

УДК 57.017.35-611.83

# Восстановление поврежденного нерва с помощью клеточной терапии (фундаментальные аспекты)

Е. С. Петрова

Институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

E-mail: lemmorphol@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.03.2015

**РЕФЕРАТ** В обзоре обобщены результаты экспериментальных исследований последних лет, посвященных стимуляции восстановления периферических нервных проводников с помощью стволовых и прогениторных клеток. Проанализированы данные о подборе клеточных элементов, способных вырабатывать нейротрофические и ростовые факторы и выживать при пересадке в поврежденный нервный ствол или кондуит. Описаны способы усовершенствования кондуитов, соединяющих сегменты перерезанного нерва. Представлены данные о механизмах влияния пересаженных клеток на рост и регенерацию нервных волокон реципиента. Отмечены возможные негативные последствия трансплантации стволовых клеток. Подчеркнута необходимость дальнейшего изучения судьбы пересаженных клеток в условиях измененного микроокружения.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** клеточная терапия, нерв, регенерация, стволовые клетки.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ПНС – периферическая нервная система; СК – стволовые клетки; NGF – фактор роста нервов; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; BDNF – нейротрофический фактор головного мозга; bFGF – основной фактор роста фибробластов; HGF – фактор роста гепатоцитов; NF-3 – нейротрофин-3; МРТ – магнитно-резонансная томография; GFP – зеленый флуоресцентный белок; МСК – мезенхимные стволовые клетки.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время регенерацию периферических нервных проводников стимулируют с использованием различных экспериментальных подходов. Традиционно ведется разработка способов ускорения восстановления нервных проводников с помощью лекарственных средств [1], физических факторов (магнитное поле) [2, 3] и электростимуляции [4–6]. Совершенствуются методы нейропластики [7] и шовной техники [8]. Один из подходов – создание специальных биоинженерных конструкций (кондуитов), которые могли бы заменить аутотрансплантат сегмента нерва, применяемый в клинической практике для соединения проксимального и дистального концов нервного проводника после травмы. Тем не менее все эти подходы недостаточно эффективны для решения проблемы восстановления поврежденного нерва. Это объясняется тем, что, несмотря на большую историю репаративной регенерации нервов, начиная с работ А. Валлера, С. Рамон-и-Кахаля, Б.С. Дойникова [9–11], молекулярные механизмы, регулирующие сложные процессы, развивающиеся в периферических нервных проводниках после травмы, до сих пор не ясны и требуют глубокого изучения.

После травмирования нерва путем пережатия или перерезки в дистальном его отделе начинаются деструктивные процессы, включающие в себя дегенерацию осевых цилиндров нервных волокон, разрушение миелиновых оболочек, распад миелина и активацию макрофагов. Все эти изменения соответствуют понятию «валлеровская дегенерация». Практически одновременно в поврежденном нерве начинаются репаративные процессы: наблюдается рост нервных волокон из проксимального отдела на периферию. В месте повреждения нерва часто образуется соединительно-тканый рубец, препятствующий направленному росту регенерирующих аксонов, что, в свою очередь, приводит к формированию невромы. Кроме того, в тканях и органах-мишенях после травмирования нерва развиваются дистрофические изменения, которые снижают эффективность реиннервации. Все это указывает на необходимость поиска новых способов ускорения регенерации нервных проводников.

Известно, что важную роль в регенерации нервных проводников играют гуморальные факторы, участвующие в создании микроокружения, необходимого для роста аксонов. К ним относятся ростовые

и нейротрофические факторы, цитокины и белки внеклеточного матрикса [12–14]. Для исследования их влияния на репаративные процессы разрабатываются различные модели: введение факторов роста в поврежденный нерв или кондуит с помощью микрокапсул или мини-насосов (инъекционных аппаратов, обеспечивающих постоянное поддержание концентрации вещества в течение длительного времени); трансплантация клеточных элементов, секретирующих необходимые факторы, и применение плазмид, способствующих продукции нейротрофических и ангиогенных веществ [15–18].

Один из перспективных способов стимуляции регенерации нерва – клеточная терапия, в которой источником трофических и ростовых факторов служат трансплантируемые клетки. К таким элементам, в частности, относятся сингенные шванновские клетки (нейролеммоциты) [12, 13, 15]. После травмирования нервных стволов именно шванновские клетки, участвующие в процессе миелинизации и вырабатывающие ряд таких биологически активных веществ, как NGF, VEGF, BDNF и другие, обеспечивают успех регенерации нервных волокон. Однако получение жизнеспособных донорских шванновских клеток в нужном количестве не всегда возможно.

В последнее десятилетие в клеточной терапии травмированных нервов предложено наряду со шванновскими клетками использовать эмбриональные стволовые клетки, МСК, клетки обонятельных структур, стволовые клетки волосяных фолликулов и другие клеточные элементы. Результаты этих работ обобщены в обзорах [19–25]. Однако число экспериментальных исследований в этой области, выполненных как зарубежными, так и отечественными авторами, увеличивается, появляются новые требующие решения вопросы. Цель настоящей работы состояла в обобщении результатов исследований, выполненных за последние три года.

На современном этапе на первый план выходят следующие задачи: подбор клеточных элементов, способных вырабатывать нейротрофические и ростовые факторы и длительно выживать при пересадке в поврежденный нерв или в кондуит; изучение механизмов их влияния на рост и регенерацию нервных волокон; усовершенствование кондуитов и их наполнителей; поиск способов повышения эффективности терапии с использованием СК; разработка методов оценки восстановления нерва после повреждения и применения клеточной терапии. В единичных работах ставится вопрос о возможных негативных последствиях такой терапии.

Влияние клеточной терапии на регенерацию поврежденных нервных стволов изучают с использованием различных моделей. Клетки вводят

непосредственно в травмированный нерв, в кондуит, соединяющий концы перерезанного нерва, внутривенно или в иннервируемую мышцу [26]. Используются различные модели повреждения нерва: передавливание зажимом [27–31], наложение лигатуры [32], перерезка с последующим наложением швов [33]. Отдельно стоят работы, в которых для соединения проксимального и дистального сегментов перерезанного нерва используют специальные кондуиты. В последние годы проводятся поиск биodeградируемых материалов для создания таких кондуитов и подбор специальных наполнителей с учетом создания микроокружения для трансплантируемых клеток [20, 34–36].

### **КЛЕТОЧНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В КАЧЕСТВЕ КОМПОНЕНТОВ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИЯХ НЕРВА**

В настоящее время в большинстве экспериментов на травмированном нерве используются МСК, которые получают из разных источников: из костного мозга [37], жировой ткани [24, 25, 38–42], пуповины [43], амниотической жидкости [44]. Выбор таких источников МСК, как костный мозг или подкожная жировая клетчатка, связан с доступностью их получения и возможностью аутологичных пересадок. Кроме того, МСК имеют еще одно свойство, которое делает их привлекательным материалом для пересадок – способность модулировать иммунный ответ. Показано, что МСК обладают иммуносупрессорным действием [40, 45]. Анализ молекулярных механизмов взаимоотношений МСК и иммунокомпетентных клеток показал, что введение МСК приводит к угнетению функций Т- и В-лимфоцитов и ингибированию созревания дендритных клеток [46]. Однако результаты некоторых исследований противоречат этим наблюдениям. Так, МакГрат и соавт. [37] на модели поврежденного седалищного нерва крыс с использованием фибринового кондуита с фибриновым наполнителем показали, что введенные в кондуит МСК человека оказывают положительный эффект на регенерацию нерва только в том случае, если применяется иммуносупрессия циклоспорином А. Изучение макрофагальной реакции в кондуите через 3 недели после операции показало, что под действием иммунодепрессанта снижается число макрофагов и лимфоцитов, что опосредованно приводит к стимуляции роста аксонов. Противоречия в данных о влиянии экзогенных МСК на иммунную систему реципиента можно объяснить различиями в способах введения МСК в организм реципиента и источниках их получения. В опытах *in vitro* показано, что МСК, выделенные из костного мозга, жировой ткани или пупочного канатика, различаются по спо-

способности модулировать продукцию иммуноглобулинов в клетках В-лимфоидного ряда [47]. Установлено также, что МСК из разных источников различаются пластичностью, нейрогенным потенциалом и паракринной активностью [48, 49].

Отмечена высокая миграционная способность МСК [50]. Они оказывают влияние на регенерацию аксонов поврежденного нерва не только при введении непосредственно в место повреждения нерва или в конduit, соединяющий концы перерезанного нерва [26, 39, 51], но и при внутривенном введении [27, 30, 52]. МСК человека, благодаря их способности к миграции, через 7 сут после внутривенного введения мышам определяются в области повреждения седалищного нерва и ускоряют его функциональное восстановление [27].

В разрабатываемых методах клеточной терапии, наряду с МСК, используются нейральные стволовые клетки (НСК). Так, Лин и соавт. [53] выделяли НСК спинного мозга эмбрионов крыс на 14–15 сут развития и культивировали в течение 7 сут в определенных условиях. Когда клетки приобретали нейрональный и глиальный фенотип (начинали синтезировать  $\beta$ III-тубулин или GFAP соответственно), их взвесь вводили в дистальный конец перерезанного большеберцового нерва. Такая трансплантация способствовала восстановлению денервированной икроножной мышцы. Подобные исследования выполняли и ранее [54]. Новизна результатов работы Лин и соавт. [53] заключается в том, что авторы рекомендуют пересаживать клетки не сразу после повреждения нерва, а спустя 7 сут. Через несколько суток после повреждения в нерве заканчивается острая фаза воспаления, уменьшается концентрация воспалительных цитокинов, возрастает пролиферация шванновских клеток и синтез ими трофических факторов [53]. Такое микроокружение более благоприятно для пересаженных НСК, чем микроокружение, формирующееся в нерве сразу после повреждения.

Некоторые исследователи в качестве клеточной терапии, направленной на стимуляцию регенерации поврежденного нерва у мышей, используют нейральные стволовые клетки, выделенные из субвентрикулярной нейрогенной зоны взрослых мышей [55]. Такая терапия способствует выживанию мотонейронов спинного мозга реципиента, подвергающихся ретроградной дегенерации вследствие повреждения седалищного нерва. Кроме того, она приводит к увеличению числа регенерирующих миелинизированных аксонов в дистальном конце поврежденного нерва почти в 3 раза. Высказано предположение о том, что НСК, как и МСК, обладают иммуномодулирующим действием [55].

Американские [56] и японские [57] исследователи

независимо друг от друга применили для клеточной терапии поврежденного нерва грызунов индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs). Известно, что iPSCs, полученные из соматических клеток взрослого организма (в частности, фибробластов кожи) путем активации определенных генов, широко используются в экспериментальных разработках в области регенеративной медицины. Это связано с тем, что iPSCs имеют высокий пролиферативный потенциал, их можно получить в необходимом количестве из клеток реципиента. Установлено, что наполнение этими клетками биodeградируемых кондуитов, соединяющих сегменты перерезанного нерва, приводит к увеличению роста регенерирующих аксонов реципиента в несколько раз по сравнению с контролем [57]. Этот эффект удалось еще больше усилить с помощью трех фундаментальных методологий: кондуита из биodeградируемых материалов, наполнения его iPSCs, а также введения в него микрокапсул, содержащих фактор роста bFGF [58]. Применение нейрогенных СК, полученных из iPSCs человека, позволило выявить пересаженные клетки в дистальном конце нерва среди нервных волокон реципиента [56]. Для этого ядерный антиген клеток человека выявили иммуногистохимическими методами [56]. Колокализация в этих клетках двух антигенов: ядерного антигена клеток человека и белка S100, маркера шванновских клеток, позволила утверждать, что пересаженные клетки дифференцируются в направлении нейролеммоцитов, а механизм, объясняющий стимуляцию роста аксонов, связан с участием экзогенных клеток в миелинизации регенерирующих волокон. Имеются данные, что при использовании разных моделей повреждения нерва iPSCs могут дифференцироваться в клетки различного типа, например, в нейроны, экспрессирующие  $\beta$ III-тубулин [59], или в гладкомышечные клетки кровеносных сосудов [60]. Учитывая результаты этих пионерских исследований, можно заключить, что закономерности дифференцировки iPSCs, развивающихся в условиях пересадки в поврежденный нерв или конduit, требуют дальнейшего изучения.

Индийские исследователи [33] применили в терапии поврежденного седалищного нерва крыс мононуклеарные клетки, выделенные из костного мозга. Через 1 месяц после введения этих клеток в разных концентрациях в место повреждения нерва наблюдали положительный дозозависимый эффект клеточной терапии. Однако авторы не высказывали предположений по поводу механизмов полученного эффекта. Возможно, он связан с паракринной активностью мононуклеарных клеток костного мозга, которую отмечают некоторые исследователи [61]. Можно также предположить, что экзогенные мононуклеар-

ные клетки способствуют более быстрому очищению области повреждения нерва от продуктов распада миелина, тем самым ускоряя репаративные процессы и рост аксонов.

Среди новых, ранее не используемых клеточных элементов, нужно отметить миогенные стволовые/прогениторные клетки, полученные из скелетной мышечной ткани [31, 62, 63]. Тамаки и соавт. [63] показали, что после пересадки в нерв такие клетки-предшественники способны дифференцироваться как в шванновские клетки, так и в соединительно-тканые клетки эндоневрия и периневрия, и в клетки кровеносных сосудов (эндотелиоциты, перициты, гладкомышечные клетки). Доступность и легкость получения таких клеток, возможность их использования для аутологичных пересадок привлекают исследователей, однако имеются данные и о негативных последствиях их применения [62].

### **ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ВЛИЯНИЯ КЛЕТочНОЙ ТЕРАПИИ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВНЫХ ПРОВОДНИКОВ**

Механизмы благоприятного влияния клеточной терапии на регенерацию нервов изучены недостаточно. Можно выделить следующие возможные механизмы: дифференцировка экзогенных клеточных элементов в направлении шванновских клеток, их участие в миелинизации регенерирующих нервных волокон, выработка пересаженными клетками трофических факторов и белков внеклеточного матрикса, способствующих росту аксонов реципиента, стимуляция пролиферации и дифференцировки эндогенных клеток реципиента, стимуляция ангиогенеза, снижение воспалительной реакции в поврежденном нерве.

#### **Дифференцировка СК в шванновские клетки**

Обсуждается возможность формирования из пересаженных СК клеточных элементов, обладающих свойствами шванновских клеток. Некоторые авторы считают, что клеточные элементы могут дифференцироваться непосредственно в шванновские клетки после пересадки в нерв и участвовать в процессе миелинизации регенерирующих аксонов. Другие исследователи полагают, что это возможно только после предварительной «трансдифференцировки» или «предифференцировки» этих клеток в условиях *in vitro* перед пересадкой. Термин «предифференцировка» используется в случае применения НСК или ЭСК. О «трансдифференцировке» говорят, когда применяют МСК. Хотя здесь уместнее использовать термин «трансдетерминация», предложенный В.Е. Охотиным и соавт. [64]. Известно, что МСК в условиях *in situ* являются источником клеток тканей мезодермального происхождения: костной, мышечной,

жировой и т.д., они детерминированы в направлении дифференцировки в клетки соответствующих типов. При добавлении в культуральную среду различных биологически активных веществ их детерминация может изменяться – происходит трансдетерминация, приводящая к формированию из МСК клеток, подобных нейролеммоцитам, нейронам, астроцитам и др.

Томита и соавт. [28] изучали глиальную дифференцировку МСК, полученных из жировой ткани человека, в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Было подтверждено, что при культивировании с применением смеси глиальных факторов роста, добавленных в культуральную среду, возможно формирование из МСК клеток, обладающих отдельными свойствами нейролеммоцитов. Установлено, что МСК с «направленной дифференцировкой» отличаются от обычных МСК более высокой (в 7 раз) выживаемостью после пересадки в поврежденный большеберцовый нерв крысы. Кроме того, такие МСК (меченные GFP) способны участвовать в миелинизации регенерирующих аксонов: одна треть пересаженных клеток была ассоциирована с регенерирующими аксонами. В них наблюдалась колокализация GFP и P0, маркера нейролеммоцитов. Способность МСК дифференцироваться в клетки, проявляющие свойства нейролеммоцитов, отмечена и другими авторами [65, 66].

Некоторые исследователи считают, что большинство пересаженных МСК не дифференцируются в нейролеммоциты, они остаются в своем первоначальном состоянии [67], а стимуляция роста аксонов реципиента под действием клеточной терапии связана не с трансдифференцировкой экзогенных клеток, а с выработкой ими трофических факторов [26, 67, 68].

#### **Секреция СК трофических факторов и белков внеклеточного матрикса**

В большинстве работ, выполненных на поврежденном нерве за последние 3 года, при проведении клеточной терапии предлагается использовать МСК из разных источников: костного мозга, жировой ткани, пуповинной крови и др. Широкое использование МСК в экспериментах, направленных на стимуляцию репаративных процессов, основано на их высокой секреторной активности [69]. Способность МСК вырабатывать трофические факторы, факторы роста и цитокины убедительно доказана [27, 38, 70, 71], причем, с возрастом эта способность снижается как у человека, так и у экспериментальных животных [72, 73].

Среди трофических факторов, вырабатываемых МСК и стимулирующих рост аксонов, следует назвать NGF, BDNF, NF-3, инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-I) [24, 27, 29, 38, 51].

Кроме того, МСК секретируют такие ангиогенные факторы, как VEGF и тромбоцитарный фактор роста (PDGF) [27, 38].

Убедительно показано, что МСК, полученные из жировой ткани и примененные для улучшения регенерации нерва, способны синтезировать BDNF. Установлено, что нейтрализация BDNF антителами к этому белку снижает его влияние на регенерацию нервных волокон [29]. С помощью специфических антител установлено также, что МСК, пересаженные в конduit, соединяющий сегменты перерезанного нерва, продуцируют bFGF [71].

Однако то, на какие именно процессы воздействуют вырабатываемые факторы, какие клеточные реакции они могут вызывать в регенерирующем нерве, изучено недостаточно. Считается, что нейротрофические факторы влияют на мотонейроны и чувствительные нейроны реципиента [26]. Показано, что нейротрофические факторы, вырабатываемые пересаженными в поврежденный нерв клетками, оказывают ретроградное нейропротективное воздействие на соответствующие мотонейроны и чувствительные нейроны реципиента, вследствие чего число аксонов в поврежденном периферическом нерве увеличивается. Предполагается, что МСК, введенные в поврежденный нерв, оказывают нейропротекторное действие на клетки чувствительного ганглия заднего корешка благодаря выработке наряду с BDNF эндотелиального фактора роста, фактора роста гепатоцитов и инсулиноподобного фактора роста [70].

Положительный эффект клеточной терапии проявляется уже в первую неделю после операции [29]. Известно, что в это время после любого травматического повреждения периферического нерва в дистальном его конце, как правило, наблюдается гибель аксонов и распад миелина [9, 74, 75]: после перерезки – в дистальном сегменте дегенерируют все нервные волокна; после передавливания – часть из них может сохраняться. В связи с этим можно предположить, что присутствие в передавленном нерве экзогенных клеток-предшественников с высокой паракринной активностью в первые несколько дней после повреждения способствует не столько росту аксонов, сколько их сохранности.

#### **Стимуляция эндогенных клеток нерва реципиента**

Эндогенные шванновские клетки создают микроокружение, необходимое для регенерации волокон периферического нерва. Именно эти клетки способны вырабатывать трофические факторы, цитокины и белки внеклеточного матрикса, необходимые для поддержания и роста нервных волокон [12–14]. Считается, что при клеточной терапии активируются шванновские клетки реципиента. Так, при вве-

дении в нерв или в конduit, соединяющий концы поврежденного нерва, СК наблюдается увеличение пролиферативной активности шванновских клеток реципиента и стимуляция секреции ими биологически активных веществ [51, 71, 76, 77]. Применение клеточной терапии (в данном случае НСК) приводит к увеличению экспрессии NGF и HGF в эндогенных шванновских клетках [77]. Оригинальное исследование провели Маркони и соавт. [27]. Исследуя состав кондиционной среды культуры МСК, показали, что в условиях *in vitro* МСК секретируют ряд нейростовых факторов, но не вырабатывают нейротрофический фактор глиальных клеток (GDNF). Оказалось, что после пересадки таких МСК в нерв концентрация GDNF в нервном стволе увеличивается. Сделан вывод, что клеточная терапия приводит к стимуляции собственных шванновских клеток, которые начинают вырабатывать GDNF в большей концентрации, чем в норме.

Улучшение регенерации нерва реципиента под влиянием клеточной терапии связано со стимуляцией ангиогенеза. Ранее отмечалось, что при хирургических вмешательствах регенерация нервных проводников зависит от состояния их кровеносных сосудов и уровня их кровоснабжения [78]. С помощью генной терапии подтверждено, что ряд ангиогенных факторов способствуют репаративным процессам в нервных проводниках [16, 17]. Улучшение кровоснабжения нерва под влиянием МСК связано с выработкой ими фактора роста фибробластов, эндотелиального фактора роста, плацентарного фактора роста и других ангиогенных белков [38]. Введение СК, полученных из жировой ткани, в фибриновый конduit, соединяющий сегменты перерезанного седалищного нерва, улучшает васкуляризацию кондуита и способствует регенерации нерва благодаря экспрессии пересаженными клетками VEGF-A и ангиопоэтина-1 [79].

#### **Ингибирование роста соединительной ткани, уменьшение рубца**

Воспаление и, как его следствие, разрастание соединительной ткани (фиброз) мешают росту периферических аксонов. Есть мнение, что клеточная терапия может препятствовать развитию этих процессов. Маркони и соавт. [27] исследовали дегенерацию в дистальном конце передавленного зажимом седалищного нерва крысы после введения МСК. Используя маркеры лимфоцитов (CD3) и моноцитов/макрофагов (CD11b), выявили значительное уменьшение воспалительных инфильтратов в поврежденном нерве уже через 7 сут, а также через 14 и 21 сут после введения МСК. Регулируя функцию клеток иммунной системы, МСК влияют на уровень воспаления и повреждения в тканях реципиента [46]. Хсу

и соавт. [80] изучали регенерацию перерезанного сегментального нерва крысы после соединения его проксимального и дистального сегментов силиконовым кондуитом со скаффолдом из хитозана и ламинина. К такой конструкции добавляли еще и МСК костного мозга крыс. Оценка процесса воспаления, основанная на подсчете числа эозинофилов и макрофагов на единицу площади гистологического препарата, показала, что стенки кондуита содержат значительное число воспалительных элементов, а применение МСК приводило к уменьшению их количества. По-видимому, эффект МСК связан с выработкой ими противовоспалительных цитокинов. Спектр цитокинов, синтезируемых МСК, охарактеризован в обзоре [81].

Имеются данные, согласно которым клеточная терапия поврежденного нерва с использованием НСК также может уменьшать воспалительную реакцию в нерве после операции. При введении НСК в поврежденном нерве снижается уровень провоспалительных цитокинов (интерлейкинов 1 и 6) [52]. Следует отметить, что роль цитокинов в аксональной дегенерации и регенерации изучена недостаточно, поэтому применение дополнительных клеток, вырабатывающих эти факторы, требует углубленных фундаментальных исследований.

### **БИОИНЖЕНЕРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ СОЕДИНЕНИЯ СЕГМЕНТОВ ПОВРЕЖДЕННОГО НЕРВА**

В практической медицине в тех случаях, когда повреждение нервного сегмента достигает трех и более сантиметров, для соединения проксимального и дистального концов используется трансплантация сегмента аутологичного нерва. Возникающие при этом осложнения (невромы), а также ограниченная возможность получения донорского материала привели к необходимости создания конструкций, заменяющих трансплантируемый аутологичный сегмент (см. обзоры [20, 35, 80, 82, 83]). Классификация кондуитов, применяемых для соединения сегментов поврежденных нервов, детально описана в обзоре [35].

В настоящее время продолжают поиски биodeградируемых материалов и специальных наполнителей, способствующих направленной регенерации периферических аксонов [84]. Такие конструкции должны удовлетворять следующим требованиям: они должны быть биосовместимыми, пористыми, биodeградируемыми и нетоксичными. При деградации кондуита не должно возникать воспалительной реакции.

В экспериментах на лабораторных животных разрабатываются конструкции, в качестве наполнителей в которых используются коллаген, фибрин, ламинин, гидрогель кератина. Представлены стратегии создания благоприятного микроокружения для ре-

генерирующих нервных волокон в кондуите, такие, как использование экзогенных ростовых факторов (фактор роста фибробластов, VEGF, нейротрофинов (NF-3, NGF), нейропоэтических цитокинов) и клеточная терапия. Назначение ростовых факторов заключается в том, чтобы способствовать миграции в кондуит и пролиферации шванновских клеток реципиента, которые, в свою очередь, определяют необходимое микроокружение для последующей регенерации нервных волокон.

Еще одно важное требование, предъявляемое к кондуитам, – создание благоприятных условий для трансплантируемых в них СК. Дифференцировка и выживаемость помещаемых в кондуит СК зависят от условий микроокружения [59, 85].

Некоторые кондуиты, хоть и обладают такими свойствами, как биосовместимость, отсутствие токсичности, биodeградируемость, недостаточно пригодны для выживания помещенных в них СК. Например, кондуиты из поликапролактона гидрофобны и могут препятствовать клеточной адгезии, а кондуиты из молочной и гликолевой кислот при деградации выделяют вещества, препятствующие росту клеток [80]. Благоприятный для выживания МСК костного мозга крыс кондуит из хитозана и ламинина также не лишен недостатков. Оказалось, что фрагменты деградации хитозана могут приводить к развитию хронического воспаления в нерве [80].

Помимо создания различных синтетических конструкций для соединения концов поврежденных нервов, продолжается поиск новых биологических заменителей фрагмента нерва. Нередко используются такие биологические кондуиты, как кровеносные сосуды [52, 86]. Следует отметить, что и в более ранних работах [74] использование фрагментов кровеносного сосуда для направленной регенерации перерезанного нерва привело к получению положительных результатов. В экспериментах, направленных на выбор биологических кондуитов для соединения проксимального и дистального концов нерва, изучено влияние компонентов внеклеточного матрикса на регенерацию нервных волокон [87]. В качестве кондуитов для поврежденного нерва крысы применили фрагменты артерии, фрагменты нервного ствола и участки дермы свиньи, лишённые клеток. Клеточные элементы из этих кондуитов были предварительно убраны с помощью специальных методов (см. ниже), а внеклеточный матрикс, свойственный этим органам, сохранен. Данные о составе внеклеточного матрикса получены с помощью иммуногистохимического выявления ряда белков: коллагенов типа I, III и IV, фибронектина и ламинина. Соотношение этих белков в артерии, нерве и дерме различно. Это позволило установить, что благоприятное воздействие

на регенерацию нерва оказывает микроокружение, содержащее ламинин и коллаген типа IV, но не фибронектин и коллаген типа I.

В настоящее время проведено несколько исследований с применением СК и фрагмента нерва, лишённого клеток, в качестве кондуита. Такой трансплантат содержит базальные мембраны и коллагеновые волокна, не препятствует пролиферации и миграции клеток и клеточной адгезии, кроме того, он способствует выживанию пересаженных в него СК [22, 67, 88, 89]. Чтобы пересаженные в такой конduit клетки сохраняли жизнеспособность, следует учитывать способ, с помощью которого удаляли собственные клеточные элементы нерва. Способы получения сегмента нерва для нейротрансплантации, не содержащего клеточных элементов, представлены в обзоре [22], в котором приведены протоколы таких методов удаления клеток из нервных стволов, как обработка низкими температурами, химическими детергентами и при помощи облучения.

Показано, что трансплантация лишённого собственных клеток сегмента нерва с введенными в него МСК жировой ткани крысы в поврежденный нерв кролика не вызывает отторжения или воспаления и стимулирует регенерацию нервных волокон реципиента [88]. Первыми трансплантат заселяют шванновские клетки реципиента. Среди них встречаются дифференцирующиеся в направлении нейролеммоцитов экзогенные МСК. Синтезируя NGF, BDNF и другие факторы, они создают микроокружение, сходное с эндоневрием. С помощью физиологических тестов, электрофизиологической оценки проводимости нерва и морфометрического анализа регенерирующих волокон установлено, что регенерация нерва через такой биологический конduit осуществляется в той же степени, что и через фрагмент аутологичного трансплантата нерва (так называемого «золотого стандарта» для изучения регенерации нерва в эксперименте) [88].

Таким образом, разнообразие используемых кондуитов достаточно велико. От того, из каких материалов состоит конduit и его наполнитель, зависит судьба помещенных в него СК. Вопрос об их выживании и дифференцировке в условиях пересадки в конduit нуждается в изучении. Есть мнение, что выживаемость СК после трансплантации невелика. Поэтому проводится поиск способов увеличения времени жизни пересаженных клеток.

### **СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ, НАПРАВЛЕННОЙ НА УЛУЧШЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОВРЕЖДЕННОГО НЕРВА**

В последние годы для повышения выживаемости пересаживаемых СК и стимуляции регенерации нерв-

ных проводников разрабатываются способы дополнительной терапии.

В качестве такой терапии предлагают, например, совместную пересадку МСК с другими клеточными элементами. Показано, что культивирование МСК с леммоцитами определяет дифференцировку МСК в направлении шванновских клеток, причем последние вырабатывают нейротрофические факторы в большем количестве, чем обычные нейролеммоциты [90]. Использование смеси МСК со шванновскими клетками для наполнения биодеградируемого кондуита, соединяющего сегменты перерезанного нерва, оказалось более эффективным способом стимуляции регенерации поврежденного нерва, чем суспензии, состоящие из клеток одного вида [90].

Применение лазерной терапии способствует восстановлению поврежденных нервных проводников и улучшает регенерацию травмированного нерва через биодеградируемый конduit [91, 92]. Этот эффект связан с уменьшением воспалительных процессов в нерве.

На разных моделях показано, что использование в качестве комбинированной терапии различных биологически активных веществ способствует сохранности СК, пересаженных в конduit, усиливая тем самым их влияние на репаративные процессы. Так, применение МСК в сочетании с трансформирующим фактором  $\beta 1$  приводит к уменьшению апоптоза пересаженных клеток. Следствием этого является улучшение ангиогенеза и снижение воспалительных процессов в поврежденном нерве [93]. Сочетание трансплантации НСК в конduit, состоящий из молочной и гликолевой кислот, с применением нейротрофического фактора NF-3 приводит к улучшению выживания пересаженных клеток. Благодаря созданию с помощью NF-3 благоприятного микроокружения НСК сохраняют жизнеспособность и дифференцируются, главным образом, в нейроны [35]. Показано, что применение СК в сочетании с субстанцией Р улучшает регенерацию нервов и репаративные процессы в коже [94].

В экспериментах на лабораторных животных разработана комбинированная терапия стромальными клетками костного мозга с одновременным введением хондроитиназы ABC (бактериального фермента, применяемого при грыжах межпозвоночных дисков) [95]. Подобная комбинированная терапия улучшает выживаемость пересаженных клеток и способствует регенерации нерва в большей степени, чем только клеточная. Молекулярный механизм этого эффекта заключается в том, что хондроитиназа ABC вызывает деградацию хондроитинсульфата, который способствует образованию соединительно-тканного рубца в поврежденных органах ПНС.

### ОЦЕНКА ПОЛНОТЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ НЕРВА ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Во всех перечисленных экспериментальных исследованиях одной из важнейших задач является адекватная оценка степени регенерации нервных проводников. Морфометрический анализ регенерирующих аксонов, выполненный на полутонких поперечных срезах нерва или кондуита, мы считаем наиболее надежным и наглядным способом оценки регенерации нервных волокон. Этот метод применяется в большинстве работ, изучающих восстановление нервных проводников [4, 32, 36, 51, 91, 94].

Подсчет числа регенерирующих нервных волокон возможен также при помощи иммуногистохимического окрашивания определенных структурных белков, содержащихся в осевых цилиндрах нервных проводников, таких, как  $\beta$ III-тубулин [37, 79] или нейрофиламенты (НФ) [36, 51, 57]. Количественную оценку нервных волокон проводят также после их выявления с помощью иммуногистохимических реакций на НФ и белок Р0 или основной белок миелина – маркеры шванновских клеток [28, 75]. Существует метод оценки полноты восстановления нерва путем измерения площади, занятой структурами, содержащими маркеры шванновских клеток или аксонов [51, 57].

Перечисленные иммуногистохимические методы позволяют оценивать регенерацию аксонов на поперечных срезах, проходящих через нерв. Существуют методические подходы, позволяющие оценивать рост нервных волокон реципиента и на продольных срезах. Длину регенерирующих волокон в поврежденном нерве на продольных срезах измеряют, применяя маркер регенерирующих аксонов – белок нервных окончаний и конусов роста GAP-43 [27]; основной маркер структур ПНС – белок PGP 9.5 [68]; аксональный маркер  $\beta$ III-тубулин [79].

Наряду с морфологической оценкой роста нервных волокон используют физиологические тесты [28, 30, 42, 54, 67] и оценивают изменение проводимости нервов электрофизиологическими методами [39, 53, 60, 75, 96].

Еще один метод оценки целостности нервных проводников – изучение ретроградной дегенерации мотонейронов спинного мозга и чувствительных нейронов спинального ганглия после повреждения нерва [40, 52, 79, 97]. С помощью этого метода показано, что введение МСК в конduit, состоящий из хитозана и ламинина и соединяющий проксимальный и дистальный сегменты перерезанного нерва крысы, приводит к увеличению числа жизнеспособных мотонейронов поясничного отдела спинного мозга реципиента в несколько раз по сравнению с использованием кондуита, не содержащего клетки [80]. Установлено

также, что МСК, введенные в конduit из поликапролактона, соединяющий концы перерезанного седалищного нерва крысы, препятствуют ретроградной дегенерации нейронов спинномозгового ганглия [70]. При этом нейропротективный эффект наблюдается только в том случае, если МСК предварительно подвергали дифференцировке в направлении шванновских клеток [70]. Имеются данные, что посттравматическое выживание чувствительных нейронов улучшается при аллотрансплантации в соответствующий поврежденный проводник нервной ткани эмбрионов [98].

Один из способов оценки регенерации нерва состоит в измерении массы и размеров иннервируемой этим нервом мышцы, а также в изучении ее структурных особенностей. Известно, что полному восстановлению нервов после их травмы препятствуют также структурные изменения, которые достаточно быстро возникают в тканях-мишенях после нарушения иннервации. Например, при перерезке седалищного нерва наблюдается атрофия икроножной мышцы. Уровень восстановления нервных волокон нерва оценивают с помощью измерения массы соответствующей мышцы, гистологического анализа ее мышечных волокон, иммуногистохимического исследования пре- и постсинаптических отделов нервно-мышечных синапсов [34, 54, 65, 86, 96, 99].

В 2012 году появились работы, в которых для мониторинга регенерации нерва после повреждения и после трансплантации МСК стали использовать МРТ [100, 101]. Предварительное мечение МСК супермагнитными наночастицами оксида железа позволяет с помощью МРТ проследить судьбу пересаженных клеток [41, 102].

### НЕГАТИВНЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Возможные негативные последствия клеточной терапии обсуждали ранее многие исследователи [103–108]. Среди негативных последствий применения СК выделяют иммунный ответ реципиента на введение чужеродных клеток, стимуляцию новообразований, развитие воспаления и соединительно-тканного рубца, активацию микрофлоры и др. Отмечают также, что введение эмбриональных закладок или стволовых клеток в поврежденные нервные стволы экспериментальных животных может приводить к нежелательным последствиям [62, 85, 109].

Среди исследований, выполненных в течение последних трех лет, практически не встречается работ, в которых обсуждается проблема опухолевого перерождения трансплантируемых в нерв стволовых клеток. Это связано с отказом от использования в клеточной терапии ЭСК, обладающих наибольшей

среди СК способностью трансформироваться в опухолевые клетки. НСК используют лишь после их прединференцировки, например, в нервные или глиальные клетки, что уменьшает риск перерождения в опухолевые клетки.

Однако поиск новых источников клеток для клеточной терапии иногда дает неожиданные результаты. Лавазани и соавт. [62] для терапии поврежденного нерва предложили миогенные стволовые/прогениторные клетки (MDSPC), которые выделяли из скелетной мышцы взрослых мышей. Показано, что в условиях *in vitro* они образуют структуры, сходные с нейросферами, и экспрессируют маркеры не только миогенных клеток (десмин и актин гладкомышечных клеток), но и маркеры, свойственные нейронам и глиоцитам. Установлено, что после введения в поврежденный нерв крысы MDSPC трансформируются и через 11 недель образуют опухоли больших размеров. Одновременно такие клетки пересадили в мышцу. В условиях характерного для этих клеток микроокружения MDSPC подвергались нормальной дифференцировке в миоциты, что еще раз показывает, насколько велико значение микроокружения для дифференцировки пересаженных клеток-предшественников.

По-видимому, к успеху может привести использование только подвергнутых предварительной дифференцировке МСК, а недифференцированные МСК использовать в клеточной терапии поврежденного нерва опасно [85, 110]. Риск возникновения опухолей необходимо оценивать в ходе долговременных наблюдений. В настоящее время в случае подходов к клеточной терапии поврежденного нерва таких наблюдений немного. В отдельных работах, в которых срок наблюдений достигает года, не отмечено негативных последствий трансплантации [56, 111].

Следует отметить, что значительное внимание уделяется взаимоотношениям МСК с опухолевыми клетками. Это связано с тем, что из-за большого разнообразия свойств МСК по-разному действуют на рост различных опухолей. Есть данные, что благодаря таким свойствам, как ангиогенный эффект, ростстимулирующее и иммуносупрессорное действие, МСК способны поддерживать рост злокачественных образований [112, 113]. Однако МСК способны также подавлять опухолевый рост [69, 114]. Показано, что в процессе продолжительного сокультуривания МСК, полученных из эмбрионального костного мозга мышей, с клетками глиомы U251MG характер действия МСК на пролиферацию опухолевых клеток может изменяться: на ранних сроках культивирования МСК активируют, а затем ингибируют пролиферацию клеток глиомы [115]. Изучение взаимоотношений МСК с опухолевыми тканями про-

должается, однако накопленный материал недостаточен для однозначных выводов и необходимо проведение дальнейших исследований.

Наряду с работами, в которых отмечено негативное влияние клеточной терапии на реципиента, опубликованы данные о том, что эффект от применения клеточной терапии незначителен или отсутствует вовсе [116]. Возможно, что этот эффект проявляется непродолжительное время, как в случае использования СК на других экспериментальных моделях [108, 117]. Все эти вопросы требуют дальнейшего изучения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Во многих работах, посвященных разработке новых клеточных технологий, направленных на стимуляцию восстановления нерва, показано, что клеточная терапия может способствовать росту нервных волокон и улучшать их проводимость. Однако механизмы влияния экзо- и эндогенных клеток на репаративные процессы в тканях реципиента изучены недостаточно. Мало исследованы механизмы воздействия клеточной терапии на собственные клетки нерва реципиента: нейролеммоциты, макрофаги, клетки сосудов, клетки рыхлой соединительной ткани, клетки эпилепсии и периневрия.

В большинстве работ, выполненных в последние годы, в качестве клеточной терапии предлагается использовать МСК, полученные из разных источников: костного мозга, жировой ткани, пуповинной крови и др. Благодаря синтезу различных биологически активных веществ они могут способствовать репаративным процессам в поврежденных тканях. Кроме того, их использование позволяет проводить аутологичные пересадки.

Результаты экспериментов, выполненных на лабораторных животных в течение последнего десятилетия, нашли продолжение в первых попытках клинических исследований [118–121]. Кроме того, в 2012 году впервые на модели диабетической полинейропатии попытались использовать клеточную терапию для восстановления иннервации у животных [60, 93].

Следует отметить, что, несмотря на большое число публикаций, судьба пересаживаемых стволовых клеток и клеток-предшественников до конца не ясна [39, 85, 122]. Эта проблема особенно актуальна в связи с применением новых биоинженерных конструкций, выступающих в качестве кондуитов, соединяющих проксимальный и дистальный сегменты поврежденного нерва. В каждой из таких конструкций создается уникальное микроокружение, определяющее возможность выживания и модификацию направления развития пересаженных клеток. Оказалось, что для обеспечения выживания пересаженных

в нерв или кондукт клеток необходимы дополнительные терапевтические воздействия.

Таким образом, продолжается поиск способов стимуляции направленной регенерации нервных проводников. Использование в опытах, выполненных на поврежденном нерве, клеточной терапии привело к возникновению новых вопросов, требующих углубленных фундаментальных исследований. Для создания новых безопасных медицинских технологий необходимо накопление знаний о преифференцировке и трансдетерминации пересаженных СК, что будет способствовать расшифровке сложных

молекулярных и клеточных механизмов действия клеточной терапии на репаративные процессы в тканях нерва реципиента. Для исключения негативных последствий клеточной терапии необходимо хорошо понимать судьбу пересаженных стволовых клеток и клеток-предшественников в течение сроков, соизмеримых с продолжительностью жизни лабораторного животного. Совершенствование кондуктов и их наполнителей следует осуществлять, учитывая необходимость создания условий, благоприятных как для выживания, так и для дифференцировки и функционирования пересаженных в них клеток. ●

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mohammadi R., Azad-Tigran M., Amini K. // *Injury*. 2013. V. 44. № 4. P. 565–569.
- Нинель В.Г., Норкин И.А., Пучиньян Д.М., Богомолова Н.В., Коршунова Г.А., Матвеева О.В., Айтемиров Ш.М. // *Медицинские науки. Фундаментальные исследования*. 2012. № 12. С. 336–340.
- Beck-Broichsitter В.Е., Lamia A., Geuna S., Fregnan F., Smeets R., Becker S.T., Sinis N. // *Biomed. Res. Int*. 2014. V. 2014. P. 401760.
- Щудло Н.А., Борисова И.В., Щудло М.М. // *Морфология*. 2012. Т. 142. № 12. С. 30–35.
- Maciel F.O., Viterdo F., Chinaque L.F.C., Souza B.M. // *Acta Cir. Bras*. 2013. V. 28. № 1. P. 39–47.
- de Assis D.C.M., Lima K.M., Goes B.T., Cavalcanti J.Z., Paixão A.B., Vannier-Santos M.A., Martinez A.M., Baptista A.F. // *Biomed. Res. Int*. 2014. V. 2014. P. 572949.
- Меркулов М.В., Голубев И.О., Крупаткин А.И., Кузьмичев В.А., Бушуев О.М., Ширяева Г.Н., Кутепов И.А. // *Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова*. 2012. № 3. С. 53–58.
- Берснев В.П., Хамзаев Р.И., Борода Ю.И. // *Вестник хирургии им. И.И. Грекова*. 2009. Т. 168. № 1. С. 61–63.
- Waller A. // *Lond. J. Med*. 1852. V. 4. № 43. P. 609–625.
- Ramon y Cajal S. *Degeneration and regeneration of the nervous system*. L.: Oxf. H. Milford. 1928. V. 1–2. 50 с.
- Дойников Б.С. *Избранные труды по нейроморфологии и невропатологии*. М.: Медгиз, 1955. 468 с.
- Gordon T. // *Neurosurgical Focus*. 2009. V. 26. № 2. P. E3.
- Lutz A.B., Barres B.A. // *Developmental Cell*. 2014. V. 28. P. 7–17.
- Gu Y., Zhu J., Xue C., Li Z., Ding F., Yang Y., Gu X. // *Biomaterials*. 2014. V. 35. № 7. P. 2253–2263.
- Pfister L.A., Papalonzos M., Merkle H.R., Gander B. // *J. Peripher. Nerv. Syst*. 2007. V. 12. № 2. P. 65–82.
- Масгутов Р.Ф., Салафутдинов И.И., Богов А.А., Трофимова А.А., Ханнанова И.Г., Муллин Р.И., Исламов Р.Р., Чельшев Ю.А., Ризванов А.А. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2011. Т. 6. № 3. С. 67–70.
- Чельшев Ю.А., Мухамедшина Я.Ю., Шаймарданова Г.Ф., Николаев С.И. // *Неврол. вестник (журн. им. В.М. Бехтерева)*. 2012. Т. 44. № 1. С. 76–83.
- Масгутов Р.Ф., Ризванов А.А., Богов А.А. (мл.), Галлямов А.Р., Киясов А.П., Богов А.А. // *Практическая медицина*. 2013. Т. 69. № 1–2. С. 99–103.
- Walsh S., Midha R. // *Neurosurgery*. 2009. V. 65. № 4. P. 80–86.
- Chimutengwende-Gordon M., Khan W. // *Open Orthop. J*. 2012. V. 6. № 1. P. 103–107.
- Петрова Е.С. // *Цитология*. 2012. Т. 54. № 7. С. 525–540.
- Szynkaruk M., Kemp S.W.P., Wood M.D., Gordon T., Borschel G.H. // *Tissue Eng. Part B. Rev*. 2013. V. 19. № 1. P. 83–96.
- Zack-Williams S.D., Butler P.E., Kalaskar D.M. // *World J. Stem. Cells*. 2015. V. 7. № 1. P. 51–64.
- Widgerow A.D., Salibian A.A., Kohan E., Sartinferreira T., Afzel H., Tham T., Evans G.R. // *Microsurgery*. 2014. V. 34. № 4. P. 324–330.
- Martinez A.M., Goulart C.O., Ramalho Bdos S., Oliveira J.T., Almeida F.M. // *World J. Stem. Cells*. 2014. V. 6. № 2. P. 179–194.
- Fairbairn N.G., Meppelink A.M., Ng-Glazier J., Randolph M.A., Winograd J.M. // *World J. Stem. Cells*. 2015. V. 7. № 1. P. 11–26.
- Marconi S., Castiglione G., Turano E., Biscolotti G., Angiari S., Farinazzo A., Constantin G., Bedogni G., Bedogni A., Bonetti B. // *Tissue Engineering*. 2012. V. 18. № 11–12. P. 1264–1272.
- Tomita K., Madura T., Mantovani C., Terenghi G. // *J. Neurosci. Res*. 2012. V. 90. № 7. P. 1392–1402.
- Карагяур М.Н. *Влияние мезенхимальных стволовых клеток на восстановление периферического нерва после травмы: Автореф. дис. канд. биол. наук. М.: ФГБУ РКНПК МЗ РФ*, 2013.
- Matthes S.M., Reimers K., Janssen I., Liebsch C., Kocsis J.D., Vogt P.M., Radtke C. // *Biomed. Res. Int*. 2013. V. 2013. P. 573169.
- Zeng X., Zhang L., Sun L., Zhang D., Zhao H., Jia J., Wang W. // *Exp. Ther. Med*. 2013. V. 5. № 1. P. 193–196.
- Петрова Е.С., Исаева Е.Н. // *Изв. АН. Сер. биол.* 2014. № 6. С. 549–556.
- Raheja A., Suri V., Suri A., Sarkar C., Srivastava A., Mohanty S., Jain K.G., Sharma M.C., Mallick H.N., Yadav P.K., et al. // *J. Neurosurg*. 2012. V. 117. № 6. P. 1170–1181.
- Xiong Y., Zhu J., Fang Z.U., Zeng C.G., Qi G.L., Li M.H., Zhang W., Quan D.P., Wan J. // *Inter. J. Nanomedicine*. 2012. V. 7. P. 1977–1989.
- Daly W., Yao L., Zeugolis D., Windebank A., Pandit A. // *J. R. Intarface*. 2012. V. 9. № 67. P. 202–221.
- Georgiou M., Golding J.P., Loughlin A.J., Kingham P.J., Phillips J.B. // *Biomaterials*. 2015. V. 37. P. 242–251.
- McGrath A.M., Brochlin M., Kingham P.J., Novikov L.N., Wiberg M., Novikova L.N. // *Neurosci. Lett*. 2012. V. 516. № 2. P. 171–176.
- Lopatina T., Kalinina N., Karagyaur M., Stambolsky D., Rubina K., Revischin A., Pavlova G., Parfyonova Y., Tkachuk V. // *PLoS One*. 2011. V. 14. № 6. P. e17899.

39. Kim D.Y., Choi Y.S., Kim S.E., Lee J.H., Kim S.M., Kim Y.J., Rhie J.W., Jun Y.J. // *J. Korean. Med. Sci.* 2014. № 3. P. 183–192.
40. Hsueh Y.-Y., Chang Y.J., Huang T.C., Fan S.C., Wang D.H., Chen J.J., Wu C.C., Lin S.C. // *Biomaterials.* 2014. V. 35. № 7. P. 2234–2244.
41. Tseng T.C., Hsu S.H. // *Biomaterials.* 2014. V. 35. № 9. P. 2630–2641.
42. Marinescu S.A., Zărnescu O., Mihai I.R., Giuglea C., Sinescu R.D. // *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2014. V. 55. № 3. P. 891–903.
43. Pereira T., Gartner A., Amorim I., Almeida A., Caseiro A.R., Armada-da-Silva P.A., Amado S., Fregnan F., Varejro A.S., Santos J.D., et al. // *Biomed. Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 302659.
44. Li Y., Guo L., Ahn H.S., Kim M.H., Kim S.W. // *J. Cell. Mol. Med.* 2014. V. 18. № 6. P. 1028–1034.
45. Stagg J., Galipeau J. // *Curr. Mol. Med.* 2013. V. 13. № 5. P. 856–867.
46. Рубцов Ю.П., Суздальцева Ю.Г., Горюнов К.В., Калинина Н.И., Сысоева В.Ю., Ткачук В.А. // *Acta Naturae.* 2012. Т. 4. № 1. С. 24–33.
47. Айзенштадт А.А., Иванова Н.А., Багаева В.В., Смолянинов А.Б., Пиневич А.А., Самойлович М.П., Климович В.Б. // *Цитология.* 2014. Т. 56. № 2. С. 117–122.
48. Земелько В.И., Кожухарова И.В., Алексеенко Л.Л., Домнина А.П., Решетникова Г.Ф., Пузанов М.В., Дмитриева Р.И., Гринчук Т.М., Никольский Н.И., Анисимов С.В. // *Цитология.* 2013. Т. 55. № 2. С. 101–110.
49. Han C., Zhang L., Song L., Liu Y., Zou W., Piao H., Liu J. // *Chin. Med. J. (Engl.)* 2014. V. 127. № 2. P. 329–337.
50. Тюрин-Кузьмин П.А., Воротников А.В., Ткачук В.А. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2013. Т. 99. № 3. С. 294–312.
51. Cartarozzia L.P., Spejo A.B., Ferreira R.S., Barravierab B., Duek E., Carvalhad G.L., Goes A.M., Oliveiraa A.L.R. // *Brain Res. Bull.* 2015. V. 112. P. 14–24.
52. Lerner M.Z., Matsushita T., Lankford K.L., Radtke C., Kocsis J.D., Young N.O. // *Laryngoscope.* 2014. V. 124. № 11. P. 2555–2560.
53. Lin S., Xu L., Hu S., Zhang C., Wang Y., Xu J. // *Muscle Nerve.* 2013. V. 47. № 2. P. 194–201.
54. Thomas C.K., Erb D.E., Grumbles R.M., Bunge R.P. // *J. Neurophysiol.* 2000. V. 84. № 1. P. 591–595.
55. Franchi S., Valsecchi A.E., Borsani E., Procacci P., Zaffa C., Sartori P., Rodella L.F., Vescovi A., Maione S., Rossi F., et al. // *Pain.* 2012. V. 153. № 4. P. 850–861.
56. Wang A., Tang Z., Park I.H., Zhu Y., Patel S., Daley G.Q., Li S. // *Biomaterials.* 2011. V. 32. № 22. P. 5023–5032.
57. Uemura T., Takamatsu K., Ikeda M., Okada M., Kazuki K., Ikada Y., Nakamura H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012. V. 419. № 1. P. 130–135.
58. Ikeda M., Uemura T., Takamatsu K., Okada M., Kazuki K., Tabata Y., Ikada Y., Nakamura H. // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2014. V. 102. № 5. P. 1370–1378.
59. Kuo Y.C., Lin C.C. // *Colloids. Surf. B. Biointerfaces.* 2013. V. 1. № 103. P. 595–600.
60. Okawa T., Kamiya H., Himeno T., Kato J., Sieno Y., Fujiya A., Kondo M., Tsunekawa S., Naruse K., Hamada Y., et al. // *Cell Transplant.* 2013. V. 22. № 10. P. 1767–1783.
61. Байкова Ю.П., Фатхудинов Т.Х., Большакова Г.Б., Бухарова Т.Б., Дубовая Т.К., Кактурский Л.В., Гольдштейн Д.В. // *Клет. техн. биол. мед.* 2011. № 3. С. 140–146.
62. Lavasani M., Pollett J.B., Usas A., Thompson S.D., Pollett A.F., Huard J. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 12. P. e82173.
63. Tamaki T., Hirata M., Soeda S., Nakajima N., Saito K., Nakazato K., Okada Y., Hashimoto H., Uchiyama Y., Mochida J. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 3. P. e91257.
64. Охотин В.Е., Ревизицн А.В., Павлова Г.В. // *Тихоокеанский мед. журн.* 2012. № 2. С. 60–65.
65. Frattini F., Lopes F.R., Almeida F.M., Rodrigues R.F., Boldrini L.C., Tomaz M.A., Baptista A.F., Melo P.A., Martinez A.M. // *Tissue Eng. Part A.* 2012. V. 18. № 19–20. P. 2030–2039.
66. Orbay H., Uysal A.C., Hyakusoku H., Mizuno H. // *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 2012. V. 65. № 5. P. 657–664.
67. Wang Y., Zhao Z., Ren Z., Zhao B., Zhang L., Chen J., Xu W., Lu S., Zhao Q., Peng J. // *Neurosci Lett.* 2012. V. 514. № 1. P. 96–101.
68. Suganuma S., Tada K., Hayashi K., Takeuchi A., Sugimoto N., Ikeda K., Tsuchiya H. // *J. Orthop. Sci.* 2013. V. 18. № 1. P. 145–151.
69. Калинина Н.И., Сысоева В.Ю., Рубина К.А., Парфенова Е.В., Ткачук В.А. // *Acta Naturae.* 2011. Т. 3. № 4. С. 32–39.
70. Reid A.J., Sun M., Wiberg M., Downes S., Terenghi G., Kingham P.J. // *Neuroscience.* 2011. V. 199. P. 515–522.
71. Ribeiro-Resende V.T., Carrier-Ruiz A., Lemes R.M.R., Reis R.A.M., Mendez-Otero R. // *Mol. Neurodegeneration.* 2012. V. 7. P. 34.
72. Ефименко А.Ю., Джояшвили Н.А., Калинина Н.И., Кочегура Т.Н., Ачкурин П.С., Ткачук В.А., Парфенова Е.В. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* 2012. Т. 7. № 4. С. 73–82.
73. Mantovani C., Terenghi G., Magnaghi V. // *Neural Regen. Res.* 2014. V. 9. № 1. P. 10–15.
74. Ноздрачев А.Д., Чумасов Е.И. *Периферическая нервная система.* СПб.: Наука, 1999. 281 с.
75. Sta M., Cappaert N.L., Ramekers D., Baas F., Wadman W.J. // *J. Neurosci. Methods.* 2014. V. 222. P. 189–198.
76. Wang J., Ding F., Gu Y., Liu J., Gu X. // *Brain Res.* 2009. V. 1262. P. 7–15.
77. Xu L., Zhou S., Feng G.Y., Zhang L.P., Zhao D.M., Liu Q., Huang F. // *Mol. Neurobiol.* 2012. V. 46. P. 265–274.
78. Берснев В.П., Яковенко И.В., Семенютин В.Б., Кокин Г.С. *Хирургическое лечение поврежденных нервов с учетом их кровотока и данных интраоперационной диагностики.* Л.: Изд-во Рос. научно-иссл. нейрохирургического института им. А.Л. Поленова, 1991. 30 с.
79. Kingham P.J., Kolar M.K., Novikova L.N., Novikov L.N., Wiberg M. // *Stem Cells Dev.* 2014. V. 23. № 7. P. 741–754.
80. Hsu S.H., Kuo W.C., Chen Y.T., Yen C.T., Chen Y.F., Chen K.S., Huang W.C., Cheng H. // *Acta Biomater.* 2013. V. 9. № 5. P. 6606–6615.
81. Salgado A.J., Reis R.L., Sousa N.J., Gimble J.M. // *Curr. Stem. Cell. Res. Ther.* 2010. V. 5. № 2. P. 103–110.
82. Kuffler D.P. // *Prog. Neurobiol.* 2014. V. 116. P. 1–12.
83. Ramburrin P., Kumar P., Choonara Y.E., Bijukumar D., du Toit L.C., Pillay V. // *Biomed. Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 132350.
84. Nectow A.R., Marra K.G., Kaplan D.L. // *Tissue Eng. Part B Rev.* 2012. V. 18. № 1. P. 40–50.
85. Ladak A., Olson J., Tredget E.E., Gordon T. // *Exp. Neurol.* 2011. V. 228. № 2. P. 242–252.
86. Cunha A.S., Costa M.P., Silva C.F. // *Acta Cir. Bras.* 2013. V. 28. № 2. P. 94–101.
87. Liao I.C., Wan H., Qi S., Cui C., Patel P., Sun W., Xu H. // *J. Tissue Eng.* 2013. № 4. P. 2041731413481036.
88. Jia H., Wang Y., Tong X.J., Liu G.-B., Li Q., Zhang L.X., Sun X.H. // *Synapse.* 2012. V. 66. № 3. P. 256–269.
89. Khuong H.T., Kumar R., Senjaya F., Grochmal J., Ivanovic A., Shakhbazau A., Forden J., Webb A., Biernaskie J., Midha R. // *Exp. Neurol.* 2014. V. 254. P. 168–179.
90. Dai L.G., Huang G.S., Hsu S.H. // *Cell Transplantation.* 2012. V. 22. № 11. P. 2029–2039.
91. Shen C.C., Yang Y.C., Liu B.S. // *J. Biomed. Materials Res.* 2013. V. 101. № 1. P. 239–252.

92. Yang C.C., Wang J., Chen S.C., Hsieh Y.L. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2013. doi: 10.1002/term.1714.
93. Luo H., Zhang Y., Zhang Z., Jin Y. // *Biomaterials.* 2012. V. 33. № 17. P. 4277–4287.
94. Zhu F.B., Liu D.W., Zhang H.Y., Xu J.C., Peng Y., Zhong Q.L., Li Y.T. // *Zhonghua. Shao. Shang. Za. Zhi.* 2012. V. 28. № 1. P. 25–31.
95. Wang Y., Jai H., Li W.Y., Tong X.J., Liu G.B., Kang S.W. // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2012. V. 32. № 3. P. 361–371.
96. Marinescu S.A., Zrnescu O., Mihai I.R., Giuglea C., Sinescu R.D. // *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2014. V. 55. № 3. P. 891–903.
97. Jonsson S., Wiberg R., McGrath A.M., Novikov L.N., Wiberg M., Novikova L.N., Kingham P.J. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 2. P. e56484.
98. Масгутов Р.Ф., Масгутова Г.А., Рагинов И.С., Маломуж А.И., Нигметзянова М.В., Челышев Ю.А. // *Клеточные технологии в биологии и медицине.* 2009. № 2. С. 103–104.
99. Liu Y., Nie L., Zhao H., Zhang W., Zhang Y.Q., Wang S.S., Cheng L. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 10. P. e110993.
100. Duan X.H., Cheng L.N., Zhang F., Liu J., Guo R.M., Zhong X.M., Wen X.H., Shen J. // *Eur. J. Radiol.* 2012. V. 81. № 9. P. 2154–2160.
101. Liao C.D., Zhang F., Guo R.M., Zhong X.M., Zhu J., Wen X.H., Shen J. // *Radiology.* 2012. V. 262. № 1. P. 161–171.
102. Li K., Qin J., Wang X., Xu Y., Shen Z., Lu X., Zhang G. // *Cytotherapy.* 2013. V. 15. № 10. P. 1275–1285.
103. Угрюмов М.В., Коновалов А.Н., Гусев Е.И. // *Вестник РАМН.* 2004. № 11. С. 8–17.
104. Стадников А.А., Шевлюк Н.Н. // *Морфология.* 2006. Т. 130. № 6. С. 84–88.
105. Barmade-Heider F., Frisen J. // *Cell Stem Cell.* 2008. V. 3. № 1. P. 16–24.
106. Анисимов С.В. // *Успехи геронтол.* 2009. Т. 22. № 3. С. 418–439.
107. Лосева Е.В. // *Нейрокомпьютеры: разработка, применение.* 2013. № 7. С. 32–44.
108. Попов Б.В. *Клеточные механизмы регенеративного потенциала мезенхимных стволовых клеток, роль семейства продукта гена ретинобластомы.* СПб.: ИЦ РАН, 2014.
109. Keilhoff G., Fansa H. // *Exp. Neurology.* 2011. V. 232. № 3. P. 110–113.
110. Pan Y., Cai S. // *Mol. Cell Biochem.* 2012. V. 368. № 1–2. P. 127–135.
111. Hu N., Wu H., Xue C., Gong Y., Wu J., Xiao Z., Yang Y., Ding F., Gu X. // *Biomaterials.* 2013. V. 34. № 1. P. 100–111.
112. Klopp A.H., Gupta A., Spaeth E., Andreeff M., Marini F. // *Stem Cells.* 2011. V. 29. № 1. P. 11–19.
113. Castellone M.D., Laatikainen L.E., Laurila J.P., Langella A., Hematti P., Soricelli A., Salvatore M., Laukkanen M.O. // *Stem Cells.* 2013. V. 31. № 6. P. 1218–1223.
114. Tian L.L., Yue W., Zhu F., Li S., Li W. // *J. Cell. Physiol.* 2011. V. 226. № 7. P. 1860–1867.
115. Чистякова И.А., Полянская Г.Г. // *Цитология.* 2014. Т. 56. № 11. С. 801–808.
116. Shi W., Yao J., Chen X., Lin W., Gu X., Wang X. // *Artif. Cells Blood. Substit. Immobil. Biotechnol.* 2010. V. 38. № 1. P. 29–37.
117. Лосева Е.В., Подгорный О.В., Полтавцева Р.А., Марей М.В., Логинова Н.А., Курская О.В., Сухих Г.Т., Чайлахян Р.К., Александрова М.А. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2011. Т. 97. № 2. С. 155–168.
118. Braga-Silva J., Gehlen D., Padoin A.V., Machado D.C., Gari-cochea B., Costa da Costa J. // *J. Hand. Surg. Eur.* 2008. V. 33. № 4. P. 488–493.
119. Салафутдинов И.И., Масгутов Р.Ф., Богов А.А., Ризванов А.А., Ханнанова И.Г., Муллин Р.И., Богов А.А. *Терапевтический потенциал клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани при регенерации дефектов периферических нервов // Стволовые клетки и регенеративная медицина / Под ред. В.А. Ткачука. М.: Махс-пресс, 2012. С. 70–71.*
120. Li Z., Qin H., Feng Z., Liu W., Zhou Y., Yang L., Zhao W., Li Y. // *Neural. Regen. Res.* 2013. V. 8. № 36. P. 3441–3448.
121. Бойко Э.В., Бисара Г.Н., Коваленко А.В., Исаева Г.Е., Коваленко И.Ю., Новицкий А.В., Букин С.В. // *Вест. Рос. военно-мед. академии.* 2014. № 3. С. 12–18.
122. Widgerow A.D., Salibian A.A., Lalezari S., Evans G.R. // *J. Neurosci. Res.* 2013. V. 19. № 12. P. 1517–1524.