают многочисленные немиелинизированные аксоны обонятельных нейронов. Обкладочные клетки обонятельной выстилки представляют собой узкоспециализированные, и, вероятно, гетерогенные популяции глиальных клеток, которые имеют морфологические и нейрохимические особенности как, шванновских клеток, так и астроцитов, хотя они отличаются от обоих. Их нейрохимический состав подчеркивает их функциональную гетерогенность, им свойственна экспрессия маркеров астроцитов (например, GFAP и s100 β), шванновских клеток (рецептор нейтрофинов (Nerve growth factor receptor p75, p75NTR), предшественников олигодендроцитов (O4, NG2), маркеров радиальной глии ЦНС (основного белка, связывающего липиды (BLBP), а также важных для развития белков CD44, β 1 интегрина, P200 и Notch 3 (Au E. et al., 2003). Обкладочные клетки формируют контакты с аксонами обонятельных нейронов по всей их длине вплоть до обонятельной луковицы, выполняя трофическую и защитную функцию и участвуя в поддержании их регенерации (Chehrehasa F. et al., 2010; Tennent R. et al., 1996). Обнаружено, что они создают благоприятные условия для роста и восстановления аксонов, фагоцитируя клеточный дебрис и/или бактерий (Nazareth L. et al., 2015; Leung J.Y. et al., 2008), участвуют в нейровоспалении, ангиогенезе, экспрессии нейротрофических факторов, а также в секреции молекул внеклеточного матрикса, которые обеспечивают субстрат для вновь генерируемых аксонов (Yao R. et al., 2018).

Кроме того, в обонятельной области слизистой оболочки носа содержатся МСК, которые были впервые идентифицированы относительно недавно в культуре обонятельной выстилки эмбрионов крыс по экспрессии

специфических для МСК маркеров CD90, CD105, STRO-1 и их способности дифференцироваться в три основные клеточные линии (Van Pham P., 2017). В экспериментах *in vitro* было показано, что МСК обонятельной выстилки проявляют более высокую митотическую активность по сравнению с МСК костного мозга (почти в три раза выше), которая сохраняется при длительном культивировании данных клеток (более 15 недель) за счет поддержания активности теломеразы. В исследовании Lindsay S.L. и соавторов в 2013 году была показана способность МСК обонятельной слизистой оболочки участвовать в миелинизации аксонов ЦНС *in vitro* (Lindsay S.L. et al., 2013). В 2017 году при трансплантации этими авторами данных клеток в спинной мозг крыс на хронической стадии повреждения наблюдалась ремиелинизация в области белого вещества и уменьшение кистозных полостей, однако никаких улучшений показателей двигательных функций выявлено не было (Lindsay S.L. et al., 2017). Таким образом, необходимы дальнейшие исследования в области трансплантации этих клеток при повреждениях спинного мозга.

В отличие от МСК более изученными типами клеток обонятельной зоны слизистой оболочки носа рассматриваются НСПК и обкладочные клетки, эффективность их использования была показана рядом исследователей при разных типах повреждения спинного мозга.

1.6.2. Нейральные стволовые/прогениторные клетки обонятельной области слизистой оболочки носа в терапии травм спинного мозга

С начала 21 века для наращивания достаточного для трансплантации количества НСПК из обонятельной области слизистой оболочки носа исследователями применяется метод получения нейросфер (Murrell W. et al., 2005; Roisen F.J. et al., 2001; Zheng X. et al., 2006). Полученные культуры НСПК обонятельного эпителия были изучены в нескольких экспериментальных работах по лечению травм спинного мозга при разных типах и на различных стадиях повреждения. Например, при частичной гемисекции спинного мозга в

шейном отделе крыс было обнаружено, что полученные из обонятельного эпителия обонятельной выстилки НСПК выживают после трансплантации, мигрируют, интегрируются в спинной мозг хозяина, оказывают нейропротективные эффекты на аксоны нейронов руброспинального тракта, а также способствуют регенерации аксонов, что приводит к восстановлению функций (Xiao M. et al, 2005; Xiao M. et al, 2007). Ранее в отделе фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ НМИЦ ПН им. В.П. Сербского была проведена трансплантация стволовых клеток из обонятельной выстилки в острую фазу повреждения спинного мозга (Лебедев С.В. и др., 2010). Было показано, что при этом значительно улучшаются показатели двигательных функций конечностей, уменьшается зона травматического повреждения и активируется посттравматическая ремиелинизация. Также было показано, что при трансплантации НСПК из обонятельной слизистой оболочки на 9-е сутки после травмы наблюдается значительное улучшение двигательной активности задних конечностей по сравнению с контрольной группой, а также их дифференцировка в нейроны (Muniswami D.M. et al., 2017). В этих экспериментальных работах были получены положительные результаты, однако для трансляции в клиническую практику данных недостаточно. Таким образом, необходимы дальнейшие экспериментальные исследования по регенерации спинного мозга с использованием нейральных стволовых/прогениторных клеток обонятельной области слизистой оболочки носа.

1.6.3. Обкладочные клетки обонятельной области слизистой оболочки носа в терапии травм спинного мозга

Особенный интерес представляют собой обкладочные клетки обонятельной зоны слизистой оболочки носа, регенеративный потенциал которых при травмах спинного мозга активно изучается с конца прошлого века в связи с их способностью эффективно поддерживать нейрональную регенерацию (Barnett S.C. et al., 2007; Mackay-Sim A. et al., 2011). Во-первых,

обкладочные клетки секретируют большое разнообразие нейротрофических факторов, включая фактор роста нервов (Woodhall E. et al., 2001), фактор роста эндотелия сосудов (Vincent L.J. et al., 2005), нейротрофический фактор, полученный из глиальной клеточной линии (Woodhall E. et al., 2001), фактор роста фибробластов (Chuah M.I. et al., 1999), инсулиноподобный фактор роста (Yan H. et al., 2001) и нейротрофины-3 и -4 и экспрессируют молекулы клеточной адгезии, такие как ламинин-1 и молекулы адгезии нейрональных клеток. Эти нейротрофические факторы создают условия для нейропротекции, астроглиоза, ремиелинизации, ангиогенеза, а также способствуют нейропластичности. Во-вторых, обкладочные клетки активируют миелинизацию и регенерацию аксонов (Franklin R.J. et al., 1996; Imaizumi T. et al., 1998; Sasaki M. et al., 2004). Эти клетки также могут способствовать уменьшению площади астроцитарного рубца и прорастанию аксонов, так как обкладочные клетки экспрессируют матричные металлопротеиназы-2 и -9, которые позволяют им мигрировать и проникать во внеклеточный матрикс (Gueye Y., et al., 2011). В-третьих, они опосредованно способствуют восстановлению спинного мозга путем рекрутирования эндогенных шванновских клеток в область повреждения (Richter N.W. et al., 2005).

Как уже было сказано выше, для экспериментальных исследований по терапии травм спинного мозга обкладочные клетки получают также из обонятельной луковицы млекопитающих. Однако, наиболее предпочтительными для лечения пациентов являются обкладочные клетки именно из обонятельной выстилки (Bianco J.I. et al., 2004). Процедура получения биоптата обонятельной слизистой оболочки носа для создания аутологичного препарата является доступной, тогда как биопсия обонятельных луковиц для этих целей не рассматривается возможной (Tabakow P. et al., 2013). Кроме того, показано, что трансплантированные обкладочные клетки обонятельной выстилки способны выживать в спинном мозге до 60 дней (Mayeur A. et al., 2013), а также обладают повышенной

миграционной способностью по сравнению с клетками из обонятельных луковиц (Richter N.W. et al., 2005).

В серии экспериментальных исследований продемонстрировано, что трансплантация обкладочных клеток в поврежденный спинной мозг крыс может способствовать уменьшению площади повреждения, стимулировать регенерацию и ремиелинизацию нервных волокон и их аксонов (Richter N.W. et al., 2005), а также восстанавливать моторные и сенсорные функции конечностей (Iwatsuki K. et al., 2008; Yamamoto M. et al., 2009; Aoki M. et al., 2010; Amemori T. et al., 2010; Gorrie C.A. et al., 2010; Tharion G. et al., 2011). Большинство этих экспериментальных исследований посвящено изучению эффективности обкладочных клеток человека и крыс при трансплантации в острую и подострую фазу повреждения спинного мозга (табл. 1).

Таблица 1

Экспериментальные исследования в области трансплантации обкладочных клеток (ОК) при различных типах и на разных стадиях повреждения

Автор, год	Модель повреждения (на крысах)	Трансплантат	Сроки трансплантации после повреждения	Результаты трансплантации
Iwatsuki K. et al., 2008	Трансекция на уровне Th8–Th 9	ОК крыс (фрагменты собственной пластинки)	0 день (острое повреждение)	Восстановление двигательных функций задних конечностей, выживаемость трансплантированных клеток в течение 2 недель
Bretzner F. et al., 2008	Размозжение спинного мозга	1.5×10^5 ОК крыс	0 день (острое повреждение)	Нейропротективный эффект
Yamamoto et al., 2009	Односторонняя абляция кортикоспинального тракта	1×10^5 ОК крыс	через 8 недель (хроническое повреждение)	Восстановление функций передней конечности
Kalincik et al., 2010	Трансекция на уровне Th4	1×10^6 ОК крыс	0 день (острое повреждение)	Уменьшение площади повреждения, объема кистозных полостей, нейропротективный эффект
Aoki M. et al., 2010	Трансекция на уровне Th10	Фрагменты ткани обонятельной слизистой оболочки	через 2 недели (подострая фаза повреждения)	Улучшение двигательных функций задних конечностей, уменьшение объема кист
Amemori T. et al., 2010	Размозжение спинного мозга	3×10^5 ОК крыс	на 7 день (подострая фаза повреждения)	Улучшение показателей двигательной активности, электрофизиологических показателей, нейропротективные эффекты

Bretzner F. et al., 2010	Размозжение спинного мозга	1.5×10^5 ОК крыс	0 день (острое повреждение)	Трансплантация препятствовала образованию кист, астроглиозу, способствовала снижению порогу чувствительности, уменьшению площади повреждения, выживаемость трансплантированных клеток течение 4 недель
Gorrie C.A. et al., 2010	Контузионная травма на уровне Th10	1×10^6 ОК человека	через 12 часов (острое повреждение)	Улучшение показателей двигательной активности, уменьшение площади повреждения, объема полостей, выживаемость клеток до 6 недель
Zhang S.X. et al., 2011	Контузионная травма на уровне Th10	Фрагменты собственной пластинки/ фрагменты собственной пластинки + ОК крыс	через 6 недель (хроническое повреждение)	Абляция рубца в комбинации с трансплантацией способствовала уменьшению площади повреждения, полости, но не способствовала восстановлению двигательной активности
Centenaro L. et al., 2011	Трансекция	Фрагменты собственной пластинки/ фрагменты собственной пластинки + ОК крыс	0 день (острое повреждение) через 2 недели (подострое повреждение) через 4 недели (острое повреждение)	Не было выявлено значимых эффектов
Tharion G. et al., 2011	Контузионная травма на уровне Th10	$0.7-2 \times 10^6$ ОК крыс	через 2 недели (подострое повреждение)	Улучшение двигательных функций
Stamegna J.C. et al., 2011	Контузионная травма на уровне C2	6×10^5 ОК крыс	на 15 день (подострое повреждение)	Восстановление дыхательных функций через 3 месяца после трансплантации, проращение аксонов
Centenaro L. et al., 2013	Контузионная травма на уровне Th8–Th9	Фрагменты собственной пластинки/ фрагменты собственной пластинки + ОК крыс	0 день (острое повреждение) через 2 недели (подострое повреждение) через 4 недели (острое повреждение)	Трансплантация способствовала миелинизации нервных волокон
Mayeur A. et al., 2013	Трансекция на уровне Th10	ОК крыс	0 день (острое повреждение)	Показано улучшение электрофизиологических показателей, функциональное восстановление, снижение реактивности астроцитов, выживаемость клеток в течение 60 дней и их миграция
Cloutier F. et al., 2016	Трансенкция на уровне Th4	1×10^5 ОК крыс перед повреждением	0 день (острое повреждение)	Выживаемость трансплантированных клеток до 8 недель, улучшение вегетативных функций и спинного мозга

Carwardine D. et al., 2017	Размножение спинного мозга	8×10^4 модифицированных ОК собак	0 день (острое повреждение)	Выживаемость трансплантированных клеток в течение 4 недель, спрутинг
----------------------------	----------------------------	---	-----------------------------	--

В ряде единичных клинических испытаний с использованием обкладочных клеток собственной пластинки обонятельной выстилки человека было показано, что трансплантация аутологичных обкладочных клеток является безопасным методом терапии травматических повреждений спинного мозга, не вызывающим хирургических осложнений и применимым для лечения пациентов (Feron F., et al., 2005; Mackay-Sim A. et al., 2011; Tabakow P. et al., 2013; Wang S. et al., 2016).

Заключение к обзору литературы

Травмы спинного мозга являются одной из основных причин тяжелой инвалидизации. Ежегодно в мире диагностируется до 500 тысяч новых случаев травматических повреждений спинного мозга, а у каждого третьего из пострадавших в спинном мозге образуются посттравматические кисты. Основными клиническими проявлениями заболевания являются параличи конечностей, нарушения чувствительности и функций органов малого таза. Эти симптомы, как правило, неуклонно прогрессируют. Применяемые в настоящее время методы лечения посттравматических кист практически неэффективны. В связи с этим поиск новых подходов к лечению посттравматических кист спинного мозга является актуальнейшей проблемой.

Наиболее перспективным направлением в лечении посттравматических повреждений спинного мозга является клеточная терапия. В экспериментальных работах и ряде клинических испытаний были изучены различные типы клеток: эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, шванновские клетки, нейральные стволовые/прогениторные клетки, обкладочные клетки и другие. В последние годы большое количество

исследований в этой области посвящено клеткам, полученным из обонятельной области слизистой оболочки носа.

Обонятельная слизистая оболочка служит уникальным источником клеток для клеточной терапии, так как является частью периферической нервной системы, а регенеративные процессы в ней происходят в течение всей жизни. Получение обонятельной слизистой оболочки носа является технически доступной и безопасной для пациентов и может быть источником нейральных стволовых/прогениторных и обкладочных клеток. Обкладочные клетки секретируют нейротрофические факторы, которые способствуют регенерации аксонов. Показано, что трансплантированные обкладочные клетки способны выживать в спинном мозге в течение 2-х месяцев. Нейральные стволовые/прогениторные клетки, полученные из обонятельного эпителия, после трансплантации в спинной мозг способны мигрировать и оказывать нейропротективные и прорегенераторные эффекты. По данным экспериментальных исследований ряда авторов трансплантация этих клеток в спинной мозг на разных стадиях повреждения оказывает положительный эффект на восстановление двигательных функций конечностей, а также способствует уменьшению зоны травматического повреждения спинного мозга.

Однако терапевтический эффект нейральных стволовых/прогениторных и обкладочных клеток обонятельной области слизистой оболочки носа клеток мало изучен при хронических повреждениях спинного мозга, в том числе, при посттравматических кистах спинного мозга. Кроме того, до сих пор отсутствуют оптимальные и воспроизводимые протоколы получения этих клеток. Для возможности дальнейшего использования данных клеток в доклинических исследованиях и клинической практике необходимо разработать оптимальные протоколы для получения клеточных препаратов и изучить данные клетки в терапии посттравматических кист спинного мозга.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Реактивы и расходные материалы

В исследовании использовали реактивы аналитической чистоты для работы с культурами клеток: среду Игла в модификации Дульбекко с добавлением питательных веществ (F-12) в соотношении 1:1 (ДМЕМ/F-12) (Gibco, США), добавки к ростовым средам L - глутамин, антибиотики стрептомицин, пенициллин, гентамицин (Gibco, США), эмбриональную телячью сыворотку (FBS) (HyClone, США), фосфатно – солевой буфер (ФСБ) (Gibco, США), эпидермальный фактор роста (EGF) и фактор роста фибробластов (FGF) (Gibco, США), гормон гидрокортизон, добавка инсулин-трансферрин-селен-этаноламин (ITS-X) (100X) (Gibco, США), ферменты диспазу II, коллагеназу (Gibco, США), трипсин (Invitrogen, США), версен (Панэко, Россия), матрикс поли-L-лизин, среду для заморозки «Recovery - Cell Culture Freezing Medium» (Gibco, США), культуральную посуду (культуральные флаконы, пробирки, чашки Петри, наконечники для дозаторов, стерилизующие фильтры) (Costar, ULplast, Corning, SPL Lifesciences, Axygen Biosciences, США).

Для фиксации клеток использовали 3,7% параформальдегид (ПФА), для пермеабилзации мембран клеток применяли тритон X-100 Detergent Surfact-Ams™ Solution (Thermo Scientific, США).

Для проведения иммунофлуоресцентного окрашивания использовали первичные моноклональные антитела к p75NTR, GFAP, SOX2, Нестину, b-III-тубулину (Abcam, США), вторичные антитела Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, США), DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) для окрашивания клеточных ядер (Invitrogen, США), 1% раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA) для разведения антител, для выявления трансплантированных клеток в спинном мозге использовали прижизненный мембранный краситель PKH26 (Sigma, США). Для заключения

полученных препаратов применяли Aqua Poly/Mount media (Polysciences, США).

2.2. Экспериментальные животные

В исследовании были использованы крысы Вистар (Филиал «Андреевка» ФГБУН "НЦБМТ" ФМБА России). Животные содержались в стандартных условиях экспериментально-биологической клиники "НМИЦ ПН им. В.П. Сербского" Минздрава России (ГОСТ №33215-2014 от 09 ноября 2015 г. «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур»; ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами»).

В качестве подстилки использовали мелкую стружку из экологически чистой древесины лиственных пород (ТУ 5313-001-1897639-92). Крысы имели свободный доступ к корму и воде. В состав корма в дополнение к стандартному гранулированному корму для грызунов (комбикорм полнорационный экструдированный для лабораторных животных – мышей, крыс, хомяков; стандарт РООС ПР98 В01220, удостоверение о качестве от 10.07.08), входили сырая морковь, капуста, отварное мясо. Световой день составлял 12 часов (с 7:00 до 19:00). Освещенность в светлый период цикла составляла 70-90 лкс. Температура в помещении постоянного содержания была 22°C.

Все манипуляции с животными проводили с соблюдением правил гуманного обращения с лабораторными животными, руководствуясь принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов (ETS 123, Страсбург, 1986) и директивы Европейского парламента и Совета Европейского Союза (2010/63/EU, Страсбург, 2010). На проведение эксперимента было получено разрешение

локального этического комитета РНИМУ им. Н.И. Пирогова (протокол № 153 от 14.03.2016).

2.3. Получение ткани обонятельной слизистой оболочки носа человека и крыс

В работе были использованы образцы обонятельной области слизистой оболочки носа человека и крыс. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Образцы обонятельной выстилки человека получали из верхних носовых ходов 40 пациентов при плановом хирургическом вмешательстве в Отделении пластической хирургии УКБ № 1. От всех пациентов было получено информированное согласие. Ткань, полученная из обонятельной зоны слизистой оболочки, имеет бурый оттенок, который придает ей пигмент, содержащийся в поддерживающих эпителиоцитах.

Для получения ткани обонятельной слизистой оболочки использовали половозрелых крыс Вистар ($N=100$). Животных обезболивали интраперитонеальным введением смеси реланиум/кетамин (1:1) (1 мкл/г). Далее проводили декапитацию. Затем производили сечение черепа в сагиттальной плоскости на уровне носовой перегородки для забора материала обонятельной выстилки животного под бинокулярной лупой. Отличительной особенностью слизистой оболочки обонятельной области является то, что она окрашена в более темный цвет: от желто-бурого до темно-коричневого.

После получения обонятельной слизистой оболочки человека и крыс образцы ткани транспортировали в среде ДМЕМ/F-12 с добавлением 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ед/мл пенициллина при 4°C в стерильных условиях в течение 4 часов.

Перед выделением клеток обонятельную слизистую оболочку человека и крыс промывали 3 раза в среде ДМЕМ/F-12 с добавлением 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ед/мл для того, чтобы удалить сгустки крови, сосуды и костную ткань. Затем проводили обработку обонятельной слизистой оболочки

ферментом диспазой, после чего механически разделяли ткань на обонятельный эпителий и подлежащую собственную пластинку. Собственную пластинку использовали для получения обкладочных клеток, а ткань обонятельного эпителия для получения нейральных стволовых/прогениторных клеток.

2.4. Разработка протоколов получения обкладочных клеток обонятельной слизистой оболочки носа человека и крыс

Обкладочные клетки получали из собственной пластинки обонятельной слизистой оболочки крыс и человека по разработанной нами в отделе фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России методике с помощью метода эксплантной культуры (Voronova A.D. et al., 2018; Stepanova O.V. et al., 2018). Суть данного метода заключается в том, что собственная пластинка подвергается механическому измельчению, а полученные фрагменты ткани помещают в чашки Петри и культивируют в питательной среде. Через несколько дней фрагменты ткани адгезируют к пластику, и из них начинают мигрировать клетки и пролиферировать. Культивирование проводили до образования монослоя. Далее клетки пассировали в селективные условия для получения обогащенной культуры обкладочных клеток. Целью разработки такого протокола являлось получение культуры, обогащенной обкладочными клетками. Морфологию полученных клеток оценивали с помощью фазово-контрастного инвертированного микроскопа Leica (модель DM 2500).

2.5. Разработка протоколов получения нейральных стволовых/прогениторных клеток обонятельной слизистой оболочки носа человека и крыс

Для разработки протоколов получения НСПК крыс и человека использовали обонятельный эпителий обонятельной слизистой оболочки. Для наращивания НСПК был выбран метод получения нейросфер. Суть метода заключается в том, что при культивировании в бессывороточной среде

большинство дифференцированных клеточных типов погибает в течение нескольких дней, тогда как немногочисленная популяция клеток-предшественников начинает активно пролиферировать в присутствии EGF и bFGF. При этом НСПК образуют колонии недифференцированных клеток, называемые нейросферами, которые могут быть субкультивированы для увеличения их численности (Reynolds B.A. et al., 1992). Анализ полученных культур проводили с помощью фазово-контрастного инвертированного микроскопа Leica DM 2500.

2.6. Иммуоцитохимический анализ

Иммуоцитохимическое исследование проводили согласно следующему протоколу. Клетки выращивали на покровных стеклах. После чего стекла с клетками фиксировали 3,7% параформальдегидом в течение 5 минут при комнатной температуре и три раза промывали ФСБ. Далее проводили пермеабиллизацию клеточных мембран раствором тритона X-100 в течение 5 минут при комнатной температуре. Далее препараты три раза промывали ФСБ и проводили инкубацию с ФСБ для блокирования неспецифических сайтов связывания сывороткой в течение 1,5 часов при комнатной температуре. Затем стекла с клетками промывали три раза в ФСБ и инкубировали с раствором первичных антител в течение 1 часа при комнатной температуре. После чего препараты три раза промывали ФСБ и инкубировали с раствором вторичных антител в течение 1 часа при комнатной температуре. После трехкратной промывки ФСБ окрашивали ядра клеток с помощью DAPI (1:3000) в течение 5 минут, после чего покровные стекла заключали в Aqua Poly/Mount.

Для того, чтобы охарактеризовать полученные культуры обкладочных клеток, использовали их общепринятые маркеры (p75NTR, GFAP). Для того, чтобы определить, на каком пассаже полученные культуры клеток человека и крыс наиболее обогащены обкладочными клетками, производили подсчет p75NTR/GFAP-позитивных клеток в 10 полях зрения для каждого пассажа (1-

5 пассажи). Для выявления НСПК использовали маркеры SOX2 и Нестин. Концентрации антител соответствовали концентрациям, рекомендованным производителями (p75NTR (1:200), GFAP (1:200), sox2 (1:200), нестин (1:100), Alexa Flor 488 (1:2000) и Alexa Flour 594 (1:2000)).

Анализ препаратов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Observer Z.1 («Zeiss»). Для получения изображений использовали цифровую видеокамеру AxioCam HRC («Zeiss»). Полученные изображения были обработаны в программе Axiovision 3.1 («Zeiss») и Adobe Photoshop («Adobe Systems»).

2.7. Моделирование посттравматических кист спинного мозга

Моделирование посттравматических кист спинного мозга проводили по модифицированной нами методике Zhang C. (Zhang C. et al., 2015) на половозрелых самках крыс Вистар весом от 200 грамм ($N=300$). Все манипуляции выполняли при обезболивании животных. Для этого крыс наркотизировали интраперитонеальным введением смеси реланиум/кетамин (1:1) (1 мкл/г). Далее на уровне 2-5 грудного позвонка (Th2-Th5) с помощью скальпеля производили срединный надрез вдоль позвоночника и частичную резекцию мышц с обеих сторон от остистого отростка. Для получения доступа к спинному мозгу удаляли остистый отросток 4-го грудного позвонка (Th4) с помощью хирургических кусачек. Далее позвоночник крыс фиксировали на лабораторном столике и с помощью импактора (Precision Systems and Instrumentation LLC, Fairfax, VA) производили контузионную травму воздействием ударного механизма силой 200 кдин. Через 4 недели травмы проводили МРТ для визуализации спинного мозга в зоне повреждения.

2.8. Магнитно-резонансная томография (МРТ)

МРТ спинного мозга проводили для визуализации повреждения спинного мозга через 4 недели после травмы и через 4 недели после

трансплантации клеток на томографе ClinScan фирмы Bruker (США) с напряженностью поля 7Т в T2 взвешенном режиме на кафедре медицинских нанобиотехнологий медико-биологического факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова. Перед проведением МРТ животное наркотизировали изофлураном в течение 5 минут. Далее животное помещали в аппарат МРТ, фиксировали с подведенной трубкой для наркоза. Съемку спинного мозга проводили в двух плоскостях: сагиттальной и аксиальной. При получении T2 взвешенных изображений использовали частотное подавление жира. Анализ полученных изображений проводили с помощью программного пакета DICOM view MultiVox.

С помощью полученных на МРТ T2 взвешенных изображений проводили волюмометрию - количественную оценку объема посттравматических кист. Размеры кист измеряли через 4 недели после травмы (перед трансплантацией клеток) (V0) и через 4 недели после трансплантации (V1). Для этого проводили анализ МРТ-изображений в программе Vidar Dicom Viewer по срезам в фронтальной и сагиттальной проекциях спинного мозга крыс с шагом сканирования 0.5 мм. В каждом срезе выделяли область, соответствующую обнаруженной кисте. Программа автоматически вычисляла площадь выбранного участка. Для определения объема кист средние значения площадей кист умножали на шаг сканирования: $V = ((S1 + \dots + Sn)/n) * (h + d)$, где V — объем, S1...n — измеряемая площадь на каждом срезе, h - толщина среза, d - межсрезовой промежуток, равный 0,025 мм. Изменение размеров кист определяли как разницу между значением V0 и V1.

2.9. Оценка динамики восстановления двигательной активности задних конечностей крыс с помощью теста BBB

Основным инструментом для оценки восстановления моторной функции после травмы спинного мозга является 21 - балльная шкала открытого поля, разработанная Basso, Beattie и Bresnahan (BBB) (табл. 2),

которая позволяет изучить динамику восстановления опорно-двигательного аппарата, принимая во внимание раннюю стадию (BBB оценка от 0 до 7), промежуточную (8-13) и позднюю фазу (14-21) восстановления (Basso D.M. et al., 1995):

Таблица 2

21-бальная шкала BBB, позволяющая оценить динамику восстановления моторных функций задних конечностей

Баллы	Характеристики
0	отсутствие видимых движений задних конечностей
1	слабые движения в одном или двух суставах, обычно тазобедренном и/или коленном
2	экстенсивные движения в одном суставе или экстенсивные движения в одном суставе и слабые движения в другом суставе
3	экстенсивные движения в двух суставах
4	слабые движения во всех трех суставах задних конечностей
5	слабые движения в двух суставах и экстенсивные движения в третьем суставе
6	экстенсивные движения в двух суставах и слабые движения в третьем суставе
7	экстенсивные движения во всех трех суставах задних конечностей
8	размашистые движения задних конечностей без поддержания веса тела или плантарная постановка стопы без поддержания веса тела
9	плантарная постановка стопы с поддержанием веса тела только в покое или единичные, частые или постоянные дорсальные шаги с поддержанием веса тела; отсутствие плантарных шагов
10	единичные плантарные шаги с поддержанием веса тела, отсутствие координации передних и задних конечностей
11	частые или постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, отсутствие координации передних и задних конечностей
12	частые или постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, единичные шаги с координацией передних и задних конечностей
13	частые или постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, частые шаги с координацией передних и задних конечностей
14	постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, постоянная координация передних и задних конечностей; при движении стопа преимущественно находится в состоянии наружной и внутренней ротации, как момент начала контакта с поверхностью, так и в момент начала переноса конечности или частые плантарные

	шаги с поддержанием веса тела, постоянная координация передних и задних конечностей, единичные дорсальные шаги
15	постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, постоянная координация, отсутствие клиренса пальцев при выносе конечности вперед, преимущественное положение стопы в момент начала контакта параллельно телу
16	постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, при ходьбе постоянная координация передних и задних конечностей, клиренса пальцев при выносе конечности вперед наблюдается часто, преимущественное положение стопы в момент начала контакта параллельно телу, в момент начала переноса конечности – ротация
17	постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, при ходьбе постоянная координация передних и задних конечностей, клиренса пальцев при выносе конечности вперед наблюдается часто, преимущественное положение стопы в момент начала контакта параллельно телу, как в момент начала контакта, так и в момент начала переноса конечности
18	постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, при ходьбе постоянная координация передних и задних конечностей, клиренса пальцев при выносе конечности вперед наблюдается постоянно, преимущественное положение стопы в момент начала контакта параллельно телу, в момент начала переноса конечности – ротация
19	постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, при ходьбе постоянная координация передних и задних конечностей, клиренса пальцев при выносе конечности вперед наблюдается постоянно, преимущественное положение стопы в момент начала контакта параллельно телу, как в момент начала контакта, так и в момент начала переноса конечности, хвост опущен иногда или всегда
20	постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, при ходьбе постоянная координация передних и задних конечностей, клиренса пальцев при выносе конечности вперед наблюдается постоянно, преимущественное положение стопы в момент начала контакта параллельно телу, как в момент начала контакта, так и в момент начала переноса конечности, хвост всегда поднят, нестабильность туловища при ходьбе
21	постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, при ходьбе постоянная координация передних и задних конечностей, клиренса пальцев при выносе конечности вперед наблюдается постоянно, преимущественное положение стопы в момент начала контакта параллельно телу, как в момент начала контакта, так и в момент начала переноса конечности, хвост всегда поднят, при ходьбе туловище стабильно

К шкале имеются следующие пояснения:

- Слабые движения - частичные движения в суставе, менее, чем половина физиологически возможного движения
- Экстенсивные движения - частичные движения в суставе, более, чем половина физиологически возможного движения
- Размашистые движения - ритмичные движения, при которых все три сустава задних конечностей сгибаются и разгибаются, обычно при этом животное

лежит на боку, плантарная поверхность стопы может контактировать с грунтом, поддержания веса не наблюдается

- Отсутствие поддержания веса тела - отсутствие напряжения мышц-экстензоров задних конечностей при плантарном положении стопы, или отсутствие поднимания задней части туловища
- Поддержание веса тела - напряжение мышц-экстензоров задних конечностей при плантарном положении стопы, или поднимание задней части туловища
- Плантарные шаги - плантарное положение стопы при поддержании веса тела задними конечностями, при переносе конечности вперед и в момент отпоры на конечность
- Дорсальные шаги - опора на дорсальную часть в какой-либо точке шагательного цикла
- Координация передних и задних конечностей - перед каждой передней конечностью происходит шаг задней конечностью, задние конечности чередуются
- Единичные - менее или приблизительно в половине случаев, <50%
- Частые - более, чем в половине случаев, но не всегда, 51 - 94%
- Постоянные - почти всегда или всегда, 95 - 100%
- Нестабильность туловища - переваливание туловища с бока на бок при ходьбе.

Для оценки животное помещали на «открытое поле» и наблюдали в течение нескольких минут. Оценку проводили одновременно двумя или более исследователями (по итогу фиксировали средний бал) и слепым методом, когда проводящему оценку было неизвестно к какой экспериментальной группе относилось тестируемое животное.

Динамику восстановления двигательной активности задних конечностей крыс определяли непосредственно перед трансплантацией клеток и после трансплантации раз в неделю в течение 4 недель. Динамику восстановления после трансплантации выражали как дельта BBB - значения

равное баллу BBB после трансплантации минус значение BBB до трансплантации.

2.10. Трансплантация клеточного препарата в спинной мозг

Для экспериментов по трансплантации клеточных препаратов отбирали крыс, которые находились на ранней и промежуточной стадиях восстановления, то есть значение BBB у данных животных было не более 13 баллов. Животные, у которых показатели BBB составляли 14 и более баллов, были исключены из исследования. Далее все животные были разделены на две большие группы:

- 1) Животные, у которых через 4 недели наблюдали формирование посттравматических кист (были использованы для изучения эффективности клеток обонятельной выстилки в терапии посттравматических кист спинного мозга).
- 2) Животные, у которых через 4 недели не наблюдалось сформированных кист или наблюдали микрокисты (были использованы в качестве группы сравнения).

Далее животных распределяли по экспериментальным группам для изучения эффективности трансплантации обкладочных клеток крыс в количестве 750 тысяч и 1,5 миллиона; обкладочных клеток человека в количестве 750 тысяч и 1,5 миллиона; НСПК крыс в количестве 200 тысяч; НСПК человека в количестве 200 тысяч; комбинации обкладочных клеток и НСПК (750 тысяч и 200 тысяч соответственно) крыс и человека. Такие количества клеток соответствуют успешно используемым другими авторами при различных типах повреждения (Yasuda A. et al., 2011; Daniel J. et al, 2007; Li J. et al., 2013).

В работе было изучено 14 экспериментальных групп (табл. 3). Животных распределяли по группам с использованием метода рандомизации (Шагидулин М.Ю. и др., 2017).

Таблица 3

Трансплантация клеточных препаратов обонятельной слизистой оболочки носа крыс и человека

№ экспериментальной группы	Травма спинного мозга	Клетки	Количество клеток	Количество животных
Группа 1	киста	Обкладочные клетки крыс	750 тыс	8
Группа 2	киста	Обкладочные клетки крыс	1,5 млн	9
Группа 3	Хроническое повреждение без кисты	Обкладочные клетки крыс	750 тыс	6
Группа 4	Хроническое повреждение без кисты	Обкладочные клетки крыс	1,5 млн	6
Группа 5	киста	Обкладочные клетки человека	750 тыс	8
Группа 6	киста	Обкладочные клетки человека	1,5 млн	7
Группа 7	Хроническое повреждение без кисты	Обкладочные клетки человека	750 тыс	7
Группа 8	Хроническое повреждение без кисты	Обкладочные клетки человека	1,5 млн	7
Группа 9	киста	НСПК крыс	200 тыс	5
Группа 10	Хроническое повреждение без кисты	НСПК крыс	200 тыс	4
Группа 11	киста	НСПК человека	200 тыс	7
Группа 12	Хроническое повреждение без кисты	НСПК человека	200 тыс	5

Группа 13	киста	Обкладочные клетки + НСПК крыс	750 тыс + 200 тыс	3
Группа 14	киста	Обкладочные клетки + НСПК человека	750 тыс + 200 тыс	6

Клеточные препараты вводили в область посттравматических кист спинного мозга (в зону повреждения спинного мозга животным без сформированных кист) в среде ДМЕМ/F-12 (1:1), общий объем вводимого клеточного препарата составлял 10 мкл. Контрольным животным вводили в кисты 10 мкл среды без клеток ($N=9$). Также в исследовании была изучена группа животных, которым вводили в кисты астроциты крыс в количестве 750 тысяч клеток в качестве клеточного контроля ($N=4$). Количество животных в группе контрольной группе без сформированных кист спинного мозга было 11. Перед трансплантацией обкладочных клеток, НСПК и астроцитов подсчет клеток проводили в камере Горяева. Для этого адгезивные культуры обкладочных клеток и астроцитов снимали 0,05% раствором трипсина. Так как НСПК вводили в составе нейросфер, перед каждым экспериментом для подсчета клеток во вводимом препарате нейросфер клетки считали в одной из чашек Петри. Так как каждую чашку рассаживали на одинаковое количество клеток, можно было определить среднее количество клеток в каждой чашке.

Перед трансплантацией животных наркотизировали интраперитонеальным введением смеси реланиум/кетамин (1:1) (1 мкл/г). Локализацию зоны повреждения, в том числе, кисты, относительно удаленного остистого отростка позвонка и ее размеры предварительно определяли с помощью изображений МРТ. Координаты для введения клеток определяли стереотаксически. Кожу приподнимали над удаленным остистым отростком, далее делали прокол иглой инжектора, далее направляли иглу под углом 45° к зоне повреждения (кисте). При попадании иглы в полость кист

происходило изменение парциальных давлений, что ощущалось как «попадание в пустоту». Далее со скоростью 6 мкл/мин проводили трансплантацию клеток. Методика трансплантации была отработана в предварительных экспериментах по введению клеток, меченных прижизненным мембранным красителем RKN26. Было показано, что вероятность попадания клеток в полость кисты вышеописанным способом составляет не менее 75%. Для того, чтобы устранить осложнения, связанные с воспалительным процессом, возникающим после трансплантации, сразу же после трансплантации и через неделю после внутримышечно делали инъекции антибиотика широкого спектра действия – цефазолина, доза 300 мкл на крысу (раствор 1г на 4 мл воды для инъекций).

После отсева животных с показателями BBB более 13 баллов, выбросов в результате последующей статистической обработки, а также исключения некоторых животных в результате гибели будут представлены данные по 101 животному.

2.11. Выявление трансплантированных клеток в спинном мозге

Для выявления клеток в спинном мозге после трансплантации в кисты нами использовали прижизненный мембранный краситель RKN26 (Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labeling) — красный флюорохром с максимумом поглощения 551 нм и максимумом излучения 567 нм. Клетки были мечены в соответствии с инструкцией фирмы Sigma. Клетки отмывали в ФСБ, центрифугировали в эппендорфе 5 минут при 900 об/мин, ресуспендировали в 500 мкл дилуента С, добавляли к полученной суспензии 500 мкл раствора RKN26 в дилуенте С. После чего ресуспендировали и инкубировали 1 минуту при комнатной температуре. Реакцию окрашивания останавливали добавлением 1 мл ФСБ. Затем два раза отмывали клетки в среде с 10%-ным содержанием сыворотки. Меченые клетки вводили в среде ДМЕМ/F-12 (1:1), общий объем трансплантата составлял 10 мкл.

Контрольным животным вводили то же количество среды без клеток. Выживаемость трансплантированных клеток изучали в течение 4 недель.

Для этого получали фрагмент поврежденного спинного мозга через 2 и 4 недели после трансплантации. Животных интраперитонеально наркотизировали раствором реланиума (25 мг/кг) и кетамина (50 мг/кг). После чего производили декапитацию крыс. Для получения доступа к месту травмы производили разрезы кожных покровов, удаляли жировую и соединительную ткань и с помощью микроножниц и пинцета, удаляли ножки дуг позвонков выше и ниже места травмы для обеспечения доступа к спинному мозгу. Далее извлекали нужный участок спинного мозга и помещали в 10% параформальдегида для фиксации на сутки. После чего отмывали раствором ФСБ. Образец фиксировали с помощью клея на специальную подставку вибрационного микротомы ThermoFisher Scientific (США). Получали срезы толщиной 40 мкм. Полученные срезы отмывали в ФСБТ (ФСБ + Полисорбат (Tween)-20 (50 мкл на 50 мл)). Далее на срезы наносили раствор тритона X-100 на 5 минут для перфорации мембран. Затем отмывали раствором ФСБТ 3 раза по 5 минут. Далее для уменьшения неспецифического связывания антител клетки обрабатывали раствором БСА при комнатной температуре в течение 45 минут. Отмывали раствором ФСБТ 3 раза по 5 минут. Затем проводили инкубацию с первичными моноклональными мышинными антителами к маркеру нейральных клеток (β -III-тубулину) (1:400) в течение 1 часа. Далее отмывали раствором ФСБТ 3 раза по 5 минут, после чего инкубировали с вторичными флуоресцентными антителами Alexa Fluor 488 в темноте при комнатной температуре в течение 60 минут. Затем отмывали раствором ФСБТ 3 раза по 5 минут. Для окрашивания клеточных ядер использовали DAPI (1:3000), инкубацию проводили в течение 10 минут в темноте. Затем отмывали ФСБТ 3 раза по 5 минут и заключали препараты под покровные стекла с помощью Aqua Poly/Mount media.

Анализ препаратов проводили с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа с мультифотонным модулем Nikon

A1R MP+ (Япония) и с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Observer Z.1 («Zeiss»). Полученные изображения были обработаны в программе Axiovision 3.1 («Zeiss») и Adobe Photoshop («Adobe Systems»).

2.12. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных данных проводили в программах GraphPad prism 8 (GrapPad Software Inc., США) и «Excel» из пакета приложений Microsoft Office. Полученные данные о процентном содержании обкладочных клеток на разных пассажах, результатах ВВВ-теста и изменении размеров кист после трансплантации представлены в виде средних значений и стандартных отклонений. Для парных сравнений использовали непараметрический критерий Манна-Уитни и тест Данна для множественных сравнений. При этом минимально допустимым количеством данных для включения в сравнение было $N = 3$, а используемый статистический уровень значимости $p \leq 0.05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Разработка оптимальных протоколов получения и культивирования обкладочных клеток обонятельной слизистой оболочки носа крыс и человека

На первом этапе данного исследования нами были разработаны оптимальные протоколы получения обкладочных клеток человека и крыс (Voronova A.D. et al., 2018; Stepanova O.V. et al., 2018; Пат. 2676142 РФ. Степанова О.В.). Обкладочные клетки были получены из собственной пластинки обонятельной области слизистой оболочки носа. Для этого образцы ткани обонятельной слизистой оболочки промывали три раза в среде ДМЕМ/F-12 (1:1) с добавлением 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ед/мл пенициллина. Далее ткань инкубировали в растворе диспазы II с концентрацией 2мг/мл. Обонятельную слизистую оболочку человека инкубировали в течение 1 часа при 37°C, обонятельную слизистую оболочку крыс - в течение 15 минут. Затем ткань переносили в среду культивирования ДМЕМ/F-12 (1:1) с антибиотиками и механически отделяли обонятельный эпителий от собственной пластинки. Затем собственную пластинку измельчали и культивировали в виде эксплантной культуры в среде ДМЕМ/F-12(1:1), содержащей 10% FBS, 2 mM L-глутамина, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ед/мл пенициллина и 60 мкг/мл гентамицина. Каждые три дня производили смену среды. Анализ первичной культуры собственной пластинки методом фазово-контрастной микроскопии показал, что на 3-5 день фрагменты ткани адгезируют к пластику, после чего на 7-9 день из них начинают мигрировать клетки и пролиферировать (рис. 5).

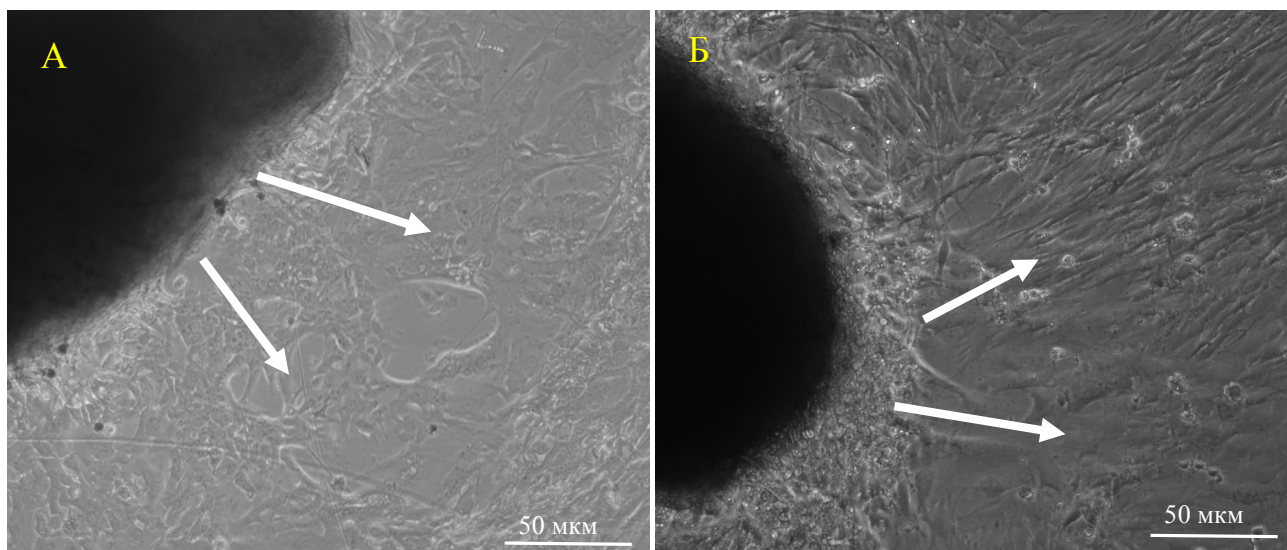


Рисунок 5. Культуры клеток собственной пластинки, полученные эксплантным методом. А – эксплантная культура человека; Б – эксплантная культура крыс (Б). Стрелками отмечено направление миграции клеток из экспланта. Фазово-контрастная микроскопия.

Культивирование проводили в среднем в течение 14 суток до образования монослоя, после чего клетки снимали с помощью 0,05% раствора трипсина. Далее клетки первичной культуры помещали на пластик, покрытый 0,01% поли-L-лизином и культивировали в селективной ростовой среде на основе ДМЕМ/F-12(1:1), содержащей 10% FBS, 2 мМ L-глутамин, 1% добавки инсулина, трансферрина, селенита натрия (ITS), 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ед/мл пенициллина и 500 нг/мл гидрокортизона, в течение 3 дней (рис. 6). Оценку морфологии полученных клеток проводили с помощью фазово-контрастного инвертированного микроскопа «Leica DM 2500». Было показано, что полученные нами культуры человека и крыс преимущественно состояли из глиальных веретеновидных астроцитоподобных клеток и более крупных, напоминающие шванновские клетки. Полученные данные согласуются с литературными данными о морфологии обкладочных клеток (Neetu S. et al., 2013).

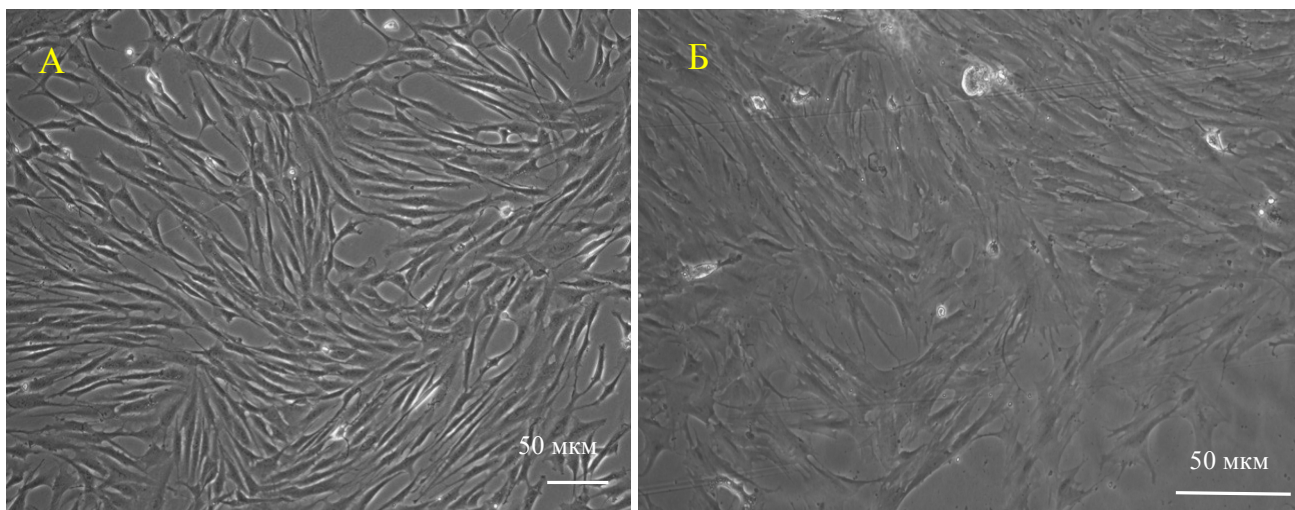


Рисунок 6. Обкладочные клетки человека и крыс, полученные при культивировании в селективной среде на поли-L-лизине. А – обкладочные клетки человека; Б – обкладочные клетки крыс. Фазово-контрастная микроскопия.

Полученные культуры обкладочных клеток человека и крыс были выявлены по одновременной экспрессии общепринятых маркеров p75NTR и GFAP (рис. 7, рис. 8). Анализ препаратов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Observer Z.1 («Zeiss»).

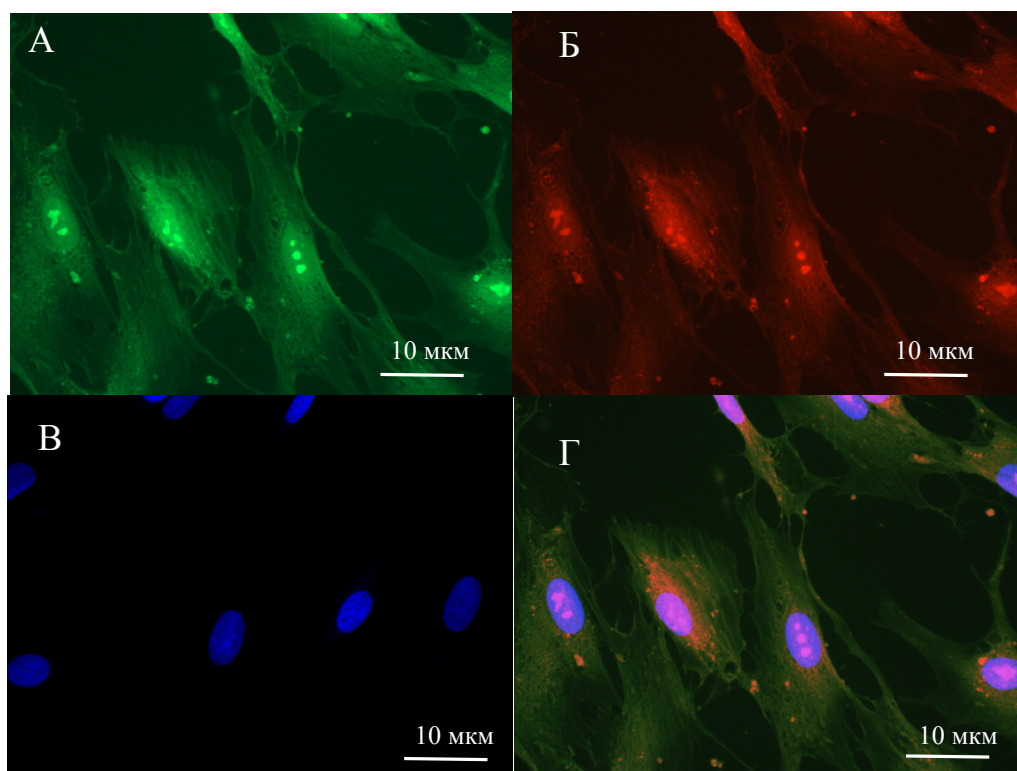


Рисунок 7. Результаты иммунофлуоресцентного анализа культуры обкладочных клеток человека. А - окрашивание на GFAP, Б – окрашивание на p75NTR, В - окрашивание на DAPI, Г – совмещение изображений А, Б и В.

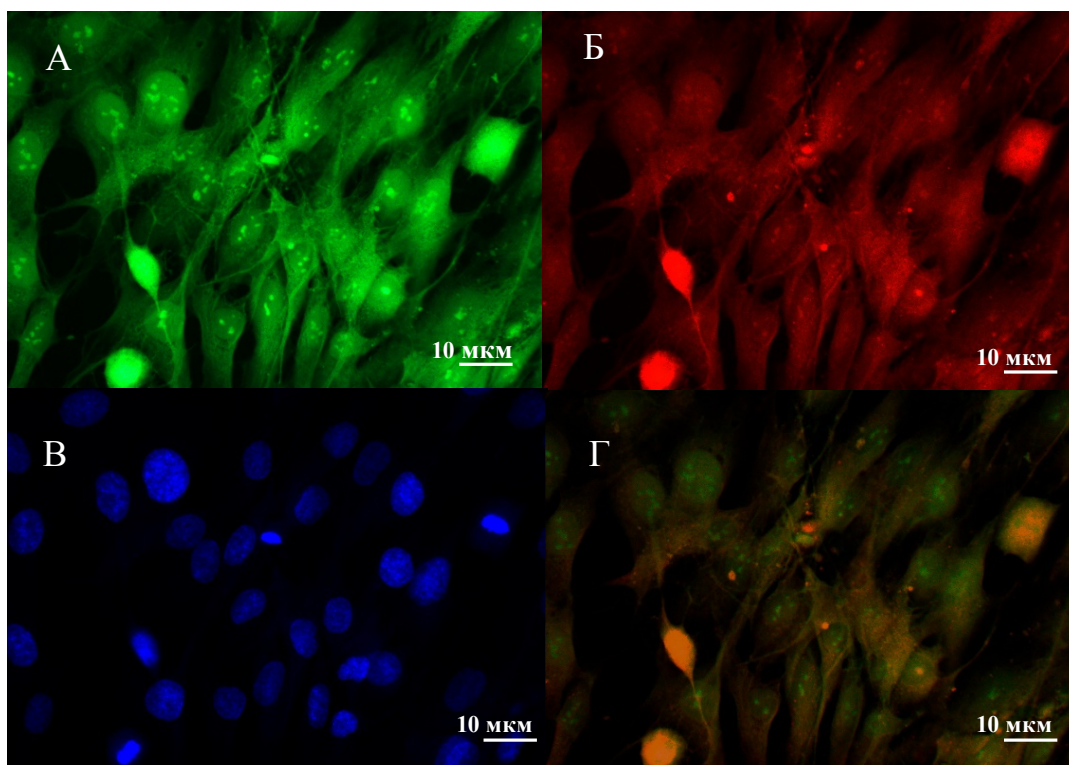


Рисунок 8. Результаты иммунофлуоресцентного анализа культуры обкладочных клеток крыс. А - окрашивание на GFAP, Б – окрашивание на p75NTR, В – окрашивание на DAPI, Г – совмещение изображений А, Б и В.

Для того, чтобы повысить эффективность клеточной терапии, необходимо использование культуры, обогащенной обкладочными клетками. С этой целью нами было изучено процентное содержание обкладочных клеток в различных пассажах при культивировании в селективной среде. В данной работе были получены культуры обкладочных клеток человека и крыс 1-го, 2-го, 3-его, 4-го и 5-го пассажей. В каждом пассаже с помощью иммунофлуоресцентного метода был проведен подсчет p75NTR/GFAP-позитивно окрашенных клеток (рис. 9) (Voronova A.D. et al., 2018).

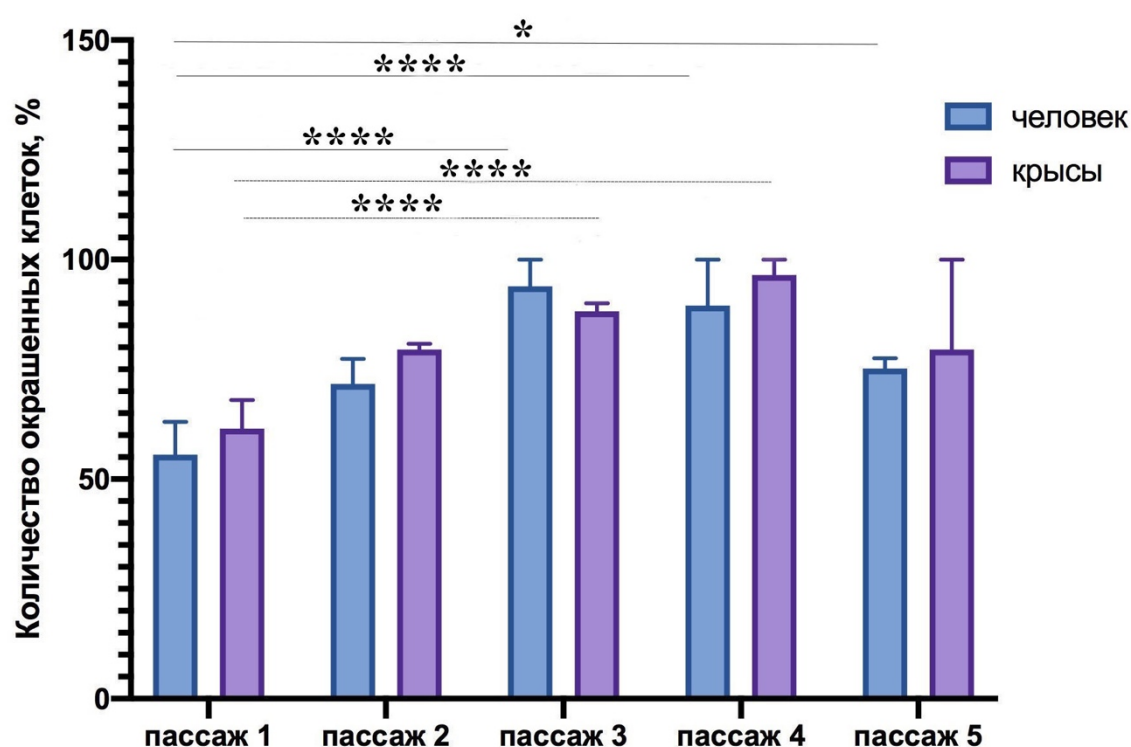


Рисунок 9. Содержание GFAP/p75NTR⁺ обкладочных клеток человека и крыс в культуре на 1,2,3,4 и 5-м пассажах при культивировании в селективной среде. На графике указаны средние значения со стандартными отклонениями. Сравнительный анализ проведен с помощью теста Данна, статистически значимые различия отмечены *($p < 0,05$); ****($p < 0,0001$).

При оценке содержания в культурах обкладочных клеток человека наибольшее содержание обкладочных клеток было обнаружено в 3-ем - 93,9% и 4-ом пассаже - 89,5%. При оценке содержания в культурах обкладочных клеток крыс наибольшее их содержание было обнаружено в 3-ем - 88,2% и в

4-ом пассаже - 96,6%. Содержание обкладочных клеток немного снижается в 5 пассаже (75,3% в культуре обкладочных клеток человека и 79,5% в культуре обкладочных клеток крыс). Это связано с тем, что клетки других типов активно делятся, несмотря на селективные для обкладочных клеток условия культивирования. Интересно отметить, что динамика обогащения обкладочными клетками схожа как в культуре клеток человека, так и в культуре клеток крыс.

В данной работе впервые было показано, что длительное культивирование на поли-L-лизине в селективной среде к 3-4 пассажу значительно повышает содержание обкладочных клеток, что позволяет сделать вывод, что 3 и 4 пассажи культур обкладочных клеток наиболее обогащены обкладочными клетками. Для дальнейшей клеточной терапии использовали наиболее обогащенные культуры обкладочных клеток человека и крыс 3-4 пассажей. Кроме того, важно отметить, что к 3-4 пассажу получали достаточное количество клеток для последующей клеточной трансплантации.

3.2. Разработка оптимальных протоколов получения и культивирования нейральных стволовых/прогениторных клеток обонятельной слизистой оболочки носа крыс и человека

В работе были разработаны протоколы для получения НСПК из обонятельной области слизистой оболочки носа человека и крыс. В результате ферментативной обработки обонятельной выстилки диспазой и механического разделения ткани обонятельной выстилки, проводимых на подготовительном этапе, была получена суспензия с фрагментами ткани обонятельного эпителия, которую центрифугировали 2 минуты при 900g. Далее проводили инкубацию обонятельного эпителия с раствором коллагеназы в концентрации 2мг/мл в течение 10 минут при 37°C для полной диссоциации эпителия на отдельные клетки. Инактивацию фермента проводили средой, содержащей сыворотку, и центрифугировали 5 минут при 900g.

Полученную первичную культуру обонятельного эпителия человека культивировали в течение 5-7 суток в среде ДМЕМ/F-12(1:1), содержащей 10% FBS, 2 mM L-глутамина, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ед/мл пенициллина и 60 мкг/мл гентамицина до образования монослоя. Смену среды производили каждые два дня. Анализ первичной культуры показал, что на 5-7 день первичная культура клеток обонятельного эпителия человека образует монослой и является гетерогенной по своему составу (рис. 10А), преимущественно состоит из полигональных эпителиальных клеток. Аналогично получали первичную культуру обонятельного эпителия крыс (рис. 10Б) (Voropova et al., 2020). Однако было показано, что культура клеток крыс раньше достигает конфлюэнтного монослоя, на 3-5 день культивирования.

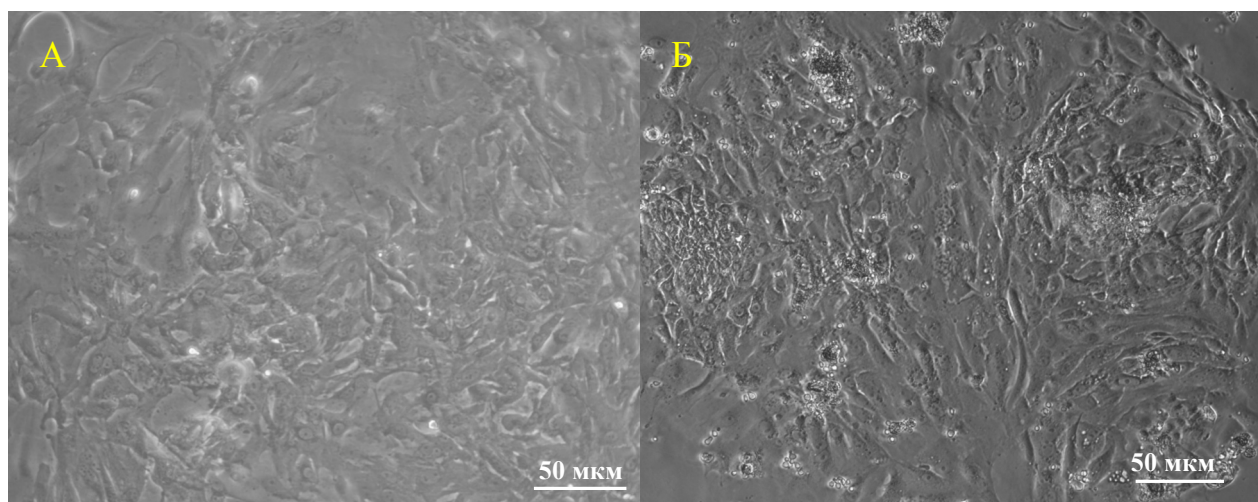


Рисунок 10. Первичная культура клеток обонятельного эпителия обонятельной области слизистой оболочки носа. А – обонятельный эпителий человека; Б – обонятельный эпителий крыс (Б). Фазово-контрастная микроскопия.

В первичных культурах обонятельного эпителия человека и крыс с помощью иммунофлуоресцентного метода были выявлены НСПК по одновременной экспрессии маркеров SOX2 и Нестин (рис. 11, рис. 12). Было определено их процентное содержание в культуре, которое составляло 5-7%.

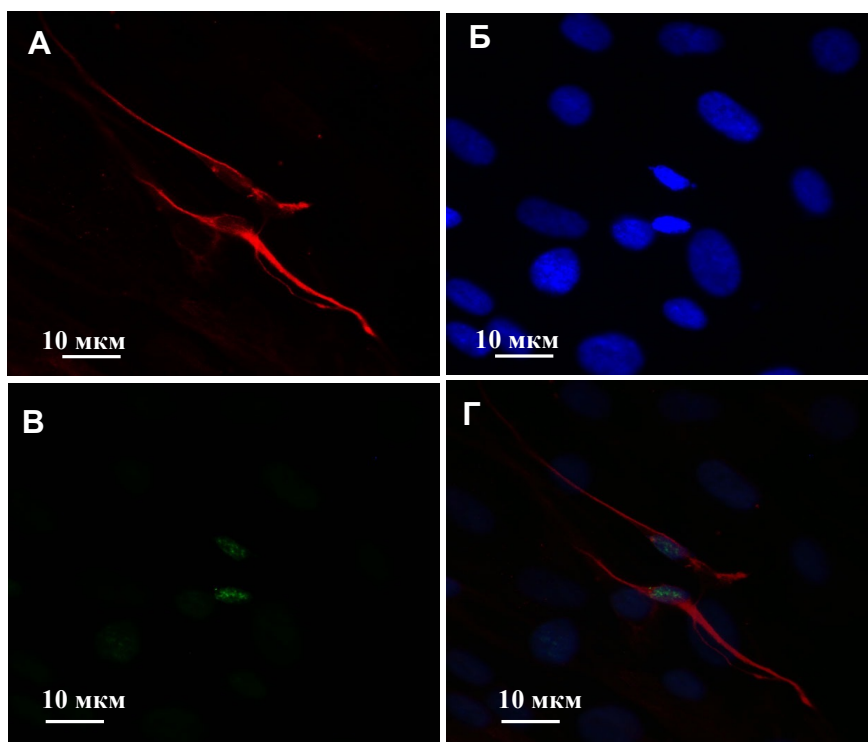


Рисунок 11. НСПК, выявленные в обонятельном эпителии человека с помощью иммунофлуоресцентного метода. А - окрашивание на Нестин, Б – окрашивание на DAPI, В – окрашивание на SOX2, Г – совмещение изображений А, Б и В (х 600).

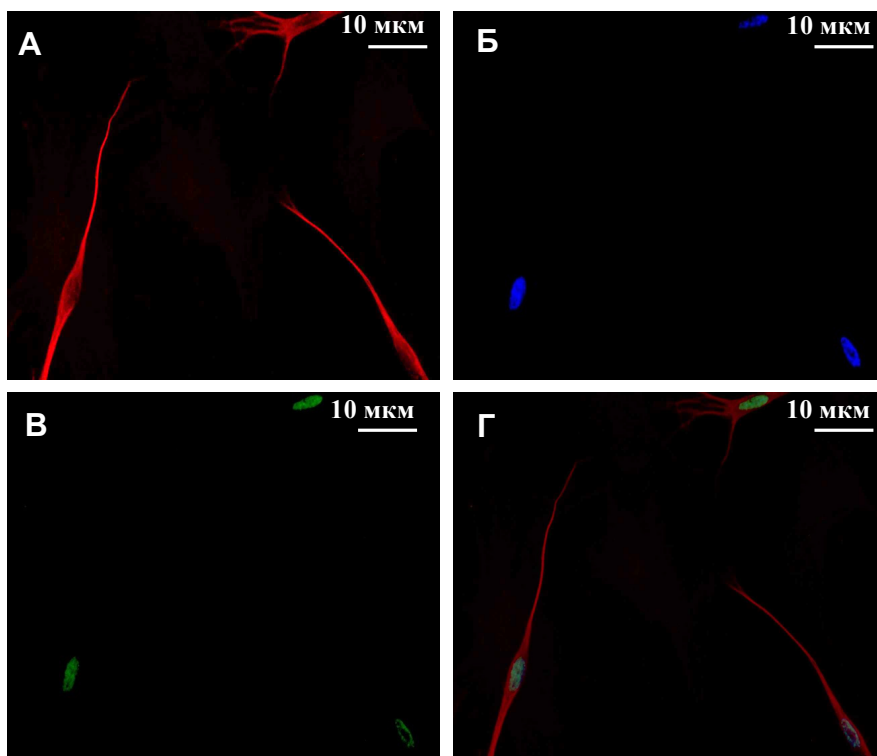


Рисунок 12. НСПК, выявленные в обонятельном эпителии крыс с помощью иммунофлуоресцентного метода. А - окрашивание на Нестин, Б – окрашивание на DAPI, В – окрашивание на SOX2, Г – совмещение изображений А, Б и В. (х 600).

Для получения культуры, обогащенной НСПК, клетки обонятельного эпителия пассировали в селективные условия, которые способствуют образованию нейросфер. Клетки первичной культуры обонятельного эпителия снимали 0,1% раствором трипсина и помещали на пластик, покрытый 0,01% поли-L-лизинном, и культивировали в среде ДМЕМ/F-12(1:1), содержащей 2 mM L-глутамин, 1% добавки инсулина, трансферрина, селенита натрия (ITS), 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ед/мл пенициллина, эпидермального фактора роста (EGF) и основного фактора роста фибробластов (bFGF). Оценку морфологии полученных нейросфер человека и крыс проводили методом фазово-контрастной микроскопии. Полученные нами нейросферы из обонятельной слизистой оболочки носа были гетерогенны по размеру (рис. 13). Культура преимущественно состояла из свободноплавающих нейросфер, также наблюдали и прикрепленные нейросферы. Методом фазово-контрастной микроскопии каждый день в течение первых 5 суток культивирования нейросфер был проведен сравнительный анализ количества нейросфер в культуре, подсчет проводили в 10 полях зрения в трех независимых экспериментах. Наибольшее количество нейросфер наблюдали на 2-е сутки культивирования.

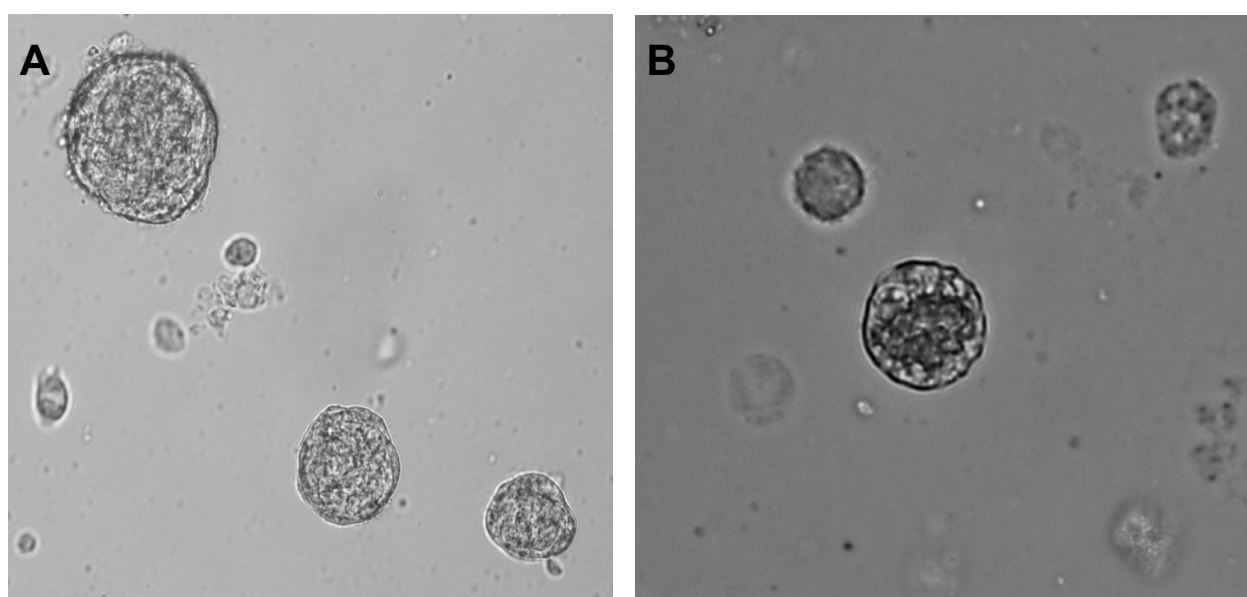


Рисунок 13. Нейросферы, полученные из обонятельного эпителия обонятельной слизистой оболочки при культивировании на поли-L-лизине. А - нейросферы человека; Б – нейросферы крысы,. Фазово-контрастная микроскопия (x200).

3.3. Моделирование экспериментальных посттравматических кист спинного мозга

По разработанной в нашей лаборатории методике были смоделированы посттравматические кисты спинного мозга крыс. В результате контузионной травмы у 96 из 300 животных (32%) животных через 4 недели образуются сформированные кисты. Формирование посттравматических кист в верхнегрудном отделе подтверждали с помощью метода МРТ через 4 недели после травмы (рис. 14). Кисты, заполненные жидкостью, на снимках МРТ выглядят как светлые округлые области. У остальных животных через 4 недели не наблюдалось образование сформированных кист или наблюдали микрокисты. Такие животные с хроническими повреждениями спинного мозга без образования кист были использованы в дальнейших экспериментах по клеточной терапии в качестве группы сравнения.

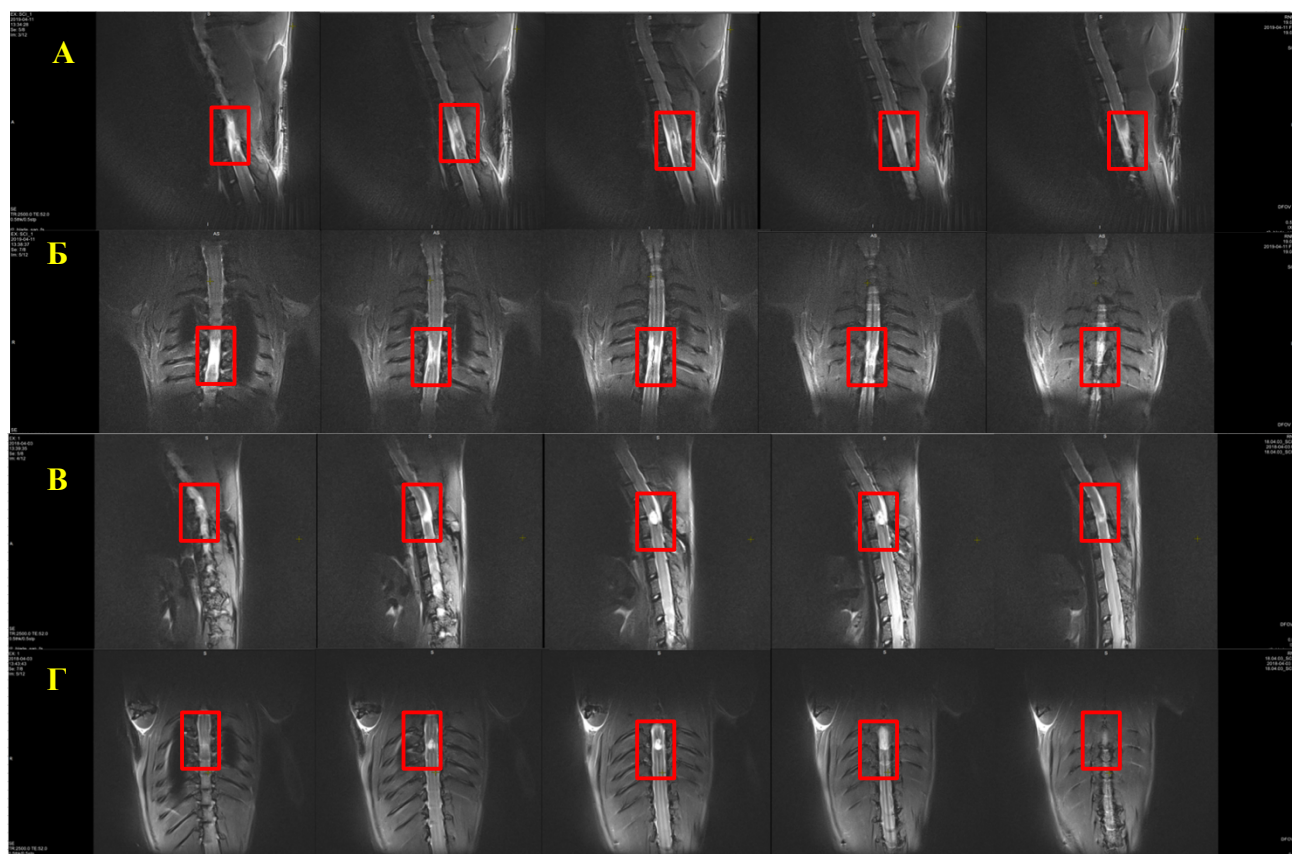


Рисунок 14. Визуализация спинного мозга через 4 недели после травмы с помощью метода МРТ. А - хроническое повреждение спинного мозга без образования сформированных кист в сагиттальной плоскости, представлены срезы 3-7 из 12; Б - хроническое повреждение спинного мозга того же животного без образования сформированных кист в аксиальной плоскости, срезы 5-9 из 12; В - посттравматическая киста спинного мозга в сагиттальной плоскости, срезы 4-8 из 12; Г - посттравматическая киста спинного мозга того же животного в аксиальной плоскости, срезы 5-9 из 12. Область травмы выделена рамкой.

Все данные об исследуемом животном, как номер животного в конкретном эксперименте (например, SCI_8), место проведения (RNRMU), дата проведения МРТ (например, 2018-04-10 и 11:41:14) и номер среза (например, 6/12), указаны на снимке в верхнем правом и левом углу. Шаг сканирования (0,5 мм) указан в правом нижнем углу (рис. 14). В дальнейших экспериментах по изучению эффективности клеточных препаратов будут представлены данные МРТ по срезам во фронтальной и сагиттальной проекциях с наибольшей площадью посттравматических кист. Репрезентативные данные до и после трансплантации будут представлены по одному и тому же животному в одинаковых срезах.

3.4. Изучение терапевтического эффекта обкладочных клеток крыс и человека при посттравматических кистах спинного мозга

В данной работе впервые были изучены терапевтические эффекты после трансплантации обкладочных клеток обонятельной слизистой оболочки носа крыс и человека в посттравматические кисты (Stepanova O.V. et al., 2018; Stepanova O.V. et al., 2019; Voronova A.D. et al., 2019). Была оценена эффективность трансплантации обкладочных клеток в количестве 750 тысяч и 1,5 миллиона.

3.4.1. Оценка восстановления двигательной активности задних конечностей при трансплантации обкладочных клеток крыс и человека

а) *Восстановление двигательной активности задних конечностей при трансплантации обкладочных клеток крыс в посттравматические кисты.*

В данной работе было впервые показано, что при трансплантации обкладочных клеток крыс как в количестве 750 тысяч, так 1,5 миллиона наблюдается положительная динамика восстановления двигательной активности задних конечностей (дельта BBB) (Stepanova O.V. et al., 2018; Voronova A.D. et al., 2019), тогда как в контрольных группах (введение среды без клеток и введение астроцитов в качестве клеточного контроля) какого-либо восстановления моторных функций выявлено не было (рис. 15., табл. 4).

Таблица 4

Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс в течение 4 недель после трансплантации обкладочных клеток (ОК) крыс в кисты спинного мозга, представлена по изменениям баллов (дельта BBB). Сравнение с контролем проводили с использованием теста Данна.

группа неделя	Контрольная группа, ΔBBB	Контрольная группа II (астроциты), ΔBBB	р	Трансплантация 750 тысяч ОК, ΔBBB	р	Трансплантация 750 тысяч ОК, ΔBBB	р
1	-0,33	-0,25	0,99	0,69	0,14	1,67	0,27
2	-0,06	-0,75	0,9	1,63	0,027	0,56	0,6
3	-0,33	-0,75	0,99	1,5	0,013	1,28	0,013
4	-0,06	-0,25	0,99	1,38	0,067	1,33	0,024

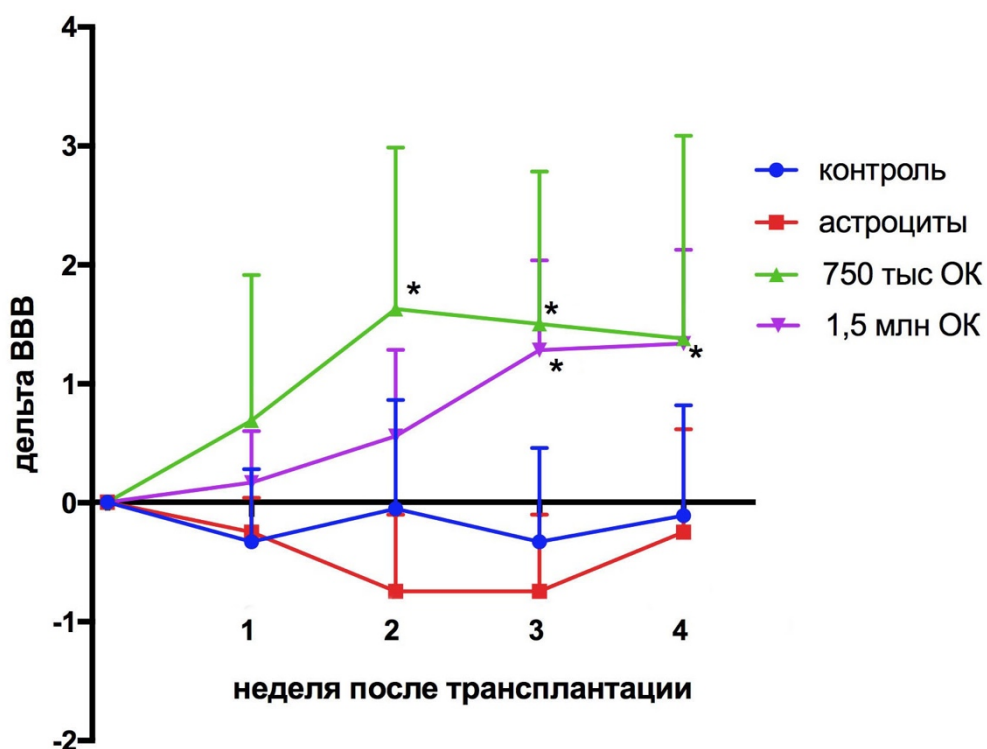


Рисунок 15. Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс после трансплантации обкладочных клеток (ОК) крыс в кисты спинного мозга, представлена по изменениям баллов (дельта BBV). На графике указаны средние значения со стандартными отклонениями. Статистически значимые различия по сравнению с контролем были получены с использованием теста Данна и отмечены $*(p < 0,05)$.

Было показано, что при трансплантации 750 тысяч обкладочных клеток положительная динамика восстановления двигательной активности задних конечностей наблюдалась уже на 1-й неделе после трансплантации и была положительной в течение всех 4 недель, при этом выраженные и статистически значимые ($p < 0,05$) эффекты были выявлены на 2-й неделе и 3-й неделе. При трансплантации 1,5 миллионов клеток динамика восстановления двигательной активности была положительной в течение всех 4 недель, при этом статистически значимые различия ($p < 0,05$) наблюдали на 3-й и 4-й неделе после трансплантации.

Интересно отметить, что у животных контрольной группы (введение среды) и животных группы клеточного контроля (введение астроцитов) после трансплантации наблюдали незначительное снижение двигательной

активности, что могло быть вызвано различными факторами, такими как наркотизирование крыс перед трансплантацией и непосредственно само хирургическое вмешательство во время трансплантации. В то же время у крыс, которым трансплантировали 750 тысяч и 1,5 миллионов обкладочных клеток, снижение двигательной активности не наблюдалось, что может быть связано с тем, что эти клетки оказывают нейропротективный эффект.

В данном эксперименте не было выявлено статистически значимых различий показателей двигательной активности между двумя контрольными группами. Таким образом, в дальнейших экспериментах в качестве группы контроля использовали животных, которым вводили среду без клеток.

б) Восстановление двигательной активности задних конечностей животных при трансплантации обкладочных клеток крыс в спинной мозг без посттравматических кист.

Показано, что динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс была положительна во всех трех группах в течение всех 4 недель наблюдений. Однако как при трансплантации 750 тысяч, так и 1,5 млн. обкладочных клеток крыс не наблюдалось каких-либо статистически значимых улучшений динамики восстановления двигательной активности задних конечностей по сравнению с контрольной группой (рис. 16, табл. 5).

Таблица 5

Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс в течение 4 недель после трансплантации обкладочных клеток (ОК) крыс в спинной мозг без сформированных кист, представлена по изменениям баллов (дельта ВВВ). Сравнение с контролем проводили с использованием теста Данна

неделя после трансплантации	группа	Контрольная группа, Δ BVV	Трансплантация 750 тысяч ОК, Δ BVV	p	Трансплантация 1,5 млн ОК, Δ BVV	p
1		0,78	0,33	0,36	0,75	0,99
2		0,97	0,58	0,74	1,08	0,96
3		1,13	0,75	0,7	1,25	0,97
4		1,14	0,75	0,69	1,25	0,97

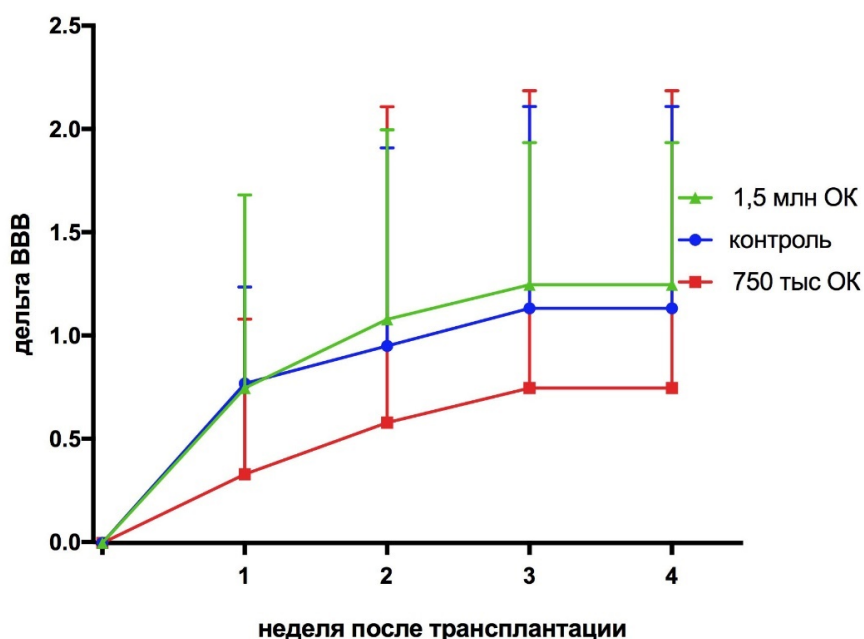


Рисунок 16. Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс (дельта BVV) после трансплантации обкладочных клеток крыс в спинной мозг при хроническом повреждении без образования посттравматических кист. На графике указаны средние значения со стандартными отклонениями. Сравнение с контролем проводили с использованием теста Данна.

Таким образом, в данной работе не было выявлено каких-либо терапевтических эффектов от трансплантации обкладочных клеток крыс в спинной мозг при хроническом повреждении без образования кист.

в) *Восстановление двигательной активности задних конечностей при трансплантации обкладочных клеток человека в посттравматические кисты.*

В данной работе впервые были показаны положительные эффекты при трансплантации обкладочных клеток человека в посттравматические кисты спинного мозга (Voronova A.D. et al., 2019; Stepanova O.V. et al., 2019). Было показано, что при трансплантации как 750 тысяч, так и 1,5 млн обкладочных клеток человека наблюдается положительная динамика восстановления двигательной активности задних конечностей в течение всех 4 недель, тогда как в контрольной группе не наблюдалось значимых изменений. При этом в случае трансплантации 750 тысяч клеток достоверные различия ($p < 0,5$) между опытной и контрольной группами наблюдали на 1-й, 3-й и 4-й неделе, а в случае трансплантации 1,5 миллионов клеток – на 3-й и 4-й (рис. 17, табл. 6). Кроме того, в контрольной группе наблюдалось ухудшение двигательной активности задних конечностей на 1-ой неделе после трансплантации, тогда как при трансплантации обкладочных клеток человека ухудшений выявлено не было.

Таблица 6

Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс течение 4 недель после трансплантации обкладочных клеток (ОК) человека в кисты спинного мозга, представлена по изменениям баллов (дельта ВВВ). Сравнение с контролем проводили с использованием теста Данна

неделя после трансплантации	группа	Контрольная группа, $\Delta ВВВ$	Трансплантация 750 тысяч ОК, $\Delta ВВВ$	р	Трансплантация 1,5 млн ОК, $\Delta ВВВ$	р
1		-0,33	0,5	0,047	0,5	0,095
2		-0,06	1,125	0,12	1,07	0,13
3		-0,33	1,44	0,03	1,29	0,02
4		-0,06	1,5	0,027	1,36	0,039

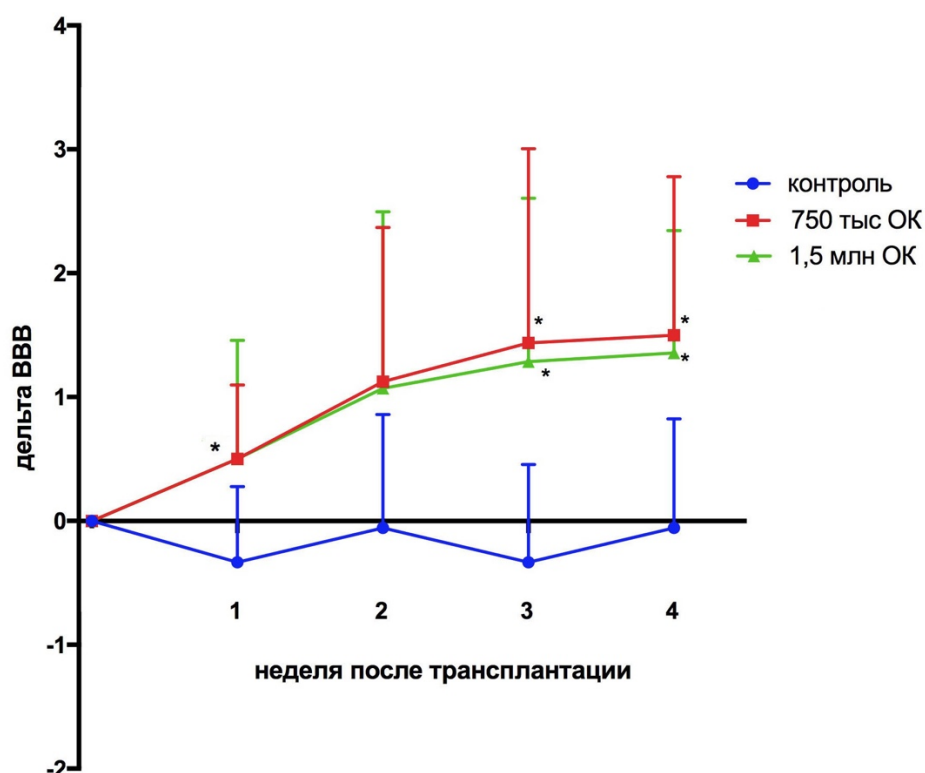


Рисунок 17. Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей человека после трансплантации обкладочных клеток (ОК) человека в кисты спинного мозга, представлена по изменениям баллов (дельта BBV). На графике указаны средние значения со стандартными отклонениями. Статистически значимые различия по сравнению с контролем были получены с использованием теста Данна и отмечены $*(p < 0,05)$.

При трансплантации 750 тысяч клеток человека наблюдали более выраженные эффекты, чем при трансплантации 1,5 млн клеток. Таким образом, можно говорить о том, что для трансплантации 750 тысяч обкладочных клеток человека является достаточным количеством.

г) Восстановление двигательной активности задних конечностей при трансплантации обкладочных клеток человека в спинной мозг без посттравматических кист.

В данной работе при трансплантации обкладочных клеток человека в спинной мозг при хроническом повреждении без формирования посттравматических кист не было выявлено каких-либо терапевтических эффектов. Динамика восстановления была положительной в течение всех 4 недель во всех трех группах. Однако, статистически значимых улучшений по

сравнению с контролем при трансплантации 750 тысяч и 1,5 млн. обкладочных клеток не наблюдалось (рис. 18, табл. 7). Данные результаты соответствуют полученным нами результатам эксперимента по трансплантации указанных количеств обкладочных клеток крыс при хроническом повреждении без образования кист.

Таблица 7

Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс в течение 4 недель после трансплантации обкладочных клеток (ОК) человека в спинной мозг без сформированных кист, представлена по изменениям баллов (дельта ВВВ). Сравнение с контролем проводили с использованием теста Данна

неделя после трансплантации \ группа	Контрольная группа, Δ ВВВ	Трансплантация 750 тысяч ОК, Δ ВВВ	р	Трансплантация 1,5 млн ОК, Δ ВВВ	р
1	0,78	0,43	0,43	0,93	0,83
2	0,97	0,79	0,95	0,93	0,999
3	1,13	0,86	0,84	1,2	0,99
4	1,14	0,79	0,999	1	0,96

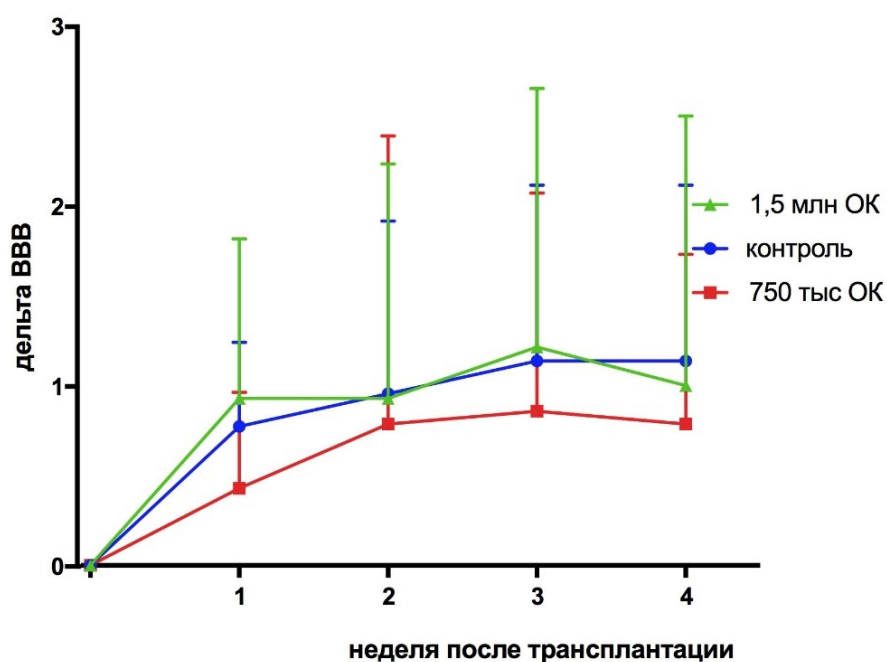


Рисунок 18. Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс (дельта ВВВ) после трансплантации обкладочных клеток

(ОК) человека в спинной мозг при хроническом повреждении без образования посттравматических кист. На графике указаны средние значения со стандартными отклонениями. Сравнение с контролем проводили с использованием теста Данна.

3.4.2. Оценка изменения размеров посттравматических кист при трансплантации обкладочных клеток обонятельной слизистой оболочки носа крыс и человека

В данной работе было показано изменение размеров посттравматических кист спинного мозга крыс при трансплантации обкладочных клеток крыс и человека.

а) Изменение размеров кист при трансплантации обкладочных клеток крыс.

При анализе МРТ-изображений спинного мозга крыс в области посттравматических кист до и после трансплантации было показано, что через 4 недели после трансплантации 750 тысяч клеток происходило уменьшение размеров кист в среднем на 17%, а после трансплантации 1,5 миллионов клеток – на 23%, тогда как в контрольной группе наблюдали увеличение кист на 26% (рис. 19, табл. 8). При сравнительном анализе данных, полученных при трансплантации обкладочных клеток крыс по сравнению с контролем, было показано, что достоверное уменьшение объемов кист наблюдается в случае трансплантации 750 тысяч.

Таблица 8

Изменение размеров кист через 4 недели после трансплантации обкладочных клеток (ОК) крыс в количестве 750 тысяч клеток и 1,5 миллиона. Изменение выражено как отношение размеров кист после трансплантации к объему до трансплантации (в процентах). Сравнение с контролем проводили с использованием теста Данна

контроль	750 тыс ОК		1,5 млн ОК	
Изменение размеров кисты, %	Изменение размеров кисты, %	p	Изменение размеров кисты, %	p
25,6	-17,3	0,046	-23,7	0,089

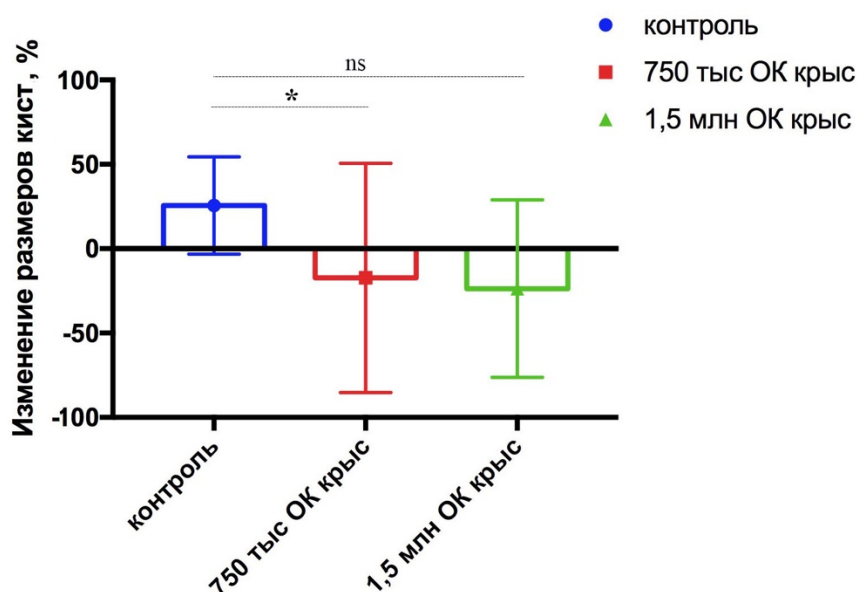


Рисунок 19. Изменение размеров кист через 4 недели после трансплантации обкладочных клеток (ОК) крыс в количестве 750 тысяч клеток и 1,5 миллиона. Изменение выражено как отношение размеров кист после трансплантации к объему до трансплантации (в процентах). На диаграмме представлены средние значения со стандартными отклонениями. Сравнение с контролем проводили с использованием теста Данна. $** (p < 0,05)$, ns (not significant) – нет статистически значимых различий.

В работе впервые было показано, что при трансплантации 1,5 миллионов обкладочных клеток крыс у одного животного наблюдали полное исчезновение посттравматических кист, тогда как в контрольной группе или при трансплантации 750 тысяч клеток крыс не наблюдалось полного исчезновения кист (рис. 20).

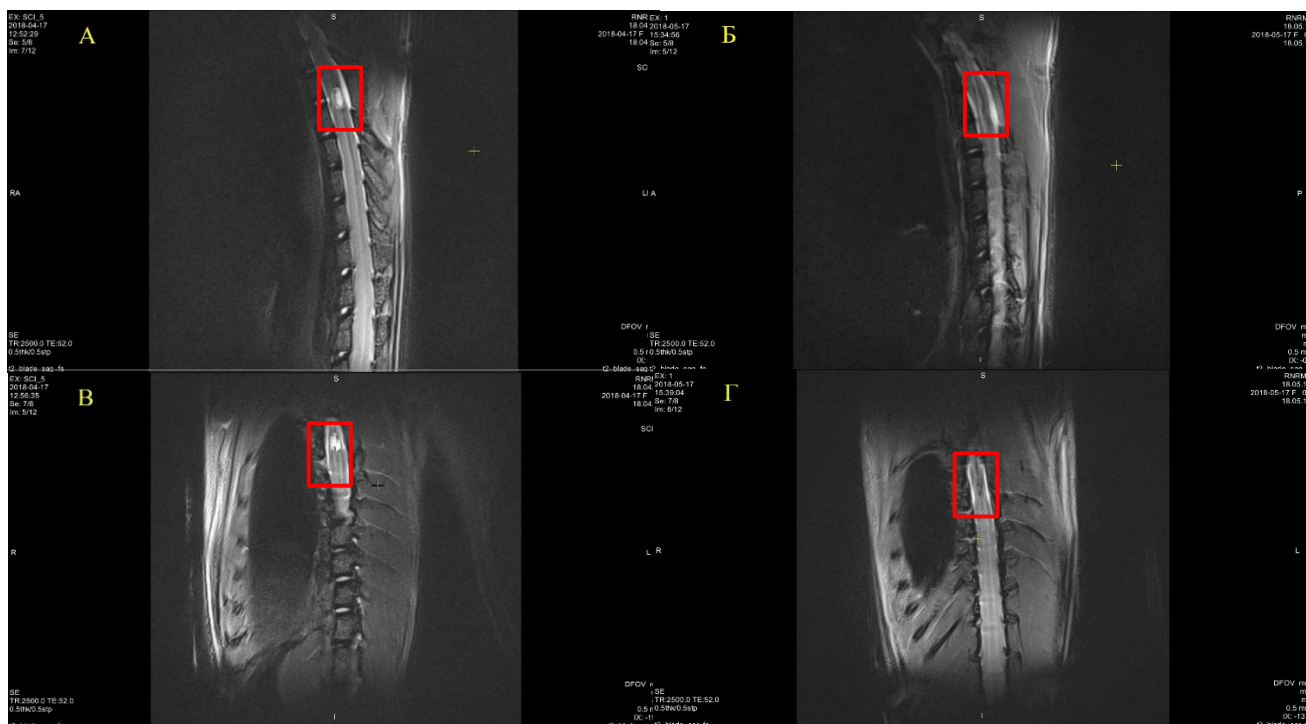


Рисунок 20. МРТ визуализация посттравматической кисты спинного мозга до и через 4 недели после трансплантации 1,5 миллионов обкладочных клеток крыс. А, В – до трансплантации (в сагиттальной и аксиальной проекциях соответственно); Б, Г - после трансплантации (в сагиттальной и аксиальной проекциях соответственно). После трансплантации клеток наблюдается полное исчезновение кист. Область кисты выделена рамкой.

При сопоставлении полученных данных об исчезновении кист с результатами ВВВ-теста у тех же самых животных было показано увеличение двигательной активности у этих животных на 1,5 балла, что соотносится с динамикой у животных всей группы при трансплантации 1,5 миллионов обкладочных клеток крыс. По-видимому, можно говорить только об индивидуальной предрасположенности крыс к регенерации спинного мозга, когда у некоторых животных после трансплантации клеток кисты уменьшаются или даже полностью исчезают.

б) Изменения размеров кист при трансплантации обкладочных клеток человека.

В данной работе было показано, что через 4 недели после трансплантации обкладочных клеток человека происходит значительное уменьшение размеров посттравматических кист (рис. 21, табл. 9). У животных,

которым трансплантировали 750 тысяч клеток объемы кист уменьшались на 32%, а которым трансплантировали 1,5 млн – на 35%.

Таблица 9

Изменение размеров кист через 4 недели после трансплантации обкладочных клеток (ОК) человека в количестве 750 тысяч клеток и 1,5 миллиона. Изменение выражено как отношение размеров кист после трансплантации к объему до трансплантации (в процентах). Сравнение с контролем проводили с использованием теста Данна

контроль	750 тыс ОК		1,5 млн ОК	
Изменение размеров кисты, %	Изменение размеров кисты, %	p	Изменение размеров кисты, %	p
25,6	-33	0,0021	-35	0,0037

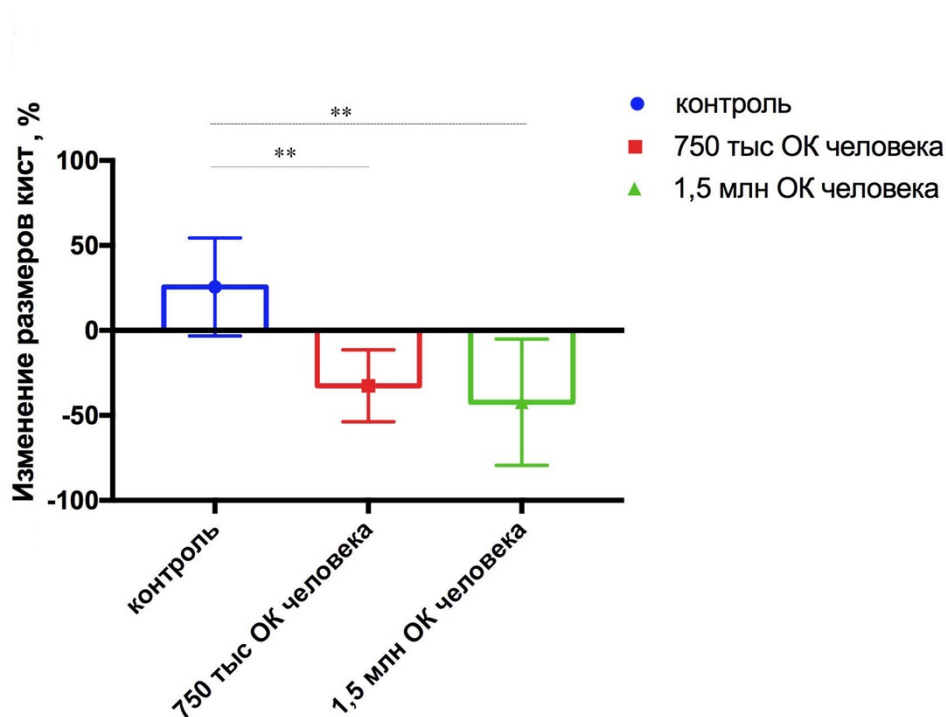


Рисунок 21. Изменение размеров кист через 4 недели после трансплантации обкладочных клеток (ОК) человека в количестве 750 тысяч клеток и 1,5 миллиона. Изменение выражено как отношение размеров кист после трансплантации к объему до трансплантации (в процентах). На диаграмме представлены средние значения со стандартными отклонениями. Статистически значимые различия по сравнению с контролем были получены с использованием теста Данна, статистически значимые различия отмечены $^{**}(p < 0,01)$.

Кроме того, при анализе МРТ-изображений было показано, что у двух крыс, которым трансплантировали 1,5 миллиона обкладочных клеток происходило исчезновение посттравматических кист спинного мозга (рис. 22), тогда как в контрольной группе и при трансплантации 750 тысяч клеток случаев исчезновения кист выявлено не было.

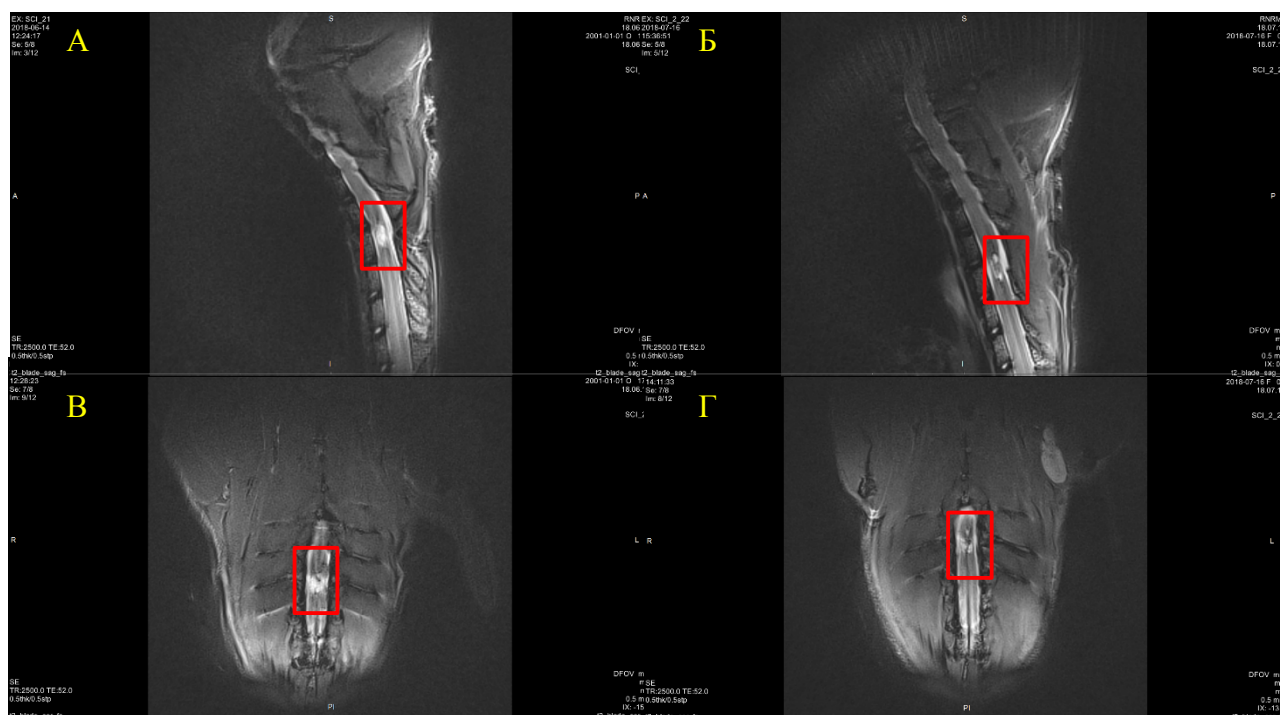


Рисунок 22. МРТ визуализация посттравматических кист спинного мозга до (А, В) и 4 недели после трансплантации 1,5 миллионов обкладочных клеток человека (Б, Г). Изображения были получены в сагиттальной (А, Б) и аксиальной (В, Г) проекциях. После трансплантации клеток наблюдается исчезновение кист. Область кисты выделена рамкой.

При сопоставлении полученных данных об исчезновении кист при трансплантации 1,5 миллионов обкладочных клеток человека у тех же самых

животных с результатами ВВВ-теста было показано увеличение двигательной активности у этих крыс на 2 балла, что соотносится с динамикой у животных всей экспериментальной группы. Таким образом, можно говорить только об индивидуальной предрасположенности отдельных животных к восстановлению спинного мозга.

В данной работе при трансплантации обкладочных клеток обонятельной выстилки крыс и человека в посттравматические кисты была выявлена положительная динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс, а также уменьшение размеров кист на 17-35%, что может свидетельствовать о регенеративных процессах в спинном мозге. При этом, у 3 из 32 (10%) экспериментальных животных, которым трансплантировали обкладочные клетки, наблюдалось исчезновение кист по данным МРТ. Однако одной из важнейших проблем трансплантологии является выживаемость клеток в органах-мишенях. В том числе, вопрос о том, как долго трансплантированные клетки способны сохраняться при посттравматических кистах спинного мозга.

3.4.3. Выявление обкладочных клеток человека и крыс после трансплантации в посттравматические кисты спинного мозга

В данной работе была изучена судьба обкладочных клеток обонятельной выстилки человека и крыс, трансплантированных в посттравматические кисты спинного мозга.

Обкладочные клетки крыс, меченные прижизненным красителем РКН26, были выявлены в области кист через 2 недели после трансплантации (рис. 23), что может свидетельствовать о том, что клетки выживают. Кроме того, единичные меченные клетки были выявлены в прилежащей ткани спинного мозга (Voronova A.D. et al., 2018), что может свидетельствовать о миграции этих клеток.

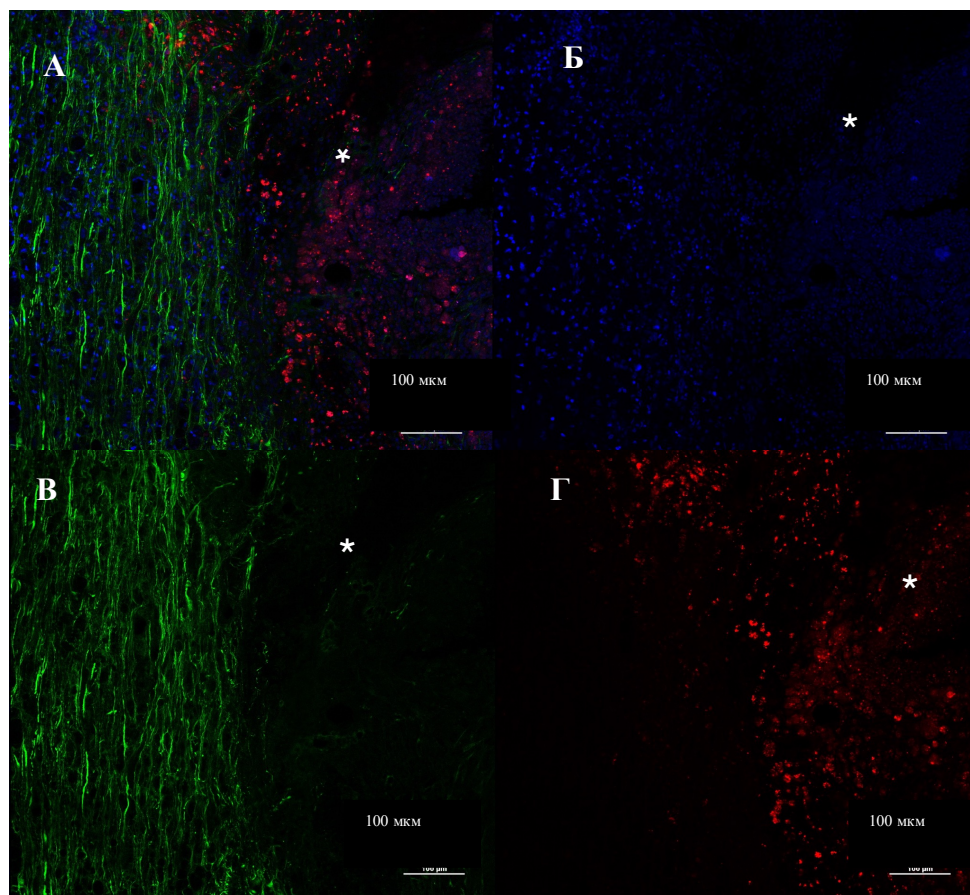


Рисунок 23. Выявление обкладочных клеток крыс в посттравматических кистах спинного мозга через 2 недели после трансплантации. А- совмещение изображений Б, В, Г; Б – окрашивание ядер DAPI, В - окрашивание с антителами к маркеру зрелых нейронов b-III-тубулину, Г - PKH26-меченые обкладочные клетки. Наблюдается миграция клеток в близлежащие ткани спинного мозга. Область кисты отмечена звездочкой.

Через 4 недели после трансплантации обкладочные клетки были также выявлены в области посттравматических кист спинного мозга (Рисунок 24). Показано, что обкладочные клетки обонятельной слизистой оболочки мигрируют в близлежащие ткани спинного мозга, причем через 4 недели миграция клеток была наиболее выраженной, чем через 2 недели (Voropova A.D. et al., 2018).

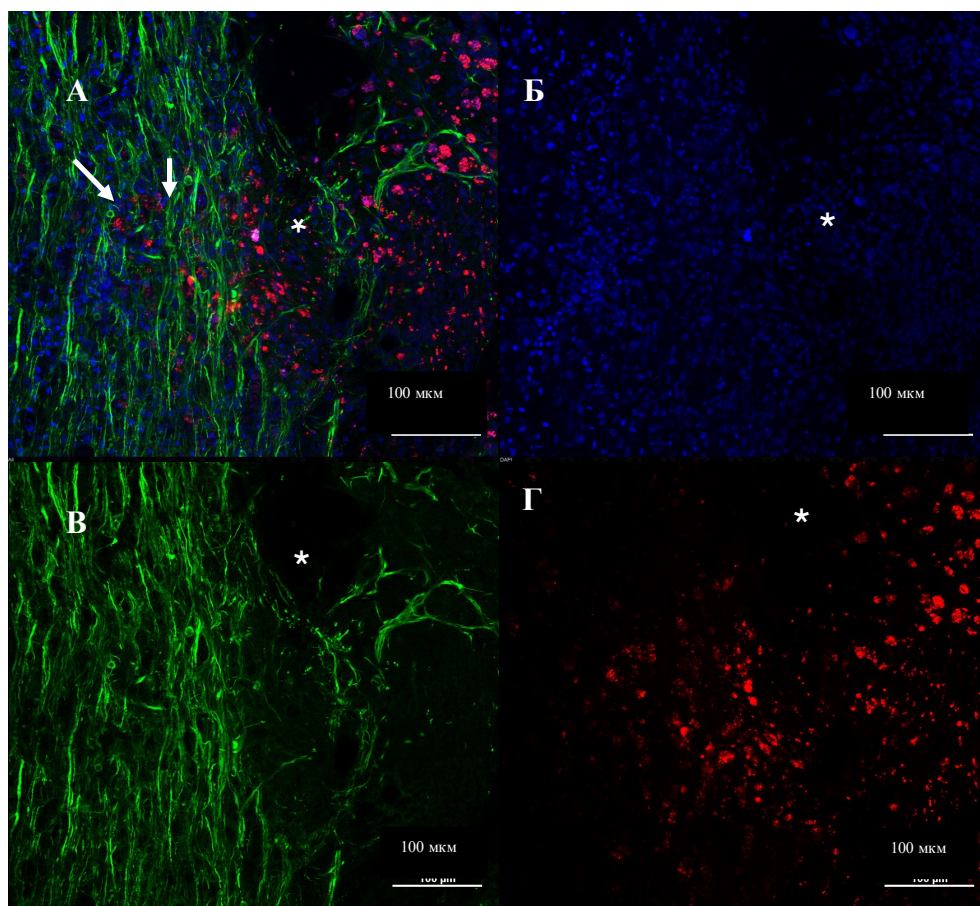


Рисунок 24. Выявление обкладочных клеток крыс в посттравматических кистах спинного мозга через 4 недели после трансплантации. А- совмещение изображений Б, В, Г. Б – окрашивание ядер DAPI, В - окрашивание сантителами к маркеру зрелых нейронов b-III-тубулину, Г - PKH26-меченые обкладочные клетки. Наблюдается миграция клеток в близлежащие ткани спинного мозга. Область кисты отмечена звездочкой.

Показано, что обкладочные клетки человека выявляются в течение 4 недель после трансплантации в посттравматические кисты спинного мозга крыс (рис. 25), что может свидетельствовать о том, что клетки выживают. Кроме того, наблюдалась миграция клеток в близлежащие ткани спинного мозга (Stepanova O.V. et al., 2019).

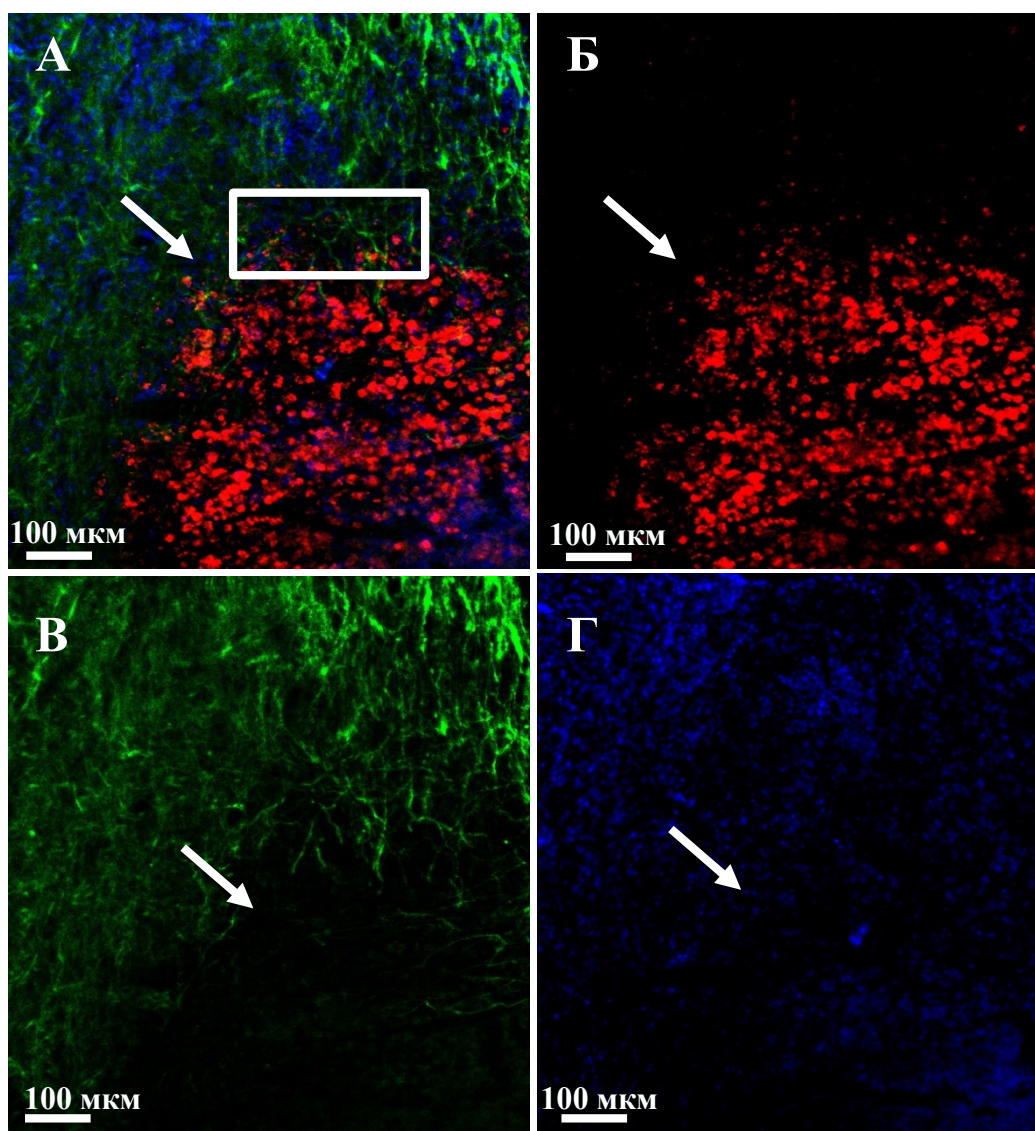


Рисунок 25. Выявление обкладочных клеток человека в посттравматических кистах спинного мозга через 4 недели после трансплантации. А- совмещение изображений Б, В, Г. Б - РНК26-меченые обкладочные клетки крыс, В - окрашивание с антителами к маркеру зрелых нейронов β -III-тубулину, Г - окрашивание ядер DAPI. Наблюдается миграция клеток в близлежащие ткани спинного мозга (отмечено прямоугольником). Область кисты отмечена стрелкой.

В данной работе показано, что в течение 4 недель после трансплантации обкладочных клеток человека и крыс в области кист выявляются РНК26 меченные клетки, что может свидетельствовать о том, что обкладочные клетки выживают и мигрируют в соседние ткани спинного мозга.

3.5. Изучение терапевтического эффекта нейральных стволовых/прогениторных клеток крыс и человека при посттравматических кистах спинного мозга

В данной работе была изучена эффективность трансплантации НСПК обонятельной выстилки крыс и человека при посттравматических кистах спинного мозга. 200 НСПК вводили в составе нейросфер 2-го дня культивирования.

3.5.1. Оценка восстановления двигательной активности задних конечностей при трансплантации НСПК крыс и человека

а) Восстановление двигательной активности задних конечностей при трансплантации НСПК крыс в посттравматические кисты спинного мозга.

В данной работе было показано, что при трансплантации 200 тысяч НСПК крыс на 1-й неделе наблюдается положительная динамика восстановления двигательной активности задних конечностей по шкале ВВВ, при этом, что значения дельты ВВВ были выше по сравнению с контрольной группой на 1,3 и 4 неделе. В контрольной группе никаких улучшений выявлено не было, при этом, на 1-й и 4-й неделе наблюдали ухудшение функций (рис. 26, табл. 10). Однако, так как статистически значимых улучшений не было выявлено, можно говорить лишь о тенденции к улучшению функций.

Таблица 10

Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс в течение 4 недель после трансплантации НСПК крыс в кисты спинного мозга, представлена по изменениям баллов (дельта ВВВ). Сравнение с контролем проводили с использованием критерия Манна-Уитни

неделя после трансплантации \ группа	Контрольная группа, Δ ВВВ	Трансплантация НСПК, Δ ВВВ	p
1	-0,33	0,4	0,146
2	-0,06	0,1	0,930
3	-0,33	0	0,761
4	-0,06	1	0,665

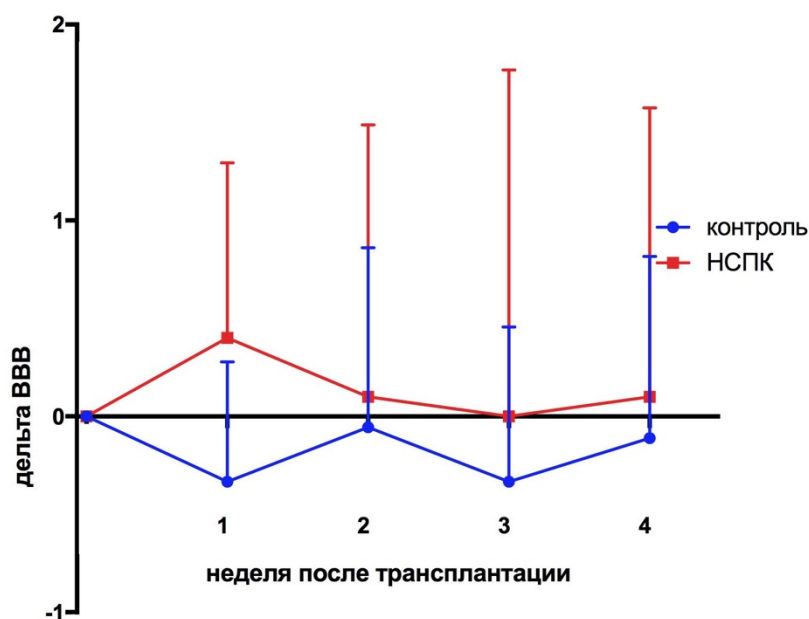


Рисунок 26. Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс после трансплантации НСПК крыс в кисты спинного мозга, представлена по изменениям баллов (дельта ВВВ). На графике указаны средние значения со стандартными отклонениями. Сравнение с контролем проводили с использованием критерия Манна-Уитни.

б) Восстановление двигательной активности задних конечностей при трансплантации НСПК человека в спинной мозг при посттравматических кистах.

При трансплантации НСПК человека в посттравматические кисты спинного мозга крыс наблюдалось улучшение динамики восстановления двигательной активности задних конечностей крыс в течение всех 4-х недель (рис. 27, табл. 11). При этом показатели ВВВ при трансплантации НСПК были выше (в среднем на 1 балл). На 1й неделе после трансплантации НСПК человека в отличие от контрольной группы не наблюдалось снижения двигательной активности, что может быть связано с нейропротективными эффектами НСПК. Однако полученные различия у животных опытной и контрольной групп не были статистически значимыми, таким образом, можно говорить лишь о тенденции к улучшению двигательных функций задних конечностей.

Таблица 11

Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс в течение 4 недель после трансплантации НСПК человека в кисты спинного мозга, представлена по изменениям баллов (дельта ВВВ). Сравнение с контролем проводили с использованием критерия Манна-Уитни

неделя после трансплантации \ группа	Контрольная группа, $\Delta ВВВ$	Трансплантация НСПК, $\Delta ВВВ$	p
1	-0,33	0,357	0,1593
2	-0,06	0,286	0,4429
3	-0,33	0,643	0,0600
4	-0,06	0,571	0,2794

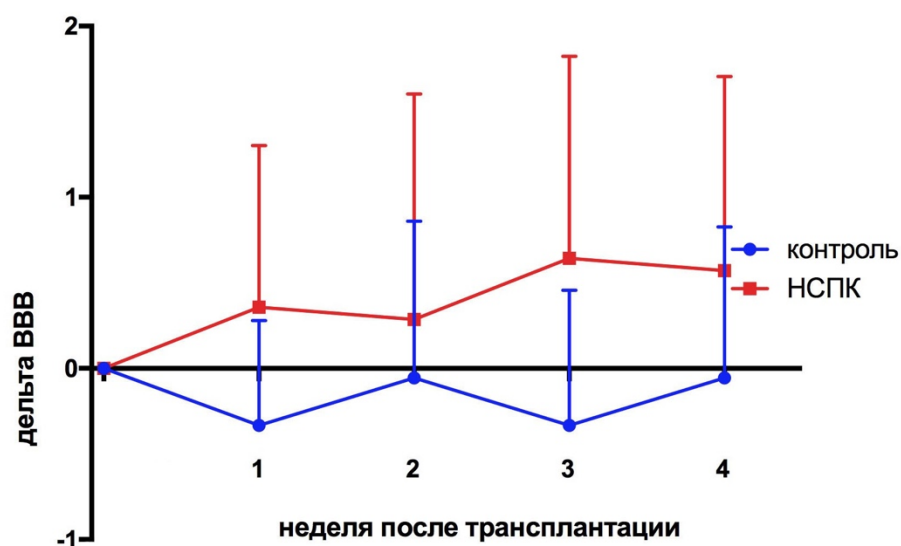


Рисунок 27. Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс после трансплантации НСПК человека в кисты спинного мозга, представлена по изменениям баллов (дельта ВВВ). На графике указаны средние значения со стандартными отклонениями. Сравнение с контролем проводили с использованием критерия Манна-Уитни.

б) Восстановление двигательной активности задних конечностей при трансплантации НСПК крыс в спинной мозг без посттравматических кист.

При трансплантации НСПК крыс и человека в спинной мозг при хроническом повреждении без образования кист было показано, что динамика восстановления двигательной активности была ниже, чем в контрольной группе (рис. 28, табл. 12). При этом при трансплантации НСПК крыс на 4-ой неделе после трансплантации наблюдали значимое ухудшение двигательной активности задних конечностей ($p < 0,05$). Улучшение в контрольной группой может быть связано с возможностью активной репаративной регенерации спинного мозга у крыс. Таким образом, при повреждении без образования кист терапевтический эффект трансплантации НСПК не наблюдался. Эти результаты совпадают с полученными нами для обкладочных клеток.

Таблица 12

Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс в течение 4 недель после трансплантации НСПК крыс и НСПК человека с спинной мозг без сформированных кист, представлена по изменениям баллов (дельта ВВВ). Сравнение с контролем проводили с использованием теста Данна

неделя после трансплантации \ группа	Контрольная группа, $\Delta ВВВ$	Трансплантация НСПК крыс, $\Delta ВВВ$	p	Трансплантация НСПК человека, $\Delta ВВВ$	p
1	0,77	0	0,09	0,5	0,66
2	0,95	0	0,087	0	0,053
3	1,14	0	0,02	0,5	0,17
4	1,14	-1	0,003	0,5	0,243

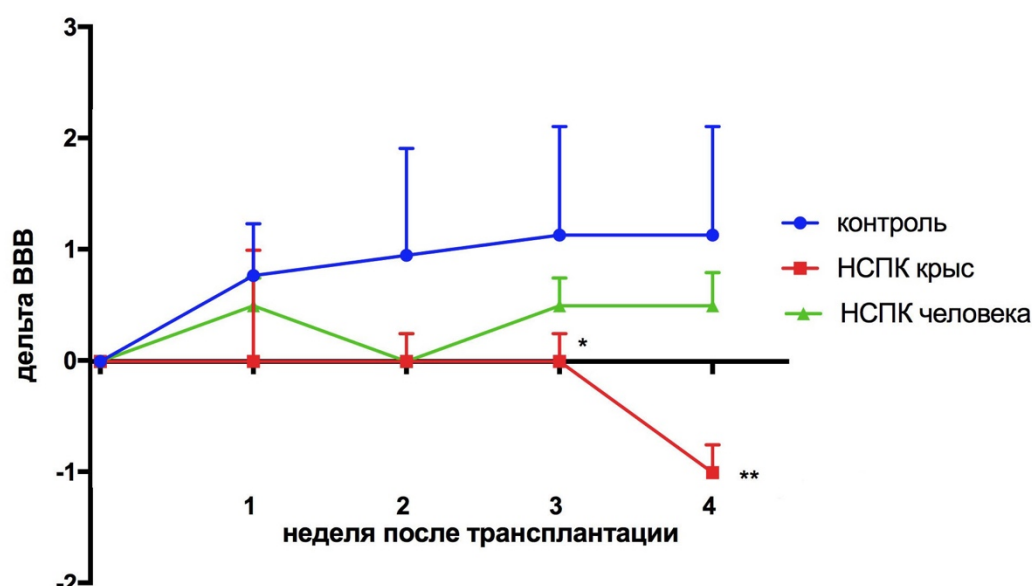


Рисунок 28. Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс после трансплантации НСПК человека и НСПК крыс в спинной мозг при хроническом повреждении без образования кист. Динамика представлена по изменениям баллов (дельта BBB). На графике указаны средние значения со стандартными отклонениями. Сравнение с контролем проводили с использованием теста Данна, статистически значимые различия отмечены * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$).

В данной работе при трансплантации НСПК крыс и человека в посттравматические кисты спинной не было выявлено каких-либо статистически значимых эффектов по восстановлению двигательной активности задних конечностей у крыс.

3.5.2. Оценка изменения размеров посттравматических кист при трансплантации НСПК обонятельной слизистой оболочки носа крыс и человека

Через 4 недели после трансплантации НСПК человека и крыс в кисты спинного мозга с помощью метода МРТ проводили оценку изменения размеров кист. Было показано, что в группе животных, которым проводили трансплантацию НСПК крыс животных наблюдалось уменьшение размеров кист в среднем на 13 %, одна по сравнению с контролем эти изменения были статистически незначимыми. При трансплантации НСПК человека не

наблюдалось с статистически значимого уменьшения размеров кист (рис. 29, табл. 13).

Таблица 13

Изменение размеров кист спинного мозга через 4 недели после трансплантации НСПК крыс и НСПК человека. Изменение выражено как отношение размеров кист после трансплантации к объему после (в процентах). Сравнение с контролем проводили с использованием теста Данна

контроль	НСПК крыс		НСПК человека	
Изменение размеров кисты, %	Изменение размеров кисты, %	p	Изменение размеров кисты, %	p
25,6	-13,7	0,183	9	0,263

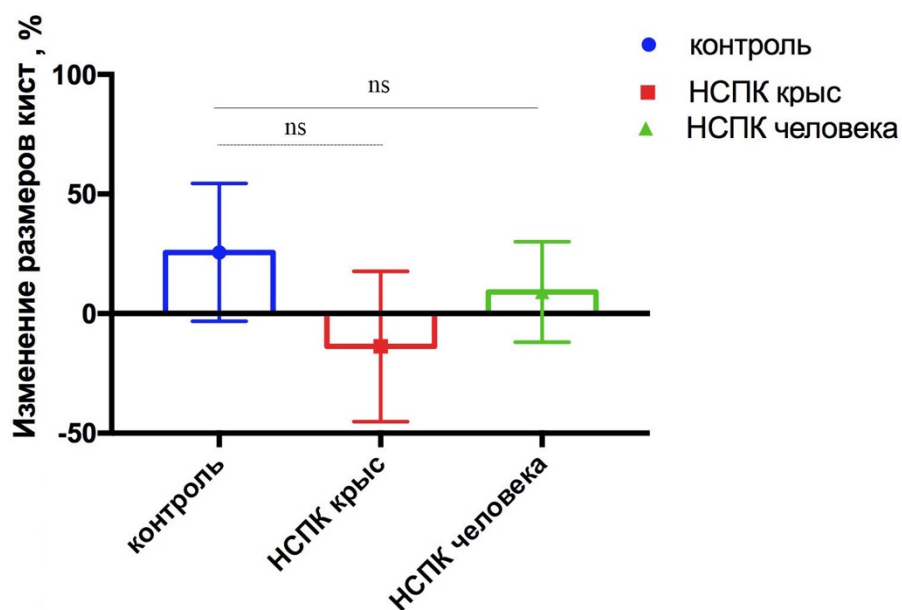


Рисунок 29. Изменение размеров кист через 4 недели после трансплантации НСПК крыс и человека. Изменение выражено как отношение размеров кист после трансплантации к объему после (в процентах). На диаграмме представлены средние значения со стандартными отклонениями. Сравнение с контролем проводили с использованием теста Данна. ns (not significant) – нет статистически значимых различий.

Таким образом, только у отдельных взятых животных при трансплантации НСПК крыс и человека (у 33%) животных наблюдалось уменьшение размеров посттравматических кист (рис. 30). Также следует отметить, что при трансплантации НСПК крыс и человека мы не наблюдали исчезновения кист, наблюдаемое при трансплантации обкладочных клеток.



Рисунок 30. МРТ визуализация спинного мозга крыс до (А, В) и после (Б, Г) трансплантации НСПК человека в посттравматические кисты. Уменьшение размеров кист наблюдали у некоторых животных через 4 недели при трансплантации. Изображения были получены в сагиттальной (А, Б) и в аксиальной (В, Г) проекциях. Область кисты выделена рамкой.

1.5.3. Выявление НСПК после трансплантации в посттравматические кисты спинного мозга

В данной работе НСПК крыс и человека, меченные PKH26, были выявлены в посттравматических кистах через 4 недели после трансплантации, кроме того, эти клетки наблюдались в близлежащей к кисте ткани спинного мозга (рис. 31).

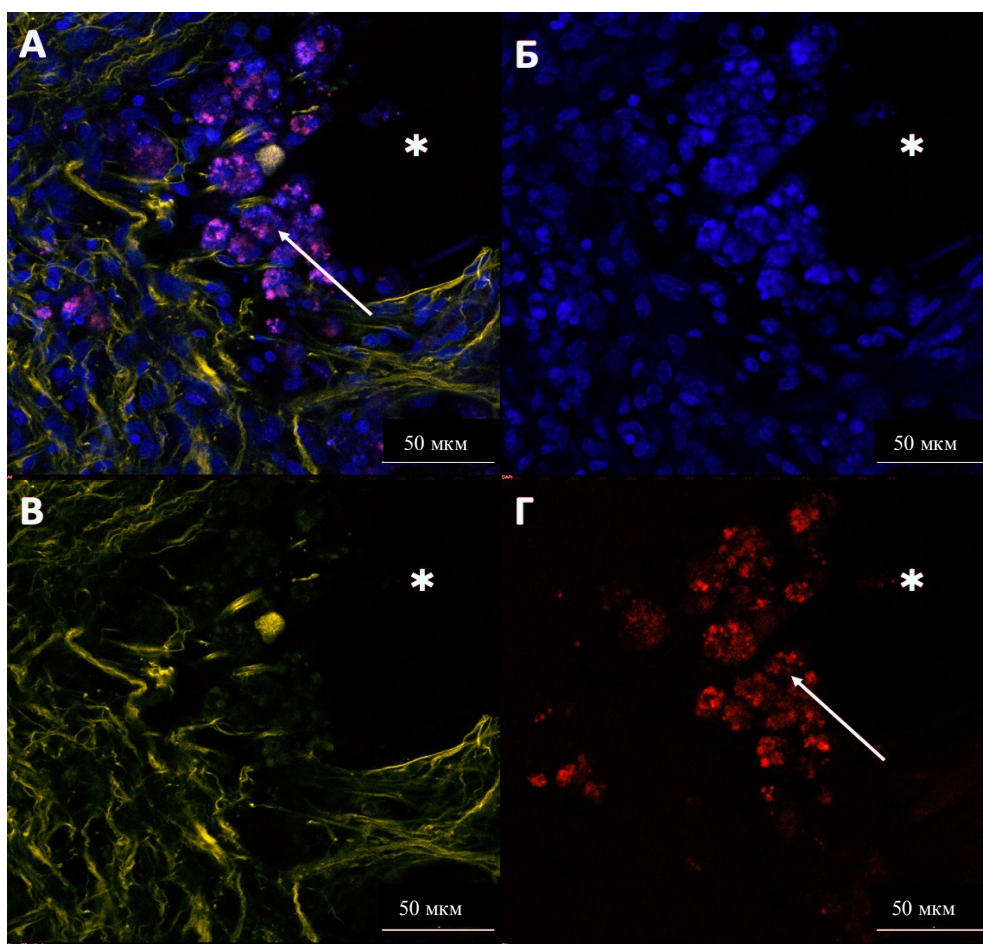


Рисунок 31. Выявление НСПК в посттравматических кистах спинного мозга через 4 недели после трансплантации. А- совмещение изображений Б, В, Г. Б – окрашивание ядер DAPI, В - окрашивание с антителами к маркеру зрелых нейронов b-III-тубулину, Г - PKH26-меченые НСПК. Наблюдается миграция клеток в близлежащие ткани спинного мозга. Область кисты отмечена звездочкой.

Таким образом, НСПК обонятельной области слизистой оболочки носа крыс и человека, по-видимому способны выживать в течение 4 недель после трансплантации в кисты и мигрировать через стенку кисты.

3.6. Изучение терапевтического эффекта комбинации обкладочных клеток и нейральных стволовых/прогениторных клеток человека и крыс на экспериментальные кисты спинного мозга крыс

В данной работе впервые была проведена клеточная трансплантация препаратов крыс и человека, состоящих из комбинации обкладочных клеток обонятельной области слизистой оболочки носа и НСПК из того же источника.

3.6.1. Оценка восстановления двигательной активности задних конечностей при трансплантации комбинации обкладочных клеток и НСПК крыс и человека

а) Восстановление двигательной активности задних конечностей при трансплантации комбинации обкладочных клеток и НСПК крыс, в посттравматические кисты спинного мозга.

Для оценки эффективности препарата, состоящего из комбинации обкладочных клеток и НСПК крыс был проведен сравнительный анализ полученных по результатам ВВВ-теста данных с данными трансплантации всех клеточных препаратов крыс (рис. 32, табл. 14). Статистически значимые эффекты были выявлены только при трансплантации обкладочных клеток, при этом наибольшая эффективность была показана при трансплантации 750 тысяч обкладочных клеток. Наименее эффективной оказалась трансплантация препарата, состоящего из комбинации 750 тысяч обкладочных клеток и 200 тысяч НСПК, при этом не было выявлено каких-либо статистических значимых улучшений двигательных функций задних конечностей крыс по сравнению с контрольной группой. Таким образом, было показано, что данное сочетание количеств НСПК и обкладочных клеток в составе препарата не оказывает терапевтические эффекты на восстановление двигательной активности при посттравматических кистах спинного мозга.

Таблица 14

Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс в течение 4 недель после трансплантации комбинации обкладочных клеток (ОК) и НСПК крыс в кисты спинного мозга, представлена по изменениям баллов (дельта ВВВ). Сравнение с контролем проводили с использованием теста Данна

неделя после трансплантации	группа	Контрольная группа, Δ BVV	Трансплантация ОК + НСПК, Δ BVV	p
1		-0,33	0	0,99
2		-0,06	-1,67	0,99
3		-0,33	0	0,99
4		-0,06	0,1	0,99

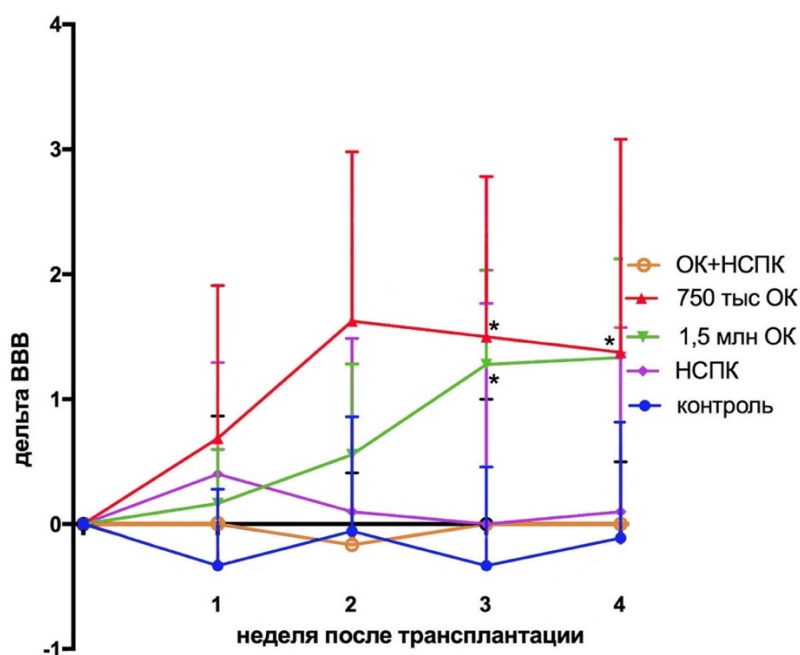


Рисунок 32. Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс (дельта BVV) после трансплантации препарата, состоящего из комбинации обкладочных клеток обонятельной выстилки крыс и НСПК из того же источника, представленная в сравнении с клеточными препаратами обкладочных клеток и НСПК по отдельности. На графике указаны средние значения со стандартными отклонениями. На диаграмме представлены средние значения со стандартными отклонениями. Статистически значимые различия по сравнению с контролем были получены с использованием теста Данна и отмечены $*(p < 0,05)$.

б) Восстановление двигательной активности задних конечностей при трансплантации препарата, состоящего из комбинации обкладочных клеток и НСПК человека, в посттравматические кисты спинного мозга.

При трансплантации комбинированного препарата была показана положительная динамика восстановления двигательной активности на 2, 3 и 4 неделе после трансплантации (рис. 33, табл. 15), однако статистически значимых различий по сравнению с контрольной группой выявлено не было. При сравнительном анализе данных ВВВ теста, полученных во всех экспериментальных группах по трансплантации клеточных препаратов обонятельной слизистой оболочки человека показано, что эффективность трансплантации комбинации обкладочных клеток и НСПК была выше, чем при трансплантации 200 тысяч НСПК отдельно, однако, ниже, чем при трансплантации обкладочных клеток (рис. 33). Статистически значимые эффекты на восстановление двигательной активности задних конечностей крыс оказывает только трансплантация обкладочных клеток (Воронова А.Д. и др., 2020). Таким образом, можно говорить о тенденции к восстановлению двигательных функций задних конечностей у крыс при трансплантации комбинации обкладочных клеток и НСПК человека. Также не наблюдался нейропротективный эффект, который оказывали по отдельности обкладочные клетки и НСПК на 1 неделе. Таким образом, необходимо дальнейшее исследование эффективности комбинированного препарата клеток обонятельной слизистой оболочки.

Таблица 15

Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс в течение 4 недель после трансплантации комбинации обкладочных клеток (ОК) и НСПК человека в кисты спинного мозга, представлена по изменениям баллов (дельта ВВВ). Сравнение с контролем проводили с использованием теста Данна

неделя после трансплантации \ группа	Контрольная группа, Δ BVV	Трансплантация ОК + НСПК, Δ BVV	p
1	-0,33	-1,667	0,99
2	-0,06	0,500	0,99
3	-0,33	0,833	0,18
4	-0,06	0,833	0,44

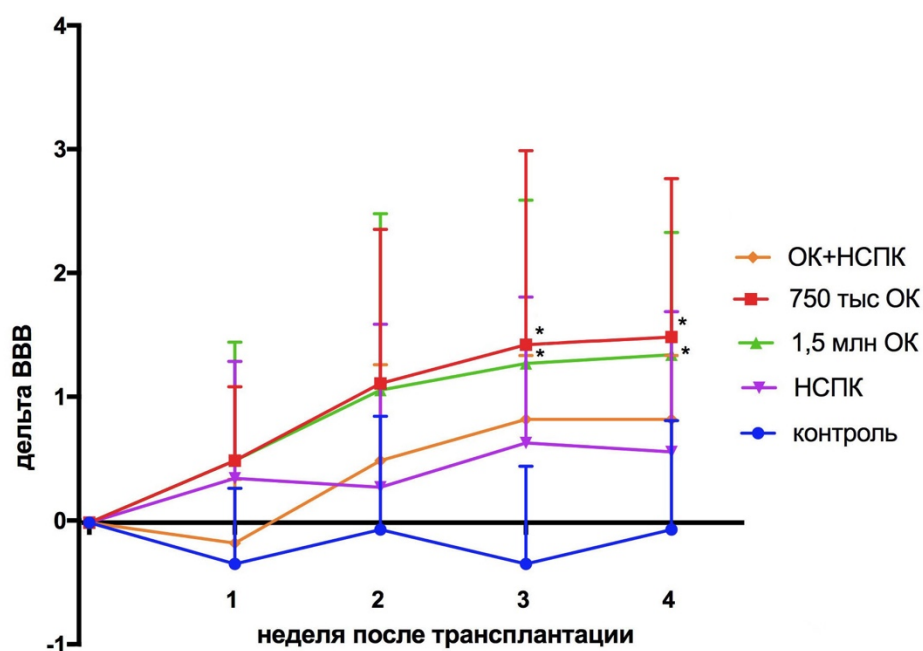


Рисунок 33. Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс (дельта BVV) после трансплантации препарата, состоящего из комбинации обкладочных клеток и НСПК человека по сравнению с клеточными препаратами обкладочных клеток и НСПК по отдельности. На графике указаны средние значения со стандартными отклонениями. Статистически значимые различия по сравнению с контролем были получены с использованием теста Данна и отмечены $*$ ($p < 0,05$).

Таким образом, при сравнительном анализе всех групп было показано, что самые лучшие эффекты на восстановление двигательной активности задних конечностей крыс наблюдаются при трансплантации 750 тысяч клеток человека и 750 тысяч обкладочных клеток крыс.

3.6.2. Оценка изменения размеров посттравматических кист при трансплантации комбинации обкладочных и нейральных стволовых/прогениторных клеток человека и крыс на экспериментальные кисты спинного мозга крыс

Через 4 недели после трансплантации комбинации обкладочных клеток крыс и человека не было выявлено статистически значимых изменений размеров кист (рис. 34, табл. 15).

Таблица 16

Изменение размеров кист через 4 недели после трансплантации комбинации обкладочных клеток и НСПК крыс и человека. Изменение выражено как отношение размеров кист после трансплантации к объему после (в процентах). Сравнение с контролем проводили с теста Данна

контроль	ОК + НСПК крыс	ОК + НСПК человека
Изменение размеров кисты, %	Изменение размеров кисты, %	Изменение размеров кисты, %
25,6	16	-5,3
	p	p
	0,79	0,0504

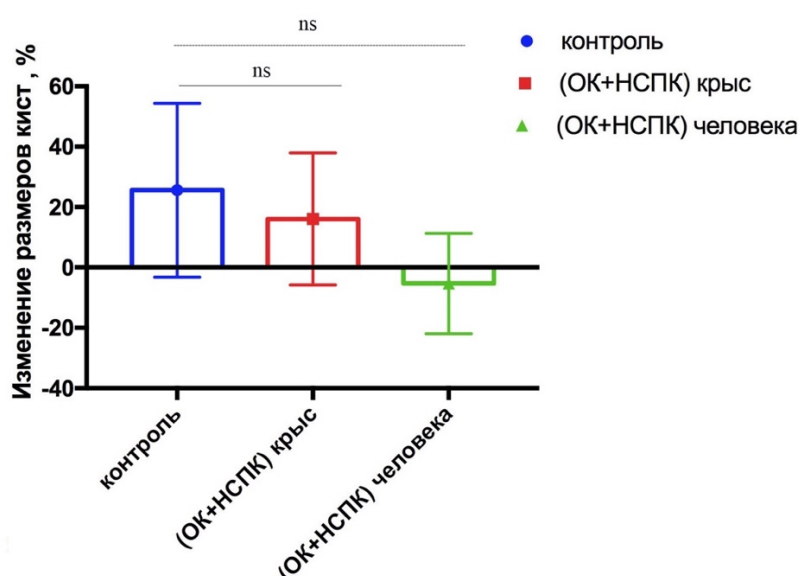


Рисунок 34. Изменение размеров кист через 4 недели после трансплантации комбинации обкладочных клеток и НСПК крыс и человека. Изменение выражено в процентах от объема до трансплантации. На диаграмме представлены средние значения со стандартными отклонениями. Сравнение с

контролем проводили с использованием теста Данна. ns (not significant) – нет статистически значимых различий.

Однако, у некоторых животных (у 4 из 6), которым трансплантировали препарат, состоящий из комбинации обкладочных клеток и НСПК человека, наблюдали уменьшение объема кисты через 4 недели после трансплантации комбинированного препарата человека на 3-25 %. (Рисунок 35). При этом, полного исчезновения кист не наблюдали ни у одного из животных.

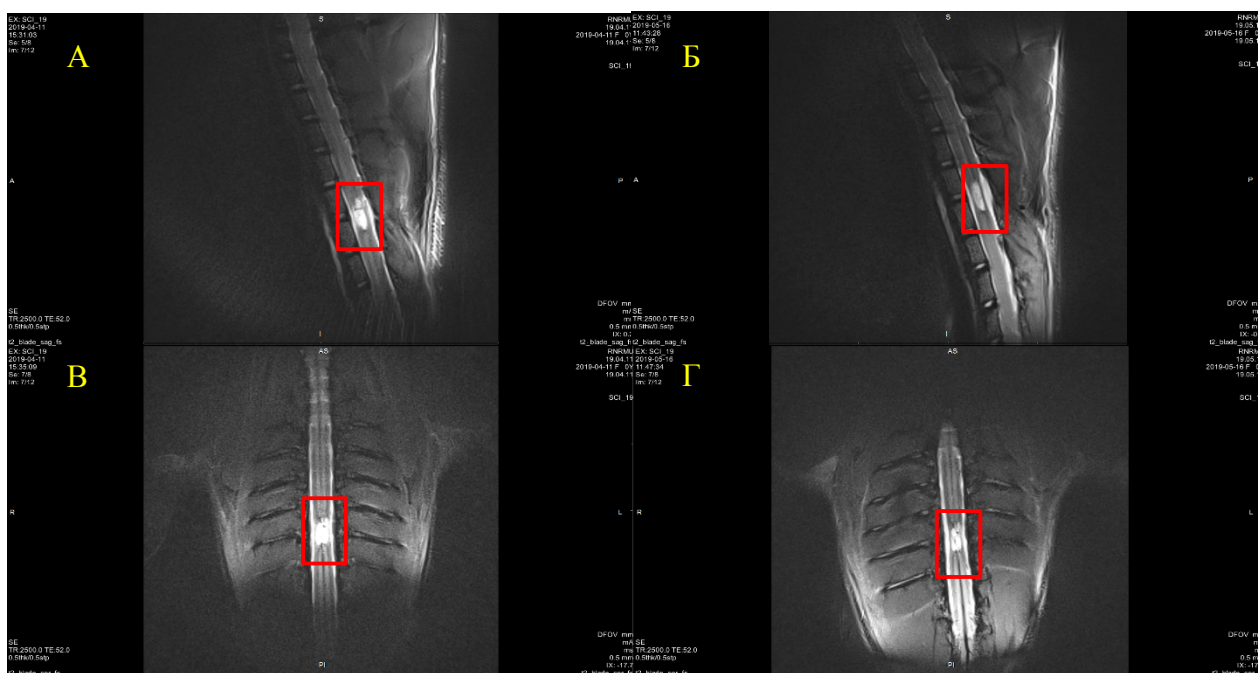


Рисунок 35. МРТ визуализация спинного мозга крыс до (А) и после (Б) трансплантации комбинации обкладочных клеток и НСПК человека в посттравматические кисты. Уменьшение размеров кист наблюдали у некоторых животных через 4 недели при трансплантации. Изображения были получены в сагиттальной (А, Б) и в аксиальной (В, Г) проекциях. Область кисты выделена рамкой.

Таким образом, в данной работе впервые была изучена эффективность препаратов крыс и человека, состоящих из комбинации обкладочных клеток обонятельной области слизистой оболочки носа и НСПК из того же источника. При этом было показано уменьшение размеров кист у некоторых животных по данным МРТ, однако улучшений двигательных функций задних конечностей выявлено не было.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЯ

Анализ литературных данных показал, что клеточная терапия экспериментальных посттравматических кист спинного мозга практически не изучена. Большинство исследований посвящено трансплантации различных клеточных препаратов в острую и подострую фазу повреждения (Cheng I. et al., 2012; Parr A.M. et al., 2007), тогда как существует мало работ, посвященных лечению хронических повреждений спинного мозга, в том числе, терапии кист. В одной из работ были изучены МСК обонятельной выстилки при посттравматической сирингомиелии (Lindsay S.L. et al., 2013), однако при этом не было выявлено положительных эффектов. В другом исследовании крысам с посттравматическими кистами были трансплантированы НСПК крыс, полученные из субвентрикулярной зоны (Riemann L. et al., 2018). В результате наблюдалось незначительное уменьшение размеров кист и некоторое улучшение показателей двигательной активности, однако важно отметить, что в данном случае трансплантация клеток проводилась на 10-ый день после травмы, когда кисты находятся еще на начальном этапе формирования.

В многочисленных работах по лечению посттравматических повреждений спинного мозга были изучены клетки, полученные из различных источников. Однако применение одних связано с возникновением тератомного или других побочных эффектов, при получении других возникают определенные технологические или биоэтические проблемы, или же трансплантация не приводит к желаемым результатам. Таким образом, такие клеточные препараты не могут быть использованы в клинической практике.

В данной работе были изучены клеточные препараты, полученные из обонятельной выстилки носа. По ряду показателей, данный источник является перспективным для получения клеток для аутотрансплантации в спинной мозг. Эффективность и безопасность обкладочных клетки и НСПК из различных источников по отдельности была показана в многочисленных экспериментальных исследованиях (Li J., 2013; Gueye Y., 2011; Yamamoto M.

et al., 2009) по лечению травм спинного мозга, кроме того, есть данные о применении клеток обонятельной выстилки в клинических испытаниях (Lima C. et al., 2006; Tabakow P. et al., 2013; Wang S. et al., 2016). Однако общепринятых единых протоколов для их получения не существует.

Разработка и оптимизация протоколов получения обкладочных клеток была проведена на основе уже существующих протоколов получения обкладочных клеток из обонятельной выстилки. Наш протокол обладает рядом преимуществ, важных для получения обогащенной обкладочными клетками культуры. Так, например, существует способ получения обкладочных клеток из аутопсийного материала обонятельной выстилки человека (Wu S. et al., 2015), однако данный метод имеет серьезные недостатки. Во-первых, для получения обкладочных клеток в данной работе ткань дополнительно обрабатывали ферментом коллагеназой Н, что определенно сказывается на выживаемости клеток при получении первичной культуры. Во-вторых, описанное в этом протоколе выращивание клеток проводили в суспензионных культурах, что является более трудоемким методом, чем культивирование адгезивных культур. В-третьих, обкладочные клетки, полученные из аутопсийных образцов, могут быть применимы только для аллогенной трансплантации, а количество и выживаемость клеток из аутопсийного материала значительно ниже.

Существуют также протоколы для получения обкладочных клеток из обонятельной выстилки пациентов. Однако данные подходы также не лишены недостатков. В том числе, при получении первичной культуры клеток собственная пластинка не отделялась от обонятельного эпителия, что по понятным причинам не позволяло авторам получить чистую культуру обкладочных клеток (Брюховецкий А.С., 2010). Однако более существенным слабым местом обсуждаемых протоколов является отсутствие стадии наращивания клеточной массы в первичной культуре до этапа культивирования клеток на поли – L - лизине, что значительно снижает количество получаемых клеток, а дополнительная обработка ферментом

коллагеназой 1 несомненно сказывается на выживаемости получаемых клеток. Разработанный в данной работе протокол оптимизирован и имеет ряд отличий от известных ранее. Основным отличием разработанного в данной работе протокола состоит в том, что ткань обонятельной выстилки подвергали обработке только одним ферментом - диспазой II для того, чтобы можно было механически отделить обонятельной эпителий от собственной пластинки с целью получения более чистой культуры обкладочных клеток. Чтобы не подвергать ткань собственной пластинки дополнительной ферментной обработке в нашем протоколе применяется метод эксплантной культуры, в этом случае собственная пластинка подвергается механическому измельчению и полученные кусочки ткани помещают в культуральные чашки в среду культивирования. Для получения большего количества клеток наращивание клеток из эксплантной культуры проводили в течение 14 дней. Далее для получения обкладочных клеток полученную культуру пересаживали на пластик или чашки, покрытые поли-L-лизинном, в среду (DMEM/F-12(1:1), с 10% FBS, 2 mM L-глутамином, 100 µg/mL стрептомицином, 100 U/mL пенициллином, 1% ITS и 500 нг/мл гидрокортизоном. Гидрокортизон увеличивает чувствительность клеток к ростовым факторам, содержащимся в сыворотке, что, несомненно, увеличивает количество клеток. Дополнительным и важнейшим преимуществом разработанного протокола является возможность его применения для получения обкладочных клеток из материала обонятельной выстилки пациентов с травмой спинного мозга для дальнейшей аутологической трансплантации этим же пациентам. По разработанным нами протоколам были получены обогащенные культуры обкладочных клеток человека 3-4 пассажа, которые в дальнейшем были использованы для трансплантации.

Далее нами были получены суспензионные культуры, обогащенные НСПК обонятельной слизистой оболочки крыс и человека. Существуют различные способы для получения НСПК из обонятельной выстилки

млекопитающих, большинство из которых направлено на получение нейросфер (Ohnishi Y. et al., 2015; Muniswami D.M. et al., 2017; Zhang X. et al., 2006). Разработка протоколов для получения НСПК в данном исследовании проводилась на основе существующих протоколов, но со значительными модификациями. Разработанный нами протокол обладает рядом преимуществ по сравнению с существующими.

Так, известен способ получения НСПК из обонятельной слизистой оболочки носа человека (Ohnishi Y. et al., 2015), заключающийся в том, что обонятельную слизистую оболочку человека диссоциировали механически, затем обрабатывали в течении 60 минут при 37⁰С смесью ферментов: коллагеназой, диспазой, ДНКазой, гиалуронидазой в ДМЕМ/F-12 среде. Полученные клетки были посажены на культуральные чашки, покрытые поли-(2- гидроксипропил-метакрилатом) для предотвращения прикрепления клеток ко дну культуральных чашек, клетки культивировали в среде ДМЕМ/F-12 с добавлением 10% сыворотки FBS, добавки B27, факторов роста bFGF и EGF и антибиотиков-антимикотиков. Через 10-14 дней были получены нейросферы, которые были диссоциированы с помощью трипсина-ЭДТА. Полученные клетки были посажены на поли- L- лизин/ламинин покрытые чашки и культивировали 14-21 день в ДМЕМ/F-12 среде, с добавлением 10% сыворотки FBS, N2, B27 и антибиотиков-антимикотиков. Методом иммунофлуоресценции в данных клетках были выявлены маркеры нейрональной дифференцировки- MAP2, Tuj1, что свидетельствует о наличии в полученных нейросферах нейральных стволовых/ прогениторных клеток. Недостатком известного способа является обработка сразу 4 ферментами - коллагеназой, диспазой, ДНКазой, гиалуронидазой. Применение такого большого количества ферментов может сказаться на выживаемости клеток при получении первичной культуры. Еще одним недостатком данного способа является то, что при получении первичной культуры клеток не отделяли собственную пластинку от обонятельного эпителия, что затрудняет получение

культуры, обогащенной НСПК, из-за примеси большого количества клеток других типов.

В другом исследовании для разработки протокола получения НСПК использовалась аутопсийный материал обонятельной выстилки (Zhang X. et al., 2006). Ткань подвергали ферментативной обработке с 0,05% раствором трипсина в течение 90 минут при 35°C. Для получения нейросфер полученную суспензию клеток сажали на пластик, покрытый ламинином и фибрнектином, и культивировали в среде ДМЕМ/F-12 с добавлением 5% сыворотки, добавки N1 и гепарина. Основные недостатки данного протокола заключаются в использовании аутопсийного материала обонятельной выстилки, а также в отсутствии стадии разделения обонятельного эпителия от *lamina propria*. Таким образом, использование данного протокола снижает выживаемость полученных клеток и чистоту получаемой культуры.

В работе Muniswami и соавторов (Muniswami D.M. et al., 2017) обонятельную выстилку крыс обрабатывали диспазой II в течение 30 минут при 37°C для механического отделения ткани обонятельного эпителия от подлежащей собственной пластинки. Далее ткань обонятельного инкубировали с 0,05% раствором трипсин-ЭДТА в течение 5-10 минут при 37°C, а затем со смесью ферментов, состоящей из коллагеназы/гиалуронидазы/ингибитора трипсина, в течение 15 минут при 37°C для диссоциации обонятельного эпителия на клетки. Полученную суспензию с клетками обонятельного эпителия сажали на пластик, покрытый поли-D-лизином, и культивировали в среде ДМЕМ/F-12 с добавлением 2% сыворотки FBS, добавки N2, фактором роста EGF и антибиотиков-антимикотиков. Данный протокол является наиболее близким к нашему, так как в нем присутствует стадия отделения собственной пластинки, однако серьезным недостатком является применение большого количества ферментов, которые могут оказывать негативное влияние на выживаемость и пролиферацию клеток.

Основным отличием и преимуществом нашего протокола было наличие стадии получения первичной культуры обонятельного эпителия. Данная стадия важна и необходима для наращивания клеточной массы, особенно, в том случае, если речь идет об обонятельной выстилке человека, так как размеры забираемой у пациента ткани ограничены. Кроме того, в нашем протоколе было увеличено время инкубации обонятельной выстилки с ферментами, что необходимо для более тщательного отделения ткани обонятельного эпителия от собственной пластинки. Использование двух ферментов и механическое отделение обонятельного эпителия от собственной пластинки позволило получать первичную культуру клеток обонятельного эпителия без примесей клеток собственной пластинки, в том числе, без примесей МСК и обкладочных клеток. В данной работе было выявлено содержание НСПК в первичной культуре обонятельного эпителия в пределах 5-7%. При помещении данных клеток в бессывороточную среду с добавлением ростовых факторов FGF и EGF и культивировании на поли-L-лизине дифференцированные типы клеток обонятельного эпителия (поддерживающие клетки и зрелые обонятельные нейроны) погибает в течение нескольких суток, в то время как немногочисленные популяции клеток-предшественников и стволовых начинают активно пролиферировать в данных условиях и образовывать нейросферы (Reynolds B.A. et al., 1992). При этом, из всех типов клеток обонятельного эпителия только НСПК могут образовывать сферы. Полученные по разработанному протоколу культуры НСПК крыс и человека могут использоваться для *in vitro* исследований по изучению их дифференцировки НСПК, а также в экспериментах *in vivo* для оценки их терапевтических свойств. Культуры НСПК, полученные на 2 сутки культивирования, были использованы для дальнейшей трансплантации в спинной мозг крыс. Однако, важно отметить, что нейросферы имеют гетерогенный состав (Reynolds B.A. et al., 1992), так как НСПК активно дифференцируются в глиальном и нейрональном направлении, что затрудняет получение чистой культуры стволовых клеток. Кроме того, при работе с

суспензионной культурой нейросфер существуют проблемы, связанные с качественной и количественной оценкой клеточного состава нейросфер. В связи с этим на данный момент нами ведутся исследования в области оптимизации протокола получения адгезивной культуры НСПК из обонятельной слизистой оболочки носа крыс и человека (Степанова О.В. и др., 2020) для последующей трансплантации в спинной мозг.

Существует большое количество работ, в которых различные типы клеток человека были изучены для лечения экспериментальных травм спинного мозга (Nistor G.I. et al., 2005; Kaeirstead H.S. et al., 2005; Sharp G. et al., 2010; Emgard M. et al., 2014; Kerr S.L. et al., 2010; Xiao M. et al., 2005; Xiao M. et al., 2007; Лебедев С.В. и др., 2010). В данном исследовании для оценки терапевтических эффектов после трансплантации в спинной мозг были использованы полученные культуры клеток обонятельной выстилки как крыс, так и человека. Изучение клеток человека на экспериментальной модели является необходимой стадией на промежуточных этапах фундаментальных и доклинических исследований. Только после того, как препарат клеток человека будет тщательно изучен на лабораторных животных, при этом будет показана его эффективность и безопасность, данный препарат может быть рекомендован для проведения клинических испытаний.

В данной работе проводили трансплантацию обкладочных клеток в количестве 750 тысяч и 1,5 млн, НСПК в количестве 200 тысяч клеток, а также совместную трансплантацию 750 тысяч обкладочных клеток и 200 тысяч НСПК. Впервые нами показано, что при трансплантации 750 тысяч и 1,5 млн обкладочных клеток крыс и 750 тысяч и 1,5 млн обкладочных клеток человека наблюдается выраженная положительная динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс по результатам тестов ВВВ. При этом 750 тысяч обкладочных клеток являлось достаточным для трансплантации количеством, как в случае клеток крыс, так и человека. Трансплантация обкладочных клеток человека и крыс также способствовала возникновению нейропротективного эффекта, так как при этом не наблюдали

ухудшений показателей динамики восстановления двигательной активности задних конечностей, как в случае контрольной группы. Для того, чтобы оценить вклад в процессы восстановления изучаемых нами клеток обонятельной выстилки, была сформирована вторая контрольная группа животных, которым проводили трансплантацию астроцитов крыс. Трансплантация астроцитов в группе клеточного контроля не оказывала каких-либо эффектов и результаты были сравнимы с контрольной группой, которой трансплантировали среду без клеток. Таким образом, можно говорить, что полученные положительные результаты связаны именно с трансплантацией обкладочных клеток, что может свидетельствовать об их уникальных терапевтических свойствах.

В данной работе показано, что эффект на восстановление двигательной активности задних конечностей крыс от трансплантации 750 тысяч обкладочных клеток как крыс, так и человека был более выраженным, чем при трансплантации 1,5 миллионов клеток. По-видимому, при трансплантации большего количества ксеногенных (в случае клеток человека) и аллогенных (в случае клеток крыс) наблюдается более выраженный иммунный ответ. Известно, что при ауто- и аллотрансплантации активируется клеточный иммунитет, а при ксенотрансплантации - также гуморальный (Cooper D.K. et al., 2015), что может негативно влиять на эффективность трансплантации. Для того, чтобы снизить риск возникновения нежелательных иммунных реакций «трансплантат против хозяина», в экспериментальных исследованиях при трансплантации ксеногенных клеток, в том числе, при трансплантации клеток человека в спинной мозг крыс обычно применяется иммуносупрессивная терапия (Hodgetts S.E. et al., 2013). Однако, существуют данные о том, что применение иммунодепрессантов негативно сказывается на восстановлении функций после повреждения спинного мозга (Yousefifard M. et al., 2016). Кроме того, в данной работе нам необходимо было смоделировать условия, в которых нам можно было бы сравнивать эффекты от трансплантации клеток крыс и человека, что требовало постановки экспериментов в одинаковых

условиях. Поэтому мы отказались от применения иммуносупрессивной терапии для животных, которым трансплантировали клетки человека.

В данной работе при трансплантации 200 тысяч НСПК обонятельной выстилки носа человека показано, что показатели BBB при трансплантации были выше в среднем на 1 балл по сравнению с контрольной группой. Для животных, находящихся на ранней и промежуточной стадиях восстановления функций (до 13 баллов по шкале BBB), улучшения даже на 1 балл являются значительным. Кроме того, трансплантация НСПК может оказывать нейропротективный эффект в отличие от контрольной группы (Voronova A.D. et al., 2020). Однако полученные различия у животных опытной и контрольной групп не были статистически значимыми, таким образом, можно говорить лишь о тенденции к улучшению двигательных функций задних конечностей. При трансплантации НСПК крыс улучшений показателей двигательной активности задних конечностей не было выявлено. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования в области эффективности этих клеток при посттравматических кистах спинного мозга.

Учеными неоднократно были предприняты попытки котрансплантации клеточных препаратов в спинной мозг. Обкладочные клетки обонятельной выстилки применяли в комбинации и с другими типами клеток: эмбриональными стволовыми, шванновскими клетками, мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга (Salehi M. et al., 2009; Wu S et al., 2015). В данных экспериментах получены обнадеживающие результаты, что делает довольно перспективной клеточную котрансплантацию. Также обкладочные клетки вводили совместно с НСПК. Обкладочные клетки для таких экспериментов получали из обонятельных луковиц крыс, источником НСПК был головной мозг плодов крыс (Ao Q. et al., 2007). Клеточная трансплантация такой комбинации после острой травмы спинного мозга значительно улучшала двигательную активность крыс. Однако не было работ, в которых проводили котрансплантацию обкладочных клеток из обонятельной области слизистой оболочки носа и НСПК из того же самого источника в спинной мозг.

В данном исследовании трансплантация такого препарата была проведена впервые. Показано, что трансплантация в комбинации обкладочных клеток и НСПК крыс не способствовала улучшению двигательной активности задних конечностей крыс. Препарат, состоящий из обкладочных клеток и НСПК человека, был более эффективен, чем препарат из НСПК, но менее эффективен, чем препарат из обкладочных клеток. По-видимому, именно обкладочные клетки вносят вклад в наблюдаемый нами терапевтический эффект, однако этот вопрос требует дальнейших исследований. Кроме того, снижение эффективности применения комбинированного препарата по сравнению с препаратом, состоящим только из 750 тысяч обкладочных клеток человека, может быть связано с применением большего количества ксеногенных клеток. Таким образом, необходимы исследования в области поиска оптимальных доз составляющих такого комбинированного препарата для повышения его эффективности.

В данной работе положительные данные по восстановлению двигательной активности задних конечностей были показаны только при трансплантации препаратов обкладочных клеток в кисты, тогда как при трансплантации клеток в спинной мозг при хроническом повреждении без образования кист не было выявлено каких-либо положительных эффектов. Наблюдаемое нами улучшение в опытных группах и контрольной группе при трансплантации в спинной мозг без сформированных кист, по-видимому, связано с возможностью самовосстановления спинного мозга. Как было показано в ряде исследований последних лет, в спинном мозге взрослых млекопитающих, включая людей, присутствуют эндогенные НСПК, которые находятся в эпендиме центрального канала. При моделировании повреждений спинного мозга была продемонстрирована активная динамика пролиферации клеток, экспрессирующих несколько маркеров стволовых клеток, что, в свою очередь, доказывает потенциальную способность к самовосстановлению спинного мозга (Shibuya S. et al., 2009). При трансплантации клеток в область травмы, вероятно, активируются также иммунные реакции, которые могут

приводить к локальному воспалению, что препятствует восстановлению двигательной активности в случае трансплантации клеток в спинной мозг без образования кист.

Наблюдаемый нами положительный терапевтический эффект при трансплантации в кисты, может быть связан с тем, что капсула кисты создает дополнительный физический барьер между трансплантированными клетками и клетками реципиента, тем самым, вероятно, уменьшая иммунный ответ и увеличивая выживаемость трансплантированных клеток. На сегодняшний день существует много исследований, в которых изучали введение трансплантируемых клеток в иммунопротективных капсулах. Инкапсуляция основывается на физическом барьере между трансплантатом и хозяином для иммунопротекции и может быть крайне важна для функционирования трансплантата (Krishnamurthy N.V. et al., 2011). В данном исследовании мы изучили выживаемость обкладочных клеток и НСПК крыс и человека в посттравматических кистах спинного мозга крыс. Было показано, что меченые клетки могут выживать в течение 4 недель после трансплантации в посттравматические кисты спинного мозга и, кроме того, наблюдается миграция клеток в соседние ткани спинного мозга. Таким образом, при трансплантации в кисту создаются условия, когда клетки могут оказывать регенеративный эффект длительное время после трансплантации.

При изучении эффективности клеточных препаратов с помощью визуализации кист методом МРТ до и после трансплантации было показано, что у животных при трансплантации 750 тысяч обкладочных клеток крыс, 750 тысяч и 1,5 миллионов обкладочных клеток человека происходит достоверное уменьшение объемов посттравматических кист по сравнению с контрольной группой. Кроме того, полное исчезновение кист наблюдалось при трансплантации 1,5 миллионов обкладочных клеток человека и 1,5 миллионов клеток крыс. Полученные данные демонстрируют важность персонализированного подхода для последующих клинических исследований

в этой области, когда необходимо учитывать биохимические, физиологические и генетические особенности каждого отдельного пациента.

Таким образом, в работе были показаны значительные эффекты на восстановление двигательной активности задних конечностей при трансплантации обкладочных клеток человека и крыс по данным BBB тестов и анализа МРТ изображений. Как известно, трансплантированные обкладочные клетки могут мигрировать через глиальный рубец и, таким образом, способствовать росту аксонов во время регенерации (Santas-Silva A. et al., 2007). Основные механизмы для объяснения того, как обкладочные клетки могут стимулировать регенерацию нервной ткани: это ремиелинизация нервных волокон, восстанавливающих нервную проводимость в месте повреждения и нейропротективные эффекты нейротрофических факторов, секретируемых трансплантированными клетками. В целом эти растворимые факторы способствуют выживанию нейронов, росту их аксонов, нейронной пластичности и регенерации спинного мозга (Nori S. et al., 2017). Также показано, что обкладочные клетки секретируют матриксные металлопротеиназы, которые способствуют деградации внеклеточного матрикса капсулы кисты, таким образом, способствуя уменьшения ее размеров (Yui S. et al., 2014).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были разработаны протоколы для получения обогащенных культур обкладочных клеток и нейральных стволовых/прогениторных клеток из обонятельной области слизистой оболочки носа крыс и человека. Обкладочные клетки и НСПК обонятельной выстилки, а также препараты, состоящие из комбинации этих клеток, были изучены при посттравматических кистах спинного мозга впервые. Эффективность полученных клеточных препаратов была оценена в тестах по изучению динамики восстановления двигательной активности задних конечностей и с помощью анализа МРТ изображений. Положительные

эффекты были получены при использовании обкладочных клеток как крыс, так и человека. Трансплантация обкладочных клеток способствовала достоверному улучшению показателей двигательной активности задних конечностей и уменьшению размеров кист, а также полному исчезновению кист у некоторых животных.

При трансплантации клеточных препаратов в спинной мозг при хроническом повреждении без образования кист не было выявлено каких-либо положительных эффектов. По-видимому, наблюдаемый положительный терапевтический эффект при трансплантации в кисты, может быть связан с тем, что капсула кисты создает дополнительный физический барьер между трансплантированными клетками и клетками реципиента, тем самым уменьшая иммунный ответ и увеличивая выживаемость трансплантированных клеток. В исследовании нами показано, что трансплантированные в посттравматические кисты спинного мозга клетки детектируются в области кист, а также в соседней к кисте ткани спинного мозга в течение всех 4 недель наблюдения, что может свидетельствовать об их выживаемости и миграции, а также позволяет предполагать, что эти клетки продолжительное время будут оказывать регенеративные эффекты на поврежденный спинной мозг. Положительная динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс может отражать регенеративные процессы в спинном мозге после трансплантации клеточных препаратов обонятельной выстилки в область посттравматических кист.

Разработка оптимальных протоколов для получения клеточных препаратов из обонятельной слизистой оболочки носа и изучение их эффективности при экспериментальных посттравматических кистах спинного мозга создает предпосылки для их успешного использования в доклинических и клинических исследованиях. В перспективе комбинированное применение клеточной терапии клетками обонятельной слизистой оболочки с хирургическими и медикаментозными подходами может позволить значительно снизить инвалидизацию пациентов.

ВЫВОДЫ

1. Разработан оригинальный протокол, который позволяет получить из обонятельной зоны слизистой оболочки носа млекопитающих обогащенную культуру с максимально высоким содержанием обкладочных клеток с фенотипом GFAP/p75NTR⁺.
2. Оптимизирован протокол, позволяющий получить из обонятельной зоны слизистой оболочки носа млекопитающих обогащенную культуру нейральных стволовых/прогениторных клеток в составе нейросфер с наибольшим их содержанием на 2-е сутки культивирования.
3. Выявлено достоверное улучшение двигательной активности задних конечностей крыс по результатам BBB-теста при трансплантации обкладочных клеток крыс и человека в течение 4 недель наблюдений в посттравматические кисты спинного мозга.
4. Анализ объемов кист спинного мозга экспериментальных животных при терапии клеточными препаратами обкладочных, нейральных стволовых/прогениторных клеток млекопитающих и их комбинации позволили установить достоверное ($p < 0,05$) уменьшение размеров кист на 17-35% при трансплантации обкладочных клеток человека и крыс. У 10% животных через 4 недели после трансплантации обкладочных клеток крыс и человека кист не было выявлено.
5. С помощью прижизненного мембранного красителя RKN26 трансплантированные обкладочные и нейральные стволовые/прогениторные клетки были идентифицированы в области кист и прилежащей ткани спинного мозга в течение 4 недель, что свидетельствует об их выживаемости и способности к миграции.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

МРТ – магнитно-резонансная томография

НСПК - нейральные стволовые/прогениторные клетки

ОК – обкладочные клетки

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

ASIA - American Spinal Injury Association - Американская ассоциация
спинальной травмы

BDNF – Brain-Derived Neurotrophic Factor – нейротрофический фактор мозга

CNTF – Ciliary Neurotrophic Factor - цилиарный нейротрофический фактор

GDNF - Glial-cell line Neurotrophic Factor – нейротрофический фактор
глиальных клеток

GFAP – Glial Fibrillary Acidic Protein – кислый глиальный фибриллярный
белок

FGF – фактор роста фибробластов

EGF – эпидермальный фактор роста

IL – InterLeukin – интерлейкин

INF – InterFeron – интерферон

NGF - nerve growth factor - фактор роста нервов

NT – NeuroTrophin - нейротрофин

TNF – tumor necrosis factor – фактор некроза опухоли

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ГОСТ №33215-2014 от 09 ноября 2015 г. «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур».
2. ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами»
3. Spinal Cord Injury Rehabilitation Evidence. 2nd ed. Vancouver: Lulu; 2008. Available at www.scireproject.com. Accessed April 9, 2010.
4. WHO 2013 Bickenbach J., Officer A., Shakespeare T., von Groote P. International Perspectives on Spinal Cord Injury. World Health Organization; 2013. Available from http://www.who.int/disabilities/policies/spinal_cord_injury/report/en/
5. Пат. 2394593 РФ. Трансплантация нервных клеток и тканевая инженерия мозга при нервных болезнях /А.С. Брюховецкий. Оpubл. 20.07.2010.
6. Пат. 2676142 РФ. Способ препарата обкладочных клеток обонятельной выстилки млекопитающих для лечения травм спинного мозга» / Степанова О.В., Чехонин В.П., Решетов И.В., Воронова А.Д., Валихов М.П., Чадин А.В.
7. Пат. 069927 Польша. Methods of the obtaining of olfactory ensheathing cells and their application / W. Jarmundowicz. Оpubл. 21.06.2007.
8. Пат. WO 2001030982 A1. AUS. Olfactory ensheathing cells isolated from the lamina propria / F. Feron. Оpubл. 03.05.2001.
9. Борщенко И. Большая книга упражнений для спины: комплекс «Умный позвоночник». Front Cover. АСТ. — 2017.
10. Быков В.Л. Частная гистология человека (краткий обзорный курс). 2-е изд. - СПб.: СОТИС, 1997.
11. Cramer G.D. Clinical anatomy of the spine, spinal cord, and ANS // Elsevier Health Sciences. — 2014. — P. 135-209.
12. Fehlings M.G., Vaccaro A.R., Boakye M., Rossignol S., Ditunno J.F., Burns A.S. Essentials of Spinal Cord Injury: Basic Research to Clinical Practice. Denver, CO: Thieme Medical Publishers Inc. — 2013.
13. Van Pham P. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, Characterization and Applications // Science. — 2017.
14. American Spinal Injury Association. International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury, 2002 Revision. Chicago, IL: American Spinal Injury Association. — 2002.

15. <https://www.ninds.nih.gov/disorders/patient-caregiver-education/factsheets/syringomyelia-fact-sheet>.
16. Баринов А.Н. Невропатический болевой синдром при болях в спине // Трудный пациент. – 2011. – № 1. – с. 17–23.
17. Виссарионов С.В., Баиндурашвили А.Г., Крюкова И.А. Международные стандарты неврологической классификации травмы спинного мозга (шкала asia/isncsci, пересмотр 2015 года) // Ортопедия, травматология и восстановительная хирургия детского возраста. – 2016. – № 2. – с. 67-72.
18. Волкова Н. С., Ермаков А. С. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и современные методы их получения // Царскосельские чтения. – 2016. – № XX. – с. 255-261.
19. Воронова А.Д., Степанова О.В., Чадин А.В., Решетов И.В., Чехонин В.П. Клеточная терапия при травмах спинного мозга // Вестник РАМН. – 2016. – № 6. – с. 420-426.
20. Воронова А.Д., Степанова О.В., Валихов М.П., Чадин А.В., Семкина А.С., Карсунцева Е.К., Фурса Г.А., Решетов И.В., Чехонин В.П. Комбинированный препарат клеток обонятельной выстилки человека в терапии посттравматических кист спинного мозга // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2020. – № 2. – с. 79-83.
21. Лебедев С.В., Карасёв А.В., Чехонин В.П., Савченко Е.А., Викторов И.В., Челышев Ю.А., Шаймарданова Г.Ф. Исследование эффективности трансплантации нейральных стволовых клеток человека крысам с травмой спинного мозга: применение функциональных нагрузочных тестов и метода ВВВ // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2010. – Т. 149. – № 3. – с. 355-360.
22. Морозов И.Н., Млявых С.Г. Эпидемиология позвоночно-спинномозговой травмы (обзор) // Медицинский альманах. – 2011. – № 4. – с. 157-159.
23. Маккиарини П., Кондратьева Е. Особенности этической экспертизы при планировании и проведении клинических исследований в регенеративной медицине // Гены и клетки. – 2011. – Т.6. – № 4. – с. 111–118.
24. Слынько, Е. И., Дядечко, А. А., Аль-кашкиш, И. И. Хирургическая тактика и результаты лечения посттравматической сирингомиелии // Ukrainian Neurosurgical Journal. – 2013. – № 4 – с. 8-11.
25. Степанова О.В., Воронова А.Д., Фурса Г.А., Карсунцева Е.К., Валихов М.П., Чадин А.В., Вишневский Д.А., Решетов И.В., Чехонин В.П. Получение адгезивной культуры нейральных стволовых/прогениторных клеток

- обонятельной выстилки для терапии травм спинного мозга // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2020. – №3. – с. 202-208.
26. Тихомирова А.В., Горячев Д.В., Меркулов В.А., Лысикова И.В., Губенко А.И., Зебрев А.И., Соловьева А.П., Ромодановский Д.П., Мельникова Д.В. Доклинические и клинические аспекты разработки биомедицинских клеточных продуктов // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2018. – Т.8. – №1. – с. 23-35.
27. Шагидулин М.Ю., Волкова Е.А., Метельский С.Т., Севастьянов В.И. Опыт организации и проведения экспериментальных исследований в фгбу «НМИЦ ТИО имени акад. В.И. Шумакова» // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2017. – Т.19. – № 4. – с. 104-112.
28. Agudo M., Woodhoo A, Webber D. et al. Schwann cell precursors transplanted into the injured spinal cord multiply, integrate and are permissive for axon growth // *Glia*. – 2008. – V. 56. – № 12. – P. 1263–70.
29. Alizadeh A. Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms // *Front Neurol*. – 2019. – № 10. – с. 282.
30. Amemori T., Jendelova P., Ruzickova K., Arboleda D., Sykova E. Co-transplantation of olfactory ensheathing glia and mesenchymal stromal cells does not have synergistic effects after spinal cord injury in the rat // *Cytotherapy*. – 2010. – V. 12. – №2. – P. 212–225.
31. Anderson A.J., Haus D.L., Hooshmand M.J. et al. Achieving stable human stem cell engraftment and survival in the CNS: is the future of regenerative medicine immunodeficient? // *Regen Med*. – 2011. – V. 6. – № 3. – P. 367–406.
32. Anderson K.D., Guest J.D., Dietrich W.D. et al. Safety of Autologous Human Schwann Cell Transplantation in Subacute Thoracic Spinal Cord Injury // *J Neurotrauma*. – 2017. – V. 34. – №21. – P. 2950-63.
33. Ankeny D.P., Popovich P.G. B cells and autoantibodies: complex roles in CNS injury // *Trends Immunol*. – 2010. – V. 31. – № 9. – P. 332-8.
34. Anwar M.A., Al Shehabi T.S., Eid A.H. Inflammogenesis of Secondary Spinal Cord Injury // *Front Cell Neurosci*. – 2016. – V. 10. – P. 98.
35. Ao Q., Wang A.J., Chen G.Q. et al. Combined transplantation of neural stem cells and olfactory ensheathing cells for the repair of spinal cord injuries // *Med Hypotheses*. – 2007. – V. 69. – № 6. – P. 1234-7.
36. Aoki M., Kishima H., Yoshimura K., Ishihara M., Ueno M., Hata K., Yamashita T., Iwatsuki K., Yoshimine T. Limited functional recovery in rats with complete spinal cord injury after transplantation of whole-layer olfactory mucosa:

- laboratory investigation // J Neurosurg Spine. 2010. – V. – 12. – №2. – P. 122–130.
37. Atlas S.W., ed. Lippincott Williams & Wilkins. Spinal Trauma in Magnetic Resonance Imaging of the Brain and Spine. // American Journal of Neuroradiology. 4th ed. — 2009. — V. 30. — № 5. — e76-e77.
 38. Au E., Roskams A.J. Olfactory ensheathing cells of the lamina propria in vivo and in vitro // Glia. — 2003. — V. 41. — P. 224–236.
 39. Barger S.W., Goodwin M.E., Porter M.M. et al. Glutamate release from activated microglia requires the oxidative burst and lipid peroxidation // J Neurochem. — 2007. — V.101. — № 5. — P.1205-13.
 40. Barnett S.C., Riddell J.S. Olfactory ensheathing cell transplantation as a strategy for spinal cord repair — what can it achieve? // Nat Clin Pract Neurol. — 2007. — V.3. — № 3. — P.152–61.
 41. 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. — V.12. — № 1. — P. 1–21.
 42. Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection // Exp Neurol. — 1996. — V. 139. — № 2. — P. 244-56.
 43. Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. et al. . MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study // J Neurotrauma. — 1996. — V.13. — P. 343–59.
 44. Beattie M.S., Bresnahan J.C., Komon J. et al. Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat // Exp Neurol. — 1997. — V. 148. — P. 453–63.
 45. Ben-Hur T. Reconstructing neural circuits using transplanted neural stem cells in the injured spinal cord // J. Clin. Invest. — 2010. — V. 120. — P. 3096–98.
 46. Bez A., Corsini E., Curti D., et al. Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization // Brain Res. — 2003. — V. 993. — № 1–2. — P. 18–29.
 47. Bianco J.I., Perry C., Harkin D.G. et al. Neurotrophin 3 promotes purification and proliferation of olfactory ensheathing cells from human nose // Glia. — 2004. — V. 4. — P. 111–23.

48. Bhanot Y., Rao S., Ghosh D. et al. Autologous mesenchymal stem cells in chronic spinal cord injury —Br J Neurosurg. — 2011. — V. 25. — № 4. —P. 516-22.
49. Blair K., Wray J., Smith A. The liberation of embryonic stem cells // PLoS Genet. —2011. —V. 7— № 4. —e1002019.
50. Bonfield C.M., Levi A.D., Arnold P.M. et. al. Surgical management of post-traumatic syringomyelia // Spine. —2010. —V. 35. — 21 S. —S. 245-258.
51. Bonner J.F., Connors T.M., Silverman W.F., Kowalski D.P., Lemay M.A., Fischer I. Grafted neural progenitors integrate and restore synaptic connectivity across the injured spinal cord // J. Neurosci. — 2011. —V. 31. —P. 4675–86.
52. Borgmann-Winter K., Willard S.L., Sinclair D. et al. Translational potential of olfactory mucosa for the study of neuropsychiatric illness // Transl Psychiatry. —2015. — № 5. —e527.
53. Bozzo A., Marcoux J., Radhakrishna M. et al. The role of magnetic resonance imaging in the management of acute spinal cord injury. // J Neurotrauma. — 2011. —V. 28. — P. 1401–1411.
54. Bradbury E.J., Burnside E.R. Moving beyond the glial scar for spinal cord repair // Nat Commun. —2019. —V. 10. — № 1. —P. 3879.
55. Bregman B.S., Reier P.J. Neural tissue transplants rescue axotomized rubrospinal cells from retrograde death // J Comp Neurol. — 1986. — V. 244. — № 1. — P. 86-95.
56. Bretzner F., Liu J., Currie E., Roskams A.J., Tetzlaff W. Undesired effects of a combinatorial treatment for spinal cord injury transplantation of olfactory ensheathing cells and BDNF infusion to the red nucleus // Eur J Neurosci. — 2008. — V. 28. —№9. — P.1795–1807.
57. Bretzner F., Plemel J.R., Liu J. et al. Combination of olfactory ensheathing cells with local versus systemic cAMP treatment after a cervical rubrospinal tract injury // J Neurosci Res. — 2010. — V. 88. — № 13. — P. 2833-46.
58. Brustle O., Jones K.N., Learishet R.D. et al. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. // Science. — 1999. — V. 285. — № 5428. — P. 754–756.
59. Carwardine D., Prager J., Neeves J., Muir E.M., Uney J., Granger N., Wong L.F. Transplantation of canine olfactory ensheathing cells producing chondroitinase ABC promotes chondroitin sulphate proteoglycan digestion and axonal sprouting following spinal cord injury // PLoS One. — 2017. — V.12. — №12. — e0188967.

60. Carpenter M.K., Inokuma M.S., Denham J., Mujtaba T., Chiu C.P., Rao M.S. Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells // *Exp Neurol.* — 2001. — V. 172. — № 2. — P. 383–397.
61. Centenaro L.A., Jaeger Mda C., Ilha J., de Souza M.A., Kalil-Gaspar P.I., Cunha N.B., Marcuzzo S., Achaval M. Olfactory and respiratory lamina propria transplantation after spinal cord transection in rats: effects on functional recovery and axonal regeneration // *Brain Res.* — 2011. — V. — 1426. — P. 54–72.
62. Centenaro L., Cunha Jaeger M., Ilha J., Souza M., Balbinot L., do Nascimento P., Marcuzzo S., Achaval M. Implications of olfactory lamina propria transplantation on hyperreflexia and myelinated fiber regeneration in rats with complete spinal cord transection // *Neurochem Res.* — 2013. — V. 38(2). — P. 371–381.
63. Chehrehasa F., Winds LCE, Ekberg JAK, et al. Olfactory glia enhance neonatal axon regeneration // *Mol Cell Neurosci.* — 2010. — V. 45. — № 3. — P. 277–288.
64. Cheng I., Mayle R.E., Cox C.A. et al. Functional assessment of the acute local and distal transplantation of human neural stem cells after spinal cord injury // *Spine J.* — 2012. — № 12. — P. 1040–44.
65. Chen J.H., Lee D.C., Chen M.S. et al. Inhibition of neurosphere formation in neural stem/progenitor cells by acrylamide // *Cell Transplant.* — 2015. — V. 24. — № 5. — P. 779–96.
66. Cheriyan T., Ryan D.J., Weinreb J.H. et al. Spinal cord injury models: a review. // *Spinal Cord.* — 2014. — V. 52. — P. 588–95.
67. Cherry J.D., Olschowka J.A., O'Banion M.K. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed // *J Neuroinflammation.* — 2014. — V. 11. — P. 98.
68. Choo A.M., Liu J., Liu Z. et al. Modeling spinal cord contusion, dislocation, and distraction: characterization of vertebral clamps, injury severities, and node of Ranvier deformations // *J Neurosci Methods.* — 2009. — V. 181. — P. 6–17.
69. Chuah M.I., Teague R. Basic fibroblast growth factor in the primary olfactory pathway: mitogenic effect on ensheathing cells // *Neurosci.* — 1999. — V. 88. — P. 1043–50.
70. Cloutier F., Kalincik T., Lauschke J., Tuxworth G., Cavanagh B., Meedeniya A., Mackay-Sim A., Carrive P., Waite P. Olfactory ensheathing cells but not fibroblasts reduce the duration of autonomic dysreflexia in spinal cord injured rats // *Auton Neurosci.* — 2016. — V. 201. — P. 17–23.

71. Cofano F., Boido M., Monticelli M., et al. Mesenchymal Stem Cells for Spinal Cord Injury: Current Options, Limitations, and Future of Cell Therapy // *Int J Mol Sci.* — 2019. — V. 20. — № 11. — P. 2698.
72. Collaborators, G. T. B. a. S. C. I. 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 2016 // *Lancet Neurol.* — 2019. — V. 18. — P. 56–87.
73. Constantini S., Young W. The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats // *J Neurosurg.* — 1994. V. 80. — № 1. — P. 97–111.
74. Cooper D.K., Bottino R. Recent advances in understanding xenotransplantation: implications for the clinic // *Expert Rev Clin Immunol.* — 2015. — V. 11. — № 12 — P. 1379–1390.
75. Cregg J.M., DePaul M.A., Filous A.R. et al. Functional regeneration beyond the glial scar // *Exp Neurol.* 2014. — V. 253. — P. 197–207.
76. Csobonyeiova M., Polak S., Zamborsky R. et al. Recent Progress in the Regeneration of Spinal Cord Injuries by Induced Pluripotent Stem Cells // *Int J Mol Sci.* — 2019. — V. 20. — № 15. — P. 3838.
77. Curt A, Keck ME, Dietz V. Functional outcome following spinal cord injury: significance of motor-evoked potentials and ASIA scores // *Arch Phys Med Rehabil.* — 1998. — V. 79. — P. 81–86.
78. Curt A., Dietz V. Electrophysiological recordings in patients with spinal cord injury: significance for predicting outcome // *Spinal Cord.* — 1999. — V. 37. — P. 157–65.
79. Cuschieri A., Bannister L.H. The development of the olfactory mucosa in the mouse: electron microscopy // *Anat.* — 1975. — V. 119. — Pt. 3. — P. 471–98.
80. Czaja K., Fornaro M., Geuna S. Neurogenesis in the adult peripheral nervous system // *Neural Regen Res.* — 2012. — V. 7. — № 14 — P. 1047–1054.
81. Demaerel P. Magnetic resonance imaging of spinal cord trauma: a pictorial essay // *Neuroradiology.* — 2006ю — V. 48. — P. 223–232.
82. Dey I., Midha N., Singh G. et al. Diabetic Schwann cells suffer from nerve growth factor and neurotrophin-3 underproduction and poor associability with axons // *Glia.* — 2013. — V. 61. — P. 1990–99.

83. Di Prospero N.A., Meiners S., Geller H.M. Inflammatory cytokines interact to modulate extracellular matrix and astrocytic support of neurite outgrowth // *Experimental Neurology*. —1997. — V. 148. — № 2. — P. 628-39.
84. Donovan W.H., Dimitrijevic M.R., Dahm L. et al. Neurophysiological approaches to chronic pain following spinal cord injury // *Paraplegia*. —1982. — V. 20. — № 3. — P. 135- 46.
85. Doucette R . PNS-CNS transitional zone of the first cranial nerve // *J Comp Neurol* 1991. —V. 312. — P. 451–66.
86. Emgard M., Piao J., Aineskog H., et al. Neuroprotective effects of human spinal cord-derived neural precursor cells after transplantation to the injured spinal cord // *Exp Neurol*. — 2014. — V. 253. — P. 138–45.
87. Faulkner J.R. Reactive Astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury // *The Journal of Neuroscience*. — 2004. —V. 24. — № 9. — P. 243-255.
88. Feron F., Perry C., Cochrane J., et al. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury // *Brain*. — 2005. —V. 128. — № 12. — P. 2951– 60.
89. Frankel H. Ascending cord lesion in the early stages following spinal injury // *Spinal Cord*. — 1969. — V. 7. — P. 111–118.
90. Franklin R.J., Gilson J.M., Franceschini I.A. Schwann cell-like myelination following transplantation of an olfactory bulb-ensheathing cell line into areas of demyelination in the adult CNS // *Glia*. —1996. —V. 17. — P. 217–24.
91. Friedenstein A.J., Deriglasova U.F., Kulagina N.N. et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method // *Exp Hematol*. —1974. — V. 2. — № 2. —P. 83–92.
92. Fujimoto Y., Abematsu M., Falk A. et al. Treatment of a mouse model of spinal cord injury by transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived long- term self-renewing neuroepithelial-like stem cells // *Stem Cells*. — 2012; — V. 30. — № 6. —P. 1163–73.
93. Gadani S.P., Walsh J.T., Lukens, J.R. et al. Dealing with Danger in the CNS: The Response of the Immune System to Injury // *Neuron*. — 2015. — V. 87. — № 1. — P. 47-62. (13)
94. Gallo V., Deneen B. Glial development: The crossroads of regeneration and repair in the CNS // *Neuron*. — 2014. — V. 83 —P. 283-308.

95. Gage FH. Mammalian neural stem cells // *Science*. —2000. —V. 287. — № 5457. —P. 1433- 8.
96. Gazdic M., Volarevic V., Harrell C.R., Fellabaum C., Jovicic N., Arsenijevic N., Stojkovic M. Stem Cells Therapy for Spinal Cord Injury // *Int J Mol Sci*. — 2018. — V. 9. — № 4. — pii: E1039.
97. Garcia E., Rodríguez-Barrera R., Mondragón-Caso J. et al. Pharmacological and Nonpharmacological Therapeutic Strategies Based on the Pathophysiology of Acute and Chronic Spinal Cord Injury. —2018.
98. Godinho M. J., Teh L., Pollett M. A. et al. Immunohistochemical, ultrastructural and functional analysis of axonal regeneration through peripheral nerve grafts containing Schwann cells expressing BDNF, CNTF or NT3 // *PLoS ONE*. — 2013. — V. 8. —e69987.
99. Gomes E.D., Mendes S.S., Assunção-Silva R.C. et al. Co-Transplantation of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells and Olfactory Ensheathing Cells for Spinal Cord Injury Repair // *Stem Cells*. — 2018. — V. 36. — № 5. —P. 696-708.
100. Gómez-López S., Wiskow O., Favaro R. et al. Sox2 and Pax6 maintain the proliferative and developmental potential of gliogenic neural stem cells In vitro. *Glia*. — 2011. —V. 59. — № 11. — P. 1588–99.
101. Goritz C., Dias D.O., Tomilin N. et al. A Pericyte Origin of Spinal Cord Scar Tissue // *Science*. — 2011. — V. 333. — № 6039. — P. 238–42.
102. Gorrie C.A., Hayward I., Cameron N., Kailainathan G., Nandapalan N., Sutharsan R., Wang J., Mackay-Sim A., Waite P.M. Effects of human OEC-derived cell transplants in rodent spinal cord contusion injury // *Brain Res*. — 2010. — V. 1337. —P. 8–20.
103. Gregoire C.A., Goldenstein B.L., Floriddia E.M. et al. Endogenous neural stem cell responses to stroke and spinal cord injury // *Glia*. — 2015. — V. 63. — P. 1469–82.
104. Guest J., Santamaria A.J., Benavides F.D. Clinical translation of autologous Schwann cell transplantation for the treatment of spinal cord injury // *Curr Opin Organ Transplant*. — 2013. — V. 18. — № 6. — P. 682-89.
105. Gueye Y., Ferhat L., Sbairi O. et al. Trafficking and secretion of matrix metalloproteinase-2 in olfactory ensheathing glial cells: A role in cell migration? // *Glia*. — 2011. —V. 59. - № 5. — P. 750-70.
106. Hastings B.M., Ntsiea M.V., Olorunju S. Factors that influence functional ability in individuals with spinal cord injury: A cross-sectional, observational study // *S Afr J Physiother*. 2015. —V. 71. — № 1. — P. 235.

107. Hawryluk G.W., Mothe A., Wang J., et al. An in vivo characterization of trophic factor production following neural precursor cell or bone marrow stromal cell transplantation for spinal cord injury // *Stem Cells Dev.* — 2012. — V. 21. — P.2222–38.
108. Heimburger R.F. Return of function after spinal cord transection // *Spinal Cord.* — 2005. — V. 43. — P. 438–40.
109. Hodgetts S.I. Simmons P.J., Plant G.W. A comparison of the behavioral and anatomical outcomes in sub-acute and chronic spinal cord injury models following treatment with human mesenchymal precursor cell transplantation and recombinant decorin // *Exp Neurol.* — 2013. — V. 248. — P. 343-59.
110. Hofstetter C.P., Holmstrom N.A., Lilja J.A. et al. Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome // *Nat Neurosci.* — 2005. — V. 8. — P. 346–53. (132)
111. Hsieh J.Y., Wang H.W., Chang S.J. et al. Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis // *PLoS One.* — 2013. — V. 8. — № 8. — e72604.
112. Iannotti C., Ping Zhang Y., Shields C. B. et al. A neuroprotective role of glial cell line-derived neurotrophic factor following moderate spinal cord contusion injury // *Exp. Neurol.* — 2004. — V. 189. — P. 317–32.
113. Ichim T.E., Solano F., Lara F. et al. Feasibility of combination allo- geneic stem cell therapy for spinal cord injury: a case report // *Int Arch Med.* 2010. — V. 3. — P. 30.
114. Imaizumi T., Lankford K.L., Waxman S.G. et al. (1998) Transplanted olfactory ensheathing cells remyelinate and enhance axonal conduction in demyelinated dorsal column of the rat spinal cord // *J Neurosci.* 1998. — V. 18. — P. 6176–85.
115. Iwatsuki K, Yoshimine T, Kishima H, Aoki M, Yoshimura K, Ishihara M, Ohnishi Y, Lima C. Transplantation of olfactory mucosa following spinal cord injury promotes recovery in rats // *Neuroreport.* 2008. — V. 19. — №13. — P.1249–52.
116. Jacobs S.R., Yeane N.K., Herbison G.J. Future ambulation prognosis as predicted by somatosensory evoked potentials in motor complete and incomplete quadriplegia // *Arch Phys Med Rehabil.* —1995. — V. 76. — P. 635–41.
117. Schwob J.E. Neural Regeneration and the Peripheral Olfactory System // *The anatomical record (new anat.).* — 2022. — V. 269. — P. 33–49.

118. Jones T.B. Lymphocytes and autoimmunity after spinal cord injury // *Exp Neurol.* — 2014. — V. 258. — P. 78-90.
119. Joshi M., Fehlings M.G. Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse: Part 1. Clip design, behavioral outcomes, and histopathology // *J Neurotrauma.* — 2002. — V. 19. — P. 175–90.
120. Kalincik T., Jozefcikova K., Sutharsan R., Mackay-Sim A., Carrive P., Waite P.M. Selected changes in spinal cord morphology after T4 transection and olfactory ensheathing cell transplantation // *Auton Neurosci.* — 2010. — V. 158. — №1–2. — P. 31–38.
121. Kanno H., Pearse D.D., Ozawa H., Itoi E., Bunge M.B. Schwann cell transplantation for spinal cord injury repair: its significant therapeutic potential and prospectus // *Rev Neurosci.* — 2015. — V. 26. — № 2. — P. 121-8.
122. Keirstead H.S., Nistor G., Bernal G. et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury // *J Neurosci.* — 2005. — V. 25. — № 19. — P. 4694–705.
123. Kerr C.L., Letzen B.S., Hill C.M. et al. Efficient differentiation of human embryonic stem cells into oligodendrocyte progenitors for application in a rat contusion model of spinal cord injury // *Int J Neurosci.* — 2010. — V. 120. — P. 305–13.
124. Kim M.S., Kim S.H. Syringomyelia associated with a spinal arachnoid cyst // *J Korean Neurosurg Soc.* — 2009. — V. 45. — № 5. — P. 315–317.
125. Kim Y.C., Kim Y.H., Kim J.W. et al. Transplantation of Mesenchymal Stem Cells for Acute Spinal Cord Injury in Rats: Comparative Study between Intralesional Injection and Scaffold Based Transplantation // *J Korean Med Sci.* — 2016. — V. 31. — № 9. — P. 1373-82.
126. Kim Y.H., Ha K.Y., Kim S.I. Spinal Cord Injury and Related Clinical Trials // *Clin Orthop Surg.* — 2017. — V. 9. — № 1. — P. 1–9.
127. Kishk N.A., Gabr H., Hamdy S. et al. Case control series of intrathecal autologous bone marrow mesenchymal stem cell therapy for chronic spinal cord injury // *Neurorehabil Neural Repair.* — 2010. — V. 24. — № 8. — 702–708.
128. Kobayashi Y., Okada Y., Itakura G. et al. Pre-evaluated safe human iPSC-derived neural stem cells promote functional recovery after spinal cord injury in common marmoset without tumorigenicity // *PLoS One.* — 2012. — V. 7. — № 12. — e52787.

129. Kohta M., Kohmura E., Yamashita T. Inhibition of TGF-beta1 promotes functional recovery after spinal cord injury // *Neuroscience Research*. — 2009. — V. 65. — № 4. — P. 393-401.
130. Krause J.S., Sternberg M., Lottes S. et al. Mortality after spinal cord injury: an 11-year prospective study // *Arch Phys Med Rehabil*. — 1997. — V. 78. — № 8. — P. 815-21.
131. Krishnamurthy N.V., Gimi B. Encapsulated cell grafts to treat cellular deficiencies and dysfunction // *Crit Rev Biomed Eng*. — 2011. — V. 39. — № 6. — P. 473-491.
132. Kwon B.K., Liu J., Messerer C. et al. Survival and Regeneration of Rubrospinal Neurons 1 Year After Spinal Cord Injury // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2002. — V. 99. — № 5. — P. 3246-3251.
133. Kwon B.K., Stammers A.M., Belanger L.M. et al. Cerebrospinal fluid inflammatory cytokines and biomarkers of injury severity in acute human spinal cord injury // *J Neurotrauma*. — 2010. — V. 27. — № 4. — P. 669-82.
134. Kwon B.K., Streijger F., Hill C.E. et al. Large animal and primate models of spinal cord injury for the testing of novel therapies // *Exp Neurol*. — 2015. — V. 269. — P.154-68.
135. Kwon B.K., Okon E.B., Plunet W. et al. A systematic review of directly applied biologic therapies for acute spinal cord injury // *Journal of Neurotrauma*. — 2011. — V. 28. — № 8. — P. 1589-1610.
136. Lammertse D., Dungan D., Dreisbach J. et al. Neuroimaging in traumatic spinal cord injury: an evidence-based review for clinical practice and research // *J Spinal Cord Med*. — 2007. — V. 30. — P. 205-214.
137. Lee-Kubli C.A., Lu P. Induced pluripotent stem cell-derived neural stem cell therapies for spinal cord injury // *Neural Regen Res*. — 2015. — V. 10. — № 1. — P. 10-16.
138. Leung J.Y., Chapman J.A., Harris J.A. et al. Olfactory ensheathing cells are attracted to, and can endocytose, bacteria // *Cell Mol Life Sci*. — 2008. — V. 65. — № 17. — P. 2732-39.
139. Li B.C., Xu C., Zhang J.Y., Li Y., Duan Z.X. Differing Schwann cells and olfactory ensheathing cells behaviors, from interacting with astrocyte, produce similar improvements in contused rat spinal cord's motor function // *J Mol Neurosci*. — 2012. — V. 48. — №1. — P. 35-44.
140. Li J., Lepski G. Cell transplantation for spinal cord injury: a systematic review // *Biomed Res Int*. — 2013. — 2013:786475.

141. Li L.S., Yu H., Raynald R. et al. Anatomical Mechanism of Spontaneous Recovery in Regions Caudal to Thoracic Spinal Cord Injury Lesions in Rats // *Peer. J.* 2017. — V. 5. — e2865.
142. Lima C., Pratas-Vital J., Escada P. et al. Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study // *J Spinal Cord Med.* — 2006. — V. 29. — № 3. — P. 191-206.
143. Lindsay S.L., Johnstone S.A., Mountford J.C. et al. Human mesenchymal stem cells isolated from olfactory biopsies but not bone enhance CNS myelination in vitro // *Glia.* — 2013. — V. 61. — № 3. — P. 368-82.
144. Lindsay S.L., Toft A., Griffin J. et al. Human olfactory mesenchymal stromal cell transplants promote remyelination and earlier improvement in gait co-ordination after spinal cord injury // *Glia.* — 2017. — V. 65. — №4. — P. 639-656.
145. Losey P., Anthony D.C. Impact of vasculature damage on the outcome of spinal cord injury: a novel collagenase-induced model may give new insights into the mechanisms involved // *Neural Regen Res.* — 2014. V. 9. — № 20. —1783-6.
146. Lukovic D., Moreno-Manzano V., Lopez-Mocholi E. et. al. Complete rat spinal cord transection as a faithful model of spinal cord injury for translational cell transplantation // *Sci. Repts.* — 2015. — V. 5. — P. 9640.
147. Lu P., Wang, Y., Graham, L., McHale, K., Gao, M., Wu, D., Brock, J., Blesch, A., Rosenzweig, E. S., Havton, L. A. et al. Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury // *Cell.* — 2012. —V. 150. — P. 1264-73.
148. Mackay-Sim A., St John J.A. Olfactory ensheathing cells from the nose: clinical application in human spinal cord injuries. *Exp Neurol.* — 2011. — V. 229. — № 1. —P. 174–180.
149. Mackay-Sim A. Olfactory mucosa: neural stem and progenitor cells for nervous system repair and cell models of brain disease // *Progenitor and Stem Cell Technologies and Therapies.* — 2012. — P. 309–30.
150. Malgieri A., Kantzari E., Patrizi M.P., Gambardella S. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art // *Int J Clin Exp Med.* —2010. — V. 3. — № 4. —P. 248–269.
151. Mantovani A., Sica A., Sozzani S. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization // *Trends Immunol.* —2004. — V. 25. — № 12. — P. 677-86.

152. Marcol W., Slusarczyk W., Gzik M. et al. Air gun impactor—a novel model of graded white matter spinal cord injury in rodents // *Reconstr. Microsurg.* — 2012. — V. 28. — № 8. — 561–568.
153. Matsui T, Svensson C.I., Hirata Y. et al. Release of prostaglandin E(2) and nitric oxide from spinal microglia is dependent on activation of p38 mitogen-activated protein kinase // *Anesth Analg.* —2010. — V. 111. — № 2. — P. 554–60.
154. Mayeur A., Duclos C., Honoré A. et al. Potential of olfactory ensheathing cells from different sources for spinal cord repair // *PLoS One.* — 2013. V. 8. — № 4. — e62860.
155. McDonald JW, et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord // *Nat Med.* — 1999. — V. 5. — № 12. —P. 1410–12.
156. Mohrman A.E., Farrag M., Huang H. et al. Spinal Cord Transcriptomic and Metabolomic Analysis after Excitotoxic Injection Injury Model of Syringomyelia // *J Neurotrauma.*— 2017. — V. 34. — № 3. — P. 720-733.
157. Muniswami D.M., Kanakasabapathy I., Tharion G. Globose basal cells for spinal cord regeneration // *Neural Regen. Res.* — 2017. — V. 12. —№ 11. — P. 1895-1904.
158. Murrell W., Féron F., Wetzig A. et al. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa // *Dev Dyn.* — 2005. — V. 233. — № 2. — P. 496–515.
159. Nakhjavan-Shahraki B., Yousefifard M., Rahimi-Movaghar V. et al. Transplantation of olfactory ensheathing cells on functional recovery and neuropathic pain after spinal cord injury; systematic review and meta-analysis // *Sci Rep.* — 2018. — V. 8. — P. 325.
160. Nardone R., Florea C., Holler Y. et al. Rodent, large animal and non-human primate models of spinal cord injury // *Zoology.* — 2017. — V. 123. — P. 101–114.
161. Nazareth L., Lineburg K.E., Chuah M.I. et al. Olfactory ensheathing cells are the main phagocytic cells that remove axon debris during early development of the olfactory system // *J Comp Neurol.* — 2015. — V. 523. — № 3. — P. 479–94.
162. Nishikawa S., Goldstein R.A., Nierras C.R. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy // *Nat Rev Mol Cell Biol.* — 2008. — V. 9. — № 9. — P. 725–29.

163. Nistor G.I., Totoiu M.O., Haque N., Carpenter M.K. et al. Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation // *Glia*. — 2005. — V. 49. — № 3. — P. 385–96.
164. Nori S., Okada Y., Yasuda A. et al. Grafted human-induced pluripotent stem-cell- derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice // *Proc Natl Acad Sci U S A*. — 2011. — V. — 108. — № 40. — P. 16825–30.
165. Nori S., Nakamura M., Okano H. Plasticity and regeneration in the injured spinal cord after cell transplantation therapy // *Prog Brain Res*. — 2017. — V. 231. — P. 33-56.
166. Nulle A., Tjurina U., Erts R. et al. A profile of traumatic spinal cord injury and medical complications in Latvia // *Spinal Cord Series and Cases*. — 2017. — V. 3. — P.17088.
167. Ohnishi Y., Iwatsuki K., Ishihara M. et al. Isolation of human adult olfactory sphere cells as a cell source of neural progenitors // *Stem Cell Research*. — 2015. — V. 15. — № 1. — P. 23-29.
168. Onifer S.M., Nunn C.D., Decker J.A. et al. Loss and spontaneous recovery of forelimb evoked potentials in both the adult rat cuneate nucleus and somatosensory cortex following contusive cervical spinal cord injury // *Exp. Neurol*. — 2007. — V. 207 — P. 238–247.
169. Orr M.B., Gensel J.C. Interactions of primary insult biomechanics and secondary cascades in spinal cord injury: implications for therapy // *Neural Regen Res*. — 2017. — V. 12. — P. 1618.
170. Oyibo C.A. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade // *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. — 2011. — V. 71. — № 2. — P.281-299.
171. Pan J.Z., Ni L., Sodhi A., et al. Cytokine activity contributes to induction of inflammatory cytokine mRNAs in spinal cord following contusion // *J Neurosci Res*. — 2002. — V. 68. — № 3. — P. 315-22.
172. Panni P., Ferguson I.A., Beacham I. et al. Phagocytosis of bacteria by olfactory ensheathing cells and Schwann cells // *Neurosci Lett*. — 2013. — V. 539. — P. 65–70.
173. Parizel P.M., van der Zijden T., Gaudino S. et al. Trauma of the spine and spinal cord: imaging strategies // *Eur Spine J*. 2010. — V. 19. — Suppl 01. — S8–S17.

174. Park I.H., Zhao R., West J.A. et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors // *Nature*. — 2008. — V. 451. — № 7175. — P. 141–6.
175. Parr A.M., Kulbatski I., Tator C.H. Transplantation of adult rat spinal cord stem/progenitor cells for spinal cord injury // *J Neurotrauma*. — 2007. — V. 24. — P. 835-45.
176. Pearce D.D., Bunge M.B. Designing cell- and gene-based regeneration strategies to repair the injured spinal cord // *J Neurotrauma*. — 2006. — V. 23. — № 3-4. — P. 438–452.
177. Pertici V., Trimaille T., Laurin J. et al. Repair of the injured spinal cord by implantation of a synthetic degradable block copolymer in rat // *Biomaterials*. — 2014. — V. 35. — № 24. — P. 6248-58.
178. Pineau I., Lacroix S. Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved // *J Comp Neurol*. — 2007. — V. 500. — № 2. — P. 267-85.
179. Piltti K.M., Salazar D.L., Uchida N., Cummings B.J., Anderson A.J. Safety of human neural stem cell transplantation in chronic spinal cord injury // *Stem Cells Transl. Med*. — 2013. — V. 2. — P. 961–74.
180. Pouw M.H., Hosman A.J., van Middendorp J.J. et al. Biomarkers in spinal cord injury // *Spinal Cord*. — 2009. — V. 47. — № 7. — P. 519-25.
181. Prockop D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues // *Science*. — 1997. — V. 276. — № 5309. — P. 71–4.
182. Puri M.C., Nagy A. Concise review: Embryonic stem cells versus induced pluripotent stem cells: the game is on // *Stem Cells*. — 2012. — V. 30. — № 1. — P. 10–14.
183. Rath E. M., Kelly D., Bouldin T. W. et al. Impaired peripheral nerve regeneration in a mutant strain of mice (Enr) with a Schwann cell defect // *J. Neurosci*. — 1995. — V. 15. — P. 7226–37.
184. Reynolds B.A., Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system // *Science*. — 1992. — V. 255. — P. 1707-10.
185. Ray S., Atkuri K.R., Deb-Basu D. et al. MYC can induce DNA breaks in vivo and in vitro independent of reactive oxygen species // *Cancer Res*. — 2006. — V. 66. — № 13. — P. 6598–605.

186. Reubinoff BE, et al. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2001;19(12):1134–1140. doi: 10.1038/nbt1201-1134.
187. Richardson P.M., McGuinness U.M., Aguayo A.J. Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts // *Nature*. — 1980. — V. 284. — № 5753. — P. 264-5.
188. Richter M.W., Fletcher P.A., Liu J. et al. Lamina propria and olfactory bulb ensheathing cells exhibit differential integration and migration and promote differential axon sprouting in the lesioned spinal cord // *J Neurosci*. — 2005. — V. 25. — P. 10700-11.
189. Riemann L., Younsi A., Scherer M. et al. Transplantation of Neural Precursor Cells Attenuates Chronic Immune Environment in Cervical Spinal Cord Injury // *Front Neurol*. — 2018. — V. 9. — P. 428.
190. Rivlin A.S., Tator C.H. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat // *Surg Neurol*. — 1978. — V. 10. — P. 38–43.
191. Roisen F. J., Klueber K. M., Lu C. L. et al. Adult human olfactory stem cells // *Brain Res*. — 2001. — V. 890. — P. 11–22.
192. Rothwell N., Allan S., Toulmond S. The role of interleukin 1 in acute neurodegeneration and stroke: pathophysiological and therapeutic implications // *J Clin Invest*. — 1997. — V. 100. — № 11 — P. 2648-52.
193. Sabelstrom H., Stenudd M., Frisen J. Neural stem cells in the adult spinal cord // *Exp Neurol*. — 2014. — V. 260. — P. 44–9.
194. Sakiyama-Elbert S., Johnson P.J., Hodgetts S.I. et al. Scaffolds to promote spinal cord regeneration // *Handb Clin Neurol*. — 2012. — V. 109. — P. 575-94.
195. Salehi M., Pasbakhsh P., Soleimani M. et al. Repair of spinal cord injury by co-transplantation of embryonic stem cell-derived motor neuron and olfactory ensheathing cell // *Iran Biomed J*. — 2009. — V. 13. — № 3. — P. 125-35.
196. Salewski R., Emrani H., Fehlings M.G. Neural stem/progenitor cells for spinal cord regeneration // Wislet-Gendebien S, editor. *Trends in cell signaling pathways in neuronal fate decision*. — 2013.
197. Sankavaram S.R., Hakim R., Covacu R. et al. Adult Neural Progenitor Cells Transplanted into Spinal Cord Injury Differentiate into Oligodendrocytes, Enhance Myelination, and Contribute to Recovery // *Stem Cell Reports*. — 2019. — V. 12. — № 5 — P. 950–66.

198. Santos-Silva A., Fairless R., Frame MC. et al. FGF/heparin differentially regulates Schwann cell and olfactory ensheathing cell interactions with astrocytes: a role in astrocytosis // *J Neurosci.* — 2007. — V. 27. — № 27. — P. 7154–67.
199. Sasaki M., Lankford K.L., Zemedkun M. et al. Identified olfactory ensheathing cells transplanted into the transected dorsal funiculus bridge the lesion and form myelin // *J Neurosci.* — 2004. — V. 24. — P. 8485–93.
200. Schaan M., Jaksche H. Comparison of different operative modalities in post-traumatic syringomyelia: preliminary report // *Eur Spine J.* — 2001. — V. 10. — № 2. — P. 135.
201. Sharp J., Frame J., Siegenthaler M. et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants improve recovery after cervical spinal cord injury // *Stem Cells.* — 2010. — V. 28. — № 1. — P. 152–63.
202. Sharp K.G., Flanagan L. A., Yee K. M. et al. A re-assessment of a combinatorial treatment involving Schwann cell transplants and elevation of cyclic AMP on recovery of motor function following thoracic spinal cord injury in rat// *Experimental Neurology.* — 2012. — V. 233. — № 2. — P. 625–644.
203. Shiras A., Chettiar S.T., Shepal V. et al. Spontaneous transformation of human adult nontumorigenic stem cells to cancer stem cells is driven by genomic instability in a human model of glioblastoma // *Stem Cells.* — 2007. — V. 25. — № 6. — P. 1478–89.
204. Seki T., Fehlings M.G. Mechanistic insights into posttraumatic syringomyelia based on a novel in vivo animal model. Laboratory investigation // *J Neurosurg Spine.* — 2008. — V. 8. — № 4. — P. 365–75.
205. Shibuya S., Yamamoto T., Itano T. Glial and axonal regeneration following spinal cord injury // *Cell Adh Migr.* — 2009. — V. 3. — № 1. — P. 99–106.
206. Shields D.C., Schaecher K.E., Hogan E.L. et al. Calpain activity and expression increased in activated glial and inflammatory cells in penumbra of spinal cord injury lesion // *J Neurosci Res.* — 2000. — V. 61. — № 2. — P. 146–50.
207. Singh N., Gopal S.C., Srivastava R.N., et al. In vitro maintenance of olfactory mucosa with enriched olfactory ensheathing cells // *J. Stem Cell Res. Ther.* — 2013. — V. 3. — P. 132.
208. Squier M.V., Lehr R.P. Post-traumatic syringomyelia // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* — 1994. — V. 57. — № 9. — P. 1095–8.
209. Stamegna J.C., Felixab M.S., Roux-Peyronnetab J. et al. Nasal OEC transplantation promotes respiratory recovery in a subchronic rat model of

- cervical spinal cord contusion // *Experimental Neurology*. — 2011. — V. 229. — № 1. — P. 120-31.
210. Stepanova O.V., Voronova A.D., Chadin AV, et al. Isolation of Rat Olfactory Ensheathing Cells and Their Use in the Therapy of Posttraumatic Cysts of the Spinal Cord // *Bull Exp Biol Med*. — 2018. — V. 165. — № 1. — P. 132-5.
 211. Stepanova O.V., Voronova A.D., Chadin A.V., et al. Efficiency of Human Olfactory Ensheathing Cell Transplantation into Spinal Cysts to Improve Mobility of the Hind Limbs // *Stem Cells Dev*. — 2019. — V. 28. — № 18. — 1253-1263.
 212. Svircev J.N., Little J.W. Syringomyelia // *Spinal Cord Medicine Principles and Practice*. 2nd ed. New York, NY: Demos Medical Publishing. — 2010. — P. 569-574.
 213. Su Z., Chen J., Qiu Y., Yuan Y. et al. Olfactory ensheathing cells: the primary innate immunocytes in the olfactory pathway to engulf apoptotic olfactory nerve debris // *Glia*. — 2013. — V. 61. — № 4. — P. 490–503.
 214. Sun T., Ye C., Zhang Z., Wu J. et al. Cotransplantation of olfactory ensheathing cells and Schwann cells combined with treadmill training promotes functional recovery in rats with contused spinal cords // *Cell Transplant*. — 2013. — V. 22. — Suppl 1. — S27- 38.
 215. Suzuki H., Kanchiku T., Imajo Y. et al. Artificial collagen-filament scaffold promotes axon regeneration and long tract reconstruction in a rat model of spinal cord transection // *Med Mol Morphol*. — 2015. — V. 48. — № 4. — P. 214-24.
 216. Tabakow P., Jarmundowicz W., Czapiga B. et al. Transplantation of autologous olfactory ensheathing cells in complete human spinal cord injury // *Cell Transplant*. — 2013. — V. 22. — № 9. — P. 1591–612.
 217. Tabesh H., Amoabediny G., Nik N.S., Het et al. The role of biodegradable engineered scaffolds seeded with Schwann cells for spinal cord regeneration // *Neurochem. Int*. — 2009. — V. 54. — P. 73–83.
 218. Takeoka A., Jindrich D.L., Muñoz-Quiles C., Zhong H., van den Brand R., Pham D.L., Ziegler M.D., Ramón-Cueto A., Roy R.R., Edgerton V.R., Phelps P.E. Axon regeneration can facilitate or suppress hindlimb function after olfactory ensheathing glia transplantation // *J Neurosci*. — 2011. — V. 31. — № 11. — P. 4298–4310.
 219. Taricco M., Colombo C., Adone R. et al. The social and vocational outcome of spinal cord injury patients // *Paraplegia*. — 1992. — V. 30. — № 3. — P. 214-9.

220. Tarlov I.M., Klinger H., Vitale S. Spinal cord compression studies. I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression // *AMA Arch Neurol Psychiatry*. — 1953. — V. 70. — P. 813–9.
221. Taylor C.J., Bolton E.M., Bradley J.A. Immunological considerations for embryonic and induced pluripotent stem cell banking // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. — 2011. — V. 366. — №1575. — P.2312-2322.
222. Tennent R., Chuah M.I. Ultrastructural study of ensheathing cells in early development of olfactory axons // *Dev Brain Res*. — 1996. — V. 95. — № 1. — P. 135–9.
223. Tetzlaff W., Okon E.B., Karimi-Abdolrezaee S. et al. A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury // *J Neurotrauma*. — 2011. — V. 28. — № 8. — P. 1611–82.
224. Tharion G., Indirani K., Durai M., Meenakshi M., Devasahayam S., Prabhav N., Solomons C., Bhattacharji S. Motor recovery following olfactory ensheathing cell transplantation in rats with spinal cord injury // *Neurology India*. — 2011. — V. 59. — №4. — P. 566–72.
225. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science*. — 1998. — V. 282. — P. 1145–47.
226. Toft A., Scott D.T., Barnett S.C. et al. Electrophysiological evidence that olfactory cell transplants improve function after spinal cord injury. // *Brain: a journal of neurology*. — 2007. — V. 130 — № 4 — P . 970–84.
227. Triolo D., Dina G., Lorenzetti I., Malaguti M. et al. (2006). Loss of glial fibrillary acidic protein (GFAP) impairs Schwanncell proliferation and delays nerve regeneration after damage // *J. Cell Sci*. — 2006. — V. 119. — P. 3981–93.
228. Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J, van der Kooy D. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron*. — 2001. — V. 30. — № 1. — P. 65–78.
229. Tsuchiya K., Fujikawa A., Honya K. et al., Tateishi H, Nitatori T. Value of diffusion- weighted MR imaging in acute cervical cord injury as a predictor of outcome // *Neuroradiology*. —2006. — V. 48. — P. 803–8.
230. Urban N., Tripathy S. Neuroscience Circuits drive cell diversity // *Nature*. — 2018. — V. 488. — № 7411. —P. 289–90

231. Ushewokunze S., Gan Y., Phillips K. et al. Surgical treatment of post-traumatic syringomyelia // *Spinal Cord*. — 2010. — V. 48. — P. 710–3.
232. van Middendorp J.J., Goss B., Urquhart S. Diagnosis and Prognosis of Traumatic Spinal Cord Injury // *Global Spine J*. — 2011. — V. 1. — № 1. — P. 1–8.
233. Vargas M.I., Delavelle J., Jlassi H. et al. Clinical applications of diffusion tensor tractography of the spinal cord // *Neuroradiology*. — 2008. — V. 50. — P. 25–9.
234. Vincent A.J., Taylor J.M., Choi-Lundberg D.L. et al. Genetic expression profile of olfactory ensheathing cells is distinct from that of Schwann cells and astrocytes // *Glia*. — 2005. — V. 51. — P. 132–47.
235. Voronova A.D., Stepanova O.V., Valikhov M.P., et al. Preparation of Human Olfactory Ensheathing Cells for the Therapy of Spinal Cord Injuries // *Bull Exp Biol Med*. — 2018. — V. 164. — № 4. — P. 523–7.
236. Voronova A.D., Valikhov M.P., Stepanova O.V., et al. Survival and Migration of Rat Olfactory Ensheathing Cells after Transplantation into Posttraumatic Cysts in the Spinal Cord // *Bull Exp Biol Med*. — 2018. — V. 166. — № 1. — P. 118–23.
237. Voronova A.D., Stepanova O.V., Valikhov M.P. et al. Comparison of the Efficiency of Transplantation of Rat and Human Olfactory Ensheathing Cells in Posttraumatic Cysts of the Spinal Cord // *Bull Exp Biol Med*. — 2019. — V. 167. — P. 536–40.
238. Voronova A.D., Stepanova O.V., Valikhov M.P. et al. Neural Stem/Progenitor Cells of Human Olfactory Mucosa for the Treatment of Chronic Spinal Cord Injuries // *Bull Exp Biol Med*. — 2020. — V. 168. — № 4. — P. 538–41.
239. Wada T., Honda M., Minami I. et al. Highly efficient differentiation and enrichment of spinal motor neurons derived from human and monkey embryonic stem cells // *PLoS One* — 2009. — V. 4. — № 8. — e6722.
240. Wang S, Lu J, Li YA, et al. Autologous Olfactory Lamina Propria Transplantation for Chronic Spinal Cord Injury: Three-Year Follow-Up Outcomes From a Prospective Double-Blinded Clinical Trial // *Cell Transplant*. — 2016. — V. 25. — № 1. — P. 141–157.
241. Waters R.L., Adkins R.H., Yakura J.S. et al. Motor and sensory recovery following incomplete tetraplegia // *Arch Phys Med Rehabil*. — 1994. — V. 75. — № 3. — P. 306–11.

242. Webber D.J. Adult Neural Precursor Cells and the Dysmyelinated Spinal Cord *Journal of Neuroscience*. — 2007. — V. 27. — № 25. — P. 6605-06.
243. Wichterle H., Lieberam I., Porter J.A. et al. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons // *Cell*. — 2002. — V. 110. — № 3. — P. 385–97.
244. Widerstrom-Noga E.G., Turk D.C. Types and effectiveness of treatments used by people with chronic pain associated with spinal cord injuries: influence of pain and psychosocial characteristics // *Spinal Cord*. — 2003. — V. 41. — № 11. — P. 600-9.
245. Woodhall E., West A.K., Chuah M.I. Cultured olfactory ensheathing cells express nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, glia cell line-derived neurotrophic factor and their receptors. *Mol Brain Res*. — 2001. — V. 88. — P. 203-13.
246. Wright K.T., El Masri W., Osman A. et al. Concise review: Bone marrow for the treatment of spinal cord injury: mechanisms and clinical applications // *Stem Cells*. — 2011. — V. 29. — № 2 — P. 169-178.
247. Wu S., Cui G., Shao H. et al. The Cotransplantation of Olfactory Ensheathing Cells with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Exerts Antiapoptotic Effects in Adult Rats after Spinal Cord Injury // *Stem Cells Int*. — 2015. — V. 2015. — P. 516215.
248. Xiao M., Klueber K.M., Lu C. et al. Human adult olfactory neural progenitors rescue axotomized rodent rubrospinal neurons and promote functional recovery // *Exp Neurol*. — 2005. — V. 194. — № 1. — P. 12–30. (154)
249. Xiao M., Klueber K.M., Guo Z. et al. Human adult olfactory neural progenitors promote axotomized rubrospinal tract axonal reinnervation and locomotor recovery // *Neurobiol Dis*. — 2007. — V. 26. — № 2. — P. 363–74.
250. Yamamoto M., Raisman G., Li D. et al. Transplanted olfactory mucosal cells restore paw reaching function without regeneration of severed corticospinal tract fibres across the lesion // *Brain Res*. — 2009. — V. 1303. — P. 26–31.
251. Yan H., Bunge M.B., Wood P.M. et al. Mitogenic response of adult rat olfactory ensheathing glia to four growth factors // *Glia*. — 2001. — V. 33. — P. 334-42.
252. Yao R., Murtaza M., Velasquez J.T. et al. Olfactory Ensheathing Cells for Spinal Cord Injury: Sniffing Out the Issues // *Cell Transplant*. — 2018. — V. 27. — № 6. — P. 879–89.

253. Yasuda A., Tsuji O., Shibata S. et al. Significance of remyelination by neural stem/progenitor cells transplanted into the injured spinal cord // *Stem Cells*. — 2011. — 29. — № 12. — P. 1983-94.
254. Yeo S, Cheng S., Hemley S. et al. Characteristics of CSF Velocity-Time Profile in Posttraumatic Syringomyelia // *American Journal of Neuroradiology* September. — 2017. — 38. — № 9. — P. 1839-44.
255. You S.W., Chen B.Y., Liu H.L., Lang B., Xia J.L., Jiao X.Y., Ju G. Spontaneous Recovery of Locomotion Induced by Remaining Fibers After Spinal Cord Transection in Adult Rats // *Restor. Neurol. Neurosci.* — 2003. — V. 21. — № 1-2. — P. 39-45.
256. Yousefifard M., Rahimi-Movaghar V., Nasirinezhad F. et al. Neural stem/progenitor cell transplantation for spinal cord injury treatment; A systematic review and meta-analysis // *Neuroscience*. — 2016. — V. 322. — P. 377-97.
257. Yui S., Fujita N., Chung C.S., Morita M., Nishimura R. Olfactory ensheathing cells (OECs) degrade neurocan in injured spinal cord by secreting matrix metalloproteinase-2 in a rat contusion model // *Jpn J Vet Res*. — 2014. — 62. — № 4. — P. 151-62.
258. Zhang N., Fang M., Chen H., Gou F., Ding M. Evaluation of spinal cord injury animal models // *Neural. Regen. Res.* — 2014. — V. 9. — № 22. — P. 2008-12.
259. Zhang C. Precise Delivery Into Chronic Spinal Cord Injury Syringomyelic Cysts with Magnetic Nanoparticles MRI Visualization // *Med Sci Monit*. — 2015. — V. 21. — P. 3179-85.
260. Zhang S.C., Wernig M., Duncan I.D. et al., Brustle O, Thomson JA. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells // *Nat Biotechnol*. — 2001. — V. 19. — № 12. — P. 1129-33.
261. Zhang S.X., Huang F., Gates M., Holmberg E.G. Scar ablation combined with LP/OEC transplantation promotes anatomical recovery and P0-positive myelination in chronically contused spinal cord of rats // *Brain Res*. — 2011. — V. 1399. — P. 1-14.
262. Zhang X., Klueber K.M., Guo Z. et al. Induction of neuronal differentiation of adult human olfactory neuroepithelial-derived progenitors // *Brain Res*. — 2006. — V. 1073-1074. — P. 109-19.