

На правах рукописи

Воронова Анастасия Денисовна

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Москва 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители: доктор медицинских наук, профессор, академик РАН
Чехонин Владимир Павлович

кандидат биологических наук
Степанова Ольга Владиславовна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, заместитель генерального директора, директор института экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Парфенова Елена Викторовна

доктор биологических наук, доцент кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова»

Исаев Николай Константинович

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова Российской академии наук (119334, Москва, ул. Вавилова, д. 26)

Защита диссертации состоится 2021 года в часов на заседании диссертационного совета (Д 001.004.01) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3, morfolhum@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте www.morfolhum.ru

Автореферат разослан « » _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор биологических наук

Косырева Анна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 локализируются 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 лукович (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 РКН26.

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение ткани обонятельной области слизистой оболочки носа человека и крыс. Образцы обонятельной слизистой оболочки человека (N=40) получали из верхних носовых ходов пациентов при плановом хирургическом вмешательстве в Отделении пластической хирургии Университетской клинической больницы № 1. От всех пациентов было получено информированное согласие. Для получения ткани обонятельной слизистой оболочки носа крыс (N=100) животных обезболивали интраперитонеальным введением смеси реланиум/кетамин (1:1) (1 мкл/г), проводили декапитацию, затем сечение черепа в сагиттальной плоскости на уровне носовой перегородки. Забор ткани проводили под бинокулярной лупой. Отличительной особенностью обонятельной слизистой оболочки является то, что она окрашена в более темный цвет: от желто-бурого до темно-коричневого. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова (протокол №153 от 14.03.2016).

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

Разработка протоколов получения обкладочных клеток обонятельной области слизистой оболочки носа человека и крыс. Обкладочные клетки получали из собственной пластинки обонятельной слизистой оболочки крыс и человека методом эксплантной культуры (Voronova A.D. et al., 2018; Stepanova O.V. et al., 2018). Культивирование проводили до образования монослоя. Далее клетки пассировали в селективные условия для получения обогащенной культуры обкладочных клеток. Морфологию полученных клеток оценивали с помощью фазово-контрастного инвертированного микроскопа Leica (модель DM 2500).

Разработка протоколов получения нейральных стволовых/прогениторных клеток обонятельной области слизистой

оболочки носа человека и крыс. Для получения НСПК использовали эпителий обонятельной слизистой оболочки. Культивирование клеток эпителия проводили до образования монослоя. Далее клетки пассировали на пластик, покрытый поли-L-лизинном, и культивировали в бессывороточной среде в присутствии эпидермального фактора роста (EGF) (Gibco, США) и основного фактора роста фибробластов (bFGF) (Gibco, США) для получения нейросфер (Reynolds B.A. et al., 1992). Анализ полученных культур проводили с помощью фазово-контрастного инвертированного микроскопа Leica DM 2500. Подсчет нейросфер проводили в 10 полях зрения в трех независимых экспериментах.

Иммуноцитохимический анализ. Клетки выращивали на покровных стеклах. Фиксацию осуществляли 3,7% параформальдегидом, для пермеабиллизации клеточных мембран использовали 1% раствор тритона X-100 (Thermo Scientific, США). Для блокирования неспецифических сайтов связывания проводили инкубацию с фетальной бычьей сывороткой. Инкубацию с раствором первичных антител проводили в течение 1 часа, далее с раствором вторичных антител в течение 1 часа при комнатной температуре. Ядра клеток окрашивали с помощью DAPI (1:3000), после чего покровные стекла заключали в Aqua Poly/Mount. Для выявления обкладочных клеток, использовали их общепринятые маркеры (p75NTR, GFAP), для выявления НСПК использовали маркеры SOX2 и Нестин. Концентрации антител соответствовали концентрациям, рекомендованным производителями (Abcam, США) (p75NTR (1:200), GFAP (1:200), SOX2 (1:200), Нестин (1:100), Alexa Fluor 488 (1:2000) и Alexa Fluor 594 (1:2000)). Анализ препаратов осуществляли с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Observer Z.1 («Zeiss»). Для получения изображений использовали цифровую видеокамеру AxioCam HRC («Zeiss»).

Моделирование посттравматических кист спинного мозга проводили по модифицированной нами методике Zhang C. (Zhang C. et al., 2015) на половозрелых самках крыс Вистар массой тела от 200 грамм ($N=300$). Все манипуляции выполняли при обезболивании животных интраперитонеальным введением смеси реланиум/кетамин (1:1) (1 мкл/г). Далее проводили ламинэктомию на уровне 4-го грудного позвонка и с помощью импактора (Precision Systems and Instrumentation LLC, Fairfax, VA) производили контузионную травму воздействием ударного механизма силой 200 кдин.

Магнитно-резонансную томографию (МРТ) 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 в сагиттальной и аксиальной плоскостях. Полученные изображения анализировали с помощью программного пакета DICOM view MultiVox. 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 - межсрезовый промежуток, равный 0,025 мм.

Тесты открытого поля по 21-балльной шкале BBB (разработана Basso, Beattie и Bresnahan) проводили для оценки динамики восстановления двигательной активности задних конечностей крыс (Basso D.M. et al., 1995) еженедельно в течение 4 недель перед и в течение 4 недель после трансплантации. Динамику восстановления после трансплантации выражали как дельта BBB = значение BBB после трансплантации - значение BBB до трансплантации.

Трансплантация клеточных препаратов в зону повреждения спинного мозга проводилась через 4 недели после травмы животным с показателями по шкале BBB через 4 недели после травмы не более 13 баллов. 750 тысяч (n=8) и 1,5 миллиона (n=9) обкладочных клеток крыс, 750 тысяч (n=8) и 1,5 миллиона (n=7) обкладочных клеток человека, 200 тысяч НСПК крыс (n=5), 200 тысяч НСПК человека (n=7), комбинацию 750 тысяч обкладочных клеток и 200 тысяч НСПК крыс (n=3), комбинацию 750 тысяч обкладочных клеток и 200 тысяч НСПК человека (n=6) трансплантировали крысам в посттравматические кисты. Общий объем трансплантата составлял 10 мкл. Контрольным животным в посттравматические кисты вводили тот же объем среды без клеток (n=9) и 750 тысяч астроцитов крыс (n=4) (группа клеточного контроля). Животные, у которых через 4 недели не наблюдалось сформированных кист, были использованы в качестве группы сравнения. В зону повреждения спинного мозга этим крысам трансплантировали 750 тысяч (n=6) и 1,5 миллиона (n=6) обкладочных клеток крыс, 750 тысяч (n=7) и 1,5 миллиона (n=7) обкладочных клеток человека, 200 тысяч НСПК крыс (n=4), 200 тысяч НСПК человека (n=5), контрольной группе вводили среду без клеток (n=11). Координаты для введения клеток определяли по изображениям МРТ. Перед трансплантацией животных наркотизировали интраперитонеальным введением смеси реланиум/кетамин (1:1) (1 мкл/г), клетки вводили с помощью инжектора R100-ЕС фирмы Razel Scientific (США) со скоростью 6 мкл/мин.

Выявление трансплантированных клеток в спинном мозге проводили в течение 4 недель с помощью прижизненного мембранного красителя PKH26 (Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell

Membrane Labeling) (Sigma) — красного флюорохрома с максимумом поглощения 551 нм и максимумом излучения 567 нм. Фрагменты поврежденного спинного мозга получали через 2 или 4 недели после трансплантации, фиксировали в 10% параформальдегиде в течение суток. Срезы толщиной 40 мкм были получены с помощью вибрационного микротомы (ThermoFisher Scientific, США) и окрашены антителами к маркеру нейральных клеток (b-III-тубулину) (1:400) для визуализации нейронов спинного мозга. 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»).

Статистическая обработка данных проводилась 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 изменению 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 $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

В работе разработан оптимальный протокол для получения обкладочных клеток человека и крыс из обонятельной слизистой оболочки. В результате ферментативной обработки обонятельной слизистой оболочки человека диспазой (2мг/мл) в течение 1 часа и обонятельной слизистой оболочки крыс в течение 15 минут ткань была механически разделена на обонятельный эпителий и собственную пластинку. Далее нами были получены первичные культуры клеток собственной пластинки с помощью эксплантного метода (рис. 1А, 1Б). Показано, что при культивировании эксплантов 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 через 3-5 дня фрагменты ткани адгезируют к пластику, после чего на 7-9 день из них начинают мигрировать клетки и пролиферировать. Культура достигала состояния конфлюэнтного монослоя в течение 14 дней.

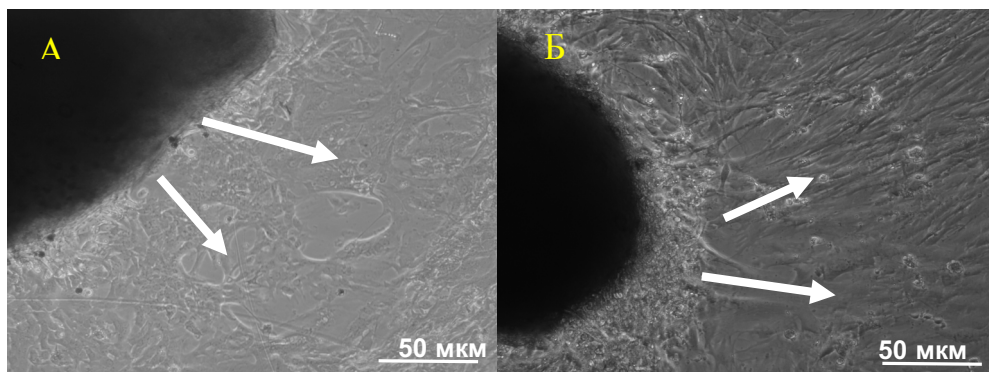


Рисунок 1. Культуры клеток собственной пластинки, полученные эксплантным методом. А – эксплантная культура человека; Б – эксплантная культура крыс. Показаны репрезентативные изображения, полученные с помощью фазово-контрастной микроскопии.

Для направленного получения обкладочных клеток полученные клетки собственной пластинки пересаживали на пластик, покрытый 0,01% поли-L-лизин, в среду DMEM/F-12(1:1) с добавлением 10% FBS, 2 mM L-глутамина, 100 µg/mL стрептомицина, 100 U/mL пенициллина, 500 нг/мл гентамицина, 1% ITS и 500 нг/мл гидрокортизона и культивировали в течение 3 дней (Рис. 2А, 1Б). Преимущественно культура состояла из глиальных веретеновидных астроцитоподобных клеток и более крупных, напоминающие шванновские клетки. Полученные нами данные соответствует уже существующим о морфологии обкладочных клеток (Singh N. et al., 2013).

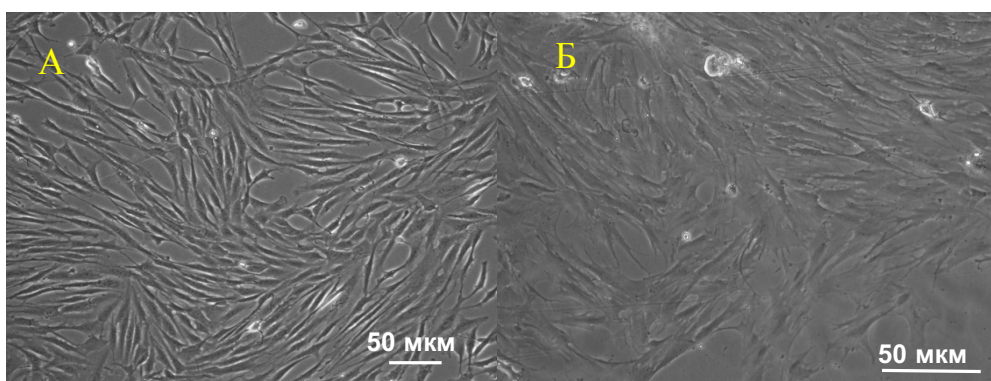


Рисунок 2. Обогащенные культуры обкладочных клеток обонятельной слизистой оболочки. А – обкладочные клетки человека; Б – обкладочные клетки крыс, полученные при культивировании в селективных условиях. Фазово-контрастная микроскопия.

Обкладочные клетки крыс (Рис. 3А) и человека (Рис. 3Б) были выявлены в полученных культурах по одновременной экспрессии маркеров p75NTR и GFAP с помощью иммунофлуоресцентного метода. Анализ процентного содержания p75NTR/GFAP-позитивно окрашенных клеток в различных пассажах при культивировании в селективной среде показал, что наибольшее содержание обкладочных клеток человека было обнаружено в 3-ем - 93,9% и 4-ом пассаже - 89,5%, обкладочных клеток крыс в 3-ем - 88,2% и в 4-ом пассаже - 96,6% (Рис. 3В) (Voronova A.D. et al., 2018). Таким образом, динамика

обогащения обкладочными клетками схожа как в культуре клеток человека, так и в культуре клеток крыс. Кроме того, важно отметить, что к 3-4 пассажу получают достаточное количество клеток для последующей трансплантации.

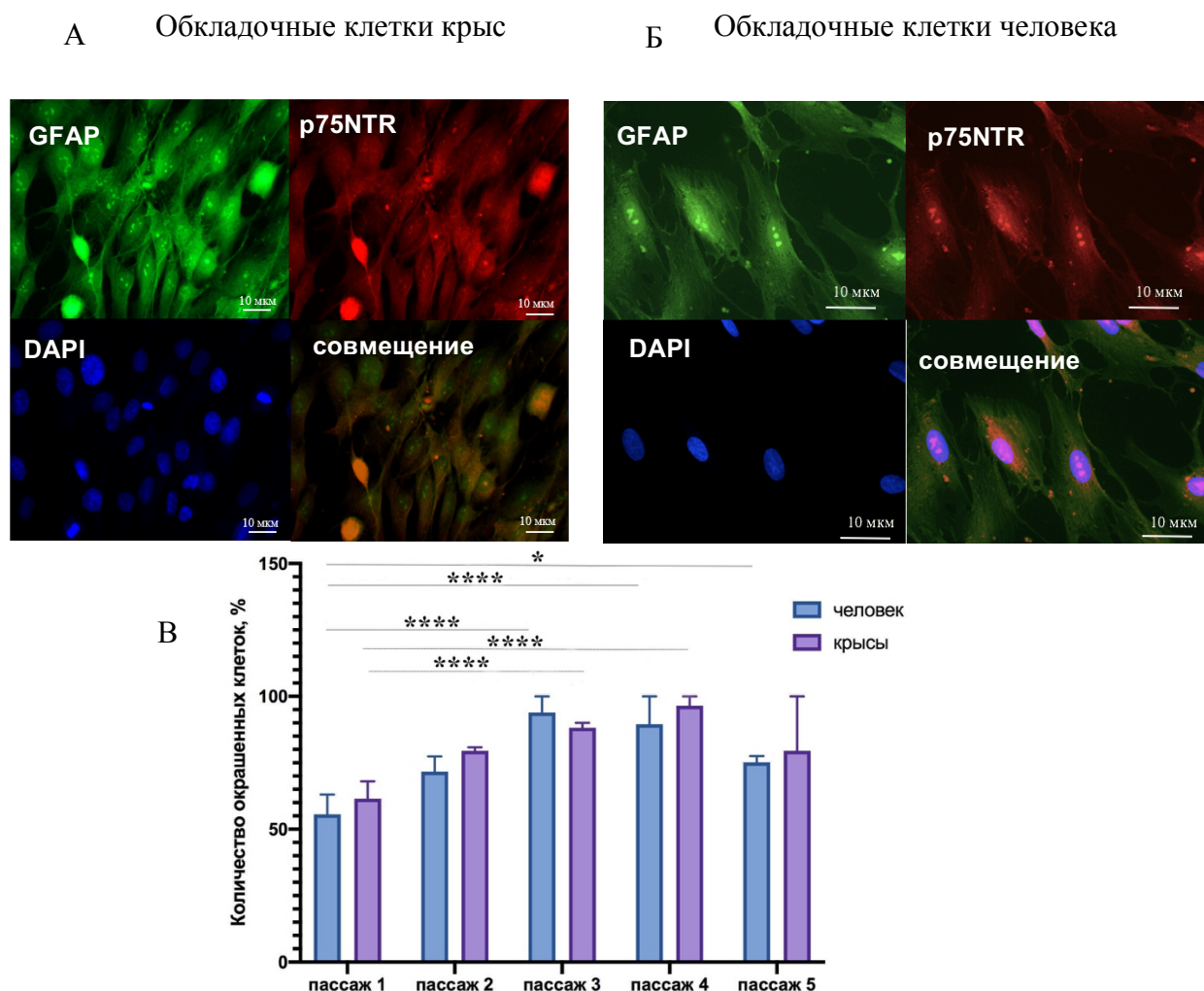


Рисунок 3. Результаты иммунофлуоресцентного анализа культуры обкладочных клеток крыс и человека. А - обкладочные клетки крыс; Б - обкладочные клетки человека. Обкладочные клетки были охарактеризованы по маркерам GFAP и p75NTR; ядра были окрашены DAPI. В - процентное содержание GFAP/p75NTR⁺ обкладочных 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. Статистически значимые различия с использованием теста Данна и отмечены *($p < 0,05$); ****($p < 0,0001$).

В литературе представлены протоколы получения обкладочных клеток из обонятельной области слизистой оболочки носа млекопитающих (Jarmundowicz W. 2007; Брюховецкий А.С., 2010; Wu S. et al., 2015), однако данные способы имеют определенные недостатки. Отсутствие стадии отделения собственной пластинки от обонятельного эпителия (Брюховецкий А.С., 2010) и этапа наращивания клеточной массы в первичной культуре клеток собственной пластинки до этапа культивирования в селективных условиях также не позволили авторам получить на выходе чистую культуру и большое количество обкладочных клеток. В нашей работе для получения

обкладочных клеток ткань обонятельной слизистой оболочки подвергалась обработке только одним ферментом диспазой II, тогда как другими авторами проводилась дополнительная обработка ферментами (Jarmundowicz W., 2007), что могло отрицательно сказаться на выживаемости получаемых клеток. Для того, чтобы избежать дополнительной ферментативной обработки, в нашем протоколе применялся метод эксплантной культуры, при этом собственная пластинка подвергалась лишь механическому измельчению. Важным этапом нашего протокола для получения обогащенной культуры являлась стадия культивирования в селективной среде с добавлением гидрокортизона, который увеличивает чувствительность клеток к ростовым факторам, содержащимся в сыворотке, что, несомненно, способствует увеличению количества 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 аутологичной трансплантации этим же пациентам. Например, клетки, полученные из аутопсийного материала обонятельной слизистой оболочки, могут быть применимы только для аллогенной трансплантации (Wu S. et al., 2015), а количество и выживаемость клеток, выделенных из аутопсийного материала, значительно ниже. В нашем исследовании при длительном культивировании обкладочных клеток на поли-L-лизине в селективной среде к 3-4 пассажу были получены наиболее обогащенные культуры, которые использовали для дальнейшей трансплантации в спинной мозг.

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

Существуют различные способы для получения НСПК из обонятельной слизистой оболочки млекопитающих, большинство из которых направлено на получение нейросфер (Zhang X. et al., 2006; Ohnishi Y. et al., 2015; Muniswami D.M. et al., 2017). В данной работе для получения НСПК из обонятельной слизистой оболочки носа человека и крыс использовали фрагменты ткани обонятельного эпителия, которые инкубировали с раствором коллагеназы (2мг/мл) в течение 10 минут при 37°C для полной диссоциации эпителия на отдельные клетки. Полученные клетки культивировали в среде ДМЕМ/F-12(1:1), содержащей 10% FBS, 2 mM L-глутамин, 100 мкг/мл стрептомицин, 100 ед/мл пенициллин и 60 мкг/мл гентамицин. Показано, что первичная культура клеток человека образует конфлюэнтный монослой в течение 5-7 суток (рис. 4А), культура клеток крыс в течение 3-5 дней (рис. 4Б). Первичная культура обонятельного эпителия является гетерогенной по своему составу и представлена, главным образом, полигональными эпителиальными клетками (Voronova A.D. et al., 2020). В первичных культурах обонятельного эпителия человека и крыс с помощью иммунофлуоресцентного метода были выявлены

НСПК по одновременной экспрессии маркеров SOX2 и Нестин (рис. 4В, рис. 4Г). Процентное содержание их в культуре составляло 5-7%.

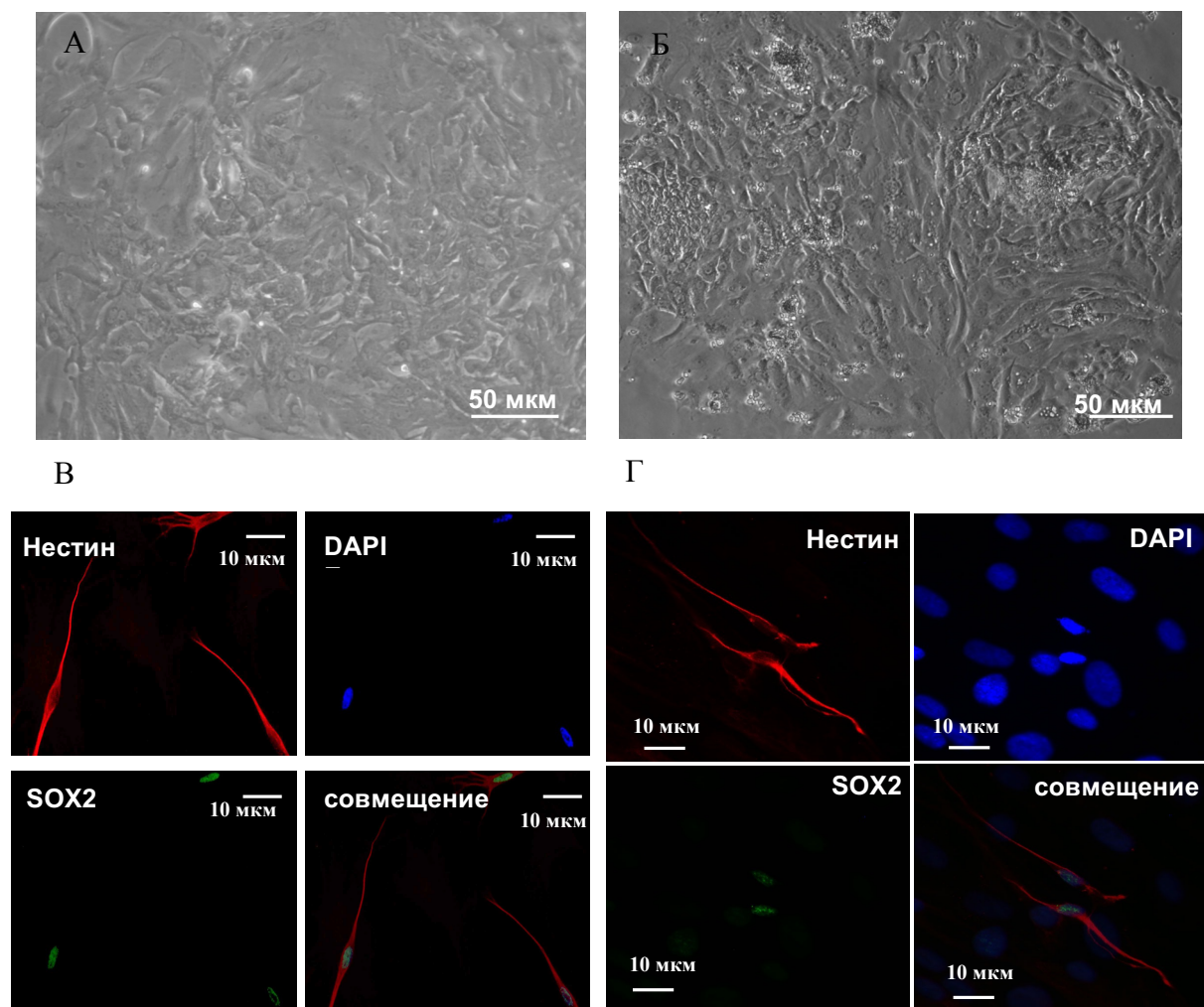


Рисунок 4. Первичная культура клеток обонятельного эпителия человека (А) и крыс (Б). Фазово-контрастная микроскопия. НСПК, выявленные в обонятельном эпителии человека (В) и крыс (Г) с помощью иммунофлуоресцентного метода по маркерам Нестин и SOX2, ядра окрашены DAPI.

При пассировании клеток первичной культуры обонятельного эпителия на пластик, покрытый 0,01% поли-L-лизином, и культивировании в среде быссывороточной среде ДМЕМ/F-12(1:1), содержащей 2 мМ L-глутамин, 1% добавки инсулина, трансферрина, селенита натрия (ITS), 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ед/мл пенициллина, EGF и bFGF, все дифференцированные типы клеток гибли в течение первых суток, тогда как недифференцированные клетки-предшественники начинали активно пролиферировать и образовывать нейросферы. Культура преимущественно состояла из свободно плавающих нейросфер, гетерогенных по размеру, также наблюдали прикрепленные нейросферы (рис. 5). При сравнительном анализе количества нейросфер в культуре на разных сроках культивирования показано, что наибольшее количество нейросфер наблюдается на 2-е сутки.

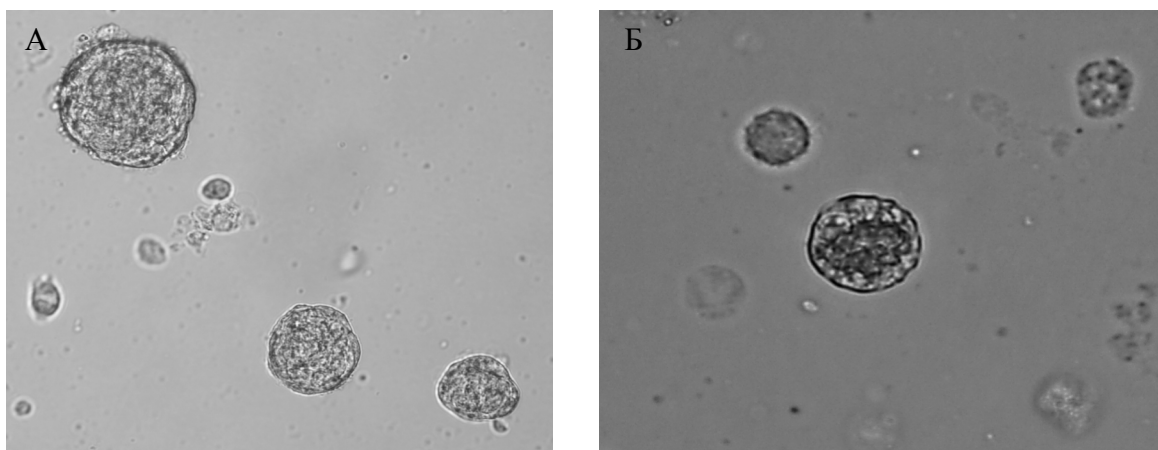


Рисунок 5. Нейросферы человека (А) и крыс (Б), полученные при культивировании на поли-L-лизине. Фазово-контрастная микроскопия (x200).

Разработку протокола получения НСПК из обонятельной слизистой оболочки в данном исследовании проводили на основе существующих протоколов, но со значительными модификациями. Наиболее близким к нашему является протокол D.M. Muniswami и соавторов (Muniswami D.M. et al., 2017), так как в нем присутствует стадия отделения эпителия от собственной пластинки. Однако серьезным недостатком этого протокола является применение большого количества ферментов, которые могут оказывать негативное влияние на выживаемость и пролиферацию клеток. Также известен способ получения НСПК из обонятельной слизистой оболочки носа человека (Ohnishi Y. et al., 2015). Недостатком известного способа является обработка сразу 4 ферментами: коллагеназой, диспазой, ДНКазой, гиалуронидазой. Кроме того, при получении первичной культуры клеток другие авторы не отделяли собственную пластинку от обонятельного эпителия, что затрудняет получение обогащенной НСПК культуры из-за примеси большого количества клеток других типов. Основными недостатками протокола X. Zhang (2006) было использование аутопсийного материала обонятельной выстилки и отсутствие стадии отделения обонятельного эпителия от собственной пластинки. Таким образом, использование данного протокола снижает выживаемость клеток и чистоту культуры.

Основным отличием и преимуществом нашего протокола было наличие стадии получения первичной культуры обонятельного эпителия. Так как размеры забираемой у пациента ткани обонятельной выстилки ограничены, эта стадия важна и необходима для наращивания достаточной клеточной массы для последующей трансплантации в спинной мозг. Использование в нашем протоколе двух ферментов (диспазы и коллагеназы) и увеличенное время инкубации обеспечило более тщательное механическое отделение обонятельного эпителия от собственной пластинки, что позволило получать первичную культуру клеток обонятельного эпителия без примесей клеток собственной пластинки, в том числе, без примесей МСК и обкладочных клеток. Из всех клеток ткани обонятельного эпителия только НСПК способны

образовать сферы в культуре. Полученные по разработанному протоколу культуры НСПК крыс и человека могут использоваться для *in vitro* исследований по изучению их дифференцировки, а также в экспериментах *in vivo* для оценки их терапевтических свойств. Культуры НСПК, полученные на 2-е сутки культивирования, были использованы нами для дальнейшей трансплантации в спинной мозг крыс.

Моделирование посттравматических кист спинного мозга у крыс

По разработанной в нашей лаборатории методике были смоделированы посттравматические кисты спинного мозга у 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. 6). 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.

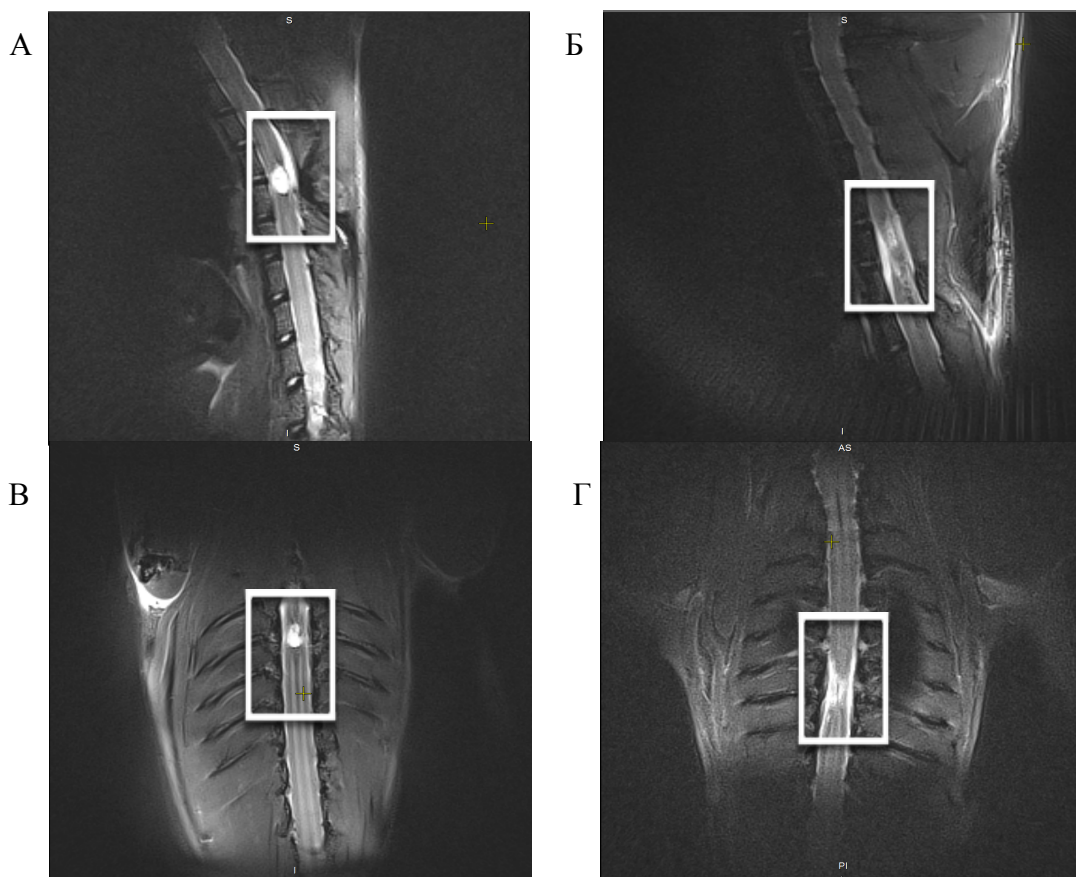


Рисунок 6. Визуализация спинного мозга через 4 недели после травмы с помощью МРТ. А, В - посттравматическая киста спинного мозга; Б, Г - хроническое повреждение спинного мозга без образования сформированных кист. Изображения были получены в сагиттальной (А, Б) и в аксиальной (В, Г) проекциях. Область травмы выделена рамкой.

Изучение терапевтического эффекта клеточных препаратов при посттравматических кистах спинного мозга с помощью оценки параметров двигательной активности задних конечностей крыс

При оценке параметров тестов BBB при трансплантации в посттравматические кисты препаратов крысы и человека, состоящих из обкладочных клеток, НСПК и комбинации обкладочных и НСПК, показано, что статистически значимые эффекты наблюдаются только при трансплантации обкладочных клеток (Stepanova O.V. et al., 2018; Stepanova O.V. et al., 2019; Voronova A.D. et al., 2019). Положительная динамика двигательной активности задних конечностей наблюдалась в течение всех 4 недель после трансплантации, кроме того, на 1-ой неделе после трансплантации не наблюдали ухудшения динамики в отличие от контрольных групп, что, по-видимому, связано с нейропротективным эффектом (Рис. 7). При этом 750 тысяч клеток было достаточно для эффективной трансплантации. При трансплантации препаратов НСПК и комбинации обкладочных клеток и НСПК в посттравматические кисты спинного мозга не было выявлено достоверного улучшения параметров BBB теста.

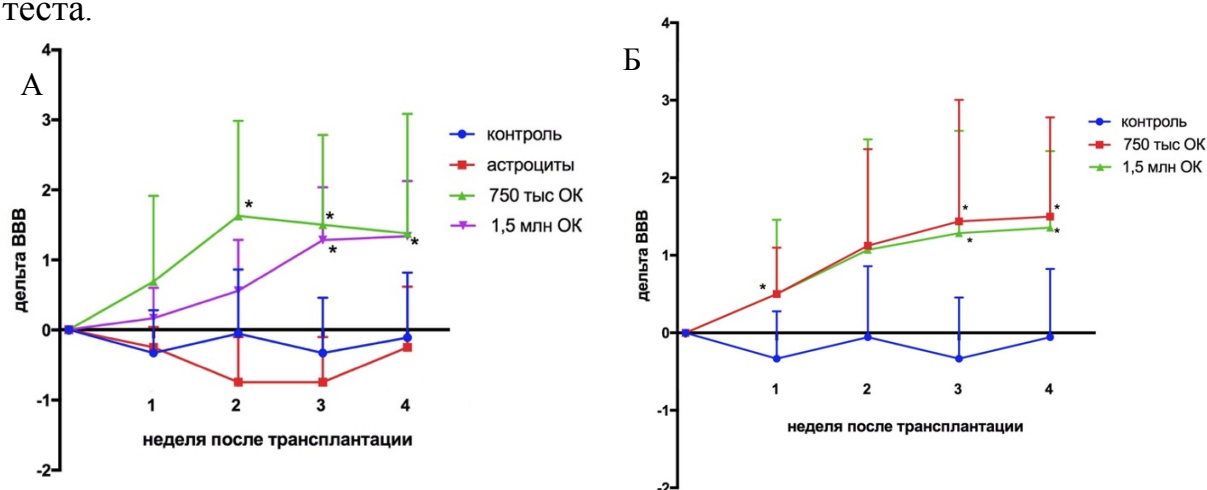


Рисунок 7. Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс после трансплантации обкладочных клеток (ОК) крыс (А) и человека (Б) в кисты спинного мозга (дельта BBB). На графиках указаны средние значения со стандартными отклонениями. Статистически значимые различия по сравнению с контролем (среда без клеток) получены с использованием теста Данна и отмечены *($p < 0,05$).

Трансплантация клеточных препаратов обонятельной слизистой оболочки крыс и человека, в том числе обкладочных клеток, в спинной мозг без сформированных кист не оказывала положительных эффектов по сравнению с контрольной группой (Рис. 8). Положительная динамика восстановления двигательной активности задних конечностей в течение 4 недель после трансплантации как в опытных группах, так и в контрольной группе может быть связана с естественной регенерацией спинного мозга после повреждения (Shibuya S. et al., 2009). Кроме того, ответом на трансплантацию

клеток в спинной мозг без сформированных кист может являться локальное воспаление, которое препятствует восстановлению двигательной активности.

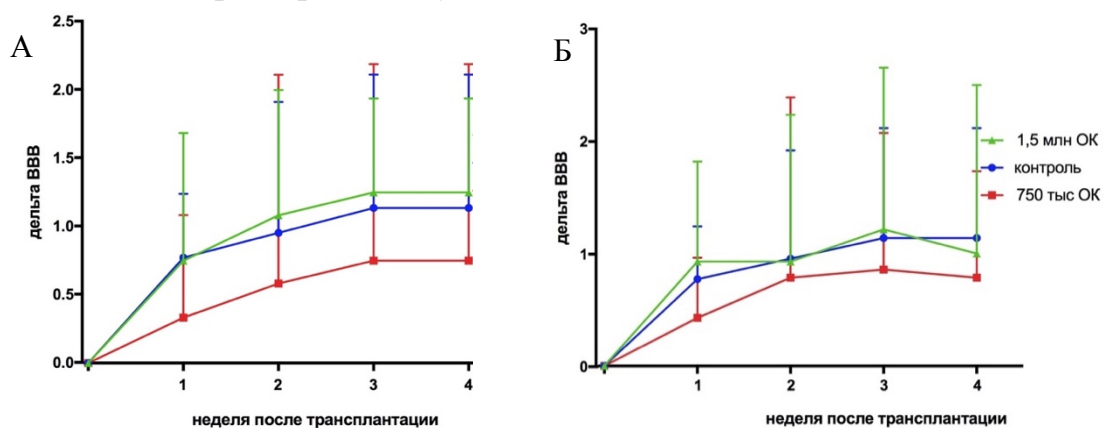


Рисунок 8. Динамика восстановления двигательной активности задних конечностей крыс после трансплантации обкладочных клеток (ОК) крыс (А) и человека (Б) в спинной мозг без сформированных кист (дельта BBB). На графиках указаны средние значения со стандартными отклонениями. Статистическую обработку данных проводили с использованием теста Данна.

Изучение терапевтического эффекта клеточных препаратов с помощью оценки размеров посттравматических кист

При анализе МРТ изображений кист до и после трансплантации клеточных препаратов крысы и человека, состоящих из обкладочных клеток, НСПК и комбинации обкладочных и НСПК, показано, что статистически значимое уменьшение размеров кист по сравнению с контрольной группой наблюдается при трансплантации 750 тысяч клеток крыс, 750 тысяч клеток человека и 1,5 миллионов обкладочных клеток человека (Рис. 9). При трансплантации 750 тысяч клеток крыс происходило уменьшение размеров кист в среднем на 17%. У животных, которым трансплантировали 750 тысяч клеток человека, объемы кист уменьшались на 32%, а которым трансплантировали 1,5 миллиона – на 35%.

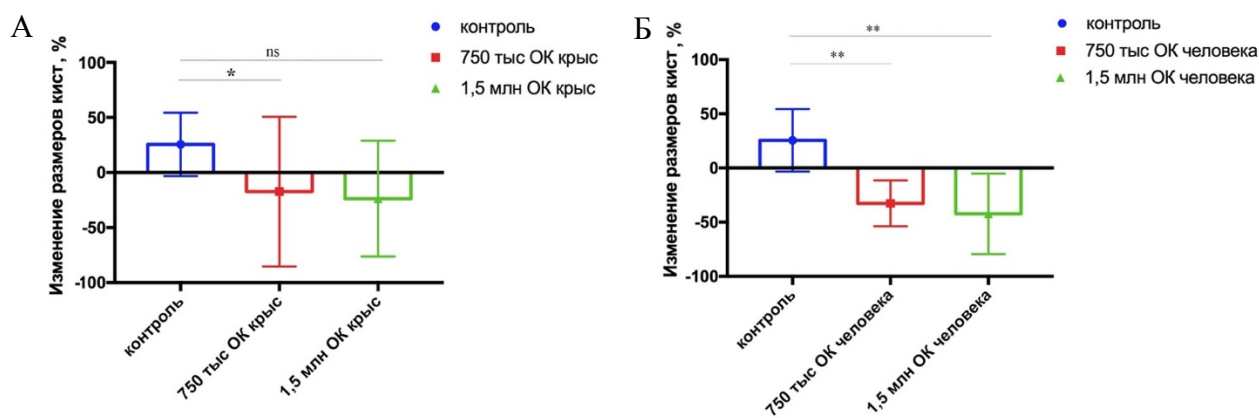


Рисунок 9. Изменение размеров кист через 4 недели после трансплантации обкладочных клеток (ОК) крыс (А) и человека (Б) в количестве 750 тысяч клеток и 1,5 миллиона. Изменение выражено как отношение размеров кист после трансплантации к объему до

трансплантации (в процентах). На диаграмме представлены средние значения со стандартными отклонениями. Сравнение с контролем проводили с использованием теста Данна. *($p < 0,05$), **($p < 0,01$), ns (not significant) – нет статистически значимых различий.

Кроме того, полное исчезновение кист наблюдалось у одного животного при трансплантации 1,5 миллионов обкладочных клеток крыс (рис. 10) и у двух животных при трансплантации 1,5 миллионов клеток человека. При сопоставлении полученных данных об исчезновении кист с результатами ВВВ-теста у тех же самых животных показано увеличение двигательной активности на 2 балла, что соответствует средним показателями динамики восстановления двигательной активности в пределах экспериментальных группы. Таким образом, можно говорить только об индивидуальных способностях отдельных животных к восстановлению спинного мозга. При трансплантации препаратов нейральных стволовых/прогениторных клеток и комбинации этих клеток не было выявлено достоверного уменьшения размеров кист.

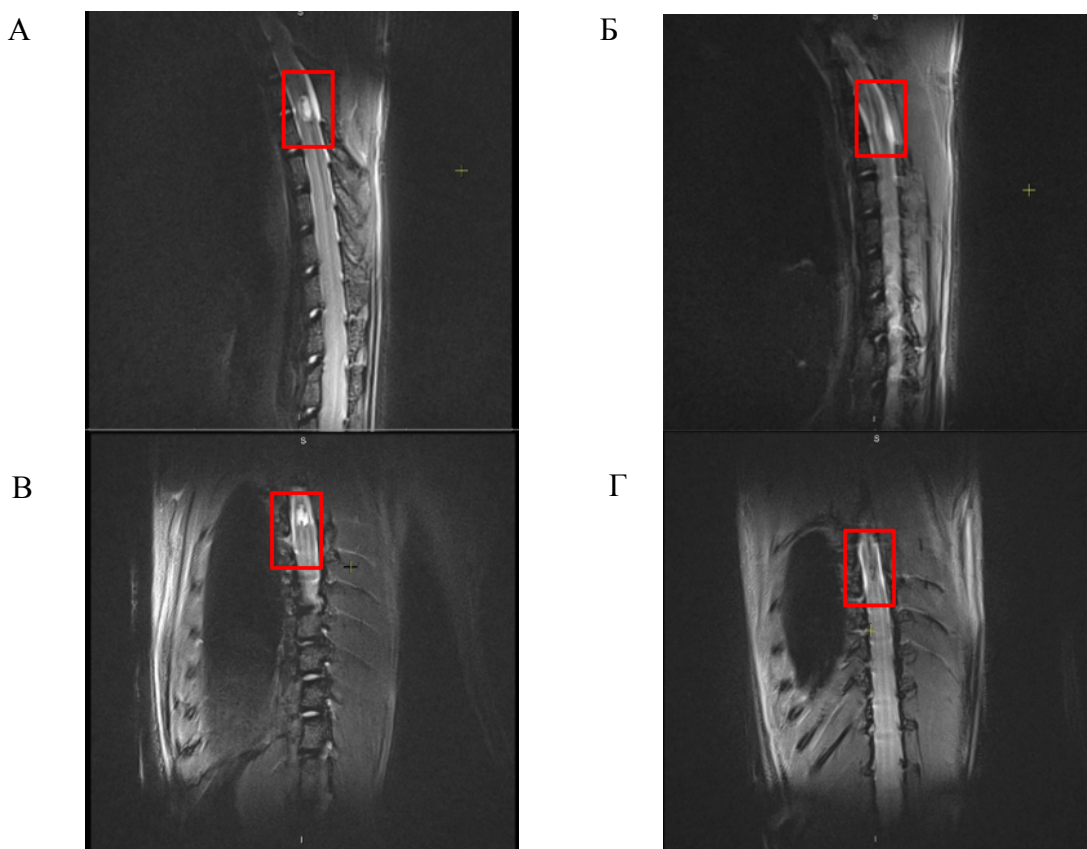


Рисунок 10. МРТ визуализация посттравматических кист спинного мозга до (А, В) и через 4 недели после трансплантации 1,5 миллионов обкладочных клеток крыс (Б, Г). Изображения были получены в сагиттальной (А, Б) и аксиальной (В, Г) проекциях. После трансплантации клеток наблюдается исчезновение кист. Область кисты выделена рамкой.

Полученные данные демонстрируют важность персонализированного подхода в последующих клинических исследованиях в этой области, когда необходимо учитывать биохимические, физиологические и генетические особенности каждого отдельного пациента.

Выявление трансплантированных клеток в посттравматических кистах спинного мозга

Обкладочные клетки обонятельной слизистой оболочки человека и крыс и нейральные стволовые/прогениторные клетки, меченные РКН26, выявляли в области кист и в близлежащей ткани спинного мозга через 2 и 4 недели после трансплантации, что может свидетельствовать о выживаемости этих клеток в течение 4 недель и миграции через стенку кисты (Рис. 11) (Voronova A.D. et al., 2018; Stepanova O.V. et al., 2019). Однако, этот вопрос требует дальнейшего изучения.

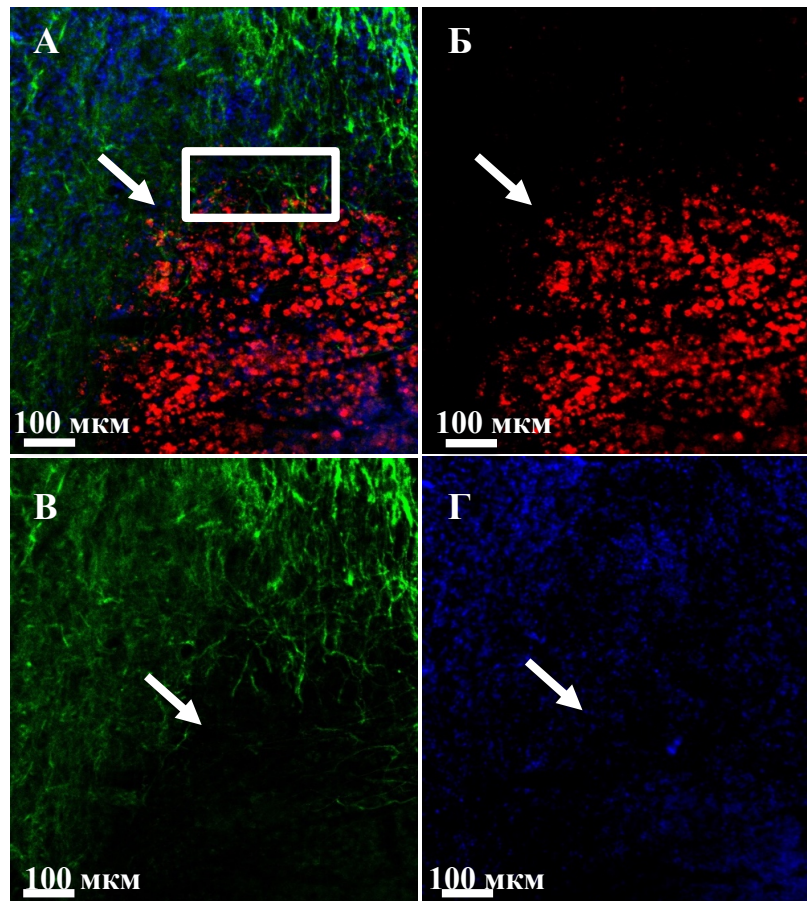


Рисунок 11. Выявление обкладочных клеток человека в посттравматических кистах спинного мозга через 4 недели после трансплантации. А- совмещение изображений Б, В, Г. Б - РКН26-меченые обкладочные клетки крыс, В - окрашивание с антителами к маркеру зрелых нейронов b-III-тубулину, Г - окрашивание ядер DAPI. Наблюдается миграция клеток в близлежащие ткани спинного мозга (отмечено прямоугольником). Область кисты отмечена стрелкой.

В нашей работе положительные результаты по восстановлению двигательной активности были получены 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. 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, 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). Таким образом, при трансплантации в кисту создаются условия, когда клетки могут оказывать регенеративный эффект длительное время после трансплантации. Как известно, трансплантированные обкладочные клетки могут мигрировать через глиальный рубец и оказывать паракринные эффекты, способствуя выживанию нейронов, росту их аксонов, нейронной пластичности и регенерации спинного мозга таким образом (Santas-Silva A. et al., 2007; Nori S. et al., 2017). Также показано, что обкладочные клетки секретируют матриксные металлопротеиназы, которые способствуют деградации внеклеточного матрикса капсулы кисты, таким образом, способствуя уменьшению ее размеров (Yui S. et al., 2014).

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применяемые в настоящее время методы лечения посттравматических кист спинного мозга практически неэффективны. В связи с этим поиск новых подходов к лечению посттравматических кист спинного мозга является актуально задачей. Перспективным направлением в этой области является клеточная терапия.

В данной работе 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 слизистой оболочки, 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 и с помощью анализа МРТ изображений. Положительные эффекты были получены при использовании обкладочных клеток как крыс, так и человека. Показано, что трансплантация обкладочных клеток способствует достоверному улучшению показателей двигательной активности, уменьшению размеров кист, а также полному исчезновению кист у некоторых животных.

Разработка оптимальных протоколов для получения клеточных препаратов из обонятельной выстилки 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 выстилки 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи 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

1. 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.
2. Stepanova O.V., Voronova A.D., Chadin A.V., Valikhov M.P., Abakumov M.A., Reshetov I.V., Chekhonin V.P. 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.
3. Voronova A.D., Stepanova O.V., Valikhov M.P., Chadin A.V., Dvornikov A.S., Reshetov I.V., Chekhonin V.P. Preparation of Human Olfactory Ensheathing Cells for the Therapy of Spinal Cord Injuries // Bull Exp Biol Med. — 2018. — V. 164. — №4. — P. 523-7.
4. Voronova A.D., Valikhov M.P., Stepanova O.V., Melnikov P.A., Chadin A.V., Sidoruk K.N., Semkina A.S., Abakumov M.A., Reshetov I.V., Chekhonin V.P. 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.
5. Voronova A.D., Stepanova O.V., Valikhov M.P., Chadin A.V., Semkina A.S., Abakumov M.A., Reshetov I.V., Chekhonin V.P. 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.
6. 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.
7. Voronova A.D., Stepanova O.V., Valikhov M.P., Chadin A.V., Semkina A.S., Chekhonin V.P. 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.
8. 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.

Другие публикации

9. Воронова А.Д., Степанова О.В., Чадин А.В., Бирюкова Г.К., Решетов И.В., Чехонин В.П. Получение клеток обонятельной выстилки, предполагаемых для использования в клеточной терапии посттравматических кист спинного мозга. Материалы III Всероссийской научной

- конференции молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия». Санкт-Петербург // Медицинский академический журнал. - 2016. - Т. 16. - №4. - с. 208.
10. Воронова А.Д., Степанова О.В., Чадин А.В., Бирюкова Г.К., Решетов И.В., Чехонин В.П. Влияние стволовых клеток обонятельной выстилки на регенеративные процессы в нервной ткани // Материалы IX международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва. - 2017. - с. 126-127.
 11. Воронова А.Д., Степанова О.В., Чадин А.В., Валихов М.П., Решетов И.В., Чехонин В.П. Клетки обонятельной выстилки в терапии посттравматических кист спинного мозга. Материалы III национального конгресса по регенеративной медицине. Москва // Гены и клетки. - 2017. - Т.12. - № 3. - с.67.
 12. Stepanova O V, Voronova A.D., Valikhov M P, Chadin A V, Reshetov I V and Chekhonin V P. The therapeutic effect of rat olfactory ensheathing cell transplantation on posttraumatic cysts of the spinal cord. Материалы 11th International Conference on Tissue Engineering & Regenerative Medicine. Rome // Journal of Tissue Science & Engineering. - 2018-V.9(1). - P.50-51.
 13. Stepanova O.V., Voronova A.D., Chadin A.V., Valikhov M.P., Semkina A.S., Karsuntseva E.K., Chekhonin I.V., Shishkina V.S., Reshetov I.V., Chekhonin V.P. 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.
 14. Воронова А.Д., Степанова О.В., Валихов М.П., Чадин А.В., Семкина А.С., Абакумов М.А., Решетов И.В., Чехонин В.П. Сравнение эффективности трансплантации обкладочных клеток крыс и человека при разных типах хронического повреждения // Материалы IX международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва. - 2019. - с. 240-243.
 15. Степанова О.В., Воронова А.Д., Чадин В.П., Валихов М.П., Семкина А.С., Решетов И.В., Чехонин В.П. Эффективность трансплантации обкладочных клеток обонятельной выстилки крыс и человека при хронических повреждениях спинного мозга. Материалы IV национального конгресса по регенеративной медицине. Москва // Гены и клетки. - 2019. - Т.14. - № S1. - С.222.
 16. Воронова А.Д., Степанова О.В., Валихов М.П., Чадин В.П., Карсунцева Е.К., Семкина А.С., Решетов И.В., Чехонин В.П. Получение и применение комбинированного препарата клеток обонятельной выстилки при травмах спинного мозга. Материалы IV национального конгресса по регенеративной медицине. Москва // Гены и клетки. - 2019. - Т.14. - № S1. - С. 56.
 17. Карсунцева Е.К., Воронова А.Д., Степанова О.В., Валихов М.П., Чадин А.В., Семкина А.С., Фурса Г.А., Мельников П.А., Решетов И.В., Чехонин В.П. Выживаемость трансплантированных клеток обонятельной выстилки человека при посттравматических кистах спинного мозга. Материалы VII Молодежной школы-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН. Санкт-Петербург // Гены и Клетки. - 2020. - Т. 14. - №3-1. - с. 163-164.
 18. Фурса Г.А., Воронова А.Д., Степанова О.В., Карсунцева Е.К., Валихов М.П., Чадин А.В., Вишневский Д.А., Решетов И.В., Чехонин В.П. Методологические особенности получения адгезивной культуры нейральных стволовых/прогениторных клеток обонятельной выстилки крыс в терапии посттравматических кист спинного мозга. Материалы VII Молодежной школы-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН. Санкт-Петербург // Гены и Клетки. - 2020. - Т. 14. - №3-1. - с. 34-35.

Патенты

1. Патент РФ № 2676142. Зарегистрирован 26.12.2018. «Способ получения 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.