

Российская академия наук
Федеральное агентство научных организаций
Министерство здравоохранения Российской Федерации
Министерство сельского хозяйства Российской Федерации

К.Н. Ярыгин, В.В. Семченко, С.И. Ерениев, В.Н. Ярыгин,
С.С. Степанов, А.М. Дыгай, Ф.И. Петровский, И.Н. Лебедев

РЕГЕНЕРАТИВНАЯ БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

Книга II. Клеточные технологии в терапии болезней нервной системы

Под общей редакцией академика РАН В.Н. Ярыгина,
академика РАН В.П. Пузырёва, члена-корреспондента РАН
К.Н. Ярыгина и профессора В.В. Семченко

Коллективная монография

Рекомендовано к изданию проблемными комиссиями
«Медицинская генетика», «Фармакология и лекарственные растения»
Научного совета по медицинским проблемам Сибири, Дальнего Востока
и Крайнего Севера, Ученым советом БУ ВО Ханты-Мансийского автономного
округа – Югры «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия»,
Ученым советом ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
бруцеллёза и туберкулёза животных» Россельхозакадемии,
Научно-техническим советом ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграр-
ный университет имени П.А. Столыпина», Ученым советом ГАБУЗ Свердлов-
ской области «Центр специализированных видов медицинской помощи
«Институт медицинских клеточных технологий»

Екатеринбург – Москва – Омск – Томск – Ханты-Мансийск
2015

УДК 616.8-08

ББК 28.03

Ярыгин К.Н., Семченко В.В., Ерениев С.И., Ярыгин В.Н., Степанов С.С., Дыгай А.М., Петровский Ф.И., Лебедев И.Н. Регенеративная биология и медицина. Книга II. Клеточные технологии в терапии болезней нервной системы / Под ред. В.Н. Ярыгина, В.П. Пузырева, К.Н. Ярыгина и В.В. Семченко. – Екатеринбург – Москва – Омск – Томск – Ханты-Мансийск: Омская областная типография, 2015. – 360 с.

Это вторая из серии книг, представляющих обзор по одной из наиболее быстро развивающихся областей биомедицины – регенеративной биологии и медицины. Книга посвящена рассмотрению перспектив использования клеточных технологий для терапии болезней нервной системы. Во всех книгах наряду с изложением фундаментальных данных особое внимание уделено практическому использованию накопленных знаний для разработки генных, клеточных, тканевых и органных биотехнологий лечения различных заболеваний, клонирования клеток и животных. Рассматриваются также методы контроля потенциальных опасностей, связанных с практическим использованием генных и клеточных технологий.

Книга рассчитана на биологов, генетиков, цитологов, гистологов, эмбриологов, физиологов, патофизиологов, фармакологов, научных работников, врачей различных специальностей, студентов медицинских и ветеринарных вузов.

Библиография – 623 названия.

Рецензенты: доктор биологических наук, профессор Ю.С. Аликин; член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор В.В. Банин; академик РАН, доктор медицинских наук, профессор С.И. Колесников.

ISBN 978-5-87367-193-9

© К.Н. Ярыгин, В.В. Семченко, С.И. Ерениев, В.Н. Ярыгин, С.С. Степанов, А.М. Дыгай, Ф.И. Петровский, И.Н. Лебедев, 2015.

© Институт ветеринарной медицины и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет имени П.А.Столыпина», 2015.

СВЕДЕНИЯ О ТВОРЧЕСКОМ КОЛЛЕКТИВЕ

Дыгай Александр Михайлович – заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга», Томск.

Ерениев Степан Иванович – доктор медицинских наук, профессор кафедры медицины труда и профессиональных заболеваний ФГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия», врач-невролог высшей квалификационной категории, Омск.

Жданов Вадим Вадимович – доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга», Томск.

Зюзьков Глеб Николаевич – доктор медицинских наук, ученый секретарь ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга», Томск.

Лебедев Игорь Николаевич – доктор биологических наук, руководитель лаборатории цитогенетики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской генетики», Томск.

Петровский Федор Игоревич – доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии, клинической фармакологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии, ректор БУ ВО Ханты-Мансийского автономного округа – Югры «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия», член руководящего комитета, руководитель рабочей группы по экспертизе технологической платформы «Медицина будущего», Ханты-Мансийск.

Пузырев Валерий Павлович – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской генетики», заведующий кафедрой медицинской генетики, заместитель председателя президиума Томского научного центра, председатель проблемной комиссии по медицинской генетике, заместитель председателя Российского общества медицинских генетиков, член Европейского и Американского обществ генетиков, Томск.

Семченко Валерий Васильевич – доктор медицинских наук, профессор кафедры анатомии, гистологии, физиологии и патологической анатомии института ветеринарной медицины и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет имени П.А.Столыпина», руководитель гистологической лаборатории с электронной микроскопией ГНУ «ВНИИБТЖ Россельхозакадемии», эксперт рабочей группы по экспертизе технологической платформы «Медицина будущего», врач невролог, Омск.

Степанов Сергей Степанович – доктор медицинских наук, научный сотрудник кафедры анатомии, гистологии, физиологии и патологической анатомии института ветеринарной медицины и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина», Омск.

Ярыгин Владимир Никитич – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологии медицинских факультетов Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, Москва.

Ярыгин Константин Никитич – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории клеточной биологии Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН, профессор кафедры общей патологии и патологической физиологии медико-биологического факультета ФГБОУ ВПО «Российская медицинская академия постдипломного образования», Москва.

Yarygin K.N., Semchenko V.V., Ereniev S.I., Yarygin V.N., Stepanov S.S., Dygai A.M., Petrovskij I.F., Lebedev I.N. Regenerative biology and medicine. Book II. Cellular technologies in therapy of nervous diseases / Series General Editors: V.N. Yarygin, V.P. Puzyrev, K.N. Yarygin, V.V. Semchenko. — Ekaterinburg – Moscow – Omsk – Tomsk – Khanty-Mansiysk: Omsk regional printing house, 2015. – 360 p.

It is the second of books representing the review of one of most rapidly developing areas of biomedicine - regenerative biology and medicine. This book is devoted to the analysis of perspectives for stem cell technologies in the nervous diseases therapy. In all books along with a statement of fundamental data the special attention is given to practical use of the state-of-the-art technologies at the gene, cell, tissue and organs levels for treatment of various diseases, cloning of cells and animals. A quality monitoring of the potential dangers connected with practical use of gene and cell technologies is considered also.

The book is calculated on biologists, genetics, cytologists, histologists, embryologists, physiologists, pathophysiologist, pharmacologists, science officers, doctors of various specialities, students of medical and veterinary high schools.

The bibliography – 623 titles.

Dygai A.M. – The Honoured Worker of Science of the Russian Federation, Full Member of the Russian Academy of Science, DrSci in medical sciences, Professor, Head of the Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named after E.D. Goldberg», Tomsk.

Ereniev S.I. – DrSci in medical sciences, Professor at Chair of the Medicine of Work-Related and Occupational Diseases at the Omsk State Medical Academy, Omsk.

Lebedev I.N. – DrSci of biological sciences, Head of Laboratory of the Cytogenetics, Institute of Medical Genetics, Tomsk.

Petrovskij I.F. – DrSci in medical sciences, Professor managing chair of pharmacology, clinical pharmacology with a course of clinical immunology and allergology, rector of «Hunts-Mansijskaja the state medical academy», Khanty-Mansiysk.

Puzyrev Valery Pavlovich – The Honoured Science Worker of the Russian Federation, Full Member of the Russian Academy of Science, DrSci in medical sciences, Professor, Head of the Research Institute of Medical Genetics, Tomsk, Head of a chair of medical genetics, Tomsk State Medical University.

Semchenko V.V. – DrSci in medical sciences, Professor of the Chair of Anatomy, Histology, Physiology and Pathological Anatomy at the Institute of Veterinary Medicine and Biotechnology of the Omsk P.A. Stolypin State Agrarian University, Omsk.

Stepanov S.S. – DrSci in medical sciences, Chair of Anatomy, Histology, Physiology and Pathological Anatomy at the Institute of Veterinary Medicine and Biotechnologies of the Omsk P.A. Stolypin State Agrarian University, Omsk.

Yarygin V.N. – Full Member of the Russian Academy of Medical Science, DrSci in medical sciences, Head of the Chair of Biology at the N.I.Pirogov Russian State Medical University, Moscow.

Yarygin K.N. – Corresponding Member of the Russian Academy of Medical Science, DrSci in biological sciences, Head of Cell Biology Laboratory at V.N.Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow.

Zhdanov V.V. – DrSci in medical sciences, Professor, the Deputy Director on research at the Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named after E.D. Goldberg», Tomsk.

Zyuz'kov G.N. – DrSci in medical sciences, the Scientific Secretary at the Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named after E.D. Goldberg», Tomsk.

**Светлой памяти академика РАМН
Ярыгина Владимира Никитича
посвящается**

Ярыгин Владимир Никитич

(10 января 1942 – 10 июня 2013, Москва), академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор, член Президиума РАМН, заведующий кафедрой биологии, ректор (1984–2007) Российского государственного медицинского университета имени Н.И. Пирогова, член бюро Учёного совета Министерства здравоохранения РФ, аттестационной коллегии Министерства образования РФ, бюро отделения медико-биологических наук РАМН, член Всероссийского научного общества анатомов, гистологов и эмбриологов, общества нейроморфологов.



ПРЕДИСЛОВИЕ

Экспериментальные исследования последних лет в области молекулярной и клеточной биологии заложили основу нового этапа развития клеточной биотехнологии и медицины. При этом, одними из наиболее значимых достижений, безусловно, следует признать открытие эмбриональных стволовых клеток и разработку протоколов получения клеток с индуцированной плюрипотентностью. Использование данных модельных систем позволило получить принципиально новые сведения об явлении плюрипотентности и механизмах направленной клеточной дифференцировки, а также приблизиться к пониманию генетических основ регуляции индивидуального развития организма. Однако, пожалуй, самым интригующим результатом исследований стал критический пересмотр постулата о необратимости клеточной дифференцировки в онтогенезе. Успешные эксперименты по клонированию многих видов животных, появление относительно эффективных технологий репрограммирования дифференцированных соматических клеток наглядно продемонстрировали возможность изменения свойств терминально специализированных клеток, приобретения ими плюрипотентности и способности формировать новые аналогичные или абсолютно другие клеточные типы.

Все эти достижения не остались без внимания и со стороны медицинской науки. При помощи новых клеточных технологий впервые появились перспективы подойти к решению ряда, казалось бы, неразрешимых задач клинической медицины, и, прежде всего, к лечению многих широко распространенных и социально значимых заболеваний – последствий инсультов и инфарктов, нейродегенеративных болезней, аутоиммунной и онкологической патологии. Новые клеточные технологии позволили получить стабильные линии стволовых клеток, клонировать пациент-специфичные стволовые клетки и исследовать их свойства как в культуре, так и в организме модельных животных, используя комплекс

современных методов клеточной и молекулярной биологии, цитогенетики, эпигенетики и иммунологии. Сопоставляя биологические свойства стволовых клеток человека и различных млекопитающих, сегодня можно получить адекватные модели для оценки эффективности и безопасности действия стволовых клеток на организм в случае их клинического применения, а также оценить терапевтический эффект новых фармакологических препаратов. Моделируя наследственные заболевания с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, стало возможным получить ключ к расшифровке их патогенеза на молекулярном и клеточном уровне.

Следует отметить, что достижения в области клеточной биотехнологии заметно усилились прогрессом и в области молекулярной генетики и геномики. Успехи в секвенировании персональных геномов и сокращение себестоимости такого анализа создают беспрецедентные возможности для детальной характеристики стволовых клеток на разных уровнях организации и реализации наследственной информации. Появление технологий редактирования геномов позволило впервые приблизиться к исправлению генных мутаций в стволовых клетках. Ожидается, что клетки с «исправленными» генотипами могут быть использованы для терапии наследственных моногенных болезней, а ближайшей перспективе – для доклинических испытаний новых лекарственных препаратов.

Перед читателями вторая книга из цикла «Регенеративная биология и медицина», посвященная рассмотрению перспектив клеточной терапии болезней нервной системы. Наряду с отмеченными выше достижениями клеточной биологии и молекулярной генетики, следует напомнить еще об одном принципиальном открытии последних лет в области нейробиологии – а именно о выявлении нейрональных стволовых клеток. Именно это открытие послужило отправной точкой в разработке новых подходов к клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний, обсуждаемых в настоящей монографии.

Авторы издания подчеркивают, что многие из представленных в книге направлений и разработок носят экспериментальный характер и еще очень далеки от практического внедрения в медицину. Нельзя также не отметить, что вопросы клеточных технологий и клеточной терапии, их клинических перспектив и безопасности становятся в последнее время неизменным атрибутом многих представительных научных форумов не только за рубежом, но и в России. Представляемые на таких научных конференциях доклады часто оказываются дискуссионными. Результаты некоторых работ требуют валидации и верификации, а поэтому не соответствуют строгим критериям, предъявляемым к современным публикациям в данной предметной области. Тем не менее, авторы взяли на себя ответственность, отметить в настоящей монографии ряд подобных исследований с единственной целью продемонстрировать тенденции развития клеточных технологий в регенеративной медицине.

**академик РАН В.Н. Ярыгин,
член-корреспондент РАН К.Н. Ярыгин**

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнологии и клеточная трансплантология как направление биомедицины существуют на протяжении уже многих десятилетий. Интерес к эмбриональным, фетальным и соматическим стволовым клеткам резко возрос после появления молекулярных технологий и методов клонирования, позволяющих генетически модифицировать отдельные клетки и даже целые организмы. В настоящее время наука потенциально может предложить различные клеточные технологии для использования в ветеринарии, сельском хозяйстве и клинической медицине. Однако большинство этих методов находятся еще на стадии разработки и не могут быть рекомендованы к практическому применению.

В 2010 г. в России опубликована предложенная коллективом отечественных и зарубежных авторов «дорожная карта» развития регенеративной биомедицины, ставшая попыткой систематизировать и обобщить имеющиеся в мире научно-практические результаты и заделы, проанализировать и свести их в единую концептуальную систему, подчинив общему замыслу (Васильев А.В., 2010). Однако закон о клеточных технологиях – по-прежнему острая тема дискуссий российских парламентариев и ученых и еще далек от ключевых этапов рассмотрения и принятия. Причин данной ситуации, на наш взгляд, несколько.

Одна из них может быть связана с тем, что применение стволовых клеток для изучения различных генетических и физиологических механизмов с перспективой лечения заболеваний, обусловленных дефектами этих механизмов, представляет несомненный интерес. Очевидно, что изучение стволовых клеток в таком направлении неизбежно приводит к инновационным разработкам, революционизирующим наши представления о возможностях клеточной терапии и регенеративной медицины в целом. Однако за внедрением новейших биотехнологий, основанных на терапевтическом применении стволовых клеток, необходим строгий контроль. Недобросовестное использование современных технологий специалистами с недостаточной профессиональной подготовкой и опытом наносит непоправимый ущерб регенеративной биомедицине, клеточной, тканевой и органной трансплантологии и подвергает опасности жизнь пациентов. Другая сторона проблемы связана с чрезвычайной коммерциализированностью сферы медицинского применения клеточных технологий и, опять-таки, с отсутствием внятных законодательных решений. Всесторонние и серьезные оценки современного состояния вопроса помогут предупредить негативные по-

следствия как необузданного применения, так и ограничений в использовании клеточных технологий для науки и практики.

Отдельную проблему представляет недостаток, а по некоторым разделам фактическое отсутствие научно-методической литературы в области клеточных технологий. Лекции по современным проблемам регенеративной медицины если и читаются, то только лишь как фрагменты более общих биологических или медицинских дисциплин, да и то не во всех вузах страны. В некоторой степени, издание настоящей монографии является попыткой компенсировать имеющуюся в стране нехватку профессиональных знаний в данной предметной области.

Следующий важный аспект – терминологическая путаница в научной и, тем более, популярной литературе, посвященной вопросам клеточных технологий. Приведем только один пример. В современной регенеративной медицине присутствуют два радикально отличающиеся друг от друга направления, которые основаны, по утверждению их сторонников, на применении клеточных технологий. Одно из них определяют как «лечение с использованием живых клеток» (Live cell therapy), другое – как «лечение с использованием стволовых клеток» (Stem cell therapy) или восстановительная регенерационная (регенеративная) терапия.

В рамках первого направления в терапевтических целях применяют биопрепараты в форме натурального или определенным образом обработанного (например, лиофилизированного или в виде экстрактов) клеточного, тканевого и органного материала животного происхождения. Обработанный биоматериал вводится перорально или путем инъекций. При этом отмечают наличие органной и отсутствие видовой специфичности терапевтического эффекта. К настоящему времени судьба биоматериала в организме достоверно не прослежена, принцип его действия неясен и может быть поэтому данное направление не нашло широкого признания.

В свою очередь, репаративная, реконструктивно-заместительная клеточно-тканевая терапия на основе биотехнологических тканевых клеточных систем с использованием стволовых клеток заключается в том, что желаемый структурно-функциональный (лечебный) эффект достигается в результате интеграции в пораженный орган специально созданного в лаборатории экзогенного или активно отоблагодарилированного эндогенного (стимуляция выброса в кровеносное русло собственных стромальных клеток костного мозга) клеточного материала. Задача клеточного материала при данном виде терапии по завершении им в рамках

соответствующего гистогенеза необходимых преобразований заключается в восполнении потери клеточных элементов определенного цитотипа (например, кардиомиоцитов при инфаркте миокарда, гепатоцитов при печеночной недостаточности и циррозах, дофаминергических нейронов при болезни Паркинсона) (van den Berge S.A. et al., 2013).

Создание клеточных терапевтических технологий стало возможным в связи с:

- открытием:
- кроветворной стволовой клетки;
- нейральных и иных регионарных прогениторных клеток-предшественников;
- унипотентной стромальной стволовой клетки костного мозга;
- идентификацией плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток мыши и человека;
- обнаружением унипотентных стволовых клеток в пуповинной крови, обонятельном эпителии и других структурах;
- совершенствованием техники культивирования клеток вне организма с возможностью получения иммортализованных (бессмертных) немалигнизующихся линий (Xiao-Cheng L.U. et al., 2012; Cramer A.O., MacLaren R.E., 2013; Faulkner S.D. et al., 2013; Jongkamonwivat N., Noisa P., 2013; Nakamura M., Okano H., 2013; Qiu Z. et al., 2013; Sun T., Ma Q.-H., 2013; Compagnucci C. et al., 2014; Imaizumi Y., Okano H., 2014);
- разработкой технологии получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с последующей направленной дифференцировкой *in vitro* в производные разных зародышевых листков. В 2012 году доктор Шинья Яманака, автор данной технологии, был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине.

Позитивный эффект от применения клеточных технологий с использованием стволовых клеток, очевидно, обусловлен сочетанием заместительного и организующе-индуцирующего действия. Организующе-индуцирующая клеточно-тканевая терапия на основе биотехнологических тканевых клеточных систем с использованием стволовых и прогениторных клеток допускает, что терапевтическое действие применяемого клеточного материала обусловлено активацией сохранившегося собственного продуктивного потенциала органа привнесенными с клеточным материалом ростовыми факторами, цитокинами и другими биологически активными веществами, запускающими, усиливающими и упорядочивающими восстановительные процессы на

тканево-органном уровне, а также стимуляцией продукции биологически активных веществ клетками самого пациента.

Вторая книга серии «Регенеративная биология и медицина» посвящена перспективам клеточной терапии болезней нервной системы. Открытие нейрональной стволовой клетки без преувеличения – центральное событие нейробиологии последнего десятилетия. Оно позволило критически пересмотреть ключевые положения о механизмах нейрогенеза и клеточной дифференцировки в центральной нервной системе. Подкрепленные методами современной генетики и геномики клиническая и фундаментальная неврология и психиатрия получили принципиально новые возможности в познании клеточных и молекулярных причин патогенеза неврологических и интеллектуальных нарушений. Появились новые способы диагностики болезней нервной системы, основанные на использовании молекулярно-генетических и молекулярно-цитогенетических технологий (например, таких как полноэкзомное или полногеномное секвенирование нового поколения, матричная сравнительная геномная гибридизация высокого разрешения). В настоящее время данные методы внедряются и используются в практике некоторых отечественных лабораторий. Понимание тонкой природы болезней нервной системы на генетическом уровне в сочетании с клеточными технологиями дало новые возможности для моделирования заболеваний и выявления ключевых мишеней для перспектив их дальнейшей терапии – задачи, которая еще несколько лет назад считалась неразрешимой.

Автором идеи данного издания и его вдохновителем был академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор Владимир Никитич Ярыгин (1942–2013 гг). Ему принадлежит ряд фундаментальных трудов в области клеточной биологии, касающихся вопросов клеточных и клеточно-популяционных механизмов развития, функционирования и возрастной динамики тканевых систем, в том числе и нервной системы. В.Н. Ярыгин являлся главным редактором ведущих отечественных журналов, посвященных вопросам клеточной биологии и медицины – «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины» и «Клеточные технологии в биологии и медицине». Посвящая данную монографию В.Н. Ярыгину, коллектив авторов предлагает читателю взвешенное и всестороннее обсуждение острых дискуссионных вопросов современной регенеративной медицины и надеется на достижение основной цели издания «Регенеративная биология и медицина» – формирование базовых и сбалансированных представлений о возможностях, достижениях, перспективах, ограничениях и рисках клеточных технологий.

Глава 1

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Клеточная инженерия – конструирование специальными методами клеток нового типа – включает:

- пересадку клеточных ядер и другие микрохирургические операции по «разборке» и «сборке» (реконструкции) жизнеспособных клеток из отдельных фрагментов разных клеток;
- гибридизацию клеток, объединение целых клеток, принадлежавших различным видам (и даже относящихся к разным царствам – растениям и животным), с образованием клетки, несущей генетический материал обеих клеток;
- культивирование клеток;
- клонирование клеток на специально подобранных средах;
- другие операции.

В узком смысле слова под термином «клеточная инженерия» понимают гибридизацию протопластов или животных клеток, в широком – различные манипуляции с ними, направленные на решение научных и практических задач.

Клеточная инженерия является одним из основных методов биотехнологии, используется для решения теоретических проблем в биотехнологии, для создания новых форм растений, обладающих полезными признаками и, одновременно, устойчивых к болезням (Пальцев М.А., 2004).

Клеточная инженерия основывается на:

- выделении определенных типов клеток;
- придании им *in vitro* с помощью генетических конструкций или сигнальных молекул специфических свойств;
- введении их в организм больного.

Примером клеточной инженерии является использование дендритных клеток для модуляции иммунного ответа при опухолях, инфекционных и аутоиммунных заболеваниях (Hitoshi S. et al., 2013). Проводятся и дают обнадеживающие результаты клинические испытания клеточных вакцин на основе дендритных клеток при лечении опухолевых заболеваний.

1.1. Трансфекция клеток и генная инженерия

Ключевым этапом в технологии создания трансгенных организмов является трансфекция – внедрение ДНК в клетки будущего трансгенного организма. В настоящее время разработано большое количество методов трансфекции.

Встраивание активного гена на место отсутствующего или поврежденного открывает путь для лечения в итоге генетических заболеваний человека.

Изменять свойства клеток можно также другими путями:

- введением клеточных органелл, изолированных из одних клеток, в протопласты других клеток (активизация фотосинтеза растительной клетки введением в нее высокоэффективных хлоропластов);

- искусственными ассоциациями растительных клеток с микроорганизмами (моделирование на клеточном уровне природных симбиотических отношений введением азотфиксирующих микроорганизмов, обеспечивающих растения азотным питанием в природных экосистемах);

- слиянием клеточных фрагментов (безъядерных, кариопластов с ядром, микроклеток, содержащих лишь часть генома интактной клетки) друг с другом или с интактными (неповрежденными) клетками, получением клеток с различными свойствами, например, гибридов или клеток с ядром и цитоплазмой от разных родителей.

1.2. Гибридизация соматических клеток

Начало клеточной инженерии относят к 60-м годам двадцатого века, когда возник метод гибридизации соматических клеток. Соматическую гибридизацию, то есть получение гибридов без участия полового процесса, проводят, культивируя совместно клетки различных линий одного вида или клетки различных видов. При определенных условиях происходит слияние двух разных клеток в одну гибридную, содержащую оба генома объединившихся клеток.

Удалось получить гибриды:

- между клетками животных, далёких по систематическому положению, например, мыши и курицы. Соматические гибриды нашли широкое применение как в научных исследованиях, так и в

биотехнологии. С помощью гибридных клеток, полученных от клеток человека и мыши (1965), человека и китайского хомячка, была проделана важная для медицины работа по картированию генов в хромосомах человека. Гибридизация соматических клеток животных сыграла важную роль в исследовании механизмов реактивации генома покоящейся клетки и степени фенотипического проявления (экспрессивности) отдельных генов, клеточного деления, в картировании генов в хромосомах человека, в анализе причин злокачественного перерождения клеток. С помощью этого метода созданы гибридомы, используемые для получения моноклональных (однородных) антител;

- между опухолевыми клетками и нормальными клетками иммунной системы (лимфоцитами) – так называемые гибридомы, обладающие свойствами обеих родительских клеточных линий. Подобно раковым клеткам, они способны неограниченно долго делиться на искусственных питательных средах (то есть они «бессмертны») и, подобно лимфоцитам, могут вырабатывать моноклональные (однородные) антитела определённой специфичности. Такие антитела применяют в лечебных и диагностических целях, в качестве чувствительных реагентов на различные органические вещества:

- между животными и растительными клетками;
- между соматическими клетками растений, освобожденными от плотной клеточной оболочки, используя изолированные протопласты. В этом случае, как и при гибридизации клеток животных, также удаётся преодолевать барьеры нескрещиваемости, которые существуют при обычной (половой) гибридизации растений разных видов и родов. Из гибридной растительной клетки на специальной среде можно вырастить клеточную массу – каллус, дифференцирующуюся в нормальное целое растение с корнями, стеблями. Такое гибридное растение можно высадить в землю, выращивать и размножать обычными способами. Эти методы, в отличие от традиционных, позволяют сравнительно легко и быстро получать достаточное количество генетически разнообразного исходного материала для селекции. Их применение привело, например, к увеличению урожайности ряда культур – картофеля, цитрусовых.

Первый межвидовой гибрид при слиянии протопластов из клеток разных видов табака был получен в 1972 году П. Карлсоном (США). Гибриды, полученные при слиянии протопластов, имеют

важные отличия от половых гибридов, поскольку несут цитоплазму обоих родителей.

Возможно создание гибридов, наследующих ядерные гены одного из родителей наряду с цитоплазматическими генами обоих родителей. Особый интерес представляют гибриды растений, несущие цитоплазматические гены устойчивости к различным патогенам и стрессорным факторам от дикорастущих видов или цитоплазматические гены мужской стерильности.

Слияние протопластов используют также для получения гибридов с ценными в хозяйственном отношении свойствами между отдаленными видами, которые плохо или вообще не скрещиваются обычным путем. Удалось, например, «ресинтезировать» рапс, являющийся естественным амфидиплоидом между турнепсом и капустой, получить соматический гибрид картофеля с томатами. При слиянии протопластов создают и новые клеточные линии – продуценты важных соединений.

В основе метода гибридизации соматических клеток лежит слияние клеток, в результате чего образуются гетерокарионы, содержащие ядра обоих родительских типов. Образовавшиеся гетерокарионы дают начало двум одноядерным гибридным клеткам. В 1965 английский ученый Г. Харрис впервые получил гетерокарионы, образованные клетками мыши и человека. Такую искусственную гибридизацию можно осуществлять между соматическими клетками, принадлежащими далеким в систематическом отношении организмам и даже между растительными и животными клетками.

Клеточная инженерия широко используется в селекции растений. Выведены гибриды томата и картофеля, яблони и вишни. Регенерированные из таких клеток растения с измененной наследственностью позволяют синтезировать новые формы, сорта, обладающие полезными свойствами и устойчивые к неблагоприятным условиям и болезням. Этот метод и широко используется для «спасения» ценных сортов, пораженных вирусными болезнями. Из их ростков в культуре выделяют несколько верхушечных клеток, еще не пораженных вирусом, и добиваются регенерации из них здоровых растений, сначала в пробирке, а затем пересаживают в почву и размножают.

1.3. Культивирование клеток

Выращиваемые на искусственных питательных средах клетки и ткани растений составляют основу разнообразных технологий в сельском хозяйстве. Одни из них направлены на получение идентичных исходной форме растений (оздоровление и клональное микроразмножение на основе меристемных культур, создание искусственных семян, криосохранение генофонда при глубоком замораживании меристем и клеток пыльцы), другие – на создание растений, генетически отличных от исходных, путем или облегчения и ускорения традиционного селекционного процесса или создания генетического разнообразия, поиска и отбора генотипов с ценными признаками. В первом случае используют искусственное оплодотворение, культуру незрелых гибридных семян и зародышей, регенерацию растений из тканей летальных гибридов, гаплоидные растения, полученные при культивировании пыльников или микроспор. Во втором — новые формы растений создаются на основе мутантов, образующихся *in vitro*, и трансгенных растений. Таким путем получены растения, устойчивые к вирусам и другим патогенам, гербицидам, растения, способные синтезировать токсины, патогенные для насекомых-вредителей, растения с чужеродными генами, контролирующими синтез белков холодоустойчивости и белков с улучшенным аминокислотным составом, растения с измененным балансом фитогормонов.

Следует обратить внимание на то, что линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека и эмбриональные герминативные клеточные линии G₁ из полового бугорка 12,5-дневного эмбриона мышей BALB/c, поддерживаемые *in vitro* длительное время (15-75 пассажей), подвержены генетическим и эпигенетическим изменениям, которые, очевидно, обусловлены адаптацией клеток к росту в культуральных условиях в недифференцированном состоянии, а значит, нуждаются в тщательном геномном мониторинге как во время культивирования, так и в детальном анализе при использовании *in vivo* и тем более в клинических целях. Применение линий ЭСК для модельных фармакологических экспериментов, преклинических и клинических испытаний в будущем предполагает использование для этих целей клеток, прошедших минимальное количество пассажей в культуре (Мелихова В.С., 2005; Яцышина А.П. и др., 2007).

1.3.1. Культивирование стромальных клеток костного мозга

Коллаген является фибриллярным белком, одним из компонентов межклеточного матрикса. В настоящее время известно 27 различных генетических типов коллагена, из них 4 фибриллообразующих, на которые приходится 95% общего количества коллагенов в организме (Ruggiero F. et al., 2005). Белками, обеспечивающими механическую прочность всех тканей млекопитающих, являются фибриллообразующие коллагены типов I, II, III и V, из которых 90% приходится на коллаген типа I. Благодаря своему уникальному и очень консервативному аминокислотному составу, коллаген мало иммуногенен и поэтому при введении под кожу практически не вызывает иммунного ответа. Кроме того, коллаген является отличным гемостатиком. Все это делает коллаген материалом, широко применяемым в медицине и биотехнологии. Уникальность коллагенового геля в качестве субстрата заключается в том, что структура молекулы фибриллярного коллагена настолько приспособлена к его фибриллообразующей функции, что раствор коллагена дает нативную фибриллу спонтанно *in vitro* при приведении системы к физиологическим условиям.

Препараты коллагена получают из шкур овцы или молодых быков методом щелочно-солевой экстракции. Способность коллагена к фибриллообразованию зависит от способа получения коллагена. Существуют три основных способа получения коллагена I типа: кислотная, ферментативная и щелочно-солевая экстракции. Все они дают нативную, то есть трехспиральную молекулу белка.

Коллаген I типа широко применяется в медицине и биотехнологии в связи с относительной простотой получения и своими биологическими свойствами. На различных молекулярных и фибриллярных коллагеновых субстратах на плоскости и при трехмерном культивировании в гелях коллагена изучается пролиферация (индекс пролиферации), распластывание (актиновый цитоскелет, площадь распластывания) и остеогенная дифференцировка (наличие внутриклеточной щелочной фосфатазы) стромальных клеток костного мозга (СККМ) для применения в заместительной клеточной терапии в качестве носителя стромальных стволовых клеток.

Препараты коллагена I типа, а также различные его комбинации с другими остеотропными препаратами, в настоящее время

активно используются при костной пластике в травматологии и ортопедии, челюстно-лицевой хирургии и стоматологии (Friedmann A. et al., 2002; Wahl D.A. et al., 2002).

В последние десятилетия интенсивно развивается новое направление биотехнологии – тканевая инженерия – создание из клеток и матрикса композиций, предназначенных для восстановления тканей (включение в коллагеновый гель дермальных фибробластов, которые живут, размножаются и перестраивают структуру геля), получение на основе коллагенового геля эквивалентов практически всех тканей организма.

Коллаген используют также при двухмерном культивировании клеток в качестве субстрата. В этом случае возможно использование как фибриллярного коллагена, так и молекулярного коллагена. При этом поведение клеток на этих разновидностях коллагенового субстрата значительно различается; в частности, от структуры нанесенного на подложку коллагена зависят форма и организация актинового цитоскелета у культивируемых фибробластов (Бармашева А.А. и др., 2009; Sato K. et al., 2003).

1.3.2. 3D-культивирование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

Феномену эпителио-мезенхимальной пластичности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), наблюдаемому в 2D культурах, до сих пор не найдено удовлетворительного объяснения. Новые возможности открывает 3D культивирование ММСК, которое моделирует закономерности образования слоев эпителиальных клеток (ламинацию). Анализ литературных данных позволяет предположить, что именно спонтанное формирование ММСК-сфероидов индуцирует образование регенерационной («бластной») ткани в фетальных и взрослых органах при повреждении. Существует возможность репрограммирования плотных сфероидов ММСК в нейроэктодерму и примитивную энтодерму (Репин В.С. и др., 2008; Сабурова И.Н. и др., 2009, 2010; Zhang X.-B., 2013). Показан надежный метод определения количества и жизнеспособности мезенхимальных стволовых клеток в культуре с помощью окрашивания ресазурином (Динстхет Т. и др. 2010).

1.3.3. Культивирование гемопоэтических стволовых клеток

В связи с поисками новых путей решения проблемы заместительной терапии с использованием стволовых клеток внимание биологов и клиницистов привлекла способность ГСК давать начало различным типам специализированных соматических клеток под влиянием ряда индуцирующих ростовых факторов и сохранять эту способность после длительной криоконсервации. Основным источником стволовых клеток является костный мозг, способный, в дополнение к своей основной гемопоэтической функции, генерировать предшественники клеточных элементов большого числа тканей организма. Однако их можно в различных количествах получить также из периферической и пуповинной крови (Sun T., Ma Q.-H., 2013).

Количество жизнеспособных клеток определяется путем окрашивания 1% раствором трипанового синего с последующим подсчетом неокрашенных клеток в камере Горяева.

Выделения CD34+ и CD133+ клеток из мононуклеарной фракции проводят с помощью иммуномагнитного сепаратора MiniMACS (Miltenyi Biotec).

Для культивирования выделенных ГСК используются питательные среды RPMI1640 (Sigma), L-15 (Sigma), DMEM/F12 (Sigma) и ПСП, содержащие 10% фетальной сыворотки плода коровы. Кроме того, ГСК культивируют в среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной сыворотки плода коровы с добавлением 100 нг/мл Flt-3 Ligand, 100 нг/мл Stem Cell Factor, 20 нг/мл IL-3, 20 нг/мл IL-6. Клетки высевают в культуральные 24 луночные плашки. Культивирование проводят при +37°C в увлажненной атмосфере содержащей 5% CO₂. Во время культивирования проводят ежедневное микроскопирование культуральных плашек с культурой клеток с помощью инвертированного микроскопа.

При культивировании CD34+ и CD133+ клеток на питательной среде RPMI 1640 содержащей 10% фетальной сыворотки плода коровы с добавлением 100 нг/мл Flt-3 Ligand, 100 нг/мл Stem Cell Factor, 20 нг/мл IL-3, 20 нг/мл IL-6 не наблюдается пролиферации клеток. Культивирование ГСК из костного мозга человека на питательных средах L-15 (Sigma), DMEM/F12 (Sigma), ПСП,

содержащих 10% фетальной сыворотки плода коровы без добавления цитокинов, в течение 3 недель культивирования размножение выделенных меченых клеток не наблюдается. На ранних сроках культивирований наблюдается частичное прикрепление клеток на поверхности культуральной посуды, по морфологическим признакам подобные лимфоцитам, и представляют собой относительно однородную совокупность округлых клеток. Часть клеток находится во взвешенном состоянии, сохраняя при этом изначальную форму.

При культивировании немеченных ядросодержащих клеток, полученных после магнитной сепарации, при таких же условиях, как и при культивировании CD34+ и CD133+ клеток, на начальных этапах отмечается появление в культуральной среде взвешенных клеток, состоящих из нескольких десятков клеток, которые на 2-3-и сутки прикрепляются к культуральной поверхности. Затем от этих колоний на 10-е сутки культивирования начинается рост фибробластоподобных клеток от центра к периферии. Кроме того, к данному сроку культивирования в культуре отмечается появление крупных клеток с зернистой цитоплазмой и клеток с ундулирующей мембраной, характерных для макрофагальных клеток. По мере культивирования макрофагальные клетки исчезают, а на их месте начинают расти фибробластоподобные клетки. На 13-е сутки культивирования число фибробластных клеток в монослое начинает увеличиваться. Образование конфлюэнтного монослоя, состоящего из фибробластовых клеток удлинённой формы, начинается к 25-дневному сроку культивирования.

Выделение ядросодержащих клеток из пуповинной и периферической крови, а также из костного мозга человека с использованием Ficoll Paque и лизирующего раствора позволяют получать максимально очищенные моноклеарные фракции. Использование иммуномагнитной сепарации позволяет выделять избирательно ГСК с фенотипами CD34+ и CD 133+ до 1% от общего количества моноклеарных клеток. Применение питательной среды RPMI 1640 в комплексе с ростовыми факторами и цитокинами для культивирования CD34+ и CD133+ клеток не приводит к активации пролиферативных свойств указанных клеток (Наханов А.Х. и др., 2007).

1.3.4. Предварительная иммунокоррекция и культивирование клеток костного мозга

Известно, что хронические длительно протекающие заболевания (хронический стресс) сопровождаются ингибированием миграционной активности и нарушениями популяционного состава иммунорегуляторных клеток, в том числе клеток костного мозга (КМ). Ранее было показано, что в связи с развитием хронической иммуносупрессии у таких больных снижена терапевтическая эффективность моноклеарной фракции клеток (МФК) КМ при проведении клеточной терапии.

У кардиохирургических больных (n=20) изучали влияние предварительной иммунокорректирующей терапии и процесса культивирования МФК КМ на изменение функциональной (миграционной) активности и фенотипического состава аутологичных клеток КМ, исследовали фенотипический состав и функциональную активность МФК из крови и КМ, взятых одновременно, без и после подготовки иммунокорректирующими препаратами, а также МФК из КМ до и через 5 суток культивирования. Предварительную иммунокорректирующую терапию осуществляли у больных, если *in vitro* исходный индекс стимуляции МФК крови был <1 (ИС <1).

Исследования клеток крови и КМ проводили на проточном цитометре Cytomics FC-500 фирмы Becton Coulter с использованием моноклональных антител к CD4, CD8, В-кл, NK, Та, и CD4/CD8. Результаты цитофлюориметрического анализа были подвергнуты статистической обработке.

Выделив в исследуемой группе показатели, характеризующие морфогенетическое звено иммунитета (CD4, CD8), авторы установили, что у больных без иммунокорректирующей подготовки из костного мозга активно мигрируют в кровь не клетки, участвующие в морфогенетических процессах, а клетки, участвующие в реализации общих иммунных реакций организма (В-кл, NK, Та). Подготовка больных иммунокорректорами тормозит выход в кровь В-кл, NK, Та из КМ, но активизирует выход из КМ клеток, участвующих в процессах пролиферации и репаративной регенерации (CD4 и CD8). В процессе культивирования аутологичных МФК КМ от больных без иммунокоррекции в культуре снижалось содержание иммунорегуляторных популяций клеток (NK, В-кл и

Та). Предварительная иммунокорректирующая подготовка также снижала эти показатели у больных, но они были все-таки более выражены у больных без проведения иммунокоррекции.

Иммунологическая подготовка активизирует миграционную активность из КМ в кровь клеток, участвующих преимущественно в процессах пролиферации и репаративной регенерации (CD4, CD8 и увеличивается отношение CD4/CD8).

Культивирование МФК КМ от больных без предварительной иммунокоррекции снижает содержание в культуре клеток, не участвующих в репаративных и пролиферативных реакциях (В-кл, NK, Та), но повышает содержание клеток, регулирующих восстановительный морфогенез (CD4, CD8) в большей степени, чем у больных с иммунокоррекцией.

Более выраженная терапевтическая эффективность МФК КМ у больных после предварительного культивирования и иммунокоррекции по сравнению с больными, клетки которых только культивировались, обусловлена возвращением этих клеток в организм, где уже восстановлена интеграционная функция иммунного статуса с помощью иммунокорректоров (Гемнов А.А. и др., 2007).

1.4. Клонирование клеток и животных

Важную роль в животноводстве сыграла разработка методов длительного хранения спермы в замороженном состоянии и искусственного осеменения. Исследования по клеточной и генной инженерии на млекопитающих развернулись только с освоением техники оплодотворения *in vitro*, обеспечившей получение достаточного количества зародышей на ранних стадиях развития.

Генетическое улучшение животных связано с разработкой технологии трансплантации эмбрионов и методов микроманипуляций с ними:

- получение однояйцевых близнецов;
- межвидовые пересадки эмбрионов и получение химерных животных;
- клонирование животных при пересадке ядер эмбриональных клеток в энуклеированные яйцеклетки.

В 1996 шотландским ученым из Эдинбурга впервые удалось получить овцу из энуклеированной яйцеклетки, в которую было

пересажено ядро соматической клетки (вымени) взрослого животного. Эта работа наметила перспективы в области клонирования животных и принципиальную возможность клонирования в будущем и человека. В этой же лаборатории было получено еще пять клонированных ягнят, в геном одного из которых был встроен ген белка человека. Клеточная инженерия позволяет конструировать клетки нового типа с помощью мутационного процесса гибридизации и, более того, комбинировать отдельные фрагменты разных клеток, клетки различных видов, относящиеся не только к разным родам, семействам, но и царствам. Это облегчает решение многих теоретических проблем и имеет практическое значение.

Другое направление клеточной инженерии – манипуляции с безъядерными клетками, свободными ядрами и другими фрагментами, сводящиеся к комбинированию разнородных частей клетки. Эти эксперименты, а также микроинъекции в клетку хромосом, красителей проводят для выяснения взаимных влияний ядра и цитоплазмы, факторов, регулирующих активность генов.

Путём соединения клеток разных зародышей на ранних стадиях их развития выращивают мозаичных животных, или химер, состоящих из двух различающихся генотипами видов клеток. С помощью таких экспериментов изучают процессы дифференцировки клеток и тканей в ходе развития организма.

Ведущиеся уже не одно десятилетие опыты по пересадке ядер соматических клеток в лишённые ядра (энуклеированные) яйцеклетки животных с последующим выращиванием зародыша во взрослый организм с конца XX века получили широкую известность как клонирование животных.

Преимущество клеточной инженерии в том, что она позволяет экспериментировать с клетками, а не с целыми организмами. Последнее гораздо сложнее, а иногда и невозможно, особенно в случае млекопитающих животных и человека или при получении отдалённых гибридов.

Методы клеточной инженерии в медицине, сельском хозяйстве, промышленности часто применяют в сочетании с генной инженерией (www.sbio.ru).

Глава 2

КЛИНИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДОВ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

2.1. Краткая история

Концепция введения клеток в организм человека с целью лечения возникла давно. Сообщение о первой попытке переливания крови от овцы человеку было во Франции в 1667 году. Во время крымской войны Н.И. Пирогов измельчал ткани поджелудочной железы лошадей и заполнял этой кашицей гнойные раны, которые на удивление быстро заживали. Сам Н.И.Пирогов приписывал такое действие уникальным свойствам поджелудочной железы, но не исключено, что в раны попадали и стволовые клетки, содержащиеся в лошадиных тканях.

Упоминания о первых экспериментах по трансплантации клеток и тканей относятся к концу XIX века. В 1890 году Thomson в New York University проводил эксперименты по трансплантации клеток головного мозга от кошки. В 1884 году Williams сообщает о подкожной имплантации фрагментов ткани поджелудочной железы овцы больному сахарным диабетом. В 1907 году R. Ottenberg выполнил первую обоснованную клеточную трансплантацию у человека, которой стало переливание АВ0-совместимой крови. В 1922 г. в США надпочечники плода были пересажены двум пациентам с болезнью Аддисона с длительным терапевтическим эффектом. В 1928 г. в Италии была произведена первая безуспешная пересадка поджелудочной железы пациенту с инсулин-зависимым сахарным диабетом. В 1931 году в Швейцарии Paul Niechans спас от смерти больную, находившуюся в судорожном статусе после ошибочного удаления околощитовидных желез, впервые в мире пересадив ей суспензию клеток околощитовидной железы телят. Примерно в это же время русский врач С. Воронцов проводил инъекции фетальных клеток человека во Франции с целью омоложения. В 1951 году Lorens и др. продемонстрировали выживаемость летально облученных животных после трансплантации костного мозга.

Современный этап развития клеточных технологий начинается с 1968 года, когда группой ученых под руководством E.D. Thomas была проведена первая успешная трансплантация HLA-совместимого

костного мозга больному лейкемией, а в лаборатории Роберта Гуда – трансплантация стволовых клеток ребенку с тяжелым врожденным иммунодефицитом. В 1972 году W.F. Bellinger, P.E. Lacy экспериментально обосновали эффективность, а в 1986 году клинически испытали трансплантацию островковых клеток поджелудочной железы для лечения сахарного диабета. В 1987 году O. Lindvall et al. осуществили трансплантацию хромаффинной ткани фетальных надпочечников в стриатум для лечения тяжелых форм нарушения двигательной активности при болезни Паркинсона. В 1988 году E. Gluckman et al. во Франции осуществлена первая успешная трансплантация пуповинной крови ребенку с анемией Фанкони. С 1992 года M. Mito et al. производятся трансплантации гепатоцитов больным с печеночной недостаточностью. В 1996 году S.E. Papet et al. осуществлена первая клиническая клеточная генотерапия посредством трансплантации аутологичных гепатоцитов, трансфицированных геном рецептора липопротеидов низкой плотности детям с семейной гиперхолестеринемией, а A. Fassas et al. начали клинические испытания трансплантации мобилизованных в периферический кровоток аутологичных гемопоэтических клеток при рассеянном склерозе. В 1997 году началась массовая коммерциализация клеточной терапии и тканевой инженерии, получены лицензионные коммерческие клеточные продукты в США (Evans J.R. et al., 2012; Rivera F.J., Aigner L., 2012; Ben-Hur T. et al., 2013; Lopez W.O. et al., 2013; de Munter J.P. et al., 2014; Mochizuki H. et al., 2014).

В 1998 году американские ученые Джеймс Томсон и Джон Беккер выделили человеческие эмбриональные стволовые клетки и получили первые линии этих клеток. В последующие годы осуществлены трансплантация аллогенных гепатоцитов ребенку с наследственной формой желтухи, трансплантация нервных клеток в головной мозг человека, перенесшего инсульт, аутологичная трансплантация пуповинной крови из частного криобанка, клеточная кардиомиопластика (введение клеток в сердце) после инфаркта (Menasche P. et al., 2001), трансплантация аллогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга детям с несовершенным остеогенезом и многое другое. Всем клиническим разработкам предшествовала кропотливая экспериментальная работа на животных.

Клеточная трансплантология – лидирующий и интенсивно развивающийся раздел науки о пересадке органов и тканей. Успех и перспективы новой медицинской технологии – трансплантации клеток – во многом определило развитие биотехнологии, клеточной и молекулярной биологии.

Вместе с тем разработка эффективных методов клеточной терапии, безусловно, требует всестороннего глубокого изучения процессов жизнедеятельности эндогенных прогениторных клеток в норме и при патологических состояниях.

Согласно современным представлениям, стволовые клетки существуют во взрослом организме млекопитающих, в том числе человека, во многих тканях. При этом наиболее значительной и мобильной популяцией элементов, обладающих уникальной способностью к самоподдержанию и дифференцировке во многие специализированные клеточные типы, является популяция мультипотентных мезенхимальных СК (МСК) костного мозга. В то же время в других органах в постнатальном периоде также присутствуют клетки, обладающие достаточно высоким пролиферативным и дифференцировочным потенциалом – региональные клетки-предшественники, назначением которых, как и вышеуказанных МСК, служит обеспечение регенерации тканей в ответ на физиологическую убыль клеток или их гибель, вызванную повреждающим фактором (Гольдберг Е.Д. и др., 2006 б; Дыгай А.М. и др., 2009 б; Дыгай А.М. и др., 2011 а, в; Xiao-Cheng L.U. et al., 2012).

Следует отметить, что СК могут не только симметрично делиться (образуя две однотипные дочерние клетки), но и способны к асимметричному делению, в результате которого одна из клеток сохраняет мультипотентный потенциал, а другая оказывается коммитированной, то есть уже направлена в своем развитии в определенную сторону. При этом поддержание популяции СК зависит от автономных регуляторов (моделируемых внешними сигналами), контролирующих их деление, а также экспрессию тех или иных генов. Внешние сигналы, определяющие судьбу СК, в свою очередь, реализуются посредством изменения функционирования так называемого микроокружения – клеточных элементов, не принимающих непосредственного участия в выполнении основной функции ткани, и компонентов внеклеточных структур. Клеточные элементы оказывают активное регуляторное влияние как посредством выработки

широкого спектра гуморальных факторов, так и за счет образования прямых межклеточных контактов. Межмембранное связывание при этом служит для передачи необходимых питательных веществ, миграции и хоуминга («оседания» и «приживления») клеток-предшественников в специфических участках ткани, в которых (под влиянием нового микроокружения по отношению к СК) происходит их дальнейшее развитие. Кроме того, благодаря непосредственному межклеточному взаимодействию, ростовые факторы: специфические факторы роста, гормоны и гормоноподобные вещества, предоставляются КП в биологически доступной форме (Гольдберг Е.Д. и др., 2007; Дыгай А.М. и др., 2009 а, б)

Весьма интересным и чрезвычайно важным представляется наличие у прогениторных клеток еще одной уникальной функциональной способности. В частности, их возможности под влиянием определенных факторов и изменений со стороны элементов микроокружения покидать тканевую «нишу» (локальное местонахождение СК, где она находится в «спокойном» состоянии), попадать в кровоток и циркулировать в нем, с последующим «оседанием» в необходимом для организма в данный момент месте и развитием в направлении, программируемом «новым» специфическим микроокружением (Дыгай А.М. и др., 2011 в, г; Young F. et al., 2013).

В ФГБУ «НИИ фармакологии» СО РАМН на протяжении многих лет проводились исследования, направленные на вскрытие роли различных пулов эндогенных прогениторных клеток в развитии и разрешении патологических процессов.

Анализ данных, полученных на различных экспериментальных моделях: инфаркт миокарда (Ставрова Л.А. и др., 2005), хронический гепатит и начальные стадии цирроза печени (Дыгай А.М. и др., 2011 б), сахарный диабет (Ермакова Н.Н. и др., 2007), энцефалопатии различного генеза (Зюзьков Г.Н. и др., 2005; Гольдберг Е.Д. и др., 2006 б), кожная рана (Гольдберг Е.Д. и др., 2006 а), показал во всех случаях развитие практически однотипных реакций со стороны прогениторных клеток, что свидетельствовало об их неспецифическом характере. Независимо от характера повреждений имела место активация мультипотентных СК костного мозга, представляющего собой основное депо данных элементов в организме, которая, однако, не сопровождалась либо сопровождалась незначительной их мобилизацией в периферическую кровь.

В то же время некоторые различия наблюдаются в реагировании регионарных СК органов-мишеней. Так, поражение сердечной мышцы не влияет на функционирование резидентных клеток-предшественников, а развитие тяжелой патологии печени и эндокринного аппарата поджелудочной железы сопровождаются быстрым и резким истощением пула тканеспецифичных паренхиматозных прогениторных клеток соответствующих органов на фоне активации дифференцировки мультипотентных типов СК в соединительнотканном направлении (Дыгай А.М. и др., 2009 б). Иная реакция со стороны регионарных СК имеет место при гипоксическом поражении ЦНС и механическом повреждении кожных покровов. В частности, кислородное голодание в значительной мере стимулирует функции нейральных СК паравентрикулярной области головного мозга, однако этого оказывается недостаточным для эффективной регенерации нервной ткани (Зюзьков Г.Н. и др., 2005), а в процессе регенерации поверхностных тканей организма важная роль принадлежит стромальным прекурсорам кожи, которые способны обеспечить репарацию лишь путем субституции (Гольдберг Е.Д. и др., 2006 а).

Таким образом, не зависимо от характера реагирования регионарных регенераторно-компетентных клеток органов-мишеней, имеющие место при многих патологических состояниях «сбои» разветвления миграционных процессов СК из тканей-депо не позволяют достичь адекватной компенсации. Данные результаты позволили сотрудникам ФГБУ «НИИ фармакологии» СО РАМН сформулировать «Концепцию о недостаточности и несостоятельности механизмов регенерации глубокого резерва», которая подтверждает необходимость радикального вмешательства, обеспечивающего замену погибших, либо дисфункционалирующих клеточных элементов на новые путем трансплантации регенераторно-компетентных клеток.

В 2002 году на заседании президиума РАМН была принята отраслевая программа «Новые клеточные технологии – медицине». Одним из флагманов научно-исследовательских медицинских центров России, занимающихся разработкой этой проблемы, является Российский государственный медицинский университет, в котором с января 2004 года проводятся клинические испытания с использованием клеточных технологий при ряде патологических состояний. Все исследования, начиная с получения материала и заканчивая

непосредственным проведением клеточной трансплантации, проводятся с соблюдением существующих правовых, юридических и этических норм Российской Федерации, а также других нормативных документов и рекомендаций, касающихся этой области медицины. Разработанные в РГМУ методы выделения, контроля качества, наращивания и транспортировки клеточного материала прошли неоднократную верификацию и показали свою эффективность.

Клеточная трансплантология включает различные клеточные технологии и подразумевает следующие последовательные этапы:

- выделение клеток из ткани организма;
- манипуляции с клетками *ex vivo* (очистка, фракционирование, культивирование, генмодификация);
- введение клеток в организм.

Трансплантация клеток является основным инструментом современной регенеративной медицины. Трансплантация, осуществляемая простой инъекцией клеток с целью лечения больного или коррекции какого-либо патологического состояния, называется «клеточной терапией».

Клеточная терапия может осуществляться как:

- самостоятельный метод;
- в виде клеточной генотерапии;
- в виде тканевой инженерии.

Пептидная терапия, возникшая при изучении механизмов действия пересаженных клеток и регенерации *in situ*, выделилась в отдельное направление регенеративной медицины.

Клеточная терапия – научный метод, развивающийся путем синтеза передовых достижений иммунологии, медицинской генетики, молекулярной биологии и биологической химии.

Оформился научно-практический сектор молекулярной и клеточной биологии – реконструктивная биология, задача которой состоит в получении требуемого биотехнологического продукта:

- макромолекул и их комплексов (например, генетических конструкций);
- генетически модифицированных клеток;
- клеточных линий;
- клонов клеток;
- ассоциаций клеток с заданными характеристиками.

Подходы и методы реконструктивной биологии в медицине служат делу создания биомедицинских диагностических и лечебных технологий:

- медицинская генная инженерия;
- генодиагностика;
- генотерапия;
- клеточная инженерия;
- клеточная терапия;
- тканевая инженерия;
- тканевая терапия;
- органная инженерия;
- органная терапия.

Термином «клеточная терапия» обозначается как терапия клетками, так и терапия собственно клеток.

Терапия стволовыми клетками – это передняя линия современной биотехнологии и медицины, перед которой стоят трудные проблемы биологического и медицинского плана, законодательства, морально-этические, экономические и другие. Клеточные технологии нуждаются в наличии специализированной наукоемкой базы и квалифицированных специалистов.

Основной принцип клеточной терапии – восстановление поврежденных в результате травмы или заболевания тканей и органов посредством трансплантации живых клеток в организм животного и человека. В основе клеточной терапии лежит внутривенная, внутриартериальная, внутриорганная трансплантация различного клеточного материала (эмбриональных стволовых клеток, аутологичных и аллогенных стволовых клеток взрослого организма, фетальных прогениторных клеток) для замещения утраченных, не активных или поврежденных клеток (Ярыгин В.Н., 2004).

2.2. Цели и принципы использования клеточной терапии

Основными целями клеточной терапии являются:

1. Замещение нефункционирующей или дефектной ткани или клеточной популяции;
2. Стимуляция собственных прогениторных клеток организма и усиление репаративной регенерации;

3. Адресная доставка лекарственных средств, генетических конструкций и биомолекул.

В эмбриональных и плацентарных тканях находится большое количество различных регуляторных веществ, таких как:

- фактор роста фибробластов,
- фактор роста нервов,
- фактор, стимулирующий рост макрофагальных и эритроидных колоний,
- инсулиноподобный и эндотелиотропный факторы роста, и, что особенно важно,
- антипролиферативные цитокины, предотвращающие гиперстимуляцию (Greenberg D.A., Jin K., 2013).

Эти вещества являются мощными регуляторами, влияющими на собственные клетки организма реципиента, корректирующими их функциональное состояние и взаимодействие, что во многих случаях способствует восстановлению их нормальной жизнедеятельности.

Чаще всего пациенту, перенесшему пересадку чужеродной ткани, приходится принимать препараты, подавляющие иммунитет и, тем самым, предупреждающие отторжение чужих клеток. Пересадка эмбриональных и фетальных клеток крайне редко сопровождается реакцией отторжения, по крайней мере, пока те не пройдут дифференциацию. А за это время в организме происходит много событий: активные вещества, вырабатываемые пересаженными клетками, включаются во взаимодействия между клетками самого реципиента и нормализуют их. В зависимости от характера заболевания и состояния организма реципиента может понадобиться новая пересадка. Период улучшения состояния, который обеспечивают пересаженные клетки, длится около года и иногда больше.

Оптимальным можно считать выделение собственных стволовых клеток нужного типа из тканей больного с последующим их размножением в лабораторных условиях. Было обнаружено, что у взрослого животного и человека имеется запас стволовых клеток в количестве, доступном для выделения и размножения "в пробирке". Эти клетки сохраняются, в том числе, в жировой ткани, из которой их можно выделить, размножить, создать условия для дифференциации в клетки нужного типа и вернуть их в тот же организм.

Другим важным направлением научных исследований является разработка методов воздействия на клетки иммунной системы реципиента для целенаправленного подавления разрушительного действия иммунной системы на пересаженные клетки.

Проблемы использования низких температур в лечебных целях и задачи хранения биообъектов при низкой температуре с целью дальнейшего их использования в клеточной трансплантологии решают криобиология и криомедицина.

Для этого используются:

- программные замораживатели-размораживатели;
- низкотемпературные банки – биохранилища с системами контроля температуры;
- сублимационные установки;
- аппараты универсальной гипотермии;
- криоэлектрокоагуляторы;
- криоинструменты;
- низкотемпературные хранилища для эмбрионов и спермы;
- разнообразная контрольно-измерительная аппаратура.

В настоящее время методы трансплантации эмбриональных клеток (ЭК) и отдельных выделенных соматических клеток (СК) используют:

в фундаментальных исследованиях для:

- изучения эмбриогенеза тканей и органов;
 - изучения процессов дифференцировки тканей и клеток разных типов;
 - изучения взаимодействия различных типов клеток между собой, в том числе для конструирования органов *in vitro*;
 - получения генетических химер, в том числе для изучения механизмов иммунитета и иммунного отторжения тканей, иммунодефицитов и иммунной толерантности;
 - получения моделей генетических заболеваний человека;
 - изучения функционирования различных нервных центров (пересадки гипоталамических ядер, эпифиза);
 - изучения механизмов старения и разработки методов омоложения тканей (пересадки нервных центров, эпифиза);
- в клинической практике для:

- лечения заболеваний системы крови (лейкозы, анемии, метаболические болезни);
- лечения врожденных иммунодефицитных состояний;
- коррекции иммунодефицитных состояний после химиотерапии и облучения;
- лечения генных заболеваний человека самой различной природы (метаболические заболевания, дегенеративные заболевания);
- лечения острой печеночной недостаточности, цирроза и наследственных метаболических заболеваний печени;
- лечения различных миодистрофий, в том числе с переносом соматических миобластов;
- лечения дегенеративных заболеваний нервной ткани, инсультов, паркинсонизма;
- лечения генетических и дегенеративных заболеваний репродуктивной сферы;
- коррекции инсулинзависимого диабета, тяжелых форм течения;
- лечения дегенеративных и иных поражений кожи, слизистой, хрящей, глаз и уха.

2.3. Лечение стволовыми клетками

Это лечение с помощью:

- эмбриональных стволовых клеток;
- клеток эмбрио-фето-пуповино-плацентарно-амниотического комплекса;
- стволовых клеток взрослого организма;
- биологически активных веществ, выделяемых стволовыми клетками.

Суть метода клеточной и тканевой трансплантации заключается в:

- активации компенсаторных ресурсов поврежденных клеток и тканей реципиента;
- стимуляции новых механизмов восстановления регенерации;
- замещении утраченных структур и функций органа, ткани.

При этом пациент получает ряд биологически активных, сбалансированных соединений естественного происхождения, обладающих разнонаправленным фармакологическим действием и способных оказывать влияние на различные стороны метаболизма це-

лостного организма и клеток, которые способны выполнять заместительные функции.

Стволовые клетки обладают большой пластичностью, темп пролиферации в них существенно выше, чем в зрелых структурах, они способны дифференцироваться в зависимости от микроокружения.

Следует отметить, что клеточная терапия требует индивидуального подхода и диагностики характера нарушений. В соответствии с выявленными нарушениями проводится индивидуальный подбор схем и препаратов для лечения.

Существуют следующие методики клеточной терапии:

- лечение с помощью эмбриональных и фетальных стволовых клеток;
- лечение с помощью препаратов эмбрио-фето-пуповино-плацентарно-амниотического комплекса;
- лечение с помощью аутологичных стволовых клеток, полученных из периферической крови;
- лечение с помощью аутологичных стволовых клеток, полученных из костного мозга;

В генной и клеточной терапии применяются несколько типов стволовых и прогениторных клеток:

- мезангиобласты;
- мышечные стволовые клетки;
- взрослые мультипотентные прогениторные клетки.

Мезангиобласты находятся рядом с сосудами. Недавно установили, что они могут частично восстанавливать функцию мышц у мышей с мышечной дистрофией, вызванной недостатком белка дельта-саркогликана.

Мышечные стволовые клетки производят несколько белков, необходимых для построения мышц. Эти клетки, похоже, объединяют свойства гематопозитических и миобластов, и ожидается, что с их помощью удастся поддерживать регенерацию крови, мышц и костей.

Взрослые мультипотентные прогениторные клетки в культуре дифференцируются в клетки эндотелия, нейроэктодермы и энтодермы. Когда их подсаживали в 3,5-дневные мышинные бластоцисты, в выросших из этих зародышей химерных мышах оказывалось примерно 45% потомков таких клеток. Это показывает, что потенциал, позволяющий превращаться в клетки всех трёх слоёв, у таких клеток

близок к потенциалу эмбриональных. После инъекции таких клеток мышам с одной из форм диабета и тяжёлой иммунной недостаточностью клетки приживались в разных нишах, таких, как костный мозг, селезёнка, кишечник, лёгочный эпителий, кровь. Использование этих клеток тормозится тем обстоятельством, что для их выращивания в культуре нужны необычные искусственные условия, которые приводят к эпигенетическим изменениям в клетках.

2.3.1. Аутологичные стволовые клетки

Периферическая кровь. В течение 4 суток перед забором крови пациенту вводится специальный препарат – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), который значительно увеличивает число стволовых клеток в периферической крови. Забор крови осуществляется из вены процедурой афереза, используя специальную медицинскую аппаратуру и специальный набор для забора стромальных стволовых клеток организма. Кровь переносится в лабораторию клеточных культур в стерильных пробирках. Работа с кровью производится стерильно в ламинарном боксе. Клетки культивируют, стимулируя их рост и размножение на специальных питательных средах и экстраклеточном матриксе до определенного количества, достаточного для проведения курса лечения. Поскольку стволовые клетки могут быть культивированы бесконечно (эти клетки бессмертны), часть клеток замораживается и помещается в криобанк под индивидуально присвоенным номером для проведения следующего цикла терапии.

Способ введения, количество и кратность введения клеток определяется строго индивидуально в зависимости от патологии.

Костный мозг. Забор костного мозга осуществляется из крыла подвздошной кости под наркозом. Костный мозг переносится в лабораторию клеточных культур в стерильных пробирках. Работа с костным мозгом производится стерильно в ламинарном боксе. При помощи сортировки клеток и особых приемов культивирования, из костного мозга выделяют гемопоэтические и мезенхимальные стромальные стволовые клетки. Дальнейшие манипуляции аналогичны манипуляциям со стволовыми клетками периферической крови.

2.3.2. Стромальные клетки жировой ткани

В последние годы в биомедицине особый интерес вызывают клетки, получаемые из жировой ткани. Для получения этих клеток используется ферментативная обработка коллагеназой образцов жировой ткани, полученной при косметической липосакции или в ходе хирургического удаления жирового отложения. Последующее центрифугирование позволяет избавиться от адипоцитов и получить осадочную фракцию клеток стромально-васкулярного фенотипа.

При культивировании в определенных условиях эти клетки способны дифференцироваться в клетки костной, хрящевой, жировой, мышечной, нервной ткани, в клетки сосудистой стенки (эндотелиальные и перициты).

Популяция свежeweыделенных стромальных клеток жировой ткани (СКЖТ) гетерогенна и характеризуются высоким содержанием клеток, экспрессирующих антиген стволовых клеток – CD34. По мере культивирования СКЖТ наблюдается обогащение популяции клетками, несущими маркеры мезенхимных клеток костного мозга (>90%). СКЖТ характеризуются высокой пролиферативной активностью. Они секретируют широкий набор проангиогенных факторов, экспрессия которых усиливается в условиях гипоксии. Секреторная активность СКЖТ способствует выживанию и пролиферации эндотелиальных клеток.

Имплантация СКЖТ человека в матригеле под кожу мыши стимулирует развитие капиллярной сети в имплантате, а введение этих клеток иммунодефицитным мышам с ишемией задней конечности стимулирует развитие сосудов в ишемизированных скелетных мышцах, что приводит к восстановлению кровотока в конечности.

Трансплантация СКЖТ в перинфарктную зону сердца крысы способствует улучшению функции сердца и стимулирует его ревазкуляризацию. При сокультивировании СКЖТ с клетками, выделенными из сердца новорожденных крысят, наблюдается образование более сложных сосудистых структур клетками постнатального сердца, и эти структуры более стабильны, чем те, которые образуются при культивировании этих клеток без СКЖТ. Стабилизирующая роль СКЖТ реализуется как за счет секреции в среду культивирования специфических факторов, так и благодаря образованию межклеточ-

точных щелевых контактов. При этом только секретируемых факторов для эффективной индукции и стабилизации структур недостаточно. Важную роль в стабилизации сосудистых структур (предположительно за счет образования коннексин-43-содержащих щелевых контактов) играют присутствующие во фракции СКЖТ перициты.

СКЖТ человека поддаются плазмидной, адено- и лентивирусным трансфекциям с высокой эффективностью, сохраняют высокую экспрессию трансгена до 14-30 дней.

Стромальные клетки жировой ткани представляют собой популяцию клеток, обладающих высокой степенью пластичности, высокой интенсивностью пролиферации, секретирующих много ангиогенных факторов и легко поддающихся трансфекции. При достаточно высоком содержании данного типа клеток в жировой ткани, относительной безопасности и низкой травматичности их получения, СКЖТ являются перспективными кандидатами для аутологической трансплантации в ишемизированные ткани с целью стимуляции ангиогенеза, для тканевой инженерии и перспективным клеточным вектором для генной терапии (Парфенова Е.В. и др., 2007; Ржанинова А.А. и др., 2010).

2.3.3. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

В последние годы применение ММСК вошло в терапию множества различных заболеваний на уровне клинических испытаний (Dominici M. et al., 2006; Barry F.P. et al., 2004; Jorgensen C., 2004). В настоящее время ММСК используются главным образом для снижения выраженности реакции «трансплантат против хозяина» при трансплантациях ГСК костного мозга у пациентов с онкогематологическими заболеваниями (Lazarus H.H. et al., 2005; Le Blanc K. et al., 2004; von Bonin M. et al., 2009; Rodriguez R. et al., 2008), а также в ортопедии (Щепкина ЕТ AL. и др., 2007; Puontos I. et al., 2006; Quarto R. et al., 2001). ММСК обладают способностью дифференцироваться в направлении большого числа клеточных типов, хотя естественными их производными считаются остеобласты, хондроциты и адипоциты, а также теноциты. Интерес клиницистов к ММСК объясняется не только уникальными свойствами этих клеток, но и сравнительной простотой их выделения из костного мозга и экспансии *in vitro*.

По данным большинства авторов, при длительном культивировании (до 25 удвоений) ММСК не подвергаются злокачественной трансформации и гибнут посредством апоптоза, достигнув фазы старения (Bernardo M.E. et al., 2007). Некоторым авторам удавалось культивировать ММСК до 36 (Stenderup K. et al., 2003) и даже до 56 пассажей (Mareschi K. et al., 2006), прежде чем прирост популяции останавливался. Тем не менее, в 2006 г. было показано, что после шестого пассажа культуры ММСК человека, полученные из костного мозга разных доноров, в разное время вступают в фазу старения, чему сопутствует постепенное снижение их пролиферативной активности и способностей к дифференцировке. Точно определить, когда в каждой конкретной культуре ММСК наступит блок пролиферации, практически невозможно (Bonab M.M. et al., 2006). Эти данные были подтверждены в независимой лаборатории научной группой W. Wagner, продемонстрировавшей, что ММСК человека после седьмого пассажа претерпевают морфологические изменения, нарушения профиля экспрессии положительных маркеров CD13, CD29, CD44, CD73, CD96, CD105, CD146 и CD166, и, в конце концов, перестают пролиферировать (Wagner W. et al., 2008). По этой причине в терапевтических целях предпочтительно использовать клетки, прошедшие менее шести пассажей *in vitro*. Это могло бы стать серьезным недостатком в отношении удобства работы с ММСК, поскольку ограниченное время, которое клетки могут провести в культуре, может накладывать временные рамки на их использование в клеточной терапии. Однако ММСК, как и любую другую клеточную культуру, возможно сохранять сколь угодно долго в замороженном состоянии, что практически не влияет на их свойства, по крайней мере, на пролиферацию и экспрессию характерных маркеров (Naack-Sorensen M. et al., 2007), а также на жизнеспособность и способность дифференцироваться в остеогенном направлении (Каплинина Н.И. и др., 2011; Kotobuki N. et al., 2005).

Большинство вопросов о корреляциях экспансии ММСК в культуре с различными характеристиками доноров остаются открытыми, поскольку данные, получаемые в независимых лабораториях, сильно разнятся. Например, до сих пор не ясно, действительно ли существует отрицательная зависимость пролиферативного потенциала ММСК от возраста донора (Bonab M.M. et al., 2006; Mareschi K. et al., 2006).

Существуют единичные работы, посвященные выявлению зависимости терапевтического потенциала ММСК от пола донора (Crisostomo P.R. et al., 2007). В указанной работе исследователи показали, что ММСК, изолированные из костного мозга самок крыс, оказывают при трансплантации лучший эффект на восстановление функций сердца после инфаркта миокарда, нежели ММСК самцов.

Касательно других факторов, например, корреляции экспрессии ММСК маркера CD71 (рецептор трансферрина), который принято считать в работах клеточных биологов маркером пролиферации, и реальной пролиферации культуры, практически нет данных. Хотя для тимоцитов с помощью проточной цитофлуориметрии была показана прямая зависимость пролиферативной активности и экспрессии на мембране клеток CD71.

Авторы поставили цель определить зависимость пролиферации ММСК после криоконсервации от следующих факторов:

- пола донора;
- возраста донора;
- CD71-статуса образцов костного мозга, из которых были выделены клетки;
- CD71-статуса культур ММСК перед криоконсервацией.

Изучали изменения, происходящие с клетками до седьмого удвоения популяции.

В связи с тем, что пролиферативная активность ММСК, полученных от разных доноров, строго индивидуальна, а ее вариабельность может быть очень широкой, авторы считают, что при криоконсервации ММСК, предназначенных для дальнейшего применения в экспериментальной клеточной терапии, имеет смысл замораживать отдельно небольшое количество клеток (до 2 млн.) в так называемой ампуле-спутнике, которые после криоконсервации будут немедленно разморожены и культивированы до седьмого пассажа. По данным о приросте ММСК из ампулы-спутника можно будет с большой точностью судить о динамике роста основной массы клеток донора, а, значит, планировать сроки подготовки культуры ММСК для использования в необходимом количестве и на точно определенном пассаже.

В работе были использованы культуры ММСК, полученные из костного мозга 36 доноров в возрасте от 21 года до 70 лет. Среди

них 11 человек практически здоровых, 20 – страдающих различными заболеваниями, исключая онкогематологические и острые воспалительные, и 5 пациентов, страдающих онкогематологическими заболеваниями (острый и хронический миелолейкоз). Культуры ММСК, полученные от разных доноров, в том числе и от доноров с онкогематологическими заболеваниями, оценивались совокупно, так как ранее было показано, что ММСК доноров без онкогематологических заболеваний и ММСК пациентов с онкогематологическими заболеваниями не различаются по фенотипическим и функциональным характеристикам (Zhao Z.G. et al., 2007).

Суспензию КМ выделяли посредством стерильной пункции и высевали на культуральную пластиковую посуду (Sarstedt, Германия) в среде культивирования *sxMEM* (HyClone, Новая Зеландия). Через 48 ч производили отмыв адгезивной фракции костного мозга от форменных элементов крови с помощью физиологического раствора натрия хлорида (0,9% NaCl, ОАО «Биосинтез» Россия). ММСК культивировали в монослое при +37°C и 5%CO₂, каждые трое суток заменяя питательную среду. Пересевы культуры до криоконсервирования производили по достижении 100% конфлюэнтности при помощи 0,25% раствора трипсина в ЭДТА (HyClone, Новая Зеландия).

На третьем пассаже (P3) культуру ММСК криоконсервировали. Для этого клетки снимали с пластика раствором трипсина и ЭДТА, центрифугировали в течение 5 мин при 300 g и ресуспендировали в среде культивирования с добавлением в пропорции 1:1 20% раствора криопротектора – диметилсульфоксида (Bright-Line, США) на аутосыворотке. Затем криовials с суспензией помещали в пары жидкого азота (около -80°C).

После криоконсервации одну из криовиал с клеточной суспензией (ампулу-спутник, содержащую 2 млн. клеток) размораживали при комнатной температуре, разбавляли ее содержимое 2-3 мл культуральной среды и центрифугировали 5 мин при 300 g. Клетки в количестве 1 млн. высевали на культуральный пластик, после чего культивировали в стандартных условиях по следующей схеме: пересевы производили через каждые 48-72 часа, после каждого производили подсчет клеток в гемоцитометре (Bright-Line, США). Всего проводилось четыре пересева ММСК после размораживания, то есть клетки вели в культуре до седьмого пассажа (P7). Термин «пассаж»

употребляется здесь как синоним пересева культуры через равные временные интервалы вне зависимости от прироста популяции.

Для наиболее полной характеристики культур ММСК после криоконсервации их подвергали на третьем либо на четвертом пассаже направленной дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипоцитарном направлениях. Для индукции дифференцировки ММСК использовали опубликованные протоколы и соответствующие коктейли ростовых факторов и морфогенов. Во всех случаях обработка индукторами дифференцировки длилась 2 недели, половину среды культивирования меняли каждые 3 суток.

Морфологические изменения после дифференцировок оценивали визуально с помощью микроскопа (Leica, Германия). В дальнейшем авторы не проводили специфических окрасок, а судили о дифференцировке клеток по их морфологии.

Фенотипирование образцов костного мозга и ММСК человека проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре FACSScan (Beckton Dickinson, США). Образцы костного мозга характеризовали по содержанию в них гемопоэтических стволовых клеток (CD34+/CD45+) и количеству CD71+ клеток; ММСК характеризовали на третьем пассаже перед криоконсервированием по «позитивным маркерам» CD90 и CD106, по «негативным маркерам» CD45 и CD34, а число предположительно пролиферирующих клеток в культуре оценивали окрашиванием клеток антителами против маркера CD71 (все антитела производства Beckton Dickinson, США). Фенотипирование проводили по стандартным протоколам фирмы-производителя.

Анализ зависимости пролиферации ММСК от пола донора был оценен с помощью парного F-критерия Фишера, поскольку полученные данные подчинялись нормальному распределению.

Зависимость пролиферации клеток от возраста донора оценивалась с помощью множественного регрессионного анализа для выявления возможных корреляций; различия в пролиферации ММСК у возрастных групп были оценены по критерию Краскела-Уоллиса для распределений, имеющих отклонения от нормального.

Зависимость пролиферативной активности ММСК от доли CD71 + клеток в образцах костного мозга оценивалась по результатам множественного регрессионного анализа, различия в группах с

разным содержанием CD71+ клеток оценивались по t-критерию Стьюдента.

Зависимость пролиферации ММСК от присутствия в популяции CD71+ клеток, а также сравнение пролиферативной динамики ММСК до и после криоконсервирования, было проведено тестом Краскела-Уоллиса.

В результате, после криоконсервации и последующего размораживания все без исключения культуры ММСК успешно дифференцировались в ортодоксальных направлениях, а именно, в остеогенном, хондрогенном и адипоцитарном.

Общий разброс коэффициентов прироста различных популяций ММСК независимо от пассажа после криоконсервации составил в абсолютных цифрах от 0,72 до 5,1 за двое суток.

По результатам исследования зависимость пролиферации ММСК после криоконсервации от возраста донора, от пола донора, от доли CD71 клеток в костном мозге донора, а также от CD71-статуса ММСК на третьем пассаже перед криоконсервацией отсутствовала. Результаты исследования указывают на то, что пролиферативная активность ММСК не снижается вплоть до семидесятилетнего возраста. Отсутствие зависимости пролиферации ММСК от доли CD71+ клеток, присутствующих в костном мозге донора, позволяет усомниться в том, что CD71 является маркером пролиферирующих клеток и не отражает реальной пролиферации культуры ММСК.

По литературным данным, у экспериментальных животных при неограниченных возможностях подбора возрастных групп установлено четкое снижение способности к адгезии к культуральному пластику и пролиферативной активности ММСК, выделенных из костного мозга молодых и старых животных (Kretlow J.D. et al., 2008; Tokalov S.V. et al., 2007), а также уменьшение терапевтического потенциала клеток, что было продемонстрировано на модели инфаркта миокарда у крыс. При этом показано, что снижение пролиферативной активности ММСК *in vitro* является прямым показателем снижения их регенерационных способностей *in vivo* (Zhang H. et al., 2005).

Для ММСК человека показано, что с увеличением возраста донора снижается их пролиферативная активность и способность формировать колонии при изоляции из костного мозга (Stolzinger A. et al., 2008).

Авторы отмечают, что пролиферативная активность ММСК – весьма стабильный показатель, на который не оказывает существенного влияния ни один из изученных факторов. Остаются вопросы об изменении с возрастом и под влиянием различных факторов дифференцировочного потенциала ММСК, продукции ими различных биологически активных соединений, а также о поиске молекулярных маркеров, с помощью которых можно делать уверенные выводы о свойствах мультипотентных мезенхимальных клеток. В настоящее время работа в данном направлении далека от завершения.

Динамика роста у различных популяций ММСК оказалась весьма вариабельной и индивидуальной для каждого донора, хотя ее общая картина и оставалась неизменной: популяции ММСК от третьего до седьмого пассажей удваивались в среднем за двое-трое суток, и тенденции к снижению пролиферативной активности со временем не наблюдалось ни в одном случае. Обнаруженная широкая вариабельность динамики роста ММСК подтверждает предположение о том, что в работе с предназначенными для использования в терапии культурами ММСК имеет смысл заготавливать при криоконсервации культуры ампулу-спутник с небольшим количеством клеток. Культивирование ММСК из ампулы-спутника может существенно помочь в работе с клетками, предназначенными для введения пациентам, позволив прогнозировать динамику роста культуры и точно координировать наращивание необходимого количества ММСК в лаборатории и проведение работы в клинике (Григорян А.С. и др., 2009).

2.3.4. Стволовые клетки эмбрио-фето-пуповино-плацентарно-амниотического комплекса

В последнее десятилетие интенсивно развивается новое направление в медицине – клеточная и тканевая трансплантация и терапия – применение биопрепаратов из тканей и клеток эмбрио-фето-пуповино-плацентарно-амниотического комплекса (ЭФП-ПАК) (Sun T., Ma Q-H., 2013).

Технологии криоконсервирования позволяют сохранить жизнеспособность и функциональную активность биологических объектов после отогрева, что обеспечивает высокую клиническую эффективность после их применения. Механизм действия жизнеспособ-

собных препаратов основан на сохранении после отогрева полноценности клеток и тканей и содержащихся в них биологически активных веществ естественного происхождения, обладающих разнонаправленным фармакологическим действием. Преимуществом применения клеточных и тканевых биопрепаратов является то, что пациент получает ряд биологически активных, сбалансированных соединений естественного происхождения, способных оказывать влияние на различные стороны метаболизма целостного организма, а также клетки, способные выполнять заместительные функции.

Ткани ЭФППАК содержат большое количество различных активаторов регенерации и дифференцировки: фактор роста фибробластов, фактор роста нервных волокон, фактор, стимулирующий рост макрофагальных и эритроидных колоний, а также антипролиферативные цитокины, предотвращающие клеточную и системную гиперстимуляцию.

Трансплантированные фетальные клетки и их ассоциаты практически не вызывают иммунной реакции отторжения, поскольку в 1 и 2 триместрах гестации на них не экспрессированы белки гистосовместимости 1 и 2 класса. Особенность метаболизма фетальных клеток обеспечивает их более высокую устойчивость к различным неблагоприятным факторам.

Все предлагаемые биопрепараты:

– хранятся в низкотемпературном банке биологических объектов;

– проходят проверку:

– на отсутствие бактериального и микологического загрязнения;

– на инфицированность:

– сифилисом,

– токсоплазмозом,

– вирусами гепатита В и С,

– ВИЧ,

– цитомегаловирусом,

– вирусом краснухи,

– герпеса.

Чистота биопрепаратов обеспечивается бактериологическими исследованиями на аэробную и анаэробную инфекцию. Тестирование проводится иммуноферментными методами и методом полимеразной цепной реакции. Каждый, подготовленный для использо-

вания биопрепарат имеет паспорт, удостоверяющий безопасность трансплантационного материала для реципиента, куда заносят результаты проверки.

Общим ограничением для применения препаратов из клеток и тканей ЭФППАК является наличие онкологических заболеваний. Исключением являются гемопоэтические клетки, используемые в комплексе лечения онкологических больных в качестве средства, восстанавливающего кроветворение.

Каждый биопрепарат помещается в специальный герметичный контейнер, имеющий соответствующую маркировку и паспорт, и хранится при температуре жидкого азота (-196°C). Перед использованием трансплантат подвергают процедуре отогрева с соблюдением правил асептики и антисептики при температуре $+37$ - $+40^{\circ}\text{C}$.

Всем пациентам после тканевой и клеточной трансплантации и терапии рекомендован щадящий режим, ограничение физической и психоэмоциональной нагрузки, молочно-растительная диета (стол №15) в течение 10 дней, если нет других ограничений.

В настоящее время к использованию в клинических исследованиях разрешены только стволовые клетки костного мозга человека и стволовые клетки пуповинной крови человека.

В зависимости от источника клеточного материала, клеточная терапия может быть:

- аутогенной (использование собственных клеток пациента);
- аллогенной (использование донорских клеток животных того же вида);
- ксеногенной (использование клеток животных других видов).

Применение клеточной терапии в России – процесс неоднозначный; фундаментальных организаций, работающих в этой области, немного. В основном применение клеточной терапии в нашей стране ограничено отдельной медицинской технологией или методикой, зарегистрированной в соответствующей инстанции, и выданной в качестве разрешения клиническому учреждению-заявителю на ограниченный срок (например, на год). Это означает, что применение стволовых клеток этой организацией возможно в рамках заявленной методики и строго для лечения указанного вида заболевания. Речь, безусловно, идет о применении собственных клеточных компонентов пациента или кровного донора. При нали-

ции необходимой документации, коммерческое использование клеточной терапии в этом случае допустимо.

В некоторых НИИ и других государственных учреждениях пациентам могут предложить лечение с помощью клеточных технологий в рамках ограниченных клинических испытаний, также в границах заявленной методики и лечения конкретного заболевания. Однако такие работы проводятся редко. Как правило, в этих случаях лечение бесплатно для пациента-добровольца.

Клеточная культура, используемая для пересадок, должна быть гетерогенна, то есть содержать и стволовые, и дифференцирующиеся клетки. Клеточный материал может вводиться:

- внутривенно;
- внутримышечно;
- внутрисуставно;
- подкожно;
- в виде аппликаций,

в зависимости от метода лечения и характера заболевания.

Использование стволовых клеток не является панацеей. Так, например, их применение в онкологии не приводит к излечению от рака. Однако появляются современные протоколы, направленные на реабилитацию больных в период ремиссии и перерывов между курсами химиотерапии. Больные, получающие такой курс, способны лучше переносить основное лечение, уменьшается количество осложнений, появляется возможность повторить процедуры химиотерапии раньше. Таким образом, шансы на успех излечения возрастают. Помимо этого, стволовые клетки обладают и доказанным противораковым эффектом: они сдерживают процессы развития опухоли и активизируют иммунную систему (<http://vip-1.ru/content/view/31/2/>).

2.3.5. Аллогенные гемопоэтические стволовые клетки пуповинной крови

За 1 год выполнено 16 трансплантаций ГСК ПК, заготовленных ГУЗ «Банк стволовых клеток департамента здравоохранения г. Москва» детям с онкогематологическими и неонкологическими заболеваниями. Медиана числа ядродержащих клеток на кг веса реципиента составила $6,0 \times 10^7$ (разброс 0,2-21,5), CD34-положительных клеток – $7,7 \times 10^5$ (разброс 0,5-40). Приживление

трансплантата было зарегистрировано у 9 пациентов (56,25%). Медиана времени до приживления нейтрофилов составила 24 дня (разброс 15-36 дней). Острая реакция трансплантат против хозяина (РТПХ) I-II степени развилась у 7 (43,75%) пациентов, случаев развития тяжелой РТПХ отмечено не было. Проявления хронической РТПХ выявлены у 1 (6,25%) пациента. Смертность к 100-му дню после трансплантации составила 28,5%. Общая выживаемость составила 56,2%, с медианой наблюдения 116 дней. Результаты настоящего исследования показывают, что ГСК ПК является альтернативным источником стволовых клеток (СК) для проведения трансплантации у больных с онкологической и неонкологической патологией (Шаманская Т.В. и др., 2010).

Большой интерес к пуповинной крови, возникший в последнее десятилетие, обусловлен особенностями ее клеточного состава. Уже в 70-х годах XX столетия было известно, что данная среда содержит большее количество клеток-предшественников, по сравнению с периферической кровью детей и взрослых. Среди клеток-предшественников выделяют стволовые клетки – наименее зрелые, относящиеся к длительно живущим популяциям и способные поддерживать свою численность за счет пролиферации, а также прогениторные клетки – коротко живущие, быстро дифференцирующиеся и дающие начало функционально активным клеткам крови и иммунной системы. Прогениторные клетки обеспечивают быстрое восстановление иммунной функции в организме реципиента после миелоабляции, а стволовые клетки ответственны за формирование всей самоподдерживающейся кроветворной системы.

Заготовка и использование гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови для пересадок имеет целый ряд преимуществ перед другими источниками кроветворной ткани. Прежде всего, отсутствует угроза причинения вреда здоровью матери и ребенка. Кроме того, при ее заготовке не требуется общая анестезия, а риск передачи некоторых латентных инфекций значительно ниже, чем при использовании костного мозга или периферических стволовых клеток взрослых доноров. Появляется практически неограниченная возможность длительного хранения гемопоэтических ПК в замороженном состоянии, что позволяет накапливать и сохранять различные HLA-типы клеток, в то время как потенциальные доноры костного мозга со временем выбывают из Регистра по разным при-

чинам. Замороженные образцы, находящиеся в банках пуповинной крови, могут предоставляться по требованию в любой центр трансплантации, что устранит задержки, которые нередко возникают из-за затрудненного поиска донора и заготовки костного мозга.

Вместе с тем, основным недостатком пуповинной крови, как источника стволовых клеток, является ее исходно малое количество и невозможность проведения повторного забора, поэтому и общее количество стволовых клеток, получаемых из нее, сравнительно невелико.

Проведенные в нашей стране и за рубежом исследования показали, что объем пуповинной крови зависит от множества факторов: срока гестации, при котором проводится родоразрешение, веса плода и плаценты, характера патологии, осложняющей течение беременности, способа родоразрешения и, наконец, методики сбора крови. Перед проведением сбора пуповинной крови, независимо от конечной его цели, необходимо получить согласие беременной женщины. Тщательно изучается соматический, акушерско-гинекологический и семейный анамнез беременной для выявления возможных генетических нарушений и инфекционных заболеваний, передающихся гематогенным путем. Каждую беременную обязательно обследуют на носительство HBS-Ag, наличие антител к возбудителям гепатита С, ВИЧ-инфекции, сифилиса, Т-клеточного лейкоза человека и цитомегаловирусной инфекции. При выявлении положительных серологических реакций у беременной забор пуповинной крови не проводится.

Сбор пуповинной крови осуществляется после рождения ребенка и отделения его от последа, при этом большое значение имеет время наложения зажимов на пуповину. В ряде работ было доказано, что если пуповина клеммируется позже 30 с после рождения ребенка, то объем получаемой крови уменьшается практически вдвое. Итальянские ученые получили интересные данные о положительном влиянии раннего помещения новорожденного на живот матери при самопроизвольных родах на увеличение объема пуповинной крови, что, по всей видимости, связано с повышением внутрибрюшного давления.

Существуют открытый и закрытый способы сбора пуповинной крови. При открытом способе кровь собирается в стерильную емкость самотеком, после обработки конечного участка пуповины дезинфицирующим раствором. Объем собранной таким способом

крови оказывается существенно большим, чем при сборе закрытым способом, поскольку кровь поступает в емкость одновременно из артерий и вены пуповины, имеющих большой диаметр. Однако при таком способе забора риск микробной контаминации вагинальной флорой составляет 20-30%, что на порядок выше, чем при закрытом способе.

Большинство авторов сходятся во мнении, что оптимальным является закрытый способ сбора пуповинной крови, сводящий риск бактериальной контаминации до 1-2%. В настоящее время для сбора пуповинной крови используют специальные закрытые трансфузионные системы, содержащие антикоагулянт и оснащенные дренажной иглой, или шприцы объемом 50 мл, частично заполненные антикоагулянтом. Сбор крови в трансфузионную систему осуществляется путем дренирования иглой, самотеком, тогда как при сборе шприцом имеет место активная эксфузия и отрицательное давление, создаваемое поршнем шприца, может оказывать повреждающее действие на клетки крови. Другим недостатком шприцевого метода является необходимость повторной пункции после заполнения первого шприца, что повышает риск микробной контаминации, удлиняет время процедуры и создает определенные неудобства медицинскому персоналу, особенно в случае кесарева сечения. Тем не менее, при соблюдении всех правил асептики и антисептики этот метод достаточно эффективен и безопасен и с успехом применяется в ряде учреждений, поскольку позволяет получить больший объем крови по сравнению со сбором в трансфузионные системы.

Из имеющихся на сегодняшний день антикоагулянтов предпочтительно использование CPDA, состоящего из цитрата и фосфата натрия, декстрозы и аденина. CPDA обеспечивает не только антикоагуляцию, но и обладает протективным действием в отношении клеточных мембран в процессе обработки и разделения крови на те или иные компоненты. Однако возможно применение и других антикоагулянтов, таких, как цитрат-фосфат-декстроза, кислотный-цитрат-декстроза или глюгидир.

Сбор пуповинной крови может проводиться при самопроизвольных родах и кесаревом сечении как до, так и после отделения последа. При сборе до отделения последа процедура несколько упрощается, однако во всех случаях следует помнить о том, чтобы

контейнер, в который собирается кровь, находился на 50-80 см ниже уровня положения роженицы для того, чтобы кровь самопроизвольно поступала в контейнер под действием силы тяжести.

Методы антисептической обработки одинаковы независимо от условий сбора: пупочный канатик тщательно обрабатывают на протяжении 8-12 см в месте предполагаемой пункции 5% настойкой йода и 70% раствором этилового спирта или «Октенисептом». После этого пунктируют вену пупочного канатика. Вена пуповины имеет больший диаметр, чем артерии, что легко определяется визуально. Вся процедура сбора обычно длится от 3 до 10 минут. При наступлении обескровливания плаценты, о котором можно судить по прекращению тока крови и спадению вены, пункционную иглу удаляют и закрывают защитным колпачком.

При правильном выполнении техники сбора средний объем пуповинной крови составляет, как правило, 80-100 мл. По данным литературы, объем получаемой крови может зависеть от многих факторов, таких, как масса тела новорожденного, время пересечения пуповины, срок беременности, длина пуповины. Однако в исследовании, проведенном российскими авторами, не выявлено зависимости объема собранной крови от массы плода. С другой стороны, если низкая масса новорожденного обусловлена патологией фетоплацентарного комплекса или пуповины, тяжелыми осложнениями беременности, то сбор пуповинной крови может оказаться затрудненным или вообще невозможным. Поэтому при необходимости прогнозирования, следует в большей степени опираться на клинические и лабораторные данные обследования беременной.

Важным фактором, влияющим на объем сбора пуповинной крови, является время отделения ребенка от пуповины и уровень, на котором она пересекается. Раннее отделение ребенка от последа, равно как и наложение зажимов на пуповину на максимально близком расстоянии к ребенку, не влечет за собой каких-либо отрицательных последствий для новорожденного. Поэтому, если нет акушерских или неонатальных показаний для выдержки более длительных сроков, акушерская тактика может учитывать интересы персонала, проводящего сбор пуповинной крови, и производить перевязку пуповины сразу после рождения младенца.

Профессором К.М. Абдулкадыровым и др. было проведено исследование разных способов сбора плацентарной крови путем дрени-

рования вены пуповины. Сбор пуповинной крови проводили в условиях родильного зала в трех вариантах: при физиологических родах, при нахождении плаценты *in utero* и *ex utero*, а также при кесаревом сечении. Авторами было установлено, что объемы собираемой крови существенно не различались, составив в среднем 70 мл. В том же исследовании отмечено, что, если с момента рождения ребенка до момента пережатия пуповины проходило менее 14 с, то средний объем крови составлял 80 мл, а если этот период был более продолжительным, то средний ее объем был практически вдвое меньше.

Поскольку наиболее часто целью сбора пуповинной крови является получение концентрата ядросодержащих клеток, группой авторов было проведено исследование влияния времени, прошедшего с момента сбора крови до выделения из нее различных фракций, а также температуры, при которой хранились образцы до разделения, на количественный выход моноклеарных клеток, эритроидных предшественников и колониеобразующих единиц гранулоцитов и моноцитов. Эти исследования позволили обнаружить выраженное влияние обоих факторов как на выход моноклеарных клеток в целом, так и на количество всех типов клеток-предшественников. Интересно, что наименьшие потери клеточного материала при длительности хранения до 72 ч отмечены при температуре +25°C, а наибольшие – при +4°C.

После выделения и подсчета клеточного состава полученного концентрата он подвергается замораживанию и хранится при сверхнизких температурах, как правило, в сосудах Дьюара с жидким азотом. Функцию хранения выполняют так называемые банки стволовых клеток, число которых увеличивается с каждым годом во всем мире. Хранящиеся таким образом клетки выполняют роль своего рода «биологической страховки» на случай заболевания ребенка или его ближайших родственников, чаще всего сестер и братьев.

Наибольшее применение стволовые клетки пуповинной крови находят в онкогематологии. Поскольку количество их изначально ограничено, они, как правило, используются для аутотрансплантации в случае развития злокачественных заболеваний крови у детей. Естественно, что чем меньше возраст и вес ребенка, тем больше шансов восстановить гемопоэтическую функцию после химиотерапевтической или лучевой миелоабляции с помощью аутоклеток пуповинной крови. Также возможно применение у детей аллоген-

ных клеток пуповинной крови в случае их совместимости с реципиентом по HLA-системе. Применение данных клеток у взрослых лимитировано их недостаточным количеством для замещения гемопоэза во взрослом организме.

Научные эксперименты, проводящиеся практически в каждом современном научно-исследовательском институте соответствующего профиля, как в России, так и за рубежом, направлены на определение возможностей эффективного применения стволовых клеток пуповинной крови для лечения аутоиммунных и других заболеваний. На сегодняшний день эти исследования проводятся на животных, поэтому вопрос их клинического использования остается открытым.

С начала 90-х годов XX столетия пуповинная кровь стала привлекать внимание трансфузиологов и неонатологов в качестве источника аутокомпонентов: эритроцитарной массы и плазмы. Достижения современной науки и техники позволяют добиться существенных успехов в лечении и выхаживании глубоко недоношенных детей, а также в хирургической коррекции врожденных пороков развития у новорожденных первого месяца жизни. Однако именно эти группы новорожденных наиболее часто нуждаются в трансфузиях донорских компонентов крови, несущих в себе высокий риск передачи гемотрансмиссивных заболеваний и иммунологической несовместимости.

Кроме того, донорами являются взрослые люди, кровь которых по клеточному и биохимическому составу резко отличается от крови новорожденных. В частности, эритроциты новорожденных содержат фетальный гемоглобин, отличающийся по структуре от гемоглобина взрослых.

С другой стороны, методики кровосбережения, такие как аутодонорство, нормоволемическая гемодилюция и реинфузия аутоэритроцитов, широко применяемые у взрослых пациентов, в силу очевидных причин невозможно применить у новорожденных. Поэтому единственным источником аутокомпонентов в данной ситуации может стать пуповинная кровь. На сегодняшний день над проблемой аутотрансфузии пуповинной крови работают коллективы ученых практически во всех странах мира. При этом различные группы исследователей применяют принципиально разные подходы. Так, японские исследователи в основном изучают хранение и

применение цельной пуповинной крови у недоношенных новорожденных и новорожденных с пороками развития, подлежащими хирургической коррекции. Лимитирует применение этой методики кратковременность пригодности цельной крови для введения, поскольку уже после трех дней хранения количество микросгустков и процент гемолизированных эритроцитов в ней, а, следовательно, и содержание ионов калия не позволяют провести трансфузию без осложнений. Тем не менее, у 25 детей, перенесших в первые трое суток жизни оперативные вмешательства с кровопотерей более 10% ОЦК, аутотрансфузии пуповинной крови было достаточно для достижения нормальных гемоконцентрационных показателей без дополнительных трансфузий донорской эритромаcсы.

Возможность разделения пуповинной крови на компоненты – плазму и эритроцитарную массу – с последующим хранением и применением последней параллельно исследуют группы трансфузиологов и неонатологов в ряде университетов Европы. Естественно, что при таком подходе сроки хранения эритромаcсы значительно увеличиваются, за счет чего расширяется спектр показаний для ее введения. Заготавливая пуповинную эритромаcсу с помощью специально разработанных замкнутых систем, можно удлинить сроки ее хранения до 35-42 суток. Спорным является вопрос о необходимости удаления из пуповинной эритромаcсы лейкоцитарного слоя, содержащего до 99% лейкоцитов. В ряде исследований эритромаcса заготавливалась без лейкоцитарного слоя, в других – вместе с ним. Так или иначе, но каких-либо осложнений после введения обоих типов аутоэритромаcсы новорожденным не было, а говорить об анализе отдаленных последствий трансфузий лейкоцитсодержащей эритромаcсы пока преждевременно.

В нескольких университетах Германии был проведен анализ контаминации пуповинной эритромаcсы материнскими эритроцитами и лейкоцитами, выявивший контаминацию трех образцов из 390 исследованных. Учитывая то, что такая контаминация может иметь клиническое значение только при несовместимости матери и ребенка по системе АВ0, резус или Kell, тотальный скрининг образцов не представляется целесообразным.

Крайне важным является вопрос микробиологической безопасности эритромаcсы, заготовленной из пуповинной крови. Исходя из принципа минимизации риска микробной контаминации

образцов, все авторы выделяют в качестве критериев исключения острые формы бактериальной и вирусной инфекции у беременных, сопровождающиеся признаками хориоамнионита. Различными исследовательскими группами был сделан вывод, что бактериальное загрязнение в большинстве случаев происходит при самопроизвольных родах, составляет 3-7% всех образцов с преимущественным выявлением банальной вагинальной палочковой или кокковой флоры и практически полностью зависит от квалификации и добросовестности персонала, выполняющего сбор пуповинной крови. Лишь в единичных случаях контаминация была связана с врожденными гнойно-септическими заболеваниями, в частности – с меконсальным перитонитом.

Тем не менее, в случаях, когда заключение о росте микроорганизмов было получено уже после проведения трансфузии, ни у одного ребенка не развилось гнойно-септическое осложнение.

Приведенные данные не отрицают необходимости микробиологического исследования всех образцов пуповинной крови, но указывают на два алгоритма: проведение посевов на экспрессреды с получением результата в течение 72 ч или проведение рутинных исследований с получением результата на 5-7-й день и дополнительным тестом на чувствительность микроорганизмов к антибиотикам с тем расчетом, что при развитии септического процесса у новорожденного терапия будет целенаправленной. Очевидно, что первый алгоритм является наиболее безопасным.

Что же касается применения аутоплазмы, полученной из пуповинной крови, то литературных данных о ее клиническом применении не было найдено. Лишь одной исследовательской группой был проведен анализ коагуляционного потенциала пуповинной криоплазмы, в результате чего была установлена прямая его зависимость от соотношения антикоагулянта и крови в каждом конкретном образце.

Специалисты из разных стран сходятся во мнении, что заготовка и применение компонентов аутопуповинной крови является высокоэффективным и перспективным, а также практически единственно возможным методом кровосбережения в неонатологии. Дальнейшее развитие этих методик должно быть направлено на получение как можно большего числа пригодных для клинического применения компонентов из одного образца пуповинной крови: эритроцитов, ядродержащих клеток и плазмы (Федорова Т.А. и др., 2006).

2.3.6. Гемопозитические стволовые клетки зрелой плаценты человека

В настоящее время лишь часть пациентов, нуждающихся в трансплантации гемопозитических стволовых клеток, имеет возможность получить иммунологически совместимый материал. Источниками гемопозитических стволовых клеток являются костный мозг, периферическая и пуповинная кровь. Хотя гемопозитические стволовые клетки пуповинной крови имеют много преимуществ, их количество в доступном объеме пуповинной крови недостаточно для трансплантации взрослому человеку. В данной работе авторы сообщили, что ткань зрелой плаценты человека содержит большое количество гемопозитических стволовых клеток, которые не связаны непосредственно с кровообращением плода или матери. Количество этих гемопозитических стволовых клеток в целой плаценте в 10 раз превышает их количество в доступном объеме пуповинной крови. Гемопозитические стволовые клетки, полученные из свежей или криоконсервированной плаценты, дифференцируются в клетки эритроидного и миелоидного ростков как *in vitro*, так и *in vivo* при трансплантации иммунодефицитным мышам. Таким образом, криоконсервированная плацента может служить потенциальным источником для замещения пула гемопозитических стволовых клеток у человека.

Плацента – провизорный орган, осуществляющий связь между организмом матери и плодом в процессе внутриутробного развития. Помимо выполнения известных фундаментальных функций, плацента млекопитающих представляет собой богатый резервуар гемопозитических стволовых клеток (ГСК). В процессе онтогенеза происходит миграция очагов гемопоэза. К настоящему времени наиболее детально исследованы процессы плацентарного гемопоэза у мышей, который во многих отношениях может служить моделью кроветворения у человека.

У мыши эмбриональный гемопоэз начинается после гастрুলации, когда группа специализированных мезодермальных клеток-предшественников (гемангиобластов) коммитируется на путь гемопоэза. Первые кроветворные предшественники мигрируют в стенку желточного мешка и инициируют продукцию эмбриональных «красных кровяных телец». Существуют данные, что дефинитивные ГСК, воз-

можно, происходят из другой группы мезодермальных клеток (Jaffredo T. et al., 2005). Множество исследований свидетельствует о том, что мезенхима участка эмбриона, обозначаемого как «аортагонады-мезонефрос» (АГМ), который ограничен дорзальной аортой и урогенитальными гребнями, является источником ГСК (Godin L. et al., 2002). Дополнительно ГСК формируются в пуповинной и вителлиновой артериях. Эти ГСК, вероятно, колонизируют развивающуюся печень, которая служит основным органом кроветворения уже в плодном периоде. Несмотря на прогресс в идентификации ГСК в зародышевых органах, до сих пор мало известно о происхождении различных пулов ГСК и их относительном вкладе в гемопоэз. Так, до 2003 года оставалось не выясненным, являются ли клетки АГМ единственным источником быстро растущего пула ГСК фетальной печени (Kumaravelu P. et al., 2002). Новые перспективы в решении этого вопроса появились в связи с обнаружением в мышинной плаценте на средних сроках гестации многочисленных мультипотентных клеток-предшественников и ГСК, что указывает на важную роль плаценты в становлении гемопоэза (Alvarez-Silva M. et al., 2003; Gekas C. et al., 2005; Oteersbach K. et al., 2005). Еще в 70-е годы XX века было показано, что предшественники В-клеток появляются в плаценте мыши перед тем как попасть в печень. Клетки, обладающие способностью генерировать В-лимфоциты, обнаруживались в плаценте на стадии Э9.5, их число достигало максимума на Э12.5 и затем снижалось, аналогичную кинетику демонстрировала и популяция ГСК (Gekas C. et al., 2005). Так, к концу внутриутробного развития количество ГСК в плаценте у мышей снижается, что, возможно, является отражением процесса миграции плацентарных ГСК в печень и другие развивающиеся кроветворные органы плода (тимус, селезенку и костный мозг). Накопленные данные позволяют предположить, что плацента может функционировать как орган лимфо- и миелопоэза.

Для оценки человеческой плаценты как потенциально возможного источника ГСК в процессе естественного гемопоэза зрелые плаценты человека были получены в госпитале Альта Бэйтс (Бэркли, Калифорния, США) с согласия доноров. Иммуногистохимические исследования тканей плаценты на присутствие CD34 и других маркеров ГСК (CD90, CD38, CD133) проводили на срезах с парафиновых блоков методом иммунофлюоресценции после обработки протеиназой К.

На первом этапе проводили перфузию плацент через артерии и вену пупочного канатика раствором антикоагулянта и сосудорасширяющего агента. Далее, для выделения клеток, в артериальное русло вводили 50 мл физиологического раствора на фосфатном буфере с антибиотиками (пенициллин, стрептомицин и фунгизон), протеазами (диспаза – 2,5 ед./мл), трипсин – 0,5 мг/мл) и ЭДТА. Образцы тканей плаценты измельчали и помещали в буфер с коллагеназой I (0,1%) и диспазой (2,5 ед./мл) на 30 мин при +37°C. Полученные таким образом образцы перемешивали и фильтровали через фильтр с размером пор 100 мкм в течение 5 мин.

Для получения мезенхимальных стволовых клеток (МСК), тканевый лизат центрифугировали при 400g в течение 15 мин, удаляли супернатант. Культивирование проводили в соответствии с ранее описанным протоколом (Porov B. et al., 2007).

Часть плацент криоконсервировали по следующей схеме. Плаценты промывали 250 мл буферного раствора, затем проводили перфузию раствором смеси криоконсервантов в течение 40 мин. Затем плаценты замораживали в морозильной камере (-80°C) в течение 12 ч, после чего помещали в жидкий азот.

Количество CD34+ клеток в гомогенатах тканей определяли с помощью проточного цитофлюориметра FACScaliber (BD Biosciences, San Jose, CA) с использованием Procount Progenitor Cell Enumeration Kit (BD Biosciences). Выделяли CD34/CD45 положительную популяцию клеток. Жизнеспособность клеток определяли с помощью ядерно-цитоплазматического окрашивания To-Pro.

Дифференцировочный потенциал клеток оценивали с использованием полной среды MethoCult® на основе метилцеллюлозы (Stem Cell Technologies, Canada). Присутствие клеток-инициаторов долговременно поддерживающихся культур определяли с использованием фидерного слоя из стромальных клеток плацентарного происхождения от того же донора. Для инактивации фидера культуру обрабатывали раствором митомицина C (10 мкг/мл) в течение 2 ч.

В экспериментах с трансплантацией полученных клеток использовали иммунодефицитных мышей двух линий необлученных NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1wjl}/Szj (*JaxLab Cat. №005557*) и целиком облученных (2,5 Gy) NOD.Cg-Rag1^{tm1momp} Prf1^{tm1Sdz}/Sz (*JaxLab Cat. №004848*). Всем мышам внутрибрюшинно вводили 10⁶ ядродержащих клеток, выделенных из плацентарных тканей. Через 2-3 месяца

цев после трансплантации животных выводили из опыта и производили иммуноокрашивание клеток крови, костного мозга и селезенки антителами к человеческим CD45 (общий лейкоцитарный маркер), CD3 (лимфоцитарный маркер), CD25 (лимфоцитарно/моноцитарный маркер) и CD51/CD61 (маркеры тромбоцитов/мегакариоцитов). Подсчет клеток проводили с помощью проточной цитометрии с использованием соответствующих негативных (мышь без трансплантации) и позитивных контролей (человеческая кровь).

Авторы уделили основное внимание двум классическим маркерам человеческих ГСК: CD133 и CD34. Известно, что примитивные ГСК, гемопоэтические клетки-предшественники и гемангиобласты экспрессируют CD133. CD133+ клетки костного мозга эффективно заселяются в ткани иммунодефицитных мышей, и эта популяция CD133+ ГСК содержит предшественники гранулоцитов/макрофагов. Популяция CD133+ в костном мозге и крови коэкспрессирует CD34.

У человека колониеформирующая активность характерна для популяции CD34+ клеток, которые способны к колонизации и репопуляции кроветворных органов иммунодефицитных мышей. Популяция CD34+ клеток костного мозга содержит ГСК, которые поддерживают гемопоэз в течение всей жизни организма.

Иммуногистохимическое исследование тканей плаценты показало присутствие многочисленных кластеров CD34+ клеток, не связанных с микроциркуляторным руслом, локализованных в свободной соединительной ткани. Количество CD34+ клеток составляло $0,2 \pm 0,03\%$ всех клеток плаценты, их общее число в среднем составляло $2,5 \times 10^7$ клеток на плаценту. Была отмечена колокализация CD34 и других классических маркеров ГСК – CD90, CD38, CD133.

Сравнительный анализ пуповинной крови и препаратов, полученных после обработки плаценты протеолитическими ферментами, показал гораздо более высокий выход живых CD45^{dim} CD34+ клеток из плаценты. Общее количество ГСК, доступных в препарате плаценты, по сравнению с общим объемом пуповинной крови из этого же источника, было в среднем в 10-12 раз выше.

Иммуногистохимическое исследование также показало присутствие многочисленных кластеров CD133+ клеток, локализованных в свободной соединительной ткани. Среди этих кластеров выявлялись очаги эритропоэза.

Гистологические и цитометрические данные свидетельствуют о том, что плацента является очень богатым источником CD34+ и CD133+ ГСК. Для того, чтобы убедиться в жизнеспособности и дифференцировке ГСК после обработки ткани протеиназами, авторы оценили способность клеток к дифференцировке в клетки крови, используя стандартные тесты на колониеобразование, включая CFU-E, BFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM, результаты сравнивались с такими же тестами в отношении ГСК пуповинной крови. Между числом колоний, образованных одинаковым количеством клеток плаценты или клеток пуповинной крови из той же плаценты, не было выявлено статистически значимой разницы. Клетки, растущие в Methocult® в течение 14 дней, были позитивны в отношении гемоглобина, CD45, CD25, CD31 (маркеры В-лимфоцитов, моноцитов и тромбоцитов), CD116 (маркера моноцитов и гранулоцитов) и CD69 (маркера макрофагов).

Для того, чтобы показать присутствие среди первичных плацентарных клеток клеток, инициирующих долговременную гемопоэтическую культуру, первичные плацентарные клетки культивировали в течение 6 недель на фидерном слое из стромальных клеток, выделенных из тех же образцов плаценты. В этом случае ГСК активно дифференцировались в среде Methocult®, что доказывало присутствие клеток-инициаторов долговременной культуры среди первичных плацентарных клеток.

У иммунодефицитных мышей NOD/SCID, получивших сублетальную дозу облучения, введение плацентарных CD34+ ГСК приводило к появлению в костном мозге, селезенке и периферической крови CD45+ CD3+ лимфоцитов. Химеризм (присутствие человеческих клеток крови) достигал 9-12%, составляя в среднем $3 \pm 1\%$. Наблюдалось присутствие CD45+CD29+ клеток, а также CD45+CD51V CD69+ клеток.

Аналогичные исследования после криоконсервации плацент и хранения в течение 1-3 месяцев показали сходные результаты. Удалось получить такое же количество жизнеспособных CD34+ клеток, сохранивших способность к дифференцировке.

Полученные авторами результаты показывают, что плацента человека содержит чрезвычайно большое количество гемопоэтических клеток-предшественников. Из плацентарных тканей человека можно получить большее количество CD34+ ГСК, чем из пуповинной крови. Эти клетки сохраняют свои способности к прогрессив-

ной дифференцировке по пути лимфо- и миелопоэза после криоконсервации.

В исследованиях на мышах показано, что плацента в 2-4 раза богаче ГСК, чем даже фетальная печень (Alvarez-Silva M. et al., 2003; Mikkola H. et al., 2006). На стадии 39 и 310 в плаценте уже присутствовали ГСК, в то время как в печени их еще не было.

Особенностью плацентарных ГСК является быстрое увеличение их численности в период между 311.5 и 312.5 (Gekas C. et al., 2005). В результате чего в этот период содержание ГСК в плаценте более чем в 15 раз превышает численность ГСК в АГМ или в желточном мешке, что, возможно, говорит об уникальном кроветворном микроокружении, которое существует в плаценте. Увеличение пула ГСК в период 311.5-312.5 было более выраженным, чем увеличение соответствующего пула клоногенных клеток-предшественников, что свидетельствует о том, что плацентарное микроокружение способствует поддержанию ГСК без одновременной дифференцировки в последующие кроветворные классы (Gekas C. et al., 2005). Количество гемопоэтических клеток в плаценте на средних сроках гестации (соответствующих примерно 1-2 месяцам гестационного возраста человеческого эмбриона) во много раз превосходит их количество в зрелой плаценте, пуповинной крови и циркулирующей крови. Данные результаты показывают, что плацента является ранее недооцененным источником ГСК.

В настоящее время основными источниками ГСК для трансплантации в клинической практике служат костный мозг, периферическая и пуповинная кровь. Но потребность в HLA-совместимых стволовых и прогениторных кроветворных клетках превышает возможность по их заготовке. Менее чем 30% потенциальных реципиентов имеют HLA-идентичных родственников, в связи с чем широко распространенной является пересадка аллогенных ГСК костного мозга, которая часто приводит к неблагоприятным реакциям со стороны иммунной системы. Кроме того, не следует забывать и о главном ограничении использования человеческой пуповинной крови для трансплантации – низкое содержание в ней ГСК, недостаточное для обеспечения адекватного восстановления гемопоэза у взрослых реципиентов.

Результаты работы авторов с очевидностью показывают, что криоконсервирование плаценты с помощью перфузии и последую-

щего замораживания может являться альтернативным и эффективным способом сохранения аутогенных кроветворных стволовых клеток в количестве, достаточном для реконституции гемопоэза взрослых пациентов (Сериков В.Б., Куйперс Ф., 2008).

2.3.7. Стволовые клетки амниона человека

Клетки, выделенные из кусочков амниотической оболочки плаценты человека путем ферментативного разрушения ткани, и обладающие адгезивностью к пластику, наращивали в среде DMEM-F12 с добавлением 10% бычьей фетальной сыворотки. Полученные таким образом клетки имели фибробласто-подобную морфологию.

Амнион плаценты человека состоит из эпителиальных клеток и соединительной ткани мезодермального происхождения. Фибробласто-подобные клетки амниона человека имеют иммунофенотип, схожий с мезенхимальными клетками костного мозга. Эти данные позволяют заключить, что культивируемые клетки амниона человека являются мезенхимальными клетками.

Экспрессия маркеров поверхности была изучена на разных пассажах мезенхимальных клеток амниона. Оказалось, что значимых изменений в экспрессии поверхностных маркеров не наблюдалось до 10 пассажа. Исключением явилась экспрессия МНС I класса, которая монотонно возрастала от пассажа к пассажу. Иммунофенотип клеток амниона выглядит следующим образом: CD54^{hi}-CD44^{hi}-CD90^{dim}-HLA-ABC^{lo}-HLA-DR-CD34⁻.

С целью оценить пролиферативные свойства мезенхимальных клеток амниона в культуре и проанализировать их способность к дифференцировке определены уровни экспрессии таких внутриклеточных белков как нестин, характеризующий нативное, недифференцированное состояние клеток, и Ki67, который является маркером интенсивно делящихся клеток. Оказалось, что в популяции изучаемых клеток содержится около 50% нестин-позитивных и 70% Ki67-позитивных клеток. Это говорит о том, что большинство изучаемых клеток не дифференцированы и пролиферируют.

Основным критерием «стволовости» клеток служит их способность дифференцироваться в клетки разных зародышевых листков. С целью определить, являются ли мезенхимальные клетки амниона человека стволовыми, изучили их способность дифференцировать-

ся в клетки мезодермального происхождения – остеоциты и адипоциты, а также эктодермального происхождения – нервные клетки и энтодермального происхождения – гепатоциты.

Условиями адипогенной дифференцировки являлись наличие в среде культивирования дексаметазона, индометацина, инсулина и IBMX, а также 100% конфлюентность клеток перед добавлением дифференцировочной среды. Через 3 недели инкубации клеток в такой среде, с ее сменой каждые 3 дня, в клетках начали накапливаться жировые вакуоли, количество и размер которых к концу 4-й неделе заметно увеличивались.

В случае остеогенной дифференцировки среда для культивирования была дополнена β -глицерофосфатом, дексаметазоном и фосфатом аскорбиновой кислоты. Инкубация клеток в дифференцировочной среде в течение 4 недель привела к увеличению экспрессии в клетках амниона маркерных белков остеоцитов – остеоонектина и костного сиалированного белка. Также была зарегистрирована активация щелочной фосфатазы, фермента, активность которого повышена в остеоцитах.

Для дифференцировки клеток амниона человека в гепатоциты была использована среда, содержащая ростовые факторы HGF и OSM, а также инсулин, трансферин и дексаметазон. Через 4 недели инкубации клетки были проанализированы на экспрессию альбумина и α -фетопротеина. Было обнаружено значительное увеличение экспрессии альбумина в клетках, культивированных в дифференцировочной среде, по сравнению с контрольными клетками. Однако в супернатанте клеток альбумина обнаружено не было, что говорит об отсутствии или слабой секреции этого белка.

Для проверки способности клеток амниона человека дифференцироваться в нервные клетки была использована среда, дополненная набором нейротрофных и ростовых факторов и гормонами (ретиноевая кислота, bFGF, EGF, NGF, NT-3, инсулин, гидрокортизон, прогестерон). Инкубация клеток амниона человека в течение 1 недели привела к заметному снижению уровня экспрессии нестина и увеличению экспрессии GFAP и β -тубулина – характерных белков нервных клеток.

Полученные результаты свидетельствуют о способности клеток амниона человека в определенных условиях дифференциро-

ваться в клетки различного происхождения и позволяют заключить, что полученные клетки амниотической оболочки плаценты являются мультипотентными стволовыми клетками, а амниотическая оболочка плаценты человека – альтернативным источником МСК (Холоденко И.В. и др., 2007).

В течение нескольких последних лет часть исследований была направлена на поиски альтернативных костному мозгу, более доступных источников клеток, обладающих «стволовостью» и пригодных для регенеративной медицины. Такими источниками являются экстра-эмбриональные органы, а именно: пуповина, плацента, амниотическая оболочка, амниотическая жидкость.

Для проверки способности клеток амниона человека дифференцироваться в различные типы нервных клеток *in vitro*, фибробластоподобные клетки амниона человека культивировали в средах двух видов. Одна среда представляла собой набор химических реагентов (ДМСО, 2-меркаптоэтанол, KCl) – так называемая «химическая» дифференцировка. Вторая среда была дополнена целым набором нейротрофных и ростовых факторов и гормонами (ретиноевая кислота, bFGF, EGF, NGF, NT-3, инсулин, гидрокортизон, прогестерон) – фактор-индуцируемая дифференцировка.

В результате «химической» дифференцировки клеток амниона человека в течение суток большая часть клеток гибла. Однако оставшаяся часть клеток претерпевала существенные морфологические изменения, а именно: появлялось множество отростков, морфология клеток была подобна морфологии клеток астроглии. Кроме того, в этих клетках существенно снижался уровень экспрессии нестина по сравнению с контрольными клетками, культивируемыми в стандартных условиях. С другой стороны, эти клетки начинали экспрессировать на достаточно высоком уровне глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), что не характерно для тех же клеток, растущих в обычных условиях.

Фактор-индуцируемая дифференцировка клеток амниона человека в течение 1 недели не привела к каким-либо существенным изменениям в морфологии клеток. Тем не менее, как и при «химической» дифференцировке, в этих клетках заметно снижался уровень экспрессии нестина и начинали экспрессироваться нейрональные белки, не характерные для клеток амниона, культивируемых в стандартных условиях. Так, несколько возростала

экспрессия GFAP, кроме того на достаточно высоком уровне экспрессировался β III-тубулин. Полученные результаты свидетельствуют о возможной способности клеток амниона человека в определенных условиях дифференцироваться в нейронаподобные клетки.

Кроме экспериментов *in vitro*, были также проведены эксперименты *in vivo* с использованием клеток амниона человека, меченых витальным красителем DIL, и крыс с моделью ишемического инсульта. Через сутки после индукции ишемического инсульта крысам внутривенно вводились человеческие клетки. Через 7, 14, 45 и 60 дней после введения клеток был проведен иммуногистохимический анализ криосрезов пораженного левого полушария головного мозга крыс. Подобный анализ позволил выявить по флуоресценции витального красителя наличие в очаге поражения человеческих клеток через 7 и 14 дней после введения. При этом на 7-е сутки после введения в области ишемии наблюдалась массовая гибель клеток амниона человека, тогда как через 14 дней обнаруженные в очаге поражения клетки имели целостную ненарушенную морфологию. По истечении 45 дней после внутривенного введения человеческих клеток в пораженном левом полушарии в области ишемии были обнаружены клетки слабо экспрессирующие человеческий GFAP, а через 60 дней формирующие более разветвленные сети. Иммуногистохимический анализ срезов левого полушария головного мозга крысы с инсультом через 60 дней после введения клеток человека также выявил наличие в области поражения единичных клеток, экспрессирующих человеческий β III-тубулин.

Из полученных результатов авторы сделали ряд выводов:

- при поражении головного мозга крысы, человеческие клетки, введенные внутривенно, способны проникать в область поражения, преодолевая гематоэнцефалический барьер;
- попав в очаг ишемии, большая часть человеческих клеток гибнет, однако клетки, оставшиеся в области поражения по истечении полутора-двух месяцев претерпевают изменения, возможно связанные с их дифференцировкой, отражением чего служит экспрессия глиального фибриллярного белка и β III-тубулина (Холоденко И.В. и др., 2007).

2.4. Проблемы контроля качества продукции клеточных технологий

Отрасль клеточных технологий является одним из наиболее перспективных направлений в биомедицине, однако отсутствие четкого законодательства тормозит ее развитие. Организационные проблемы существуют на всех этапах от создания клеточной технологии до применения продукции клеточных технологий в клинических испытаниях. Для лаборатории, создающей продукцию клеточных технологий, основной проблемой является контроль качества выпускаемой продукции, так как качество продукции прямо связано с обеспечением безопасности субъекта клинических испытаний.

В связи с отсутствием нормативно-правовых актов, регулирующих контроль качества продукции клеточных технологий, отсутствует стандарт для так называемого клеточного паспорта или сертификата продукции клеточных технологий, в котором должны быть отражены все необходимые параметры продукта. Сегодня контроль качества продукции, выпускаемой лабораториями клеточных технологий, заключается, как правило, в контроле донора по основным наиболее часто встречающимся инфекциям, передающимся с кровью, в бактериальном контроле исходного материала, поступающего в лабораторию и фенотипировании конечного продукта. В некоторых лабораториях продукция также подвергается микроскопическому анализу перед передачей учреждению, проводящему соответствующие клинические исследования. При этом недавно открытые нанобактерии, которые оказывают существенное влияние на функционирование клетки, сегодня чаще всего не определяются даже при трансплантации аллогенных клеток (Жукоцкий А.В. и др., 2010).

Обсуждаются особенности этической экспертизы при планировании и проведении клинических исследований в регенеративной медицине (Маккиарини П. и др., 2011).

Изучаются биологические свойства, оценивается качество и безопасность клинического применения мезенхимальных стволовых клеток из различных тканей человека (Шахназян Н.К. и др., 2011, 2012).

Данная глава написана с участием профессора В.В. Жданова и доктора медицинских наук Г.Н. Зюзькова.

Глава 3

БОЛЕЗНИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

3.1. Регенеративная биология центральной нервной системы и регенеративная неврология

Разработка эффективных методов помощи при заболеваниях и травмах центральной нервной системы – одна из самых насущных и, вместе с тем, сложных задач современной медицины. Учитывая существенное ухудшение качества жизни и высокий процент инвалидизации пациентов неврологического профиля, длительность и высокую стоимость их лечения и реабилитации, а также рост числа дегенеративных заболеваний ЦНС, обусловленный увеличением средней продолжительности жизни и другими факторами, можно с уверенностью прогнозировать дальнейшее возрастание организационной и финансовой нагрузки как на государственную систему здравоохранения, так и на общество в целом. Решение перечисленных проблем требует комплексного подхода, составляющей частью которого является разработка новых технологий лечения и реабилитации неврологических больных.

Данная глава посвящена одному из перспективных направлений современной биомедицинской науки – регенеративной неврологии, теоретическим основанием которой служит регенеративная нейробиология. Последняя представляет собой часть регенеративной биологии (Carlson B.M., 2007), быстро развивающейся области знаний, занимающейся исследованием закономерностей и механизмов регенерации, в том числе гомеостатической (обеспечивающей поддержание нормальной структуры и функциональной активности органов и тканей), адаптивной (обеспечивающей адекватные изменения структуры органов и тканей при тренировке, обучении или других изменениях в условиях их функционирования) и репаративной (обеспечивающей восстановление поврежденных органов и тканей).

Регенеративная нейробиология, исследующая механизмы регенерации нервной системы, на рубеже XX и XXI столетий добилась больших успехов. Самым значительным результатом этого периода было открытие нейральных стволовых клеток (НСК), обеспечивающих гомеостатическую и адаптивную регенерацию

нейронов в центральной нервной системе (ЦНС). Достижения регенеративной нейробиологии позволили приступить к разработке принципиально новых технологий лечения заболеваний и повреждений головного и спинного мозга, а также сетчатки и зрительного нерва, основанных на стимуляции процессов репаративной регенерации нейронов, создании условий, перmissive для регенерации нервных и глиальных клеток и роста нервных волокон, и на блокировании факторов, тормозящих перечисленные процессы (Rivera F.J., Aigner L., 2012; Mothe A.J., Tator C.H., 2013; Nakamura M., Okano H., 2013; Neirinckx V. et al., 2013; Pellegrini L. et al., 2013; Ng T.K. et al., 2014; Poulos S.G. et al., 2014).

Регенерация нейронов в ЦНС. Как и любая другая ткань, нервная ткань не может существовать и полноценно функционировать без постоянного обновления ее компонентов. В течение длительного времени, однако, считалось, что нервные клетки ЦНС представляют в этом отношении исключение. Мозг человека и других млекопитающих состоит из миллиардов нейронов, обменивающихся сигналами посредством колоссального числа каналов связи, таких как синапсы и плотные контакты. Сложная цитоархитектоника мозга – главная причина того, что на протяжении десятилетий общепринятым было представление о стабильности нейронных ансамблей и составляющих их нервных клеток в течение жизни. Это представление сформулировал еще Ramon y Cajal (Ramon y Cajal S., 1914; Colucci-D'Amato L. et al., 2006), авторитет которого обеспечил широкое распространение такой точки зрения. Способность мозга к обучению и частичному восстановлению функций после повреждения позже стали объяснять пластичностью синаптических связей, возможностью разрушения старых и установления новых связей между нервными клетками (Семченко В.В. и др., 2014; Trojan S., Pokorny J., 1999; Colucci-D'Amato L. et al., 2006). Предпринимались попытки перейти от анализа компенсаторно-пластических изменений на уровне отдельной нервной клетки (согласно представлениям классической нейробиологии, в нервной системе нейрон является элементарной единицей морфологии, физиологии и патологии) к анализу указанных процессов на уровне популяции нервных клеток (Ярыгин В.Н., 1979). Дальнейшее развитие нейробиологии в значительной мере изменило эти представления.

Обновление пула нервных клеток в ЦНС млекопитающих было постулировано еще в 1912 году (Allen E., 1912), но в то время не получило серьезного экспериментального подтверждения. Первые данные в пользу постнатального образования новых нейронов в мозге мышей, крыс и кошек были получены в середине прошлого столетия, когда эксперименты по включению ^3H -тимидина показали, что в гиппокампе этих животных присутствуют меченые клетки, морфологически подобные нейронам (Messier B. Et al., 1958; Altman J., 1962; Altman J. et al., 1965). Эти данные долгое время воспринимались большинством специалистов скептически, тем более что полученные результаты допускали альтернативную интерпретацию, такую, например, как полиплоидизация синтезирующих ДНК клеток. Четкие доказательства того, что в ЦНС взрослых млекопитающих постоянно идет образование новых нервных клеток (нейрогенез или, согласно более распространенной в мировой литературе терминологии, нейрогенез (neurogenesis), их встраивание в существующие нейронные сети и образование с их участием нейронных ансамблей *de novo* появились лишь на протяжении последних двадцати лет (Colucci-D'Amato L. Et al., 2006; Gage F.H. et al., 2008).

Мощным толчком к ускорению исследований по нейрогенезу в ЦНС млекопитающих послужили опыты с представителями другого класса позвоночных — певчими птицами, показавшие, что с наступлением сезона спаривания в ядрах мозга, связанных с вокализацией и обучением пению, наблюдается увеличение количества нейронов, число которых затем вновь постепенно приходит к исходному уровню (Paton A., Nottebohm F.N., 1984). Принципиально вопрос о центральном нейрогенезе у млекопитающих и его важной роли в гомеостатической, адаптивной и репаративной регенерации был решен после обнаружения в двух так называемых герминативных зонах взрослого мозга, а именно в субвентрикулярной зоне (СВЗ) боковых желудочков и в субгранулярной зоне (СГЗ) зубчатой извилины гиппокампа, медленно размножающихся клеток-предшественниц (прогениторов) нейронов, которые фактически являются нейральными стволовыми клетками (НСК). Понятие НСК возникло на фоне успешных исследований в области гемопоэза, в которых было продемонстрировано, что все клетки крови образуются из небольшого числа одинаковых малодифференцированных

и медленно делящихся гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), популяция которых существует в особой тканевой нише в костном мозге и поддерживается за счет асимметричных митозов, в результате которых образуется одна ГСК, идентичная материнской, и вторая клетка, начинающая ускоренно пролиферировать, давая клон клеток, дифференцирующихся в один из типов клеток крови (Чертков И.Л. и др., 2005; Islam A., 1985; Gil-Perotín S. et al., 2013). Клетки-предшественницы нейронов, находящиеся в нишах СВЗ и СГЗ – это клетки, делящиеся сравнительно редко путем асимметричного митоза. Одна из дочерних клеток идентична материнской, а другая начинает мигрировать, в процессе миграции повторно делясь (обычным симметричным митозом), причем ее потомки прогрессивно дифференцируются. Следовательно, нейральные прогениторы герминативных зон мозга обладают главными свойствами стволовых клеток, а именно способностью к пролиферации, самообновлению и дифференцировке. Как будет показано ниже, нейральные прогениторы, вероятно, существуют и вне двух «классических» нейрогенных зон (Gil-Perotin S. et al., 2013).

Настоящий обзор включает данные об НСК и других клетках-предшественницах нейронов в ЦНС млекопитающих, в том числе человека. Приводятся имеющиеся сведения об их фенотипе и физиологии, а также данные, свидетельствующие о принципиальной важности нейрогенеза для поддержания нормальной работы различных областей мозга и ЦНС в целом. Рассматриваются примеры участия нейральных прогениторов в адаптивной и репаративной регенерации. Наконец, подчеркивается перспективность терапевтического использования активации эндогенного нейрогенеза при заболеваниях и травмах мозга.

Герминативные зоны ЦНС. В мозге человека и других млекопитающих существуют две компактные области расположения НСК (герминативные или нейрогенные зоны) – СВЗ и СГЗ. НСК в обеих структурах экспрессируют ряд астроглиальных маркеров, а в СВЗ имеют и морфологическое сходство с астроглией (Hodge R.D. et al., 2008; Boda E., Buffo A., 2010). Они являются переживающими во взрослом мозге остатками так называемой радиальной глии, которая, наряду с нейроэпителием, в эмбриогенезе служит источником образования всех нейронов, астроцитов и олигодендроцитов (Grade S. et al., 2013).

СВЗ и СГЗ представляют собой тканевые ниши, устроенные во многом сходным образом. Находящиеся в них НСК являются прямыми потомками фетальных астроцитобластов, и, также как последние, характеризуются наличием в цитоплазме специфических фибриллярных белков класса III – нестина, GFAP (glial fibrillary acidic protein, глиального фибриллярного кислого белка) и виментина (Doetsch F., 2003), а также экспрессией ядерных факторов транскрипции Sox1, Sox2 и Musashi-1 (Komitova M., Ericsson P.S., 2004; Shin S. et al., 2007). Микроокружение НСК в этих нишах включает внеклеточный матрикс и клеточные элементы, в том числе астроглию, эпендимальные клетки и эндотелий микрососудов и обеспечивает длительное, на протяжении всей или большей части жизни, существование пула стволовых клеток и определенный темп их пролиферации. В этом задействованы еще не полностью охарактеризованные регуляторные внутриклеточные каскады, в том числе Wnt-, Sonic Hedgehog- и Notch-зависимые, при участии фактора ингибирующего лейкемию (leukemia inhibiting factor), трансформирующего фактора альфа (transforming factor-alfa), фактора роста фибробластов 2 (FGF2) и нейротрофинов (Ma D.K. et al., 2009). В недавней работе, выполненной на НСК крысы, показано, что в регуляции самообновления и дифференцировки нейральных прогениторов большая роль принадлежит аутокринным эффектам факторов транскрипции из группы BMPs (bone morphogenic proteins), подавляющим пролиферацию НСК, и FGF2, поддерживающему неактивные НСК в мультипотентном состоянии (Sun Y. Et al., 2011).

Предшественники нейронов, возникающие после деления НСК в СВЗ, сначала имеют фенотип $Dlx2^+$ $Mash1^+$, а затем начинают экспрессировать PSA-NCAM (polysialylated neural cell adhesion molecule) и DCX (doublecortin, даблкортин) и мигрируют в обонятельные луковицы, где дифференцируются в гранулярные ГАМК-эргические, дофаминэргические и смешанные интернейроны, а также в перигломерулярные интернейроны (Curtis M.A. et al., 2009; Ma D.K. et al., 2009; Whitman M.C., Greer C.A., 2009; Thompson L. et al., 2012). Поток прогениторов, особенно выраженный у животных с развитым обонятельным мозгом, например у грызунов, носит название роstralного миграционного потока (РМП). У мыши состояние, которое преодолевают мигрирующие клетки, равно приблизительно 5 мм, у приматов – 2 см и более. Интересно, что НСК

в некотором количестве присутствуют и внутри РМП (Hack M.A. et al., 2005; Mendoza-Torreblanca J.G. et al., 2008).

Наличие РМП у человека до сих пор остается предметом дискуссии, главным образом в связи с понятным отсутствием экспериментальных данных и ограниченностью доступа к аутопсийному материалу (Gould E., 2007; Whitman M.C., Greer C.A., 2009). Хотя большинство исследователей считают, что он существует, другие полагают, что имеющиеся данные скорее свидетельствуют в пользу продолжения нейрогенной зоны в ростральном направлении. Но в отношении того, что в обонятельной луковице взрослого человека до глубокой старости происходит обновление нейронов, существует консенсус.

Локализованные в СВЗ НСК в процессе миграции и в обонятельной луковице дифференцируются в интернейроны, астроциты, олигодендроциты и, возможно, в NG2-положительные клетки, которые будут подробнее описаны ниже (Hack M.A. et al., 2005; Menn B. Et al., 2006; Grade S. et al., 2013). Нейрогенез проходит в несколько этапов (Curtis M.A. et al., 2009; Ma D.K. et al., 2009; Whitman M.C., Greer C.A., 2009). Образовавшаяся после асимметричного деления НСК нейропрогениторная клетка начинает быстро делиться с образованием нейробластов, экспрессирующих PSA-NCAM и DCX, выстраивающихся в цепочки и мигрирующих тангенциально в направлении обонятельной луковицы. Достигнув обонятельной луковицы, нейробласты покидают цепочки и мигрируют радиально к месту конечного назначения. Стволовые клетки, локализованные в различных частях СВЗ, и резидентные НСК РМП дифференцируются в строго определенные различные типы гранулярных интернейронов. Трансплантация НСК в пределах СВЗ показывает, что направление нейрогенной дифференцировки определяется местом происхождения клетки, т.е. популяция НСК в этом смысле неоднородна. Трансплантация НСК из СВЗ в другие структуры мозга как правило приводит к подавлению нейрогенной дифференцировки в пользу образования астроцитов и олигодендроцитов. Однако при пересадке в мозжечок на ранних стадиях постнатального развития НСК из СВЗ дифференцируются как в глиальные, так и в нервные клетки, что, возможно, связано с тем, что в мозжечке в это время идет активный нейрогенез и, следовательно, наличествуют благоприятные для нейрогенеза условия. То, что

судьба предшественников, образующихся в ЦНС при асимметричном делении стволовых клеток, в очень большой степени зависит от сигналов, получаемых ими от микроокружения, подтверждается и тем, что НСК, трансплантированные в СВЗ из второй герминативной зоны мозга, СТЗ, ведут себя как нейральные прогениторы первой, перемещаются в составе РМП и дифференцируются в интернейроны обонятельной луковицы (Suhonen J.O. et al., 1996).

Прямое измерение скорости миграции нейробластов в РМП проведено лишь в условиях *in vitro* на срезах мозга мыши (Nam S.C. et al., 2007) и в этих условиях составляет 70-80 мкм/час. Если бы миграция *in vivo* происходила примерно с такой же скоростью, то клетки достигали бы места конечной локализации в обонятельной луковице мыши за 2,5-3 дня. На самом деле в мозге мыши миграция и сопутствующая ей дифференцировка нейробластов происходит несколько медленнее. Можно выделить 5 стадий дифференцировки гранулярных клеток, четко различающихся морфологически (Petreanu L., Alvarez-Buylla A., 2002). Клетки стадии 1 (C1 клетки) существуют 2-7 дней после мечения НСК путем инъекции в СВЗ содержащей тэг ретровирусной конструкции, мигрируют тангенциально в составе РМП и имеют два отростка – длинный передний и короткий задний. C2 клетки, мигрирующие радиально, имеют сходное строение и выявляются на 5-7 день. Клетки C3 лишены короткого заднего отростка, не мигрируют и выявляются через 9-13 дней после мечения НСК. C4 клетки имеют дендриты, еще не образующие конечных разветвлений с шипиками (дни 11-22). Клетки C5 обладают вполне сформированным дендритным древом (дни 15-30).

Параллельно морфологическим изменениям происходит электрофизиологическое созревание новорожденных нейронов. В течение первых 15-45 дней после достижения стадии C5 приблизительно половина новых гранулярных нейронов погибают, а оставшиеся могут жить и оставаться активными до 1 года (Petreanu L., Alvarez-Buylla A., 2002). Процессы, регулирующие гибель и переживание гранулярных нейронов, изучены недостаточно, но установлено, что при высокой нагрузке на обонятельный анализатор доля выживших клеток повышается, а при снижении нагрузки (например, путем заклеивания ноздрей) – снижается.

У крупных животных миграция нейробластов из СВЗ в обонятельные луковицы занимает более продолжительное время. Например, у макака – более 70 дней (Kornack D.R., Rakic P., 2001).

Нейральные прогениторы, образовавшиеся в СГЗ, дифференцируются и интегрируются в локальные нейральные сети как возбуждающие глутаматэргические гранулярные нейроны зубчатой извилины гиппокампа (Ma D.K. et al., 2009; Deng W. Et al., 2010), причем на ранних стадиях дифференцировки они, как и прогениторные клетки в СВЗ, экспрессируют PSA-NCAM и DCX. Направление дифференцировки и миграции определяется прежде всего сигналами, получаемыми прогениторами от микроокружения.

В СГЗ стволовые клетки имеют очень необычную морфологию и состоят из перинуклеарной части, локализованной в субгранулярном слое, и длинного ветвящегося отростка, пронизывающего слой гранулярных интернейронов (Hodge R.D. et al., 2008). В результате асимметричного митоза из апикальной части НСК образуется дочерняя стволовая клетка, сохраняющая отросток и занимающая ту же нишу, что и материнская клетка. Из базальной части после митоза формируется округлый нейробласт, перемещающийся в гранулярный слой, используя в качестве направляющей отросток сестринской или соседней стволовой клетки. Процесс миграции занимает до 3 дней, а после его завершения начинается рост дендритов и аксона. К 10-му дню аксон достигает области САЗ гиппокампа. Дендритные шипики появляются начиная с 16-го дня, а их формирование продолжается несколько недель. В мозге взрослых лабораторных грызунов процесс дифференцировки и функциональной интеграции вновь образованных гранулярных клеток занимает 42-56 дней (Kempermann G. Et al., 2004).

СВЗ и СГЗ – это остатки эмбриональной герминативной закладки клеток-предшественниц нейронов, астроглии и олигодендроглии. Соответственно, нейрогенез в этих зонах во многом сходен с нейрогенезом в раннем индивидуальном развитии. В частности, на разных стадиях онтогенеза наблюдается сходство молекулярных фенотипов нейрональных прогениторов. Сложнее вопрос о том, как определяется направление миграции. В эмбриогенезе функция строительных лесов (в англоязычной литературе «скэффолдов»), определяющих направление и конечный пункт перемещения нейробласта, принадлежит радиальной глии, но определенное значение имеет и микрососудистая сеть. В СГЗ эту роль выполняют отростки резидентных НСК (Hodge R.D. et al., 2008; Grade S. et al., 2013). Тангенциальная миграция в РМП поддерживается самими мигрирующими клетками,

выстраивающимися в цепочки и перемещающимися, взаимодействуя через специфические поверхностные рецепторы с компонентами межклеточного матрикса и хемокинами, секретируемыми различными клетками, а в определении радиальной миграции в пределах обонятельной луковицы ведущая роль принадлежит микрососудистой сети (Whitman M.C., Greer C.A., 2009).

Нейрогенез в СВЗ и СГЗ происходит постоянно и обеспечивает гомеостатическую, адаптивную и репаративную регенерацию определенных структур мозга. Степень участия этих образований в гомеостатическом и адаптивном обновлении клеточного состава других отделов ЦНС оценить трудно в связи с отсутствием достаточных данных. Не вызывает, однако, сомнения, что по крайней мере НСК локализованные в СВЗ участвуют в репаративной регенерации ткани всего мозга. Вероятно, важнейшая стадия нейрогенеза во взрослой ЦНС – стадия экспрессии даблкортина, продолжающаяся до момента, когда новообразованные нейроны начинают экспрессировать калретинин, а аксон и дендриты формируют синоптические контакты (Brandt M.D. et al., 2003).

Интенсивность обновления популяции интернейронов обонятельной луковицы и гиппокампа за счет размножения, миграции и дифференцировки НСК герминативных зон высока. Так, в обонятельную луковицу лабораторных грызунов каждый день приходят от 30000 до 80000 клеток, что составляет около 1% популяции гранулярных нейронов (Kaplan M.S. et al., 1985; Peterson D.A., 2002). Следовательно, за месяц, даже с учетом гибели половины вновь прибывших клеток, обновляется треть интернейронов. В течение месяца в зубчатой извилине гиппокампа молодой крысы возникает около 250 тысяч новых гранулярных нейронов, что составляет около 6% их популяции (Cameron H.A., McKay R.D., 2001). Как будет показано ниже, интенсивность нейрогенеза в герминативных зонах зависит от возраста и функциональной активности и изменяется в условиях патологии.

Как СВЗ, так и СГЗ содержат некоторое количество NG2-положительных клеток, не экспрессирующих маркер астроглии GFAP, которые участвуют в регенерации олигодендроглии и, по крайней мере, в раннем постнатальном отогенезе, служат предшественниками нейронов. Не вполне ясно, образуются ли они из астроцитоподобных НСК в течение всей жизни или это переживающие фетальные клетки.

В ЦНС всех исследованных млекопитающих, кроме летучих мышей, нейрогенез в герминативных зонах происходит сходным образом (Knoth R. et al., 2010). Немногочисленные исследования на аутопсийном материале показали, что это касается и человека, если, конечно, маркеры стадий этого процесса у людей и животных одинаковы (Knoth R. et al., 2010).

Гомеостатический нейрогенез вне субвентрикулярной и субгранулярной зон.

Известно, что в мозге рыб и животных некоторых других классов подтипа позвоночных активный нейрогенез происходит в пределах обширных участков паренхимы мозга, занимающих почти весь его объем (Kempermann G. et al., 2010; Gil-Perot in S. et al., 2013). Многие нейробиологи придерживаются мнения, что и в ЦНС взрослых млекопитающих новые нейроны образуются не только в СВЗ и СГЗ. Присутствие включающих метку в ДНК и делящихся прогениторов, фенотипически сходных с дифференцирующимися в нейральном направлении клетками герминативных зон, продемонстрировано в коре мозга (Magavi S.S. et al., 2000), амигдале (Park J.H. et al., 2006), стриатуме (Benraiss A. et al., 2001; Chmielnicki E. et al., 2004; Collin T. et al., 2005), черной субстанции (Zhao M. et al., 2003). Интенсивность нейрогенеза в этих структурах значительно ниже, чем в СВЗ-обонятельной луковице и гиппокампе. Тем не менее, например, в черной субстанции мыши количество вновь образующихся нейронов достаточно для полного обновления их популяции в течение жизни животного (Zhao M. et al., 2003). Убедительным подтверждением нейрогенеза в ЦНС взрослых млекопитающих вне СВЗ и СГЗ служит возможность изоляции мультипотентных НСК из различных структур головного мозга и из спинного мозга (Weiss S. et al., 1996).

На роль НСК, локализованных вне СВЗ и СГЗ, претендуют, в частности, эпендимальные клетки и танициты (безворсинчатые эпендимальные клетки) головного и спинного мозга (Bruni J.E., 1998; Johansson C.B. et al., 1999; Mothe A.J., Tator C.H., 2005; Xu Y. et al., 2005; Bennett L. et al., 2009). В частности, соответствующие клетки так называемых циркумвентрикулярных органов, примыкающих к третьему и четвертому желудочкам – субфорникального органа, *organum vasculosum* терминальной пластинки, медиальной эминенции, эпифиза, субкоммиссурального органа, *area postrema* и

хороидного сплетения пролиферируют (судя по включению ими бромдезоксидуридина и активации маркера пролиферации Ki67), способны *in vitro* и *in vivo* дифференцироваться по нейрональному и астроглиальному направлениям и экспрессируют нестин, виментин, GFAP, Sox1 и Sox2, т.е. маркеры, характерные для фетальных астроцитов, а также для НСК локализованных в СВЗ и СГЗ и для клеток-непосредственных производных НСК (Bennett L. Et al., 2009). Прогениторные клетки циркумвентрикулярных органов способны превращаться не только в нейроны и глиальные элементы, но и в некоторые специализированные типы клеток, например, нейроэндокринные.

Происхождение упомянутых выше разбросанных по паренхиме мозга нейральных прогениторов до конца не ясно, но с большой степенью вероятности они являются продуктом начальной дифференцировки стволовых клеток, фенотипически сходных с астроглией. Исследования последних лет показали, что количественно преобладающие в ЦНС млекопитающих клетки, традиционно относимые к астроглии, не только обеспечивают трофику нейронов и создание механического каркаса нервной ткани, но выполняют и другие важнейшие функции, например, наряду с нейронами участвуют в обработке информации. В раннем постнатальном онтогенезе некоторая их часть образует субпопуляцию диффузно распределенных в паренхиме головного и спинного мозга глиальных и нейральных прогениторов (Kriegstein A., Alvarez-Buylla A., 2009; Boda E., Buffo A., 2010). В ЦНС взрослых млекопитающих большая часть астроцитов – это терминально дифференцированные клетки, лишенные главной черты прогениторов – пролиферативной активности и, следовательно, не способные участвовать в обновлении клеточного состава мозга. Кандидатами на роль нейроглиальных предшественников у взрослых животных служат клетки глиальной природы, экспрессирующие трансмембранный хондроитинсульфат протеогликан NG2 и получившие различные названия, в том числе NG2+ клетки (Horner P.J. et al., 2000; Dawson M.R.L. et al., 2003), полидендроциты, чтобы подчеркнуть их морфологические особенности (Nishiyama A. et al., 2002), или синантоциты (Butt A.M. et al., 2002). Впервые эти клетки были изолированы около четверти века назад из оптического нерва как предшественники олигодендроцитов (Stallcup W.B., Beasley L., 1987), а затем идентифицированы в

спинном (Horner P.J. et al., 2000) и головном (Dawson M.R.L. et al., 2003) мозге. NG2-положительные клетки, с одной стороны, активно делятся, а с другой – демонстрируют признаки дифференцированности, экспрессируя рецепторы нейротрансмиттеров и тесно взаимодействуя с нейронами через синаптические контакты с аксонами (Nishiyama A. et al., 2009).

В раннем постнатальном периоде пролиферативный потенциал и мультипотентность, выражающаяся в способности к дифференцировке в зрелые астроциты, олигодендроциты и нейроны сохраняется и обычная NG2-отрицательная астроглия, что продемонстрировано как *in vitro*, так и *in vivo*. Так, усиленная экспрессия нейрогенных факторов транскрипции, индуцированная трансгенами, введенными в составе вирусных векторных конструкций, приводит к репрограммированию юных паренхимных астроцитов в генерирующие электрические импульсы нейроны (Heins N. et al., 2002; Berninger B. et al., 2007).

В тесте формирования нейросфер (neurosphere assay) показано, что взятые из паренхимы вне герминативных зон астроциты обладают двумя важнейшими свойствами НСК – способностью к самообновлению и мультипотентностью. Действительно, после их высаживания в суспензионную культуру в низкой плотности образуются скопления одинаковых клеток (клональные агрегаты), в которых после удаления из среды митогена наблюдается дифференцировка в астроциты, олигодендроциты и нейроны (Laywell E.D. et al., 2000; Grade S. et al., 2013). Нейрогенный потенциал, однако, обнаружен только при использовании в экспериментах мышей не старше 2-недельного возраста (Laywell E.D. et al., 2000; Buffo A. Et al., 2008). Эти данные полностью соответствуют результатам, полученным на трансгенных (knock-in hGFAPCreER¹²) мышах, в геном которых был введен промотор человеческого гена, кодирующего маркер астроглии GFAP, соединенный с тэгом (меткой), который позволяет выявлять потомство клеток, экспрессирующих на каком-то этапе GFAP, путем их перманентного мечения (Cao L. et al., 2004; Buffo A. Et al., 2008). При активации тэга на 5-12 день постнатального развития в коре мозга выявлялись меченые астроциты, олигодендроциты и небольшое количество нейронов. В более позднем возрасте выявлялись лишь меченые астроциты, количество которых не изменялось со временем.

В отличие от астроглии, не экспрессирующей NG2, клетки положительные по этому маркеру вне СВЗ и СГЗ обладают высоким пролиферативным потенциалом и, возможно, остаются мультипотентными и во взрослом организме. В культуре выделенные из зрительного нерва NG2+ клетки под действием BMPs (bone morphogenic proteins), транскрипционных факторов, играющих значительную роль в дифференцировке клеток по самым разным направлениям в онтогенезе и во взрослом организме, и ростового фактора PDGF-alfa (platelet derived growth factor alfa, фактор роста из кровяных пластинок альфа) начинают экспрессировать астроцитарный маркер GFAP (Kondo T., Raff M., 2000). В зависимости от условий культивирования клетки с фенотипом NG2+GFAP+ дифференцируются в зрелую олигодендроглию, астроглию или нейроны.

Сходные данные были получены и для NG2+ клеток, изолированных из серого вещества переднего мозга (Belachew S. et al., 2003) и белого вещества подкорковых структур (Nunes M.C. et al., 2003). Другие авторы, однако, не могли продемонстрировать мультипотентность изолированных из ЦНС взрослых млекопитающих NG2-положительных клеток в тесте формирования нейросфер и получали дифференцировку исключительно в направлении олигодендроглии (Buffo A. Et al., 2003). Одно из объяснений этого противоречия состоит в том, что нейрогенным потенциалом обладает лишь небольшая часть полидендроцитов, а именно клетки ко-экспрессирующие маркер нейробластов даблкортин (Walker T.L. et al., 2007). Данные по дифференцировке NG2+ клеток *in vivo* обобщены в обзоре Nishiyama и соавт. (Nishiyama A. et al., 2009). Результаты изучения ко-экспрессии NG2 и астроглиальных маркеров в интактном мозге дали отрицательные результаты, но в условиях деpleции астроцитов трансплантация NG2+ клеток в пораженную ткань усиливает астроглиогенез. Данные по коэкспрессии нейрональных маркеров свидетельствуют в пользу того, что полидендроциты являются предшественниками нейронов, но опыты, в которых потомство этих клеток отслеживалось по экспрессии NG2+-ассоциированного репортерного гена, дали противоречивые результаты.

Таким образом, в интактном мозге как NG2-, так и NG2+ глия является источником нейральных прогениторов в раннем постнатальном онтогенезе. Астроглия не участвует в гомеостатическом нейрогенезе в ЦНС взрослых млекопитающих, а данные в отношении участия NG2+ клеток в гомеостатическом нейрогенезе противоречивы.

Как было сказано выше, в постнатальном нейрогенезе по всей видимости участвуют также диффузно распределенные в ряде зон мозга DCX/PSA-NCAM-положительные клетки, ко-экспрессирующие другие характерные для незрелых нейронов маркеры (Cai Y. et al., 2009; Luzzati F. et al., 2009; Zhang X.-M. et al., 2009; Xiong K. et al., 2008). Эти клетки находятся на ранних стадиях нейральной дифференцировки и с наибольшей частотой встречаются в коре мозга некоторых относительно крупных взрослых млекопитающих, таких как морские свинки, кролики, кошки и приматы, включая человека, причем в ассоциативных зонах коры их концентрация выше, чем в прочих ее участках. В экспериментах на морских свинках и кошках показано, что эти клетки дифференцируются в интернейроны, в основном ГАМК-эргические, предположительно обеспечивая более интенсивное взаимодействие различных морфо-функциональных структур мозга (Xiong K. et al., 2008; Cai Y. et al., 2009). Данные об изменении количества DCX/PSA-NCAM-положительных нейральных прогениторов с возрастом противоречивы, что может быть частично связано с тем, что разные группы исследователей пользовались несколько различными методами подсчета. Аккуратно выполненное исследование этого параметра у макак резусов показало, что в амигдале количество DCX+/PSA-NCAM+ клеток мало изменялось на протяжении жизни и даже при наличии амилоидных отложений, в то время как в гиппокампе оно резко снижалось уже у макак среднего возраста (Zhang X.-M. et al., 2009).

Почти все DCX/PC-NCAM-положительные клетки, формируются в раннем онтогенезе и находятся в полудифференцированном состоянии в течение длительного времени, некоторые в течение всей жизни (Gomez-Climent M.A. et al., 2010). Их роль пока изучена слабо, но наиболее вероятным является предположение о том, что их основная функция – быстрое обновление пула интернейронов, что позволяет постоянно изменять ассоциативные связи внутри ЦНС, когда в этом появляется необходимость. По этой причине для них было предложено название «ожидающие нейроны» (standby neurons).

Адаптивный и репаративный нейрогенез в ЦНС взрослых млекопитающих.

Адаптивный нейрогенез в мозге млекопитающих выражен не слабее, чем у птиц, и в целом обеспечивает продукцию новых

нейронов, адекватную изменению функциональной нагрузки. В то же время репаративный нейрогенез в патологических условиях обычно не достаточен для морфо-функциональной регенерации и нуждается в стимуляции.

Адаптивный нейрогенез в герминативных зонах хорошо документирован. Как уже говорилось, отсутствие обонятельной нагрузки снижает, а ее усиление повышает нейрогенез в СВЗ. Правда, функциональный смысл этого не до конца понятен, так как манипулирование скоростью образования и дифференцировки нейробластов в обонятельной системе в ряде случаев сопровождается, а в других — не сопровождается изменением способности дискриминировать и запоминать запахи (Imayoshi I. et al., 2008; Whitman M.C., Greer C.A., 2009). То, что нейрогенез в СВЗ и СГЗ самок усиливается во время ухода за потомством (Mak G.K. et al., 2007) и беременности (Shingo T. et al., 2003), свидетельствует о его роли в формировании полового и материнского поведения.

Умеренное повышение физической активности в сочетании с большим количеством социальных контактов приводит к усилению нейрогенеза в гиппокампе и к повышению эффективности синапсов, улучшению памяти и обучаемости (Семченко В.В. и др., 2014; Van Praag H. et al., 2000; Cao L. et al., 2004; Tashiro A. et al., 2007). Более того, содержание крыс в таких условиях после травматического повреждения мозга, вызванного взрывом, ускорило нормализацию некоторых неврологических показателей частично за счет усиления нейрогенеза в СГЗ и амигдале. Эти данные послужили основанием для гипотезы Гердта Кемперманна (Kempermann G. et al., 2010), предположившего, что, физическая активность, наряду с интеллектуальной, является естественным пусковым механизмом адаптивного нейрогенеза. Эволюционно интеллектуальная активность неразрывно связана с физической, а человек, активно воспринимающий информацию сидя в библиотеке или у телевизора — сравнительно недавнее явление. Возможно, физическая нагрузка сигнализирует в мозг, что высоки шансы столкнуться с серьезными интеллектуальными проблемами и для их решения необходимо заранее создать пул новых интернейронов.

На нейрогенез в гиппокампе влияет стресс и сопровождающие его изменения уровней гормонов надпочечников (Mirescu C., Gould

Е., 2006), а также состояние иммунной системы, возможно, опосредованно через изменение уровня глюкокортикоидов (Wolf S.A. et al., 2009).

С практической точки зрения особый интерес представляет репаративный нейрогенез. Как уже говорилось, НСК СВЗ, участвуют в эктопическом (то есть при локализации повреждения вне обонятельных луковиц) репаративном нейрогенезе. Такой нейрогенез довольно хорошо изучен на различных моделях ишемии мозга. В настоящее время не вызывает сомнения, что фокальная ишемия ткани мозга стимулирует пролиферацию стволовых клеток СВЗ и их миграцию к границе вызванного ишемией инфаркта у экспериментальных животных (Zhang R.L. et al., 2008) и человека (Jin K. et al., 2006; Macas J. et al., 2006). Следует отметить, что такая реакция наблюдается у животных (Jin K. et al., 2004; Maslov A.Y. et al., 2004; Luo J. et al., 2006) и людей (Macas J. et al., 2006) вплоть до глубокой старости, когда гомеостатический нейрогенез в СВЗ существенно замедляется.

В эксперименте чаще других используется хорошо отработанная модель временной окклюзии средней мозговой артерии крыс, при которой область инфаркта захватывает, в частности, часть коры и стриатума. На этой модели показано, что ишемический инсульт в бассейне средней мозговой артерии усиливает клеточную пролиферацию в ипсилатеральной СВЗ за счет увеличения процента пролиферирующих клеток и укорочения митотического цикла. Тщательный подсчет пролиферирующих клеток, выполненный на большом количестве животных, показал, что, если в норме в СВЗ взрослой крысы в митозе находятся 15-21% НСК, то через 2 дня после окклюзии их выявляется 24%, через 7 дней – 31%, а через 2 недели – вновь 24% (Zhang R.L. et al., 2006). Митотический цикл через 48 часов после операции укорачивается до 11 часов, а затем постепенно в течение 2 недель возвращается к 19-часовой норме (Zhang R.L. et al., 2007). Нейральные прогениторы, выстроившись в цепочки, движутся в направлении инфаркта, в процессе перемещения и по прибытии в окружающую очаг ткань постепенно дифференцируясь в интернейроны, характерные для коры или стриатума. Миграция происходит по микрососудистой сети и по градиенту хемокинов, выделяемых в очаге ишемии (Thored P. et al., 2007; Gage F.H. et al., 2008; Massough M. et al.,

2010). Ишемический инсульт и травма оказывают длительное воздействие на нейрогенез и миграцию. В поврежденный стриатум нейробласты продолжают мигрировать по крайней мере в течение года (Thored P. et al., 2007). В процессе миграции часть клеток вступает в апоптоз и гибнет.

В СВЗ ишемический инсульт активирует не только НСК, но и эпендиму, которая в норме во взрослом мозге не пролиферирует. Эпендимальные клетки усиленно делятся, экспрессируют маркеры радиальной глии, т.е. дедифференцируются до эмбрионального состояния, мигрируют в направлении очага ишемии и дифференцируются в нейроны и астроциты (Zhang R.L. et al., 2008).

Ишемический инсульт может активировать нейрогенез и в СГЗ (Zhang R.L. et al., 2008; Kernie S.G. et al., 2010), но это зависит от того, какие именно структуры ишемизированы. Например, в одном из исследований показано, что временная окклюзия средней мозговой артерии у крыс двух различных линий не приводила к усилению нейрогенеза в зубчатой извилине гиппокампа, в то время как окклюзия передней хориоидальной артерии, участвующей в кровоснабжении гиппокампа, имела следствием усиление нейрогенеза в СГЗ (Kelsen J. et al., 2010). Нейрогенез в обеих герминативных зонах усиливается и при травме мозга (Kernie S.G. et al., 2010). Ишемический очаг или травма ЦНС у лабораторных животных и человека уже через 3-4 дня усиливают ангиогенез, т.е. рост и ветвление существующих в ткани сосудов, а также васкулогенез – образование новых сосудов с участием циркулирующих эндотелиобластов, число которых в периферической крови возрастает при повреждении ткани мозга (Ярыгин К.Н., 2008; Rouhl R.P.W. et al., 2008; Yip H.-K. et al., 2008; Xiong Y. et al., 2010). Однако, усиление нейрогенеза, ангиогенеза и васкулогенеза во многих случаях оказывается недостаточными для полноценного функционального восстановления, что может быть связано с низкой эффективностью интеграции вновь образовавшихся нейронов в нейронные сети (Kernie S.G. et al., 2010; Massough M. et al., 2010) и с недостаточной реваскуляризацией (Rouhl R.P.W. et al., 2008; Yip H.-K. et al., 2008). Впрочем, данные по дальнейшей стимуляции нейрогенеза путем внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток крысам после временной окклюзии средней мозговой артерии позволяют предположить, что ишемия сама по себе оказывается недостаточно

сильным стимулом для адекватного усиления образования нейронов *de novo*.

Репаративный нейрогенез может быть усилен путем введения лекарственных препаратов, цитокинов или факторов роста, с помощью реабилитационных мероприятий или трансплантации клеток. Многие усиливающие нейрогенез воздействия, в том числе введение нейротрофного фактора BDNF (brain-derived neurotrophic factor), эритропоэтина, прием статинов и виагры, а также клеточная трансплантация, активируют одни и те же внутриклеточные регуляторные каскады, в том числе фосфатидилинозитол-3-киназа-зависимый сигнальный каскад (PI3K-Akt), что сопровождается повышением выживаемости НСК и ускорением их пролиферации, дифференцировки и миграции (Zhang Z.G., Chopp M., 2009).

Многочисленные экспериментальные данные и первые результаты клинических исследований свидетельствуют о перспективности клеточной трансплантации при лечении инсульта, травмы ЦНС и нейродегенеративных заболеваний (Кониева А.А. и др., 2010; Сковрцова В.И. и др., 2008; Соколова И.В. и др., 2006; Цыб А.Ф. и др., 2006; Ярыгин К.Н. и др., 2009; Azari M.F. et al., 2010; Kranz A. et al., 2010; Lin Y.C. et al., 2011; Mattis V.B., Svendsen C.N., 2011; Shimada I.S., Spees J.L., 2011; Trounson A. et al., 2011; Yarygin V.N. et al., 2006; Yarygin V.N. et al., 2007; Barker R.A., de Beaufort I., 2013; Rosado-de-Castro P.H. et al., 2013; Zhang Z.G., Chopp M., 2015). Выше перечислены далеко не все публикации на эту тему (их несколько сотен), а лишь важнейшие работы, опубликованные на русском языке, а также некоторые обзорные и последние англоязычные статьи. Для трансплантации использовали самые разные аутологичные, аллогенные и ксеногенные клетки, в том числе мезенхимальные стволовые клетки (МСК) различного происхождения, НСК, гемопоэтические (CD34+) клетки, общую фракцию ядросодержащих клеток периферической крови и др. Клетки вводили в ткань мозга, эндolumбально, внутриартериально, внутривенно или подкожно. В большинстве случаев наблюдали благоприятные изменения нейрофизиологических показателей и признаки восстановления нормальной структуры ткани ЦНС.

В настоящее время клеточные и молекулярные механизмы этих эффектов активно изучаются. Стало, в частности, очевидным, что в их основе лежит не замещение поврежденных нейронов или

других клеток, но прежде всего активация регенеративных процессов в тканях реципиента. Такой механизм действия является ведущим не только при алло- (между особями одного вида) или ксено- (от особи одного вида к особи другого вида), но даже при аутологичной трансплантации или трансплантации сингенных клеток (между генетически идентичными особями). Он обусловлен в значительной мере способностью некоторых клеток, в частности МСК и НСК, инвазировать после трансплантации ткани реципиента, перемещаться в очаги ишемии, воспаления или механического повреждения в ЦНС, подвергаться там хоумингу и индуцировать или усиливать процессы регенерации за счет секреции факторов роста и цитокинов (Lau T.T. et al., 2011).

В организме реципиента трансплантированные клетки ведут себя во многом так же, как фенотипически сходные клетки реципиента, а их эффекты основаны во многом на усилении или ускорении процессов, происходящих и без трансплантации клеток. Так, МСК плаценты человека, трансплантированные внутривенно крысам через 24 часа после временной (на 30 минут) окклюзии одной из средних мозговых артерий, подобно собственным МСК из костного мозга (Ярыгин К.Н., 2008) проникают в ткань ЦНС и постепенно накапливаются вокруг зоны ишемического инсульта (Ярыгин К.Н. и др., 2009). Кроме того, трансплантированные МСК накапливаются и в нейрогенных зонах (Ярыгин К.Н. и др., 2009).

Ишемия сама по себе несколько активирует нейрогенез в СВЗ и СГЗ. После трансплантации пролиферация НСК и эпендимы и миграция прогениторов по направлению к инфаркту усиливаются в несколько раз, причем НСК мигрируют, выстроившись в цепочки по ходу мелких сосудов, т.е. воспроизводится гистогенетический процесс, наблюдающийся в норме в РМП. Насколько известно, для эндогенных циркулирующих МСК миграция в нейрогенные зоны пока никем продемонстрирована не была, но можно предположить, что она существует, так как введение аутологичных МСК вызывает качественно такие же эффекты как трансплантация алло- и ксеногенных клеток (Ярыгин К.Н. и др., 2009).

Вероятнее всего, трансплантированные МСК, достигнув области инфаркта и нейрогенных зон, оказывают стимулирующие паракринные эффекты. В области поражения стимулируется ангиогенез и васкулогенез путем активации предшественников эндотелия, а также

глиогенез и нейрогенез за счет активации резидентных даблкортин-положительных нейральных прогениторов («ожидających нейронов») и NG2+ клеток. В нейрогенных зонах стимулируется пролиферация и миграция НСК. Благоприятное воздействие клеточной трансплантации на неврологические показатели определяется их хоумингом как в зоне поражения, так и в нейрогенных зонах. При этом более быстрые эффекты, вероятно, связаны с активацией реваскуляризации пораженной ткани и глиогенезом, а более медленные – с нейрогенезом, который занимает более продолжительное время. Как следует из результатов большого количества экспериментальных исследований и первого клинического опыта, вероятность благоприятного исхода при ишемическом инсульте и травме мозга значительно повышается, если стимуляция процессов репаративной регенерации нейронов дополняется другими мероприятиями, направленными на создание условий, перmissive для регенерации нервных и глиальных клеток и роста нервных волокон, и на блокирование факторов, тормозящих перечисленные процессы.

В экспериментах с крысами, подвергнутыми временной окклюзии средней мозговой артерии, было показано, что при внутримозговой трансплантации количество проникающих в мозг клеток положительно коррелирует с объемом повреждения ткани мозга (Холоденко И.В. и др., 2012; Yarygin K.N. et al., 2012). В отсутствие повреждения клетки через гематоэнцефалический барьер почти не проникают и не обнаруживаются в нейрогенных зонах. Это подтверждает гипотезу об участии циркулирующих мезенхимальных клеток из собственного костного мозга в репарации ЦНС и имеет большое значение для планирования клинических исследований по клеточной терапии заболеваний и поражений мозга.

Анализ накопленных к настоящему времени экспериментальных данных показывает, что по крайней мере некоторые интернейроны в мозге взрослых млекопитающих, в том числе человека, постоянно обновляются и это имеет большое значение для поддержания неврологического и психического здоровья. Активизация этого процесса в условиях изменения функциональной нагрузки и патологии способствует адаптации организма к изменяющимся условиям и позволяет частично компенсировать последствия патологии. Некоторые биологически активные вещества, лекарства и, в особенности, трансплантация клеток усиливают и ускоряют репа-

ративный нейрогенез, что может быть использовано для создания принципиально новых подходов к лечению неврологических больных. Результаты экспериментов с использованием моделей некоторых патологических процессов, в частности, ишемического инсульта, показывают большой терапевтический потенциал клеточной трансплантации и ставят на повестку дня пилотные клинические исследования.

Стимуляция нейрогенеза в клинике болезней и поражений центральной нервной системы.

Выяснено, что некоторые давно использующиеся в практическом здравоохранении лекарственные средства, такие как статины, виагра и отечественный антигистаминный препарат димебон, способны стимулировать нейрогенез что, соответственно, расширяет показания к их назначению. Исследования в этой области только начались.

В то же время активно изучаются возможности применения клеточных технологий для усиления нейрорегенерации в клинике ишемических, нейродегенеративных и травматических повреждений головного и спинного мозга (Barker R.A., de Beaufort I., 2013; Carr A.J. et al., 2013; Dutta S. et al., 2013; English D. et al., 2013; Goldschlager T. et al., 2013; Hermann A., Storch A., 2013; Hitoshi S. et al., 2013; Hsu Y.-C. et al., 2013; Jaber M. et al., 2013; Kanno H., 2013; Kim S.U. et al., 2013; Lemmens R., Steinberg G.K., 2013; Li J., Lepski G., 2013; Martínez-Morales P.L. et al., 2013; Neirinckx V. et al., 2013; Yuan S.H., Shaner M., 2013; de Munter J.P. et al., 2014; Thomsen G.M. et al., 2014).

Показано, что в зоне имплантации аллогенных и ксеногенных стволовых (прогениторных) клеток нервной ткани у крыс с ишемическим корковым инсультом активизируется экспрессия мозгового нейротрофического фактора (Чехонин В.П. и др., 2010).

3.2. Методы клеточной терапии в лечении болезней нервной системы

3.2.1. Индукция нейральной дифференцировки стромальных клеток жировой ткани

Строма жировой ткани содержит малодифференцированные клетки-предшественницы, которые по своему фенотипу и экспрес-

сионному профилю сходны с мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга (Gronthos S. et al., 2001). Стромальные клетки-предшественницы из жировой ткани (СКЖТ) под действием различных индукторов способны дифференцироваться *in vitro* в различные типы клеток: остеобласты, хондробласты, адипоциты (Ashjian P.H. et al., 2003), гепатоциты, эндотелиальные клетки (Seo M.J. et al., 2005), миобласты (Mizuno H. et al., 2002), кардиомиоциты (Planat-Benard V. et al., 2004), эпителиальные клетки (Brzoska M. et al., 2005), а также нейральные предшественники (Fujimura J. et al., 2005).

Нейральную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток можно индуцировать с помощью ретиноевой кислоты (Kim B.J. et al., 2002) и нейротрофических факторов (Rivera F.J. et al., 2008). Способность СКЖТ воспринимать сигналы нейротрофических факторов остается невыясненной. Авторами проведен сравнительный анализ эффективности нейральной дифференцировки под действием различных индукторов, как по ранее опубликованным (Ashjian P.H. et al., 2003), так и по разработанным авторами протоколам, основанным на использовании ретиноевой кислоты и BDNF в сочетании с 5-азациитидином – химическим соединением, вызывающим деметилирование ДНК. BDNF способен активировать пролиферацию нейральных стволовых клеток и их дифференцировку (Reichardt L.F., 2006). Ретиноевая кислота активирует транскрипцию генов, участвующих в регуляции нейральной дифференцировки, посредством взаимодействия с ядерными рецепторами.

СКЖТ были выделены по протоколу P.A. Zuk et al. (Zuk P.A. et al., 2001). Подкожная жировая клетчатка человека была получена при полостных операциях у неонкологических больных, средний возраст которых составлял 40-60 лет. СКЖТ мыши были выделены из подкожного жира паховой области самцов линии Black/6.

СКЖТ были охарактеризованы по наличию антигенов CD34, c-kit, CD73, CD105. В результате исходная популяция стромально-васкулярных клеток жировой ткани оказалась гетерогенной. На основании анализа экспрессии маркерных антигенов на поверхности этих клеток можно утверждать, что в этой популяции содержатся стволовые клетки, сходные по антигенному профилю с мезенхимальными и гемопоэтическими клетками-предшественниками (Miranville A. et al., 2004; Planat-Benard V. et al., 2004; Zuk P.A. et al., 2001).

Через 8-9 суток культивирования определяли соотношение мезенхимальных и гемопоэтических клеток-предшественниц в этой популяции. Оказалось, что популяция клеток 2-го пассажа содержит около 98% клеток, имеющих фенотип мезенхимальных клеток-предшественниц, содержащих антигены CD73 и CD105. Несмотря на то, что в первичной культуре СКЖТ большинство клеток, несущих антиген CD73, экспрессировали также маркерный антиген гемопоэтических стволовых клеток CD34, на клетках 2-го пассажа экспрессия этого антигена практически была нулевая. Что касается маркера гемопоэтических стволовых клеток c-kit, то в популяции СКЖТ 2-го пассажа обнаружено около 1% клеток, несущих этот антиген. Доля клеток, содержащих c-kit, не изменилась по сравнению с популяцией свежевыделенных СКЖТ.

Нейральная дифференцировка клеток сопровождалась повышением экспрессии специфичных генов. В частности, клетки, дифференцирующиеся в нейральном направлении, содержали белок цитоскелета нестин (маркер ранних нейральных предшественников), нейрональную форму b3-тубулина, глиальный кислый фибриллярный белок GFAP (маркер астроцитарной глии), белок, взаимодействующий с микротрубочками MAP2, специфичную для нейронов енолазу Eno2 и другие маркеры нейральной дифференцировки.

Авторами было проанализировано содержание продуктов, перечисленных выше, маркерных генов нейральной дифференцировки в СКЖТ, инкубированных в присутствии различных индукторов, включая IBMX, b-меркаптоэтанол, 5-азациитидин (Ashjian P.H. et al., 2003; Fujimura J. et al., 2005; Ning H. et al., 2006), а также нейротрофических факторов роста BDNF и GDNF. Анализ содержания мРНК других маркерных генов показал, что уровень экспрессии Eno2, MAP2, TOBB и Nestin был выше в клетках, инкубированных в присутствии ретиноевой кислоты или BDNF на фоне 5-азациитидина.

На основании полученных результатов для индукции нейральной дифференцировки СКЖТ были выбраны ретиноевая кислота или BDNF в сочетании с 5-азациитидином. При индукции дифференцировки СКЖТ, полученных от 8 доноров, было установлено, что при культивировании клеток в присутствии ретиноевой кислоты в сочетании с 5-азациитидином в этих клетках возрастал уровень мРНК, нестина и тубулина. Индукция нейральной дифференцировки клеток с помощью

BDNF в сочетании с 5-азациитидином вызывает увеличение экспрессии всех 4 проанализированных генов.

Активация экспрессии генов *Eno2*, *MAP2*, *TUBB* и *Nestin* в СКЖТ, культивированных в присутствии BDNF или ретиноевой кислоты, может свидетельствовать об индукции нейральной дифференцировки этих клеток. Ретиноевая кислота в комплексе с белком CRABP входит в ядра клеток и взаимодействует с транскрипционным комплексом, который включает пару рецепторов ретиноевой кислоты RAR (retinoic acid receptor) и RXR (retinoic X receptor). По последним данным, ретиноевая кислота влияет на экспрессию около 530 генов, из них более 27 являются ее непосредственными мишенями. В частности, это гены транскрипционных факторов, таких как *Hoxa1*, *HOXA4*, *Hoxb1*, *Hoxb4*, *Hoxd4*, *Cdx1*, и *Pit1*, которые принимают участие в регуляции эмбрионального развития (Balmer J.E. et al., 2002). BDNF – это нейротрофический фактор, контролирующий жизнеспособность, развитие и функционирование нервных клеток в центральной и периферической нервной системе (Reichardt L.F., 2006; Dieltsova O.I. et al., 2013; Euler de Souza Lucena E. et al., 2014).

Для того чтобы проанализировать способность СКЖТ после индукции нейральной дифференцировки встраиваться в ткань мозга мыши, авторами были использованы клетки самцов мышей линии Black/6, трансгенных по гену GFP СКЖТ, содержащие зеленый флуоресцентный белок.

Клетки были введены в стриатум мышей линии Black/6, не экспрессирующих белок GFP. Через 7, 9 и 11 суток головной мозг извлекали, проводили анализ распределения трансплантированных клеток с помощью флуоресцентного микроскопа. Уже через 9 суток после инъекции были заметны различия в распределении контрольных и индуцированных клеток в ткани мозга. Так, контрольные клетки не контактировали с тканью реципиента и располагались исключительно в области трека, оставленного иглой, а СКЖТ, культивированные в присутствии индукторов, мигрировали в ткань мозга. Через 11 дней после инъекции в стриатуме контрольные клетки не обнаруживались, тогда как СКЖТ, индуцированные в нейральную дифференцировку, выживали в мозге мыши-реципиента.

Таким образом, обнаружено, что BDNF и ретиноевая кислота в сочетании с 5-азациитидином вызывают активацию экспрессии маркерных генов нейральной дифференцировки в СКЖТ. Однако

использование этих факторов без 5-азацитидина оказалось малоэффективным. С помощью анализа увеличения транскрипции маркерных генов авторы подобрали эффективные индукторы нейральной дифференцировки СКЖТ. Выживаемость и способность индуцированных клеток к миграции была проверена *in vivo* с помощью трансплантации индуцированных мышинных СКЖТ, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок (GFP), в головной мозг мыши. Клетки, в которых была индуцирована нейральная дифференцировка, способны встраиваться в ткань мозга реципиента после трансплантации и сохранять жизнеспособность более 11 суток после введения. Очевидно, трансплантация СКЖТ, в которых была индуцирована нейральная дифференцировка, может являться перспективным подходом для восстановления нервной ткани (Лопатина Т.В. и др., 2008).

3.2.2. Оптимальные условия культивирования и дифференцировки стволовых и прогениторных клеток ЦНС

К настоящему времени получены данные, свидетельствующие о наличии скрытого резерва обновления соматических клеток в постнатальном онтогенезе благодаря поддержанию пула стволовых клеток (СК) – родоначальниц различных линий клеточной дифференцировки (Репин В.С. и др., 2002; Егоров В.В. и др., 2003; Шахов В.П. и др., 2004).

Установлен факт существования нейральных стволовых и прогениторных клеток в определенных зонах ЦНС взрослых млекопитающих. Они локализованы в субэпендимной зоне, зубчатой извилине гиппокампа и обонятельной луковице головного мозга человека и грызунов (Ritzke R.L. et al., 2001). Эти клетки дают начало нейронам, макроглии и способны поддерживать локальный нейрогенез в течение всей жизни, значение которого, однако, в настоящее время недостаточно изучено. СПК, полученные от взрослых животных и человека, по многим свойствам имеют сходство с таковыми, полученными из эмбриональной ткани. Но они имеют также и различия, состоящие в количестве их в организме, в ограниченности потенциала к делению в условиях культуры. «Региональное стволовое пространство» органа (головного мозга) взрос-

лого истощается по мере старения организма (Villa A. et al., 2001). Не вызывает также сомнений, что только локальный нейрогенез не приводит к полному восстановлению анатомической структуры и функций при травматических повреждениях и сосудистой патологии ЦНС.

Причиной необходимости применения клеточных технологий в неврологии (Muraoka K. et al., 2008; Huang J. H. et al., 2008), как одного из методов терапии, являются неблагоприятные прогнозы у пациентов, перенесших обширный инсульт или страдающих нейродегенеративными заболеваниями различной этиологии.

Обнаружение нейральных предшественников, способных к развитию в нейроны и макроглию *in vitro* и *in vivo*, дает возможность для изучения клеточных механизмов, лежащих в основе развития нейропатологии и репарации (Vorasubin B. et al., 2007; Toda H. et al., 2008). Наименее всего исследованы свойства мультипотентных СПК взрослого человека и половозрелых животных, их способность генерировать нейроны, астроциты и олигодендроциты *de novo* (Muraoka K. et al., 2008; Grade S. et al., 2013).

Очевидно, что для решения практических задач и проведения фундаментальных исследований потребуется накопление СПК в достаточном количестве в культуре. Однако в настоящее время отсутствует единый протокол получения культур СПК мозга. Поэтому представляет интерес установление оптимальных условий выделения и наращивания клеточной биомассы *in vitro* СПК из нейрогенных областей мозга человека и животных (Ritzke R.L. et al., 2001; Ревущин А.В. и др., 2005), изучение их пролиферативного и дифференцировочного потенциала.

Для приготовления культур использовали ткань из разных нейрогенных областей головного мозга экспериментальных животных (1 кролик, 4 мыши, 2 крысы): субэпендимная зона желудочков, гиппокамп, обонятельная луковица.

В работе использовали также образцы мозга (субэпендимная зона желудочков, белое вещество полушарий мозга, обонятельная луковица) 4 человек, полученные при оперативных вмешательствах, выполненных по жизненным показаниям (тяжелая черепно-мозговая травма). Образцы мозга доставлялись в лабораторию в среде αMEM с антибиотиками. Хранение материала до посева клеток составляло не более 4 ч при температуре +4°C.

Для приготовления культур СПК животных использовали суспензионный метод культивирования в виде нейросфер.

Отсутствие единого стандартного протокола выделения и культивирования *in vitro* нейральных СПК взрослого человека побудило авторов на первых этапах воспользоваться методом, предлагаемым B.Reynolds, S.Weiss (1992) для культивирования СПК животных в собственной модификации.

Для фенотипирования нейральных СПК использовали антитела фирмы Stem Cell Technologies, Канада. Первичные антитела: кроличья антисыворотка к глиальному фибриллярному кислому белку (ГФКБ) для идентификации астроцитов, 1:100; моноклональные антитела к нестину, клон Rat 401 для определения стволовых клеток, 1:50; моноклональные антитела к маркеру O4 олигодендроцитов, 1:50; моноклональные антитела к микротубулярному ассоциированному белку (MAP-2) развивающихся нейронов, 1:200. Вторичные антитела: козы антимышинные, меченные флюоресцеинизотиоцианатом (FITC), 1:100; козы антикроличьи, меченные-амино-4-метилкумарин-3-уксусной кислотой (AMCA), 1:100.

Фенотипирование СПК проводили непрямым иммунофлюоресцентным анализом (НИФА).

Авторы изучили влияние четырех вариантов составов ростовых сред на способность к пролиферации и генерации нейросфер.

При микроскопии на 4-5-е сутки культур из образцов ткани мозга человека наблюдали образование свободноплавающих клеточных агрегатов – нейросфер, состоящих из 50-100 и более клеток. Размеры и количество нейросфер к 9-м суткам культивирования увеличивались, и соответственно увеличивалось количество клеток в агрегатах. Отмечена морфологическая гетерогенность нейросфер, которая выражалась в их разных размерах, плотности укладки клеток. На 10-12-е сутки культивирования наблюдалось замедление роста СПК, и возникла необходимость в пересеве их в новые флаконы со свежей питательной средой.

При диссоциации клеток из нейросфер и рассеивании их в новые культуральные флаконы через 3-5 суток наблюдали появление вновь сформированных нейросфер (вначале небольших размеров), которые в последующем увеличивались в размере за счет пролиферации клеток. При длительном пассировании в культурах наблюдали формирование новых клонов путем отпочковывания от старых

нейросфер, а не только рост клонов за счет экспансии периферических слоев прогениторных клеток, выявлявшийся при высокой плотности культур.

Для сравнительного изучения пролиферативной активности и роста культур СПК из ткани различных нейрогенных областей мозга человека и животных в асептических условиях из образцов разных нейрогенных областей (гиппокамп, субэпендимная зона желудочков, обонятельная луковица) мозга лабораторных животных и человека (обонятельная луковица, субэпендимная зона желудочков и белое вещество полушарий мозга) приготовлено 22 культуры СПК. При этом выявлено морфологическое сходство продуцируемых нейросфер, полученных как из клеток мозга человека, так и животных. Но интенсивность роста культур СПК человека и животных была разной.

При использовании первого варианта среды (α MEM + F10 + FGFb + hEGF) был наибольшим.

Таким образом, добавление в смесь питательных сред (α MEM + F10) 2-х ростовых факторов: FGF-b и hEGF обеспечивало лучшую генерацию нейросфер и наращивание в них клеток, что согласуется с данными некоторых исследователей, которые для индукции роста нейральных СПК использовали два фактора роста. Фактор, препятствующий спонтанной дифференцировке клеток – LIF, существенно не влиял на пролиферативную активность клеток. Полученный авторами результат согласуется с данными B.Reynolds, S. Weiss (1992). Этот фактор, по данным литературы, чаще добавляют для роста СК, полученных из эмбриональной и фетальной ткани, и реже для культивирования СПК взрослых млекопитающих. В то же время имеются данные, что LIF может иммортализовать стволовые клетки.

На 1-3-и сутки после посева суспензии клеток из субэпендимной зоны желудочков мозга и обонятельной луковицы кролика и мышей выявлено образование свободноплавающих нейросфер, (4-5 в поле зрения микроскопа, при увеличении $\times 200$). Начало формирования нейросфер из клеток гиппокампа животных отмечалось только на 3-4-е сутки.

При подсчете нейросфер из клеток белого вещества полушарий мозга установлено их достоверно меньшее количество – 10 ± 2 ($P < 0,01$). Данные авторов о возможности использования белого

вещества мозга в качестве источника для выделения и приготовления культур СПК согласуются с результатами других исследователей, которым также удалось получить аналогичные культуры (Nunes M. C. et al., 2003).

Таким образом, СПК из нейрогенных зон мозга животных формируют нейросферы раньше, и они накапливаются в большем количестве, чем в случае культивирования клеток мозга человека. Возможно, это связано с наличием неодинакового количества СПК в разных областях мозга человека и экспериментальных животных, что в свою очередь связано с возрастом организма (Репин В.С. и др., 2002).

Для иммуноцитохимического анализа фенотипов клеток использовали нейросферы не позже 9-х суток роста в культуре. Суспензионную культуру нейросфер переводили в монослойную путем подращивания клеток в течение 2-6 ч на высокоадгезивной поверхности (покровном стекле, обработанном поли-1-лизин). Иммуноцитохимический анализ клеток нейросфер человека и животных из разных областей мозга выявил их гетерогенный состав, характеризующийся разной степенью зрелости клеток. Количество нестин⁺-, виментин⁺-, MAP-2⁺-, O4⁺-клеток (маркер незрелых олигодендроцитов) сильно варьировало в пределах одной опытной группы. Ни в одной из культур не наблюдалось превалирования монотипа выше уровня 30-50%. Постоянный полиморфизм клеток в нейросферах подтверждает их мультипотентность.

Некоторые клетки человека из культивируемых нейросфер сохраняли маркер незрелых олигодендроцитов или нейробластов – MAP-2⁺-клетки. Выявлялись также маркеры и зрелых астроцитов – GFAP⁺-клетки.

При изучении фенотипов клеток из нейросфер, полученных от мышей, выявлены также нестин⁺-клетки, составляющие 3-15%.

Полученные авторами результаты по фенотипированию клеток из нейросфер подтверждают тот факт, что продуцируемые в культуре структуры являются истинными нейросферами – клонами СПК, а подобранные ими условия их роста обеспечивают их продукцию.

Таким образом авторами разработана технология приготовления культур СПК из нейрогенных зон мозга человека и животных, выращиваемых суспензионным способом в виде нейросфер. Опре-

делен оптимальный состав среды для пролиферации нейральных СПК из нейрогенных областей мозга человека и животных: питательная среда α MEM и F-10 с добавлением ростовых факторов – FGF-b и hEGF. Установлено, что морфологический состав нейросфер гетерогенен. Они имеют разные размеры (от 50 до 350 мкм в диаметре) и разную плотность укладки клеток. Фенотипирование популяции клеток в нейросферах выявило их следующие типы: стволовые клетки (нестин+-клетки), предшественники нейрональной природы (MAP-2+-клетки), клетки-предшественники олигодендроцитов (O4+ -клетки) и зрелых астроцитов (ГФКБ+-клетки).

Исследованы морфофункциональные свойства 22 первичных культур СПК из разных нейрогенных областей мозга человека и экспериментальных животных (кролик, мыши, крысы). Выявлена более активная пролиферация культур СПК человека, полученных из клеток обонятельной луковицы и субэпендимной зоны желудочков, чем из белого вещества мозга. Полученные результаты могут явиться научной и практической базой при разработке протоколов лечения больных с нейродегенеративными заболеваниями, травматическими повреждениями и сосудистой патологией ЦНС, основанных на аутогенной или аллогенной трансплантации СПК (Квачева З.Б. и др., 2009).

3.2.3. Метод эндоскопического получения биоптата головного мозга и выделения из него нейральных стволовых клеток для ауотрансплантации

Получение достаточного количества неиммуногенных нейральных клеток является актуальной проблемой клинической нейротрансплантации. Для замещения нефункционирующих нервных клеток или стимуляции нейрогенеза *in situ* в клинической нейротрансплантации нужны специализированные нервные клетки или прогениторы с потенциалом к росту и дифференцировке в нейрональном направлении. Наиболее распространёнными источниками такого клеточного материала в клинике является головной мозг абортированных эмбрионов (или плодов) человека (Winkler C. et al., 2005) и собственные нейрональные клетки пациента, выделенные из обонятельной зоны слизистой оболочки носа (olfactory ensheathing cells) (Huang H. et al., 2003).

В качестве альтернативного источника клеточного материала рассматриваются аллогенные нейрональные стволовые клетки (НСК) головного мозга трупов. НСК были выделены из различных отделов головного мозга (включая кору, субвентрикулярную зону, сетчатку, гиппокамп и обонятельную зону) трупов в разное время после смерти (до 140 ч) и охарактеризованы (Schwartz P.H. et al., 2003; Klassen H., 2004; Gil-Perotin S. et al., 2013). Однако использование этих источников НСК имеет те или иные ограничения или недостатки: малое количество клеток (фетальный мозг и аутогенный материал), проблема инфекционной безопасности (фетальный и трупный аллогенный материал), проблема онкогенной безопасности (эмбриональные стволовые клетки и их дериваты, ранние взрослые стволовые клетки) и иммунологический конфликт (аллогенный и ксеногенный материал). Таким образом, поиск оптимального источника клеточного материала для заместительной клинической нейротрансплантации остаётся актуальной задачей. Если бы проблема достаточного количества клеточного материала была решена, то «источником выбора» могли бы стать аутогенные НСК.

Исследователи из шведского Karolinska Institute в 2005 г. предложили новый метод выделения и экспансии аутогенных НСК: из биоптатов головного мозга неврологических пациентов. Методика была испытана на 13 больных. Метод выделения НСК из биоптатов головного мозга человека и получения из них нейронов был разработан группой 9 лет назад (Westerlund U. et al., 2003).

Микробиоптаты получали эндоскопически из боковых желудочков головного мозга во время рутинного нейрохирургического вмешательства по поводу гидроцефалии. Осложнений процедуры, включая «новый» неврологический дефицит, не наблюдали. Клеточная суспензия, выделенная из биоптатов механически-ферментативным методом, помещалась в дифференцировочную среду. Клетки всех биоптатов формировали нейросферы в течение нескольких дней и создавали новые нейросферы после диссоциации и пассирования в течение 3-7 недель. Стволовые клетки нейросфер клонировались (около 7% всех клеток нейросферы) и были способны дать новую нейросферу в 2 пассажах. То есть, если считать, что одна нейросфера содержит в среднем 300 клеток, и из одной клетки можно получить 1 нейросферу, то в двух пассажах можно выделить 90 000 клеток из одной исходной. В конце первой

недели культивирования 78% клеток несли глиальные маркёры и 22% – нейрональные. Функциональная зрелость нейронов, подтверждённая методом патч-кламп, наблюдалась через 3 недели культивирования.

Таким образом, исследователи предложили новый метод выделения ауто-НСК из головного мозга пациента, показали его безопасность, выполнимость и низкую инвазивность процедуры, возможность выделения и экспансии *ex vivo* достаточного количества НСК. Важным моментом является возможность производить экспансию *in vitro* собственных нейрональных прогениторов с получением большого количества функционально зрелых нейронов. Для выращивания нейросфер использовали протокол С.В. Johansson и др., предложенный в 1999 году. Общее количество функциональных нейрональных клеток, которое позволяет получать метод, можно считать достаточным, поскольку ранее А. Bjorklund и др. (2000) было показано, что, например, для замещения функции при болезни Паркинсона может быть достаточно всего лишь 80000 полноценных нейронов. Локализация НСК в субвентрикулярной зоне головного мозга человека позволяет безопасно забирать биоптат через стенку желудочка, поскольку рядом нет никаких функционально значимых структур, в отличие от другого сайта НСК – гиппокампа и зубчатой извилины.

По мнению А.В. Берсенева (2006), чёткая анатомическая локализация сайтов НСК в головном мозге взрослого человека, безопасность процедуры получения биоптата и возможность «наращивания» нейрональных клеток *ex vivo* позволят развивать этот метод в будущем и занять передовые позиции в клинической заместительной нейротрансплантологии.

3.2.4. Применение клеток пуповинной крови

По лечебному потенциалу клеток ПК в экспериментальной неврологии к настоящему времени уже написаны обзоры (Newman M.B., 2004; Peterson D.A., 2004). Подоплёкой к исследованиям по терапевтической эффективности трансплантации клеток ПК в неврологии послужили работы по выделению и характеристике нейрональных клеток из «стволовых популяций» ПК. Из различных популяций клеток ПК *in vitro* несколькими группами исследовате-

лей были получены все виды нервных клеток. Пионерские работы по получению нейрональных клеток из ПК были выполнены группами Sanchez-Ramos и Buzanska в 2001-2 гг. Пластик-адгезивные клетки и CD34-/CD45-клетки были размножены и подвергнуты дифференцировке под влиянием RA и других факторов роста (EGF, BDNF) (Buzanska L. et al., 2002). Причём RA выступает в данном случае основным нейроиндуктором. Другие группы исследователей подвергали дифференцировке CD45– (Bicknese A.R. et al., 2002), CD133+ (Jang Y.K. et al., 2004) и мезенхимальные клетки ПК (Fu Y.S. et al., 2004; Jeong J.A. et al., 2004). Исходя из результатов этих исследований, было констатировано, что различные популяции стволовых и прогениторных клеток ПК могут быть подвергнуты дифференцировке *in vitro* во все виды нервных клеток. Это было показано не только исследованием их иммунофенотипа, но и данными по экспрессии генов (мРНК) и характерных транскрипционных факторов. Однако наблюдается недостаток экспериментов *in vivo* на различных неврологических моделях, которые могли бы подтвердить функциональную значимость полученных клеток. Одна из таких работ, демонстрирующая дифференцировку клеток ПК *in vivo*, была выполнена группой T. Zigova (Zigova T. et al., 2002). Пластик-адгезивную моноклеарную предифференцированную фракцию ПК пересаживали унилатерально в желудочки головного мозга новорожденных крысят без иммуносупрессии. Через месяц после трансплантации было выявлено, что около 20% выживших клеток оказывались в субвентрикулярной зоне и только 2 из них экспрессировали GFAP (маркёр микроглии). Миграции клеток, характерной для нейрональных стволовых, не наблюдали. Возможной причиной низкой выживаемости, отсутствия миграции и дифференцировки в нейроны, является трансплантация весьма гетерогенной популяции клеток в иммунокомпетентный мозг крысы (Zigova T. et al., 2002).

Таким образом, результаты экспериментов *in vitro* пока не подтверждены данными *in vivo*. Вопрос об истинной дифференцировке, отсутствии артефактов (Lu P. et al., 2004) и ложноположительных результатах остаётся открытым. Самый часто применяемый индуктор – RA, возможно, не обладает «достаточной нейроспецифичностью» и вместе с другими индукторами может вызывать плеiotропные эффекты на повышение уровня экспрессии генов других по-

верхностных маркёров в культуре. Так известно, что как гемопоэтические клетки, так и мезенхимальные стромальные клетки костного мозга спонтанно экспрессируют нейрональные маркёры (Tondreau T. et al., 2004). Различные добавки в виде факторов роста в культуру могут лишь усиливать экспрессию этих генов, не вызывая прямой дифференцировки в функционально полноценный нейрон.

Терапевтические эффекты, вызываемые трансплантацией клеток ПК, были изучены на нескольких моделях неврологического дефицита. В одной из ранних работ было показано, что внутривенная трансплантация гемопоэтических CD34⁺ клеток (77-95% в трансплантате) ПК крысам с моделью ишемического инсульта приводит к значимому функциональному восстановлению неврологического дефицита. Клетки мигрировали в головной мозг, преимущественно – в зону поражения, и дифференцировались в нейроны и клетки глии (GFAP⁺, NeuN⁺, MAP-2⁺) (Chen J. et al., 2001). Показана эффективность трансплантации CD34⁺ клеток, выделенных из ПК для лечения ишемического инсульта у иммунодефицитных мышей (Taguchi A. et al., 2004). Сравнивались внутривенный и интрастриальный способы трансплантации клеток ПК (на фоне иммуносупрессии) крысам с моделью ишемического инсульта. По результатам функциональных тестов исследователи заключили, что внутривенное введение клеток может быть терапевтически выгоднее интрастриального (Willing A.E. et al., 2003).

При изучении эффектов трансплантации моноклеарных человеческих клеток ПК на модели ишемического инсульта у крыс наблюдали дозозависимый эффект достоверного улучшения поведенческих реакций и двигательной активности животных через 2 и 4 недели после трансплантации. Оказалось, что максимально эффективно введение клеток ПК в дозе 1 и 10 млн. Введённые клетки обнаруживали в головном мозге в периинсульной зоне эпсилатеральной стороны. Клеточная трансплантация значимо «уменьшала» область повреждения (Vendrame M. et al., 2004).

Показано, что клетки ПК не мигрируют через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), а только стимулируют эндогенный нейро- и ангиогенез (Borlongan C.V. et al., 2004). В подтверждение этого было выявлено повышение концентрации GDNF на 68% в головном мозге инсультных животных после введения клеток и маннитола (повышающего проницаемость ГЭБ). Концентрация 3 нейротрофических фак-

торов (GDNF, NGF, BDNF) повышалась и в периферической крови приблизительно на 15% в группе животных, получавших клеточную трансплантацию с маннитолом. В остальных группах уровень этих факторов был недетектабелен (Borlongan C.V. et al., 2004).

Таким образом, лечение экспериментального ишемического инсульта трансплантацией клетками ПК эффективно за счёт стимуляции эндогенного нейро- и ангиогенеза. Неясной остаётся способность миграции клеток в повреждённый головной мозг через ГЭБ. Способно ли радикальное повышение количества (как показано в первом исследовании) вводимых клеток вызвать их миграцию через ГЭБ? Если экстраполировать дозозависимую терапию на человека, то для достижения эффекта понадобится около 20 доз замороженных проб ПК (согласно первому исследованию).

Различные работы продемонстрировали примерно схожие эффекты трансплантации клеток ПК при экспериментальном инсульте, несмотря на разницу в количестве вводимых клеток (1-10 млн. или 200 тыс.) и степени очистки трансплантата (мононуклеарные или CD34+ клетки). Отсюда можно сделать вывод, что терапевтический эффект, по-видимому, обусловлен факторами, выделяемыми мононуклеарными клетками ПК в условиях неврологического дефицита *in vivo*, вне зависимости от событий прямой дифференцировки или слияния какой-либо конкретной стволовой или прогениторной популяции трансплантата. Схожие результаты (функциональное восстановление и данные по дифференцировке) были получены и при внутривенной трансплантации клеток ПК в модели повреждения головного мозга у крыс (Lu D. et al., 2002).

Выполнены экспериментальные работы по применению стволовых клеток пуповинной крови в постнейротравматическом периоде (Сычева Е.В. и др., 2006; Шаповалова В.В. и др., 2006).

Представляется, что терапевтическое действие клеток ПК при неврологическом дефиците неспецифично и не обусловлено их нейрональной дифференцировкой. Тем не менее, базируясь на данных экспериментальных исследований, несколько групп в разных странах приступили к клиническим испытаниям такого метода клеточной терапии. Показано восстановление моторной функции (ходьбы) через 17 лет после травмы спинного мозга у парализованной женщины, после трансплантации клеток ПК (Kang K.-S. et al., 2005) (Берсенев А.В., 2006; Смолянинов А.Б. и др., 2011).

3.2.5. Трансплантация фетальных клеток

В настоящее время прорыв в лечении неврологических расстройств обоснованно связывают с развитием клеточных технологий. Предполагается, что главенствующая роль в формировании лечебного эффекта принадлежит нейротрофическим факторам, продуцируемым трансплантированными клетками в местах повреждения мозга. Экспериментально показано, что незрелые клетки, полученные из нервной или кроветворной тканей, будучи трансплантированными в головной или спинной мозг, способны приживаться и функционировать в течение длительного времени (Семченко В.В., Ерениев С.И. и др., 2000, 2004). Лечебный эффект трансплантированных клеток связан с их способностью продуцировать нейротрофические факторы, а также вовлекать в процесс регенерации эндогенные нейральные клетки-предшественники. Таким образом, функциональная активность трансплантированных клеток может создавать благоприятное микроокружение для восстановления поврежденных нейронов. Определенный вклад в лечебный эффект может также вносить замещение утраченных клеток новыми, функционально-активными донорскими клетками (Семченко В.В., Ерениев С.И. и др., 2000).

Источником пригодных для трансплантации нейральных стволовых клеток (НСК) является фетальная нервная ткань. Источником стволовых клеток (СК) может также являться костный мозг взрослых. Однако процент костномозговых клеток, потенциально способных приживаться и дифференцироваться в тканях мозга, чрезвычайно низок, а проблема размножения таких клеток и поддержания их низкодифференцированного состояния вне организма пока далека от решения. Следует иметь в виду, что костный мозг содержит значительное количество клеток-предшественников, способных формировать хрящевую и костную ткани. Поэтому, трансплантация костномозговых клеток в ткань мозга несет с собой определенный риск развития костной ткани (Савченко С.А., 2005). Кроме того, в экспериментальной модели повреждения головного мозга у крыс было показано, что трансплантация клеток, полученных из аллогенного фетального головного мозга, более эффективна в стимуляции регенераторных процессов в сравнении с трансплантацией клеток, полученных из сингенного костного мозга взрослого животного (Савченко С.А., 2005).

В настоящее время усилия многих исследователей направлены на то, чтобы сделать клеточные технологии максимально пригодными для лечения неврологических заболеваний. В частности, решается вопрос оптимизации путей доставки клеток к очагам повреждения. Особое внимание в этом отношении обращает на себя субарахноидальный (интратекальный) путь клеточной трансплантации. Этот путь является малотравматичным. Интратекальное введение клеток не требует дорогостоящего оборудования и может быть выполнено несколько раз. В экспериментах показано, что трансплантированные в субарахноидальное пространство стволовые клетки способны мигрировать в место повреждения мозга и интенсифицировать там репаративные процессы (Sasaki M. et al., 2001; Lepore A.C. et al., 2005; Bakshi A. et al., 2006). Имеются данные, указывающие на очевидные преимущества интратекальной трансплантации клеток над их внутривенным введением. Эти преимущества, в частности, связаны с более выраженным накоплением трансплантированных клеток в очаге мозгового повреждения. В случаях, требующих экстренного хирургического вмешательства, наиболее подходящим может быть внутримозговой путь введения клеток.

Донорские нейральные стволовые клетки, трансплантированные в неповрежденную часть мозга, способны мигрировать в очаг повреждения и там реализовывать свой репаративный потенциал (Modo M. et al., 2004). Имеются данные, прямо указывающие на возможность установления контактов между клетками донора и реципиента и участия донорских нейронов в проведении нервных импульсов (Hamasaki T. et al., 1987). Следует, однако, иметь в виду, что не только нейральные стволовые, но и другие клетки нервной ткани могут способствовать восстановлению поврежденной центральной нервной системы (ЦНС). Так, в экспериментах на крысах показано, что трансплантация интактных шванновских клеток непосредственно в демиелинизированный мозговой очаг приводит к стимуляции там аксонального роста (Azanchi R. et al., 2004). Перспективным представляется использование способности незрелых астроцитов подавлять образование глиального рубца и свойств олигодендроцитов генерировать миелин в очаге повреждения. Таким образом, трансплантированные незрелые клетки разных типов способны поддерживать жизнеспособность нейронов и создавать благоприятные условия для роста и миелинизации нервных волокон. Интересно, что продуцен-

тами нейротрофических факторов могут являться не только дифференцированные клетки, являющиеся потомками стволовых клеток, но и сами стволовые клетки (Lu P. et al., 2003).

ЦНС является условно «привилегированной» зоной, частично изолированной от иммунной системы гематоэнцефалическим барьером. Лимфоциркуляция в ЦНС в норме ограничена. Этот и другие факторы препятствуют развитию иммунных реакций в ЦНС. В действительности, возможность долговременного приживания аллогенных стволовых клеток в ткани мозга интактного (не иммуносупрессированного) организма – неоспоримый факт (Семченко В.В., Ерениев С.И. и др., 2000, 2004). «Иммунопривилегированность» ЦНС, однако, не является абсолютной. Иммуносупрессия играет определяющую роль в судьбе клеточного трансплантата в случае, когда донор и реципиент принадлежат к дискордантным по отношению друг другу видам (Cicchetti F. et al., 2003).

Клеточная трансплантация способна влиять на разные стороны функциональной деятельности ЦНС, поэтому она может быть применима при лечении неврологических расстройств, имеющих разный генез и проявления. Так, билатеральная интрагиппокампальная аллотрансплантация фетальной нервной ткани крысам с разрушенными участками секторов СА1 и СА3 гиппокампа предупреждает повышение судорожной готовности мозга у большинства животных. При этом наибольший эффект наблюдается при сочетанной трансплантации ткани гиппокампа и перегородки (Семченко В.В., Ерениев С.И. и др., 2000, 2004). При химической деструкции пирамидных нейронов поля СА3 гиппокампа трансплантация нейральных стволовых клеток нормализует поведение путем восстановления высвобождения γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), ацетилхолина и глутамата. При внутримозговой трансплантации культивированных незрелых глио-нейральных клеточных элементов отмечается улучшение выработки условного рефлекса. При удалении лобной коры трансплантация культивированных астроцитов способствует восстановлению утраченных поведенческих навыков. Трансплантация ткани фетального неокортекса улучшает когнитивную функцию мозга у крыс с врожденной микроцефалией.

Считается, что за память ответственен гиппокамп. Смешанные холинэргические (септум) и серотонинэргические (ядра шва) трансплантаты, пересаженные в гиппокамп крыс через 10 мес после

его повреждения, в большей степени восстанавливали пространственную память, чем каждый трансплантат в отдельности. Астроцитные трансплантаты облегчают вызванный повреждением мозга дефицит памяти независимо от восстановления холинергических мозговых структур. Этот эффект связывают с секрецией астроцитами нейротрофических факторов.

За циркадные ритмы в организме ответственно супрахиазмальное ядро (СХЯ). Известно, что с возрастом циркадные ритмы нарушаются или исчезают полностью. Трансплантация фетальной ткани СХЯ восстанавливает у старых животных дневные ритмы гипоталамического кортикотропин-релизинг гормона и питуитарного проопиомеланокортина. Трансплантация хабенулярных и таламических клеток восстанавливает сон, нарушенный в результате денервации интерпедункулярного ядра.

Фетальные трансплантаты мозжечка, имплантированные в мозжечок мутантных животных с наследственной атаксией (экспериментальная модель наследственной атаксии Фридрейха), частично восстанавливают поведенческую функцию в тестах «открытое поле» и «балансирование».

Внутристриарная солидная аллотрансплантация незрелого стриатума взрослым крысам с экспериментальным аналогом хореи Гентингтона уменьшает их двигательный дефицит. Фетальные стриатумные трансплантаты также уменьшают когнитивный дефицит и дистонию у приматов с моделированной болезнью Гентингтона. С помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) и гистологической верификации показано приживание таких трансплантатов, а также уменьшение дегенеративных изменений и гидроцефалии в головном мозге реципиента.

Накоплен большой экспериментальный материал по изучению возможностей нейротрансплантации в различных моделях болезни Паркинсона у мышей, крыс и обезьян. У приматов пересадка диссоциированных клеток незрелой нервной ткани в участки стриатума с разрушенной дофаминергической иннервацией более эффективна, чем трансплантация цельных фрагментов. Показана принципиальная возможность трансплантации незрелых дофаминергических нейронов с профилактической целью.

Обращает на себя внимание тот факт, что восстановление поврежденных мозговых функций в эксперименте, достигаемое по-

средством клеточных трансплантаций, как правило, намного выраженнее восстановления, достигаемого с помощью применения медикаментозных средств. В целом, в свете представленных экспериментальных данных, можно сделать следующие выводы, имеющие важное практическое значение:

1) трансплантация клеток, полученных из фетальной ткани, может являться эффективным методом лечения заболеваний, обусловленных повреждением нервной ткани;

2) в процесс репарации поврежденной ЦНС вовлечены различные типы клеток. Поэтому можно предполагать, что комплексные клеточные трансплантаты, включающие в себя разные типы клеток, могут быть более эффективны в восстановлении утраченных мозговых функций, в сравнении с трансплантатами, сформированными из одного типа клеток;

3) стволовые клетки, трансплантированные в организм интракeально (через люмбальный прокол), мигрируют в очаг мозгового повреждения и интенсифицируют там регенеративные процессы;

4) клеточная трансплантация способна оказать влияние практически на все функции ЦНС, и поэтому может быть эффективно использована в лечении разных неврологических расстройств.

Применение трансплантации кроветворных клеток для лечения неврологических расстройств представляется обоснованным в свете следующих данных:

1) кроветворные ткани плода содержат стволовые клетки, способные дифференцироваться в клетки, формирующие нервную ткань;

2) фетальные кроветворные клетки могут вырабатывать медиаторы, способные поддерживать рост и жизнеспособность различных клеток;

3) кроветворные клетки способны супрессировать индуцированные донорскими антигенами иммунные клеточные реакции (Seledtsova G.V. et al., 2004);

4) клетки фетальной печени способны подавлять образование грубых соединительнотканых рубцов, и, таким образом, сохранять пути для роста нервных волокон;

5) в незрелой кроветворной ткани присутствуют клетки-предшественники эндотелиоцитов, которые способны обеспечивать неоваскуляризацию ишемизированных (поврежденных) тканей организма.

С разным успехом клеточная терапия используется в лечении неврологических расстройств у взрослых. Имеются многочисленные данные о применении клеточной трансплантации в лечении болезни Паркинсона (van den Berge S.A. et al., 2013). К 1997 году количество больных с этой патологией, которым трансплантировали дофаминэргические нейроны фетального среднего мозга превысило 2000 человек. Показана возможность приживания донорских клеток и их полноценного функционирования на протяжении 6 лет. В России первые пересадки клеток черной субстанции при паркинсонизме были выполнены в 1990 г. Показано, что стереотаксическая трансплантация клеток пациентам может приводить к снижению необходимой дозы L-Дофа, а также значительно улучшению их неврологического статуса, выражающегося в виде улучшения походки, уменьшения ригидности мышц, снижения тремора конечностей, улучшению моторики пальцев рук, почерка и речи. Отмечается, однако, что клинический эффект такого лечения наблюдается не во всех случаях, и его продолжительность у разных пациентов сильно варьирует. Имеются сообщения об эффективном использовании при лечении болезни Паркинсона субарахноидальной трансплантации клеток незрелой нервной ткани. Вместе с тем, имеются также данные, указывающие на непродолжительность улучшения состояния пациентов после такой трансплантации (Селедцов В.И. и др., 2003).

Пресенильное слабоумие, или болезнь Альцгеймера характеризуется нарушением памяти, потерей способности к познанию, неузнаванием себя и окружающих и связана с диффузной дистрофией и гибелью нейронов в лобной и теменной областях коры головного мозга, а также в базальных ядрах и подкорковых отделах мозга. В базальном ядре Мейнерта, главном источнике холинергической иннервации коры мозга, гибель нейронов может составлять 60-90%. На нервных окончаниях обнаруживаются накопления бета-амилоида. Среди клиницистов ведется активное обсуждение возможности применения клеточной терапии в лечении этого пока неизлечимого недуга. Тем не менее, пока имеется лишь единичное сообщение об использовании субарахноидальной клеточной трансплантации в лечении 52-летнего больного.

К настоящему времени в клинической практике (г. Новосибирск) накоплен значительный опыт применения клеточных техно-

логий в лечении неврологических расстройств разного генеза. Суммированы результаты лечения 452 пациентов со сроком наблюдения не менее 2 лет. Лечение пациентов проводилось в рамках клинических исследований, одобренных Ученым советом и этическим комитетом ГУ НИИКИ СО РАМН. От каждого пациента, включенного в исследование, было получено информированное согласие. Перед использованием донорские клетки проходили трехуровневое тестирование на отсутствие вирусных инфекций с использованием иммуноферментного анализа (в двух разных лабораториях), а также метода полимеразной цепной реакции. Клетки трансплантировались в субарахноидальное пространство пациента через поясничный прокол. Количество трансплантаций пациенту варьировало от 1 до 4. Пациенты с последствиями травмы спинного мозга подвергались операции, направленной на разрушение спинальной кисты и имплантации в поврежденный участок клеток, помещенных в специальный сгусток фетальных клеток.

Субарахноидальная трансплантация клеток обычно хорошо переносится взрослым пациентом. В первые сутки после трансплантации у части больных отмечаются реакции в виде подъема температуры тела до $+38,5^{\circ}\text{C}$ и симптомов менингизма. Эти реакции купируются соответствующим медикаментозным лечением.

Из опубликованных данных следует, что трансплантация фетальных клеток может быть с достаточно высокой вероятностью эффективной при лечении последствий спинальной травмы, ЧМТ, мозгового инсульта, нейроинфекции и ДЦП. Малая эффективность лечения постгипоксических энцефалопатий может быть связана с обширностью и множественностью очагов поражения. Отмеченные при лечении дегенеративных заболеваний ЦНС (рассеянный склероз, болезнь Паркинсона) улучшения неврологического статуса носят обычно кратковременный характер. Этот факт можно, по-видимому, объяснить тем, что донорские клетки не способны прервать хронические патологические процессы, лежащие в основе этих болезней.

Таким образом, в свете имеющихся данных можно сделать вывод о целесообразности применения клеточной терапии при лечении неврологических расстройств разного генеза. Обращает на себя внимание многогранность действия трансплантированных клеток, долговременность клинических эффектов и отсутствие отдаленных серьезных побочных явлений.

Механизм действия трансплантированных клеток на головной мозг является комплексным. Ведущую роль авторы отводят продукции этими клетками нейротрофических факторов, а также медиаторов, стимулирующих неоваскулогенез и улучшающих мозговую гемодинамику. Роль нейротрофических факторов может быть двоякой. С одной стороны, они способны стимулировать функциональную активность нервных клеток и активировать, таким образом, работу разных отделов мозга, в том числе тех, которые в результате развития заболевания находятся в депрессивном состоянии. С другой стороны, разные типы трансплантированных клеток могут создавать благоприятные условия для роста и миелинизации нервных окончаний и, таким образом, способствовать восстановлению нарушенных в результате развития заболевания нервных коммуникаций. На главенствующую роль продукции нейротрофических медиаторов в механизме лечебного влияния донорских клеток на поврежденный головной мозг косвенно указывает тот факт, что во многих случаях клинические улучшения у пациентов начинают регистрироваться уже с первых дней после клеточной терапии, достигая своего максимума в течение 3-6 месяцев. Вышесказанное не исключает возможную лечебную значимость установления синаптических взаимодействий донорских нейральных клеток с нейронами реципиента и их участия в проведении нервных импульсов. Такая возможность продемонстрирована в ряде экспериментальных работ (Семченко В.В., Ерениев С.И. и др., 2000, 2004).

Очевидно, что фетальные клетки в силу своей низкой дифференцированности и высокой пластичности обладают уникальными свойствами, которые могут быть эффективно использованы при лечении многих тяжелых заболеваний. Препятствия на пути их применения носят, в основном, этический характер. Использование фетального материала, получаемого в результате легального прерывания беременности, в лечении тяжелых заболеваний представляется более этичным, чем его простое уничтожение (как это в основном делается в России) или его применение в косметологических целях (как это практикуется в некоторых западных странах) (Селедцова Г.В. и др., 2008, 2010).

В эксперименте изучены морфологические изменения в гиппокампе после травмы головного мозга и применения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (Соколова И.Б. и др., 2011).

3.2.6. Особенности клеточной терапии в детской неврологии

Клеточные трансплантации используются в лечении тяжелых форм детского церебрального паралича (ДЦП), рефрактерного к общепринятому лечению. Исследование включало 30 детей (19 мальчиков, 11 девочек) в возрасте от 1,5 до 7 лет. 26 детей (87%) имели двойную гемиплегию – наименее курабельную форму ДЦП. Два пациента (7%) страдали спастической диплегией, а еще двое имели атонически-астатическую форму ДЦП. Контрольная группа была сформирована из 30 пациентов по парному принципу и была клинически сопоставима с группой исследования.

Клетки вводили в субарахноидальное пространство реципиента через спинномозговой прокол. Трансплантируемая клеточная суспензия включала в себя не только клетки фетальной нервной ткани, но также кроветворные клетки фетальной печени. Количество трансплантаций, выполненных одному пациенту, варьировало от 1 до 3. Установлено, что у 3 пациентов (10%) клеточная терапия приводила к иммунной сенсibilизации по отношению к антигенам донора, выявляемой в тесте подавления миграции лейкоцитов. Однако, пролиферативный ответ Т-лимфоцитов на донорские антигены у этих пациентов не превышал исходный уровень. Такие результаты, по мнению авторов, могут быть объяснены низким процентным содержанием сенсibilизированных лимфоцитов в суммарной Т-клеточной популяции реципиента. Лабораторных и клинических признаков развития тканедеструктивных аутоиммунных реакций у пролеченных пациентов обнаружено не было. Через 1 год после лечения уровень выполнимости основных психомоторных функций в группе исследования примерно в 2 раза превысил контрольное значение. За весь период наблюдения, который для части пациентов составляет более 10 лет, ни одного случая реверсии клинического эффекта клеточной терапии зафиксировано не было. Полученные данные указывают на то, что клеточная терапия может являться эффективным, безопасным и оправданным с иммунологической точки зрения методом лечения ДЦП (Кафанова М.Ю. и др., 2000; Селедцов В.И. и др., 2005; Селедцова Г.В. и др., 2008; Григорян А.С., 2012; Ruff C.A. et al., 2013).

Таким образом, имеющиеся данные указывают на целесообразность применения клеточной терапии в детском возрасте, когда пластические возможности мозга велики и высока вероятность достижения кардинального улучшения их неврологического статуса. Результаты клинического применения трансплантации фетальных клеток в полной мере согласуются с экспериментальными данными. Результативность клеточной терапии в значительной степени зависит от возраста реципиента. Способность к приживлению донорских клеток и их функциональная активность, как правило, тем выше, чем моложе организм реципиента (Семченко В.В., Еринев С.И. и др., 2000, 2004). Очевидно, что дети с тяжелыми врожденными и приобретенными неврологическими расстройствами должны в первую очередь рассматриваться как кандидаты для проведения клеточной терапии. Тем не менее, имеются лишь немногочисленные публикации, посвященные использованию данного метода лечения у детей, и речь пока не идет о его широкомасштабном внедрении в детской неврологии.

Согласно опубликованным данным, эндолюмбальное введение фетальных клеток незрелой нервной ткани может быть эффективным методом лечения последствий черепно-мозговой травмы у детей (Кафанова М.Ю. и др., 2000). С помощью этого метода значительное улучшение неврологического статуса может быть также достигнуто у детей с последствиями нейроинфекции (Рабинович С.С. и др., 2000; Селедцов В.И. и др., 2003; Селедцова Г.В. и др., 2008).

Субарахноидальная нейротрансплантация была применена при лечении 9 детей (средний возраст – 12,4 года), больных олигофренией. В результате лечения у этих больных отмечены редукция астенического синдрома, активизация эмоциональной сферы, улучшение познавательной функции и биоэлектрической активности мозга, уменьшение головных болей и головокружений (Брюховецкий А.С., 1996).

Опубликованы данные по результатам выполнения реконструктивных операций, включающих в себя интрацеребральную аллотрансплантацию фрагментов фетальной нервной ткани, у 67 больных эпилепсией с цереброорганическим синдромом антен- и перинатального генеза в возрасте 2-15 лет. Наблюдение в течение 6 лет показало положительную динамику в виде улучшения двигательных функций и снижения частоты эпилептических припад-

ков (76,3%). Эти улучшения коррелировали с уменьшением патологических изменений на электроэнцефалографии (ЭЭГ) и топографических картах мозга. Контрольная компьютерная томография выявила увеличение количества вещества мозга в зонах трансплантации (Берснев В.П. и др., 1998, 1999).

Проблема лечения перинатальных церебральных повреждений не теряет своей актуальности. Это объясняется не только их частотой, но и тяжестью последствий. Имеется сообщение о положительных результатах лечения 14 пациентов с перинатальной патологией ЦНС, которым была выполнена эндолюмбальная трансплантация клеток фетальной ткани. Было, однако, отмечено, что с возрастом возможности коррекции данной патологии снижаются (Аникин А.Ю. и др., 1998; Селедцова Г.В. и др., 2008).

Степень компенсации церебральных расстройств у новорожденных в значительной мере определяется не только тяжестью морфологических изменений, но и сущностью терапевтических воздействий. Реабилитационная терапия перинатальных постгипоксических повреждений нервной системы у новорожденных и детей первого года жизни с помощью фетальной терапии (фетальных тканей мозга человека) стала в конце XX века абсолютно новым этапом в терапии остаточных явлений гипоксически-ишемической энцефалопатии. Фетальные ткани, используемые в лечении, имеют уникальную и натуральную композицию веществ, нормализующих и стимулирующих репаративные процессы, в связи с чем их целесообразно включать в комплекс традиционной терапии (Барашнев Ю.И., 1999). Применяемый в лечении субстрат содержит широкий спектр биологически активных веществ (нейротрофины, гормон роста, ферменты, нейрогуморальные факторы, медиаторы и др.), оказывающих мощное влияние на процессы регенерации аксонов и проводящих путей, метаболизм головного мозга, синаптические и пресинаптические рецепторы мембран и др. Высокий терапевтический потенциал нейтрофинов, например, *in vivo* и *in vitro*, а также в клинической практике при нейрональной дисфункции и болезнях двигательного нейрона подтвержден неоднократно.

Согласно исследованиям, терапия фетальными тканями мозга человека оказывается незаменимой при грубых перинатальных повреждениях мозга, в то время как традиционная терапия с использовани-

ем медикаментозных церебральных стимуляторов (церебролизин, когитум, пирацетам, ГАМК, трентал, энцефабол) оказывается малоэффективной. Лечебный эффект тем выше (наивысшая оценка 10 баллов), чем раньше начата фетальная терапия – в 1-й месяц жизни.

В менее тяжелых ситуациях, когда гипоксически-ишемическая энцефалопатия не сопровождается обширными инфарктами мозга, а речь в основном идет о наличии выраженного и длительного отека и набухания мозговой ткани, лечебный эффект традиционной медикаментозной и фетальной терапии оказывается весьма схожим и достаточно высоким. Разница состоит лишь в том, что при фетальной терапии он может быть получен быстрее.

Первый положительный эффект, наблюдаемый врачом и родителями ребенка, обнаруживается спустя несколько дней после имплантации 3-5 мл суспензии в подкожный жировой слой брюшной стенки новорожденного. Клинически это проявляется повышением двигательной активности, мышечного тонуса и рефлекторной деятельности, появляется или усиливается сосательный рефлекс. Наиболее убедительным аргументом позитивного влияния фетальной терапии является улучшение функциональной активности высших отделов ЦНС, что отражается на ЭЭГ. На 5-10-й день после имплантации резкое угнетение биоэлектрической активности головного мозга, межполушарная асимметрия, пароксизмальные гиперсинхронные разряды эпилептоидного характера и др. изменялись в сторону улучшения биоэлектрической активности, и даже при тяжелых повреждениях продолжительное лечение фетальными тканями мозга человека (до 12 имплантаций в течение 2 лет) приводило к нормализации ЭЭГ (Барашнев Ю.И., 1999).

3.3. Клеточная терапия при болезнях нервно-мышечного синапса и мышц

Мышечная дистрофия – это группа наследственных заболеваний, которые характеризуются прогрессирующей мышечной слабостью и потерей мышечных тканей. В настоящее время все дистрофии считаются заболеваниями неизлечимыми. В некоторых случаях болезнь приводит к смерти.

Мышечные дистрофии различаются по группам поврежденных мышц, возрасту, при котором начинается болезнь, и скорости ее

прогрессирования. Молекулярной причиной, лежащей в основе многих дистрофий, являются мутации в генах, кодирующих компоненты дистрофин-гликопротеинового комплекса, который связывает миофибрильный цитоскелет с внеклеточным матриксом (O'Brien K.F. et al., 2001; Durbeej M. et al., 2002; Ehmsen J. et al., 2002).

Наиболее часто встречается и наиболее тяжело протекает мышечная дистрофия Дюшенна (МДД). МДД поражает мальчиков с частотой, равной 1 на 3500. Она проявляется в 1-2-летнем возрасте и характеризуется потерей независимого передвижения уже к 10 годам. Больные МДД, как правило, умирают в возрасте 15-25 лет от сердечной или легочной недостаточности вследствие атрофии дыхательных и сердечной мышц. Сходными симптомами и причиной возникновения характеризуется мышечная дистрофия Беккера (МДБ), однако протекает это заболевание в менее тяжелой форме. Обе болезни являются следствием мутаций в гене дистрофина, который локализован на коротком плече X-хромосомы и является самым большим из известных генов человека. Он содержит 79 экзонов и составляет приблизительно 0,1% всего генома человека. Этот ген кодирует мышечный белок дистрофин с молекулярным весом 427 кДа, который является основным структурным белком, стабилизирующим сарколемму мышечного волокна. Своим N-концом он связывается с актином – главным компонентом внутриклеточного цитоскелета, а C-концом – с группой дистрофин ассоциированных дистро- и саркогликанов – белков сарколеммы, и через них – с основным белком внеклеточного матрикса – ламинином.

Мутации в гене дистрофина приводят к полному отсутствию или сильному снижению уровня дистрофина в случае МДД или к образованию частично функционального дистрофина в случае МДБ. Отсутствие или функциональная недостаточность этого белка приводит к нарушению целостности клеточной мембраны и является причиной запуска процессов дегенерации мышечного волокна. Результатом этого процесса является повышение проницаемости мембран и возникновение в них физических разрывов, что приводит к выходу ферментов из мышц в сыворотку крови (повышение в сыворотке крови активности креатинкиназы является биохимическим маркером МДД и МДБ). На начальных стадиях заболевания дегенерация мышечных волокон компенсируется активной регенерацией

фибрилл, благодаря делению и слиянию мышечных сателлитных клеток. Однако с возрастом этот процесс становится менее эффективным, что приводит к прогрессирующей мышечной слабости.

В настоящее время при отсутствии эффективных медикаментозных способов возлагаются большие надежды на использование для лечения мышечных дистрофий методов генной и клеточной терапии. Задачей этих способов лечения является восстановление синтеза дистрофина в мышечных клетках, что достигается либо путем встраивания в клетки нормального гена дистрофина, либо коррекцией мутаций в самом гене или в иРНК (Сукач А.Н., 2006; Григорян А.С., 2007; Михайлов В.М., 2010).

Для клеточной терапии мышечных дистрофий рассматривается перспектива использования взрослых СК КМ, клеток пуповинной крови, а также различных «взрослых» мышечных предшественников.

«Взрослые» СК впервые были обнаружены в строме костного мозга (КМ) советским ученым А.Я. Фриденштейном. В настоящее время помимо КМ (Anderson D.J. et al., 2001; Blau H.M. et al., 2001; Krause D.S. et al., 2001) СК обнаружены в большинстве тканей и органов взрослых организмов, включая центральную нервную систему (Rietze R.L. et al., 2001), кожу (Alonso L. et al., 2003), сердечную мышцу (Beltrami A.P. et al., 2003) и скелетную мышцу (Asakura A. et al., 2002; Cao B. et al., 2003).

Стволовые клетки костного мозга. В КМ, основываясь на адгезивных свойствах *in vitro*, различают два типа СК: адгезивные стромальные мезенхимальные СК и неадгезивные гемопоэтические СК. Мезенхимальные СК могут дифференцироваться в клетки кости, хряща, жировой ткани и мышц как *in vitro*, так и *in vivo*. Миогенные клетки могут быть получены *in vitro* при действии на адгезивные мезенхимальные клетки 5-азацитидина (5-azacytidine), который активирует мышечный переключатель MyoD. Субпопуляция мезенхимальных СК также была идентифицирована в мононуклеарных клетках КМ – это CD45⁺/glycophorin⁺ клетки (Jiang Y. et al., 2002). После *ex vivo* экспансии эти мультипотентные взрослые прогениторные клетки могут быть трансплантированы в необлученный организм мышей, где они приживаются и развиваются в гемопоэтические линии, эпителиальные клетки, клетки печени, легких, кишечного эпителия. При введении в раннюю бластоцисту

эти клетки дифференцировались в мышечные. И хотя их способность становиться предшественниками скелетной мышцы при внутривенном введении продемонстрирована не была, свойство этих мультипотентных взрослых прогениторных клеток активно пролиферировать без очевидного старения и потери мультипотенции делает их привлекательным кандидатом для клеточной терапии.

Более перспективными для клеточной терапии мышечных дистрофий являются неадгезивные гемопоэтические СК, которые, помимо гемопоэза, участвуют в формировании нервной ткани, печени, сердечной мышцы (Beltrami A.P. et al., 2003) и скелетных мышц. Было показано, что эти миогенные прогениторы могут мигрировать и участвовать в регенерации поврежденной мышечной ткани после трансплантации КМ. В этом исследовании также было продемонстрировано, что в репарации поврежденных кардиотоксическим мышечных клеток могут участвовать не только клетки КМ, введенные непосредственно в мышцу, но также и введенные внутривенно. В обоих случаях донорские клетки сливались с мышечными волокнами реципиента. Эксперименты по внутривенному введению донорских клеток КМ mdx мышам также продемонстрировали, что трансплантированные клетки попадают из кровеносной системы в мышечную ткань и сливаются с волокнами дистрофических мышц mdx мышей (Ferrari G. et al., 2001). Однако во всех этих экспериментах репарация дистрофических мышц трансплантированными клетками КМ никогда не превышала 1%. Это можно объяснить как слабым захватом клеток КМ, так и неспособностью стволовых клеток КМ адекватно реагировать на клеточные сигналы реципиента.

Несмотря на то, что использование клеток КМ для лечения модели МДД у животных оказалось неэффективным, существует мнение некоторых исследователей, что трансплантация КМ для лечения мышечной дистрофии у людей будет более эффективной. Способность СК КМ человека участвовать в репарации мышечных волокон была продемонстрирована Gussoni с соавторами (Gussoni E. et al., 2002). Они представили иммуногистохимический и FISH анализ мышц мальчика, которому в возрасте 1 года для лечения тяжелого X-связанного иммунодефицита, диагностированного Вместе с МДД, была проведена трансплантация КМ. При этом, в 12

лет МДД имела умеренное протекание, а в мышцах больного через 13 лет после трансплантации было обнаружено присутствие диплоидных донорских ядер (0,5-0,9% мышечных волокон), что указывает на способность экзогенных клеток КМ человека сливаться со скелетными мышечными волокнами реципиента и сохраняться на протяжении, по крайней мере, 13 лет.

Таким образом, несмотря на возможность взрослых гемопоэтических СК сливаться с дистрофическими скелетными мышечными волокнами, частота таких случаев слишком низка для того, чтобы быть эффективным способом лечения мышечных дистрофий.

Клетки пуповинной крови. Очень близки по свойствам клеткам КМ клетки пуповинной крови. В их составе также присутствуют как кроветворные, так и мезенхимальные СК (Romanov Y.A. et al., 2003). Применение этих клеток лишено морально-этических ограничений, их легко получать, количество СК в пуповинной крови значительно больше, пролиферативный потенциал выше, они не отягощены грузом генетических мутаций, накопленных взрослыми соматическими СК КМ. Клетки пуповинной крови менее иммунологически зрелые. Эксперименты, проведенные на мышах (Kong K.Y. et al., 2004), продемонстрировали, что миогенные прогениторы (предшественники) присутствуют в пуповинной крови человека и способны мигрировать и дифференцироваться в миоциты. Однако, как и в случае СК КМ, до сих пор отсутствуют доказательства эффективного терапевтического действия клеток пуповинной крови при их использовании для лечения мышечных дистрофий. Как и для всех остальных потенциальных источников клеток для лечения мышечных дистрофий, существуют методические проблемы, связанные с выделением из пуповинной крови популяции миогенных предшественников и их дальнейшей экспансией в условиях *in vitro*.

Мышечные стволовые клетки. Первыми идентифицированными «взрослыми» мышечными прогениторными клетками были сателлитные клетки (SatK) мышц – коммитированные, покоящиеся мышечные предшественники, которые располагаются между сарколеммой мышечных волокон и их базальной мембраной. Активированные SatK делятся на дочерние клетки и дифференцируются в одноядерные миобласты, которые затем либо сливаются между собой и образуют новые мышечные волокна, либо сливаются с существующими мышечными волокнами.

Результаты исследований роста мышц и их регенерации дают основание предположить, что активированные СатК, возможно, пополняют свой пул путем асимметричного деления. Мышечные СатК возникают в процессе позднего эмбрионального миогенеза и, вероятно, отличаются по происхождению от других миогенных предшественников. Есть несколько гипотез, объясняющих их происхождение. В частности, было обнаружено, что СатК развиваются из спинной аорты эмбрионов *c-met*^{-/-} мышей. Скорее всего, мышечные СатК представляют собой субпопуляцию не дифференцировавшихся в процессе эмбрионального миогенеза миобластов, которые остались связанными с поверхностью развивающихся мышечных волокон. СатК гетерогенны по экспрессии CD34 и *myf*-5. Также существует популяция этих клеток, не экспрессирующая никаких маркеров. Сразу после активации СатК быстро вступают в клеточный цикл и проходят миогенез, аналогичный эмбриональной миогенной программе. *In vivo* активированные СатК ограничены мышечной линией, однако *in vitro* помимо мышц показано их участие в адипо- и остеогенезе (Wada M.R. et al., 2002).

Rax3-экспрессия в клетках-предшественниках вносит вклад в миогенную экспансию клеток. После индукции первичными миогенными факторами *Myf*5 и/или *MyoD* мезодермальные сомитные клетки коммитируются в миогенные линии (миобласты). Позже действие вторичных миогенных регуляторных факторов (миогенин и MRF4) индуцирует окончательную дифференциацию миобластов в миоциты, которые в дальнейшем сливаются, образуя многоядерные мышечные волокна. Во время более поздней фазы эмбрионального миогенеза субпопуляция миобластов, происходящая из сателлитных клеток, сливается с существующими мышечными волокнами, что позволяет им расти. Некоторые сателлитные клетки остаются связанными с мышечными волокнами в покоящемся недифференцированном состоянии. Эмбриональное происхождение сателлитных клеток остается еще не доказанным, однако Rax7 экспрессия является необходимой для спецификации/экспансии популяции сателлитных клеток (Charge. S.B. et al., 2004).

СатК были одним из первых типов клеток, используемых в клеточной терапии мышечных дистрофий. СатК, которые выращиваются *in vitro*, представляют собой моноклеарные клетки, коммитированные по миогенному пути (миобласты). Эксперименты по внутри-

мышечной трансплантации миобластов, изолированных из мышей дикого типа, mdx мышам продемонстрировали экспрессию дистрофина *in vivo*. Эти исследования послужили основанием проведения клинических испытаний миобластов с целью лечения МДД. Для этого донорские СатК были изолированы в результате биопсии мышц у близких родственников больных детей. Затем эти клетки выращивались в условиях *in vitro*, после чего 80-100 млн. донорских миобластов было введено в мышцы детей путем множественных инъекций. Контрлатеральные мышцы были инъецированы как контроль плацебо. Однако, иммуногистохимические и RT-PCR исследования мышц больных, которые проводились на протяжении года, показали, что трансплантация миобластов таким способом была неэффективна. Несмотря на то, что пересаженные миобласты действительно сохранялись и продуцировали дистрофин в мышечных волокнах пациентов с МДД, частота, при которой это встречалось, была очень низкой (<1%). Поэтому неудивительно, что не было зарегистрировано никакого функционального или клинического выздоровления. Эксперименты на мышах по использованию миобластов для лечения МДД также показали, что уже через 24 ч после трансплантации 90% гетерологичных миобластов погибает или исчезает из места трансплантации, 5% находятся в покоем состоянии, 5% сливаются с пораженными мышечными волокнами, но только в половине из них (2,5%) наблюдается синтез дистрофина.

При этом трансплантация миобластов характеризуется минимальной миграцией клеток после инъекции и иммунным отторжением (Urish K. et al., 2005), которое является одной из причин низкой степени выживания клеток. После внутримышечной инъекции пациентам с МДД высокого количества миобластов, полученных у здоровых близких родственников, правильно подобранная иммуносупрессия позволяет уже через месяц увеличить количество мышечных волокон, синтезирующих дистрофин до 10% (Camirand G. et al., 2004). Эти исследования указывают, с одной стороны, на важность использования адекватной иммуносупрессии при трансплантации миобластов, а с другой – на необходимость оптимизации метода трансплантации клеток, что включает наряду с определением оптимального количества клеток, частоту их введения и место трансплантации.

Следует заметить, что, по мнению некоторых исследователей, способность мышцы восстанавливаться после повреждения являет-

ся заключительным этапом миогенеза, начало которого закладывается в процессе эмбриогенеза и включает в себя стадию индукции миогенных регуляторных факторов и позиционных стимулов, диктующих направление клеточной дифференциации, пролиферацию и окончательную дифференциацию во взрослую мышцу (Zhao P. et al., 2004), что указывает на ограниченный миогенный потенциал мышечных СатК. Поэтому, несмотря на достаточно активные исследования, направленные на оптимизацию метода трансплантации миобластов для лечения мышечных дистрофий, многие исследователи все же склоняются к использованию для этих целей более примитивных предшественников мышечных клеток. Они справедливо считают, что эти миогенные СК будут не только сливаться с существующими мышечными волокнами реципиента, но также будут способны пролиферировать, дифференцироваться в нужном направлении и формировать новые миосимпласты. Как полагают, более примитивными мышечными предшественниками по сравнению с СатК являются мультипотентные мышечные стволовые клетки (Cao B. et al., 2003; Qu-Petersen Z. et al., 2002), мышечные SP клетки, мышечные СК гемопоэтического происхождения, и СК мышц, устойчивые к большим дозам радиации.

Мультипотентные мышечные стволовые клетки. ММСК экспрессируют как миогенные маркеры (положительные на desmin, myogenin и myoD), так и маркеры стволовых клеток (flk-1, sca-1, CD34). Они не экспрессируют c-kit, CD45 или другие маркеры клеток крови. ММСК могут быть экспандированы *in vitro* на протяжении более 30 пассажей без изменения кариотипа, могут быть генетически модифицированы для экспрессии минидистрофина и галактозидазы, могут дифференцироваться в клетки мышечной, нервной и эндотелиальной тканей *in vitro* и *in vivo* (Qu-Petersen Z. et al., 2002). ММСК обладают способностью заселять КМ и восстанавливать кроветворение у смертельно облученных mdx мышей при введении внутривенно. Они способны попадать в дистрофические мышцы и участвовать в их регенерации (Cao B. et al., 2003). Таким образом, клоны ММСК могут быть экспандированы с сохранением миогенного потенциала после гематопоэтической дифференциации. Также была показана способность этих клеток мигрировать из кровотока в поврежденные мышцы после их внутриартериальной инъекции mdx мышам (Torrente Y. et al., 2001).

SP (side population) клетки. Другой субпопуляцией взрослых мышечных предшественников, обнаруженных в мышцах и в КМ, являются так называемые SP (side population) клетки. Эта популяция мультипотентных клеток характеризуется тем, что они активно вытесняют краситель Hoechst 33342, благодаря активности на клеточной поверхности ABC переносчика ABCG2 (Zhou S. et al., 2001; Zhou S. et al., 2002). Мышечные SP клетки негативны на c-kit и CD45. Значительная часть SP клеток положительна на CD34. При внутривенной трансплантации смертельно облученным самкам mdx мышей мышечные SP клетки способны восстанавливать гемопозз. При этом на 17-28-й день после трансплантации донор-производные (Y+ ядра) дистрофин-положительные мышечные волокна были найдены у 9% волокон mdx мышей.

Следует заметить, что мышечные SP клетки отличаются еще и тем, что могут быть изолированы из мышц Pax 7-дефицитных мышей, которые не имеют миогенных SatK, что указывает на уникальность этой популяции клеток. При этом нефракционированные мышечные SP клетки могут образовывать как скелетные мышечные волокна, так и SatK после внутримышечной инъекции. Также они способны становиться мышечными клетками при Совместном культивировании с первичными миообластами (Asakura A. et al., 2003).

Стволовые клетки мышц, устойчивые к большим дозам радиации. Известна также популяция клеток, которые вносят вклад в репарацию мышц после больших доз радиации. Облучение большими дозами (18 Gy) блокирует регенерацию в мышцах mdx мышей, ингибируя митоз в пролиферирующих миобластных/сателлитных клетках. Однако дальнейшее введение myotoxin potexin (разрушает зрелые мышечные волокна, но не затрагивает моноклеарные клетки, включая сателлитные) приводит к регенерации мышц. Анализ этого явления у нормальных и дистрофических мышей после облучения показал высокий уровень пролиферации мышечных клеток-предшественников. Они, вероятно, являются резидентными стволовыми клетками.

Следует заметить, что перспектива использования взрослых СК для клеточной терапии вообще и мышечных дистрофий в частности имеет достаточно много критиков.

В частности, многими исследователями подвергается серьезным сомнениям сама возможность взрослых СК к трансдиффе-

ренциации (Castro R.F. et al., 2002; Wagers A.J. et al., 2002; Schulze M. et al., 2005). Так, исследование, проведенное группой Т. Брауна, противоречит мнению о том, что взрослые мезенхимальные СК КМ или локальные СК участвуют в восстановлении сердечных и скелетных мышц путем трансдифференциации в мышечные клетки. Исследователи продемонстрировали, что все случаи, в которых функциональные клетки скелетной мышцы вырастали из мезенхимальных СК, на самом деле основывались на слиянии мезенхимальных СК с уже дифференцированными мышечными клетками (Schulze M. et al., 2005). Сливаясь с клетками восстанавливаемой ткани, эти клетки, скорее всего, только имитируют механизм трансдифференциации, что указывает на их ограниченную способность восстанавливать поврежденные мышцы. Следует отметить, что в процессе постнатального развития наблюдается снижение способности СК к хоумингу (Liang Y. et al., 2005). Некоторые исследователи полагают, что в ДНК взрослых СК накапливаются мутации, и ее информация постепенно деградирует. Другие указывают на возможность накопления мутаций в ДНК митохондрий, в которых отсутствует механизм восстановления.

Существует также мнение о том, что СК стареют и утрачивают способность к самовозобновлению. Культивирование СК *in vitro* проводится в условиях, сильно отличающихся от условий *in vivo*, что может приводить к существенным изменениям как генетической программы этих клеток, так и их реакции на влияние внешних факторов и регуляторов (подобных ростовым факторам и цитокинам). Все эти изменения, происходящие как в процессе постнатального развития СК, так и в процессе культивирования *in vitro*, могут, в конечном итоге, приводить к ограничению их способности к миграции, самовозобновлению, пролиферации, дифференциации, а также к неадекватной реакции на клеточные сигналы микроокружения в организме реципиента. К тому же в настоящее время нет эффективных методов выращивания «взрослых» СК – в культуре они растут чрезвычайно медленно. Одним из препятствий клинического применения «взрослых» СК также является малочисленность их популяции в тканях и трудности выделения.

Эмбриональные стволовые клетки. Источником мышечных прогениторов для клеточной терапии мышечных дистрофий могут

также служить ЭСК – клетки внутренней клеточной массы бластоцисты человека. Они тотипотентны и характеризуются свойством самовозобновления. Эти клетки могут быть экспандированы *in vitro* на протяжении длительного периода времени, оставаясь в недифференцированном состоянии. Теоретически, ЭСК являются неограниченным источником клеток, способных дифференцироваться во все типы клеток, включая и мышечные. Однако, длительная экспансия ЭСК достаточно сложная и длительная процедура, требующая постоянного присутствия стромальных (фидерных) клеток, дорогостоящих цитокинов (EGF, FGF, SCF, LIF, IL-6), а также своевременной дезагрегации и пересева клеток. Невыполнение хотя бы одного из перечисленных условий приводит к уменьшению СК в культуре за счет их дифференциации или гибели.

С возрастом срока культивирования ЭСК возрастает вероятность возникновения генетических мутаций, которые будут накапливаться в последующих клеточных поколениях. Помимо этого, в настоящий момент нет точного понимания молекулярных путей, лежащих в основе формирования органов, и не определены факторы, которые необходимы и достаточны для формирования специфических типов клеток. В случае клинического применения ЭСК существует потенциальная опасность образования нежелательных клеток, тканей и даже формирования тератом. Эта опасность проистекает, главным образом, из плюрипотентности ЭСК, и их способности образовывать все клетки эктодермы, энтодермы и мезодермы. Для широкого применения ЭСК в клинической практике предстоит решить ряд достаточно сложных задач: разработать методы, позволяющие получать достаточное количество направленно дифференцированных в мышечные предшественники ЭСК, а также способы устранения плюрипотентных и частично дифференцированных клеток, которые могут вносить вклад в озлокачествление тканей (Cramer A.O., MacLaren R.E., 2013; Qiu Z. et al., 2013; Compagnucci C. et al., 2014; Imaizumi Y., Okano H., 2014).

ЭСК цитогбридов. Другим источником мышечных предшественников могут быть ЭСК, полученные в результате межвидовой цитогбридизации (Hochedlinger K. et al., 2003), которая позволяет получать гибридные бластоцисты (например, человека и свиньи, человека и коровы). Межвидовая цитогбридизация позволяет получать ЭСК с геномом человека без использования фетальных тка-

ней человека. Этот метод теоретически позволяет получать нелимитированные количества ЭСК с геномом реципиента и далее их использовать для трансплантации без риска иммунных осложнений, избавляя при этом от морально-этических проблем. Однако существует ряд научных проблем, стоящих на пути терапевтического использования цитогибридов. Во первых, стареющие постмитотические клетки характеризуются накоплением генетических ошибок и мутаций. Большой проблемой также является относительно неэффективное перепрограммирование донорского ядра обратно в плюрипотентное состояние (Jaenisch R., 2004).

Таким образом, СК, полученные в результате межвидовой гибридизации эмбрионов, могут характеризоваться большим количеством мутаций и ошибок (не говоря уже о наследственных заболеваниях), что способно лишить их эффективности, или, хуже того, стать причиной их онкологической трансформации. Необходимо заметить, что правовые и этические аспекты в области межвидовой гибридизации эмбрионов все еще остаются непроработанными.

Мышечные предшественники эмбрионов ранних сроков развития. Потенциальным источником клеток для клеточной терапии мышечных дистрофий являются миогенные предшественники, полученные из абортивных эмбрионов человека ранних сроков гестации. Эти клетки обладают существенным недостатком, ограничивающим их клиническое использование это морально-этические проблемы, связанные с их получением. Наряду с этим, они имеют достаточно много преимуществ перед постнатальными миогенными предшественниками. Во-первых, миогенные клетки эмбрионов человека включают в себя, помимо окончательно дифференцированных, вышедших из клеточного цикла и активно формирующих мышечные волокна миоцитов, мезодермальные СК и коммитированные в мышечном направлении миобласты, которые характеризуются высокой степенью самовозобновления, пролиферации, миграции и пластичности. Во-вторых, миогенные предшественники эмбрионов человека представляют собой достаточно гетерогенную по происхождению клеточную популяцию, что позволяет надеяться на их способность формировать в организме реципиента не только волокна скелетных мышц, но также и клетки, например, сердечной поперечно-полосатой мышечной ткани. В-третьих, эмбрионы человека ранних сроков гестации характеризуются практически полным отсутствием

на клеточной поверхности молекул главного комплекса гистосовместимости. Это определяет их низкую иммуногенность после трансплантации. И хотя нельзя полностью отказываться от иммуносупрессии при трансплантации этих клеток, она может быть минимальной как по времени, так и по интенсивности. В-четвертых, эмбриональные стволовые и прогениторные клетки характеризуются отсутствием приобретенных генетических нарушений.

Мезангиобласты. Это популяция мезодермальных стволовых клеток, выстилающих поверхность некоторых эмбриональных сосудов (Minasi M.G. et al., 2002). Эти клетки являются еще одним потенциальным источником взрослых СК для клеточной терапии мышечных дистрофий. Они экспрессируют маркеры ангиобластов, такие как Sca-1, Flk-1, и CD34, а также гены, типичные для мезодермы, включая рецепторы и сигнальные молекулы классических индукторов мезодермы, такие как BMP, Wnt и Notch. Мезангиобласты могут быть экспандированы *in vitro*, при действии на них цитокинов или при сокультивировании с другими клетками мезодермального происхождения (Minasi M.G. et al., 2002) способны дифференцироваться в большинство тканей, имеющих мезодермальное происхождение, включая кровь, хрящ, кость, гладкие скелетные и сердечные мышцы.

Мезангиобласты обладают удивительной способностью к хоумингу в поврежденную мышечную ткань и активно восстанавливают поврежденные мышцы (Sampaoles M. et al., 2003; Palumbo R. et al., 2004; Cossu G., 2003). Внутриартериальное введение мезангиобластов, меченных лентивирусным вектором, экспрессирующим саркогликан, мышам с моделью тазово-поясничной мышечной дистрофии (Sampaoles M. et al., 2003) продемонстрировало, что они накапливаются в капиллярах и затем мигрируют в области мышечной недостаточности или воспаления, и, в конечном итоге, исправляют морфологически и функционально дистрофические мышцы (Sampaoles M. et al., 2003). Многократные внутриартериальные трансплантации мезангиобластов привели к образованию через 4 месяца после введения более чем 50% положительных на саркогликан мышечных волокон. Помимо нового потенциального источника СК для лечения мышечных дистрофий, эти исследования показали перспективность внутриартериального способа введения клеток при клеточной терапии (Сукач А.Н., 2006).

В последние годы для лечения наследственных миопатий (главным образом, миопатии Дюшенна) в эксперименте и в клинике используют трансплантацию скелетных миобластов и клеток костного мозга (Emery A.E., 2002). Однако исследователи не удовлетворены результатами таких трансплантаций в связи с гибелью клеток, иммунным ответом и быстрой «потерей эффекта» (Emery A.E., 2002; Dell'Agnola C. et al., 2004). Поэтому продолжается поиск клеточных популяций, которые были бы способны стабильно и длительно поддерживать достаточный уровень белка дистрофина (с дефицитом которого связано развитие миопатии Дюшенна – МД) в поражённых мышцах без иммунных реакций.

Известно, что как аутогенные, так и аллогенные стволовые клетки способны стимулировать синтез дистрофина в мутантных миобластах мышеч (Qu-Petersen Z. et al., 2002). Однако мышцы не демонстрируют клинических проявлений заболевания, а потому не могут считаться подходящим модельным объектом. Одной из лучших моделей МД считаются mxd-собаки (Dell'Agnola C., et al., 2004). Оказалось, что миопатия Дюшенна сходным образом протекает у человека и у золотистого ретривера (порода собак), поэтому именно данную mxd-модель использовали авторы работы. У этих собак, как и у человека, при недостатке дистрофина наблюдается сильная дегградация мышечных волокон, что приводит к параличу сначала скелетной, а затем пищеварительной и дыхательной мускулатуры, в результате чего они погибают, не достигнув годовалого возраста.

Исследователи использовали в качестве трансплантата обнаруженные ими ранее взрослые стволовые клетки – мезангиобласты, которые получали из фрагментов биопсийного материала мышц (Minasi M.G. et al., 2002). Клетки имели фенотип CD13VCD44VCD34-/CD45VCD31VCD117. Мезангиобласты являются самообновляющейся популяцией и, вместе с тем, коммитированы к развитию в миобласты (Minasi M.G. et al., 2002). Мезангиобласты демонстрируют неоспоримые преимущества перед другими взрослыми клетками, также способными дифференцироваться и мигрировать в скелетные мышцы. Их достаточно легко изолировать и поддерживать в культуре, при этом они не теряют способности развиваться в миобласты. При трансфузии мезангиобластов в крупные артерии они трансмигрируют через сосудистые стенки и

приживляются в повреждённых мышцах, стимулируя быстрые процессы регенерации (Galvez B.G. et al., 2006).

Эксперимент проводили на 13 собаках, которые получали либо аллогенные несовместимые донорские мезангиобласты от здоровых особей, либо – аутогенные, но с введением конструкции, несущей ген микродистрофина (укороченной формы дистрофина). Трансфекция проводилась для коррекции генетического повреждения, которое несли аутогенные клетки, а укороченная форма белка использовалась потому, что она способна выполнять все функции полноразмерной молекулы, но при этом гораздо легче встраивается в вирусный вектор (Bachrach E. et al., 2004). При трансплантации как аутогенного, так и аллогенного материала проводилась сопутствующая иммуносупрессия по различным схемам. Для увеличения эффективности терапии трансфузии клеток проводились до пяти раз с интервалом в месяц. Наблюдение за собаками осуществлялось от 5 до 13 месяцев после завершения эксперимента в зависимости от их выживаемости.

Трансфузия как аутогенных, так и аллогенных мезангиобластов приводила к восстановлению экспрессии дистрофина во всех группах мышц экспериментальных животных. Белок обнаруживался не только в мышцах конечностей (трансфузии проводились в бедренную артерию), но и в местах удалённых от области первичного введения клеток. Это свидетельствует о том, что мезангиобласты способны к значительной миграции. Более того, в регенерирующих мышцах обнаруживался не только сам дистрофин, но и р-саркогликан, являющийся компонентом дистрофиновой системы. При введении мезангиобластов в грудную ветвь аорты было показано наиболее сильное распространение их по мышечной системе организма, а также наилучшая степень регенерации.

Результаты исследования оказались обнадеживающими: животное, получившее аортальную трансфузию аллогенных клеток, практически полностью восстановило способность нормально двигаться, остальные же продемонстрировали улучшения в несколько меньшей степени. В целом, те собаки, которые получили трансфузии именно аллогенных, но не аутогенных трансфецированных вектором мезангиобластов, демонстрировали более быстрое и эффективное улучшение качества жизни. Некоторые их мышцы, судя по биопсиям, после лечения практически не отличались от здоровых, другие же, несмотря на неполное восстановление, всё же мог-

ли выполнять свои функции. При дополнительном введении аллогенных мезангиобластов собакам, уже получавшим аутогенные клетки, также наблюдалось выздоровление. Таким образом, эти различия нельзя связывать со временем начала терапии.

Более выраженный эффект был получен при введении именно аллогенных клеток. Можно предположить, что если метод будет перенесён в клинику для терапии МД, при HLA-несовместимости донора и реципиента, пациент после трансплантации должен подвергаться пожизненной иммуносупрессии. Это, в свою очередь, может приводить к тяжёлым побочным эффектам. Возможно, в будущем удастся разработать более адекватный метод генетической коррекции аутогенных клеток. Решением проблемы может стать введение в вектор полноценной копии гена дистрофина. Кроме того, авторами использовался ген человеческого микродистрофина, что могло повлиять на результаты эксперимента.

Предложенный метод перспективен, требует дальнейшей разработки и, возможно, клинических испытаний. Это связано, в частности, с тем, что мезангиобласты могут применяться не только в случаях миопатии Дюшенна, но и при других миодегенеративных заболеваниях. Так, этой же группой авторов было показано, что мезангиобласты могут восстанавливать функцию мышц при некоторых других типах миодистрофий (Cossu G. et al., 2004). На данный момент таких заболеваний насчитывается около двадцати. Возможно, именно это направление окажется одним из наиболее перспективных для применения взрослых стволовых клеток в клинике (Григорян А.С., 2007).

Таким образом, следует надеяться, что СК и мышечные клетки-предшественники эмбрионов человека ранних сроков гестации при попадании в поврежденные мышечные ткани реципиента будут адекватно реагировать на клеточные сигналы микроокружения, активно пролиферировать и дифференцироваться, формируя здоровые вторичные мышечные волокна, а также сливаться с уже существующими волокнами, способствуя их репарации.

На сегодняшний день существует достаточно обширный круг потенциальных источников соматических или эмбриональных стволовых/прогениторных клеток человека, которые могут использоваться как в качестве объектов приложения генно-инженерных методов, так и для клеточной терапии мышечных дистрофий. Од-

нако для их широкого внедрения в клиническую практику необходимо решить ряд проблем как морально-этического (касательно эмбриональных клеток человека), так и методического плана. Для успешного применения методов клеточной терапии с целью лечения мышечных дистрофий необходимо:

1. Определить оптимальный тип донорских клеток, которые:
 - а) являются ранними мышечными предшественниками и обладают способностью к образованию как мышечных волокон, так и клеток сердечной мышечной ткани;
 - б) обладают высокой степенью пролиферации, пластичности и способностью к самовозобновлению;
 - в) способны адекватно реагировать на сигналы микроокружения реципиента;
 - г) способны направленно мигрировать в мышечную ткань и легко в нее встраиваться (интегрироваться);
 - д) обладают низкой степенью иммунореактивности (иммунологически толерантны) и хорошо приживаются в тканях реципиента.
2. Разработать эффективные, максимально приближающиеся к условиям *in vivo* методы культивирования и экспансии клеток *in vitro*.
3. Определить наиболее предпочтительный способ введения клеток пациенту (внутримышечный, внутривенный либо внутриартериальный).
4. Определить оптимальное количество клеток для одноразовой трансплантации и оптимальную частоту трансплантаций.
5. Установить молекулярные механизмы, способствующие миграции донорских клеток в поврежденные мышечные ткани, их включению в эти ткани и эффективному приживлению и функционированию.
6. Установить оптимальные терапевтические процедуры, направленные на максимальное снижение риска отторжения трансплантированных клеток.

Решение этих вопросов, помимо определения оптимального источника клеток и стратегии их введения в каждом конкретном случае, позволит определить проведение оптимальных терапевтических процедур до и после трансплантации клеток. Это, с одной стороны, позволит избежать отторжения трансплантированных клеток (имму-

носупрессия), а с другой обеспечит эффективную направленную миграцию клеток с их последующей интеграцией в необходимые ткани и их трофическую поддержку (введение определенных ростовых факторов, цитокинов, хемокинов) (Сукач А.Н., 2006).

3.4. Клеточная терапия при нейродегенеративных болезнях

Для предотвращения вторичной гибели нейронов и дегенерации аксонов, поддержания роста нервных волокон при травмах головного и спинного мозга, ишемических инсультах и нейродегенеративных заболеваниях одним из перспективных подходов представляется применение клеточных технологий, нейротрансплантация эмбриональных стволовых клеток, предифференцированных в нейральном направлении прогениторных клеток и нейральных стволовых клеток. Однако клиницисты сталкиваются с этическими проблемами.

Подготовленные для трансплантации стволовые клетки должны иметь предсказуемые и воспроизводимые характеристики, а именно:

- сохранять жизнеспособность;
- активно размножаться с образованием достаточного для восстановления утраченного количества клеток;
- интегрироваться с клетками органа-реципиента;
- дифференцироваться в требуемые клеточные типы;
- восстанавливать тканевый матрикс и формировать направляющие пути для роста аксонов;
- участвовать в процессе миелинизации;
- оказывать трофическое и нейропротекторное действие;
- стимулировать рост аксонов.

При этом вряд ли можно рассчитывать на замещение погибших нейронов трансплантированными клетками. Результаты клеточной терапии при нейродегенерации указывают на восстановление чувствительной и (в меньшей мере) двигательной функции, но выраженность положительного эффекта в большинстве случаев незначительна. Для трансплантации в головной или спинной мозг применяют: 1) эмбриональные стволовые клетки, 2) стволовые мезенхимные клетки костного мозга (мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки) и 3) стволовые клетки пуповинной крови.

Эмбриональные стволовые клетки. Получают из внутренней клеточной массы бластоцисты. Из бластоцисты 4-5-х суток развития методом иммунохирургии (при помощи антител, вызывающих повреждение клеток трофобласта) внутреннюю клеточную массу отделяют от трофэктодермы. Полученные клетки культивируют *in vitro* с целью выделения чистой клеточной линии, способной формировать шарообразные скопления – эмбриоидные тела. К характерным маркёрам эмбриональных стволовых клеток относятся: SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, Oct-4. С помощью специфических факторов роста можно направлять дифференцировку диссоциированных клеток эмбриоидных тел. Фактор роста гепатоцитов (HGF) и фактор роста нервов (NGF) стимулируют дифференцировку клеток всех трёх зародышевых листков. Ретиноевая кислота, фактор роста эпидермиса (EGF), костный морфогенетический белок 4 (BMP4) и щелочной фактор роста фибробластов (FGFb) индуцируют дифференцировку клеток, образующихся из эктодермы. Производные мезодермы можно получить путём воздействия на стволовые клетки трансформирующим фактором роста 31 (TGF-31) и активин-А.

Эмбриональные половые клетки. Выделяют из эмбриоидных тел, которые формируются при культивировании примордиальных половых клеток, полученных из половых валиков эмбриона 5-9-й неделе развития. Для диагностики ЭПК применяют следующие маркёры: SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81. С помощью различных факторов роста из эмбриональных половых клеток получены специализированные клетки – производные всех трёх зародышевых листков.

Для нейротрансплантации применяют:

- клетки, полученные из эмбриоидных сфер;
- предифференцированные нейральные клетки;
- дифференцированные нервные клетки;
- генетически модифицированные клетки, экспрессирующие

нейротрофические факторы или нейральные молекулы адгезии (Liew C.G. et al., 2007).

В эксперименте на крысах эмбриональные стволовые клетки, полученные из зародышевых клеток человека, после однократной инъекции в цереброспинальную жидкость восстанавливали двига-

тельную активность парализованных животных, инфицированных вирусом Sindbis (Kert D.A. et al., 2003). Вместе с тем установлено, что после трансплантации эмбриональных стволовых клеток мыши в головной мозг крыс в 20 случаях из трансплантированных клеток возникают тератомы (Bjorklund L.M. et al., 2002).

Риск опухолевой трансформации эмбриональных стволовых клеток может быть снижен, если клетки *in vitro* предварительно были подвергнуты дифференцировке в нейральные предшественники. Чаще применяют эмбриональные стволовые клетки, предифференцированные в нервные клетки, экспрессирующие фенотип дофаминергических нейронов для терапии болезни Паркинсона (Zhang S.C. et al., 2001) или холинергические нейроны (Hendricks W.A. et al., 2006) для нейротрансплантации в спинной мозг при дегенеративных заболеваниях и травмах. Однако по причине высокой вероятности трансформации стволовых клеток в опухолевые и контаминации неизвестными инфекционными агентами из материала животных, используемого для культивирования клеток, применение стволовых клеток человека в клеточной терапии было ограничено лишь экспериментальными исследованиями. В США 9 августа 2001 года был принят закон о финансировании лабораторных исследований эмбриональных стволовых клеток человека известных линий и удовлетворяющих специфическим критериям (<http://grants.nih.gov/grants/guide/notice-files/NOT-OD-02-006.html>).

Стволовые мезенхимные клетки красного костного мозга (мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки). Клетки с фенотипом CD29+, CD34+, CD44+, CD90+, CD106+, CD105VSH2+, CD73VSH3+, Sca-1+, Thy-1+, BMPFT относятся к самообновляющейся клеточной популяции, из которой образуются стромальные клетки Stro-1+, экспрессирующие маркёры стволовых клеток (CD34, Sca-1). MMCK, а также её дочерние стромальные клетки могут дифференцироваться в жировые, костные, хрящевые клетки (Jiang Y. et al., 2002). Дальнейшие исследования потенциальных возможностей MMCK обнаружили её трансдифференцировку в клетки других зародышевых листков. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* установлено, что MMCK может быть дифференцирована в нейральном и миелином направлении (Jiang Y. et al., 2002). MMCK человека, трансплантированные в головной мозг крысы, давали начало астроцитам, а в культуре клеток были получены

нейроны, экспрессирующие фенотипы холинергических, дофаминергических, глутаматергических нейронов (Dezawa M., 2006).

Широкие перспективы в применении собственных мезенхимных стволовых клеток костного мозга в клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний открывают:

- доступность клеточного материала;
- возможность трансплантации аутогенных клеток;
- отсутствие признаков образования тератомы;
- снятие множества этических вопросов.

После нейротрансплантации дофаминергических нейронов, дифференцированных из ММСК, животным с моделью болезни Паркинсона был обнаружен выраженный положительный терапевтический эффект, что и явилось отправной точкой для клинических испытаний лечения болезни Паркинсона.

Другим, не менее важным свойством ММСК является их способность к миграции. Так, после внутривенной трансфузии ММСК выселяются не только в органы гемопоэза. Например, трансплантированные клетки мигрируют в область ишемии головного мозга при моделировании инсульта у крыс (Lu L. et al., 2005). Таким образом, ММСК красного костного мозга, инъецированные в кровь, целенаправленно мигрируют к мест у нейродегенерации и способны дифференцироваться в нейроны и глиальные клетки.

Из 20-100 мл аспирата красного костного мозга через 2 недели экспансии из клеточной культуры можно получить 10×10^6 ММСК, что достаточно для нейротрансплантации человеку (Dezawa M., 2006).

Стволовые клетки пуповинной крови. К настоящему времени охарактеризованы выделенные из пуповинной крови стволовая кроветворная клетка (CD34+, CD31+, CD59+, Sca-1+, Thy1+, Oct-4+, Nanog+, SOX2+, FGF-4+), ММСК, прогениторная эндотелиальная клетка (CD34+, GATA2+, Flk-1+); SP (side population) клетка, способная дифференцироваться в миогенном и кроветворном направлениях, а также клетки, экспрессирующие специфические CD-маркеры и дающие начало разным клеточным типам.

После подтверждения трансдифференцировки стволовой кроветворной клетки и ММСК в нейральном направлении (Mazzini L. et al., 2003 и др.) начались интенсивные исследования по нейротрансплантации этих клеток в эксперименте.

Признанной экспериментальной моделью нейродегенерации считается модель бокового амиотрофического склероза. Трансплантация пуповинных клеток крови человека трансгенным мышам G93A продлевала их жизнь, а терапевтический эффект зависел от количества трансплантированных клеток. Было показано, что введенные внутривенно клетки пуповинной крови мигрировали преимущественно в места дегенерации нервной ткани, хотя эти клетки также были обнаружены и в других органах (Garbuzova-Davis S. et al., 2003). Кроме того, было установлено, что трансплантированные клетки человека экспрессировали нейрональные маркеры (например, нестин, нейрональная форма р-тубулина, GFAP).

К настоящему времени проведен анализ эффективности генно-клеточной терапии у трансгенных мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза (Мухамедьяров М.А. и др., 2012). Проведены доклинические исследования терапии бокового амиотрофического склероза с помощью генетически модифицированных мезенхимных клеток пуповины (Ризванов А.А. и др., 2012).

При моделировании инсульта у крыс трансплантация клеток пуповинной крови уменьшала клинические проявления ишемии мозга (Chen J. et al., 2001). Таким образом, вместе с появлением доказательных экспериментов по эффективности трансплантации клеток пуповинной крови животным с фенотипом нейродегенеративных заболеваний человека, наряду с клиническими испытаниями по аутотрансплантации CD34-позитивных клеток периферической крови больным амиотрофическим латеральным склерозом без видимого улучшения, становится очевидным, что применение стволовых клеток пуповинной крови является одним из перспективных направлений в клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний.

Генетически модифицированные стволовые клетки. Для повышения эффективности нейротрансплантации в настоящее время активно исследуются возможности применения генетически модифицированных стволовых клеток, экспрессирующих терапевтические гены, с целью доставки в область нейродегенерации факторов, поддерживающих выживание нейронов и рост нервных волокон. Существует несколько технологий доставки генетического материала в эукариотические клетки (см. книга I, глава 1 – книга «Генная инженерия» (Семченко В.В., Есенин С.И. и др., 2012).

Генетически модифицированные стволовые клетки, экспрессирующие клонированный ген, могут значительно усилить терапевтический эффект трансплантированных клеток и регенераторный потенциал нервной ткани. Трансфекция эмбриональных стволовых клеток мыши плазмидами, экспрессирующими клонированный ген нейрональной молекулы адгезии L1, обеспечивает не только встраивание этой молекулы адгезии в клеточную мембрану стволовых клеток, но и секрецию её растворимой формы (Chen J. et al., 2005). После трансплантации подобных клеток в травмированный спинной мозг они формировали отростки и обнаруживались в ткани реципиента спустя месяц после трансплантации, тогда как аналогичные, но нетрансфицированные клетки выживали лишь в течение 7 суток. В следующих работах (Bernreuther C. et al., 2006) было установлено, что экспрессия L1 направляет дифференцировку эмбриональных стволовых клеток по нейрональному пути. В настоящее время проводятся интенсивные исследования с целью получения генетически модифицированных стволовых мезенхимных клеток, способных дифференцироваться в заданном направлении. Установлено, что трансфекция стволовых мезенхимных клеток красного костного мозга вирусным вектором, экспрессирующим ген тирозингидроксилазы, вызывает их дифференцировку в дофаминергические нейроны (Lu L. et al., 2005).

К настоящему времени выполнены экспериментальные работы по трансплантации генетически модифицированных клеток пуповинной крови для стимуляции регенерации сердечной мышцы и сосудов. Наибольшее внимание уделяется возможности трансплантации клеток пуповинной крови, генетически модифицированных геном VEGF. Например, трансплантация клеток пуповинной крови, трансфицированных человеческим геном VEGF, активирует ангиогенез в тканях при моделировании хронической ишемии конечностей у крысы (Ikeda Y. et al., 2004) и инфаркта миокарда у мышей (Chen H.K. et al., 2005).

Перспективным направлением клеточной терапии для устранения дефектов нервной ткани, для нейропротекции и стимулирования регенерации нервных волокон в ЦНС можно считать получение и испытание генетически модифицированных клеток пуповинной крови. При этом возможно тестирование множества конкретных подходов (например, применение различных клеточных типов

пуповинной крови, разные генетические модификации клеток перед трансплантацией, варианты по срокам, количеству и способу введения клеток непосредственно в область травмы, в кровоток, в биоматрикс).

Для усиления терапевтического эффекта стволовые кроветворные клетки пуповинной крови подвергаются генетической модификации, трансфекции плазмидными векторами, экспрессирующими гены нейрональной молекулы адгезии L1 и сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF). Усиление экспрессии генов, кодирующих синтез подобных молекул, позволяет рассчитывать на более выраженный трофический эффект генетически модифицированных клеток на мотонейроны головного и спинного мозга при боковом амиотрофическом склерозе.

Известно, что молекула адгезии L1 поддерживает выживание нейронов и рост аксонов. Что касается VEGF, то его нейротрофическое действие является новым и неожиданным открытием, а применение этого фактора обоснованно считается одним из наиболее перспективных направлений. Фактор поддерживает выживание нейронов, что осуществляется через рецептор Flk-1 (Islamov R.R. et al., 2004). На модели экспериментальной травмы спинного мозга VEGF в гелевом носителе на основе экстракта белков базальной мембраны существенно поддерживает васкуляризацию и рост аксонов (Facchiano F. et al., 2002), стимулирует процесс неоваскуляризации, что важно для устранения эффекта цитотоксичности.

Анализ первых клинических испытаний по трансплантации больным боковым амиотрофическим склерозом стволовых клеток, выделенных из периферической крови, показал безопасность трансплантации и толерантность больного к трансплантированным клеткам (Mazzini L. et al., 2003). Однако клиническое применение для нейротрансплантации стволовых клеток пуповинной крови требует дополнительных экспериментальных исследований с учётом их трансдифференцировки в разные клеточные типы (Silani V. et al., 2003). При этом генетическая модификация стволовых клеток пуповинной крови может быть полезна для направленной дифференцировки клеток и ограничения возможности их злокачественной трансформации, а также для доставки специфических ростовых и трофических факторов при нейродегенеративных заболеваниях (Исламов Р.Р. и др., 2007).

Трансплантация фетальной нервной ткани при хорее Гентингтона. Хорея Гентингтона (Huntington's disease, Huntington's chorea) – наследственное моногенное неуклонно прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, проявляющееся специфическими моторными нарушениями (хореей), изменением поведения и прогрессирующей деменцией. Несколькими группами исследователей для коррекции данного заболевания был предложен метод нейротрансплантации фетальной ткани головного мозга. Целью нейротрансплантации должна была стать замена нервной ткани области стриатума в головном мозге реципиентов функционирующим трансплантатом. Именно в области подкорковых ядер происходит гибель нейронов и теряется функциональная связь с корой. После преклинического изучения метода несколько групп показали безопасность и выполнимость таких процедур в клинике (Rosser A.E. et al., 2002; Hauser R.A. et al., 2002; Rosser A.E., Bachoud-Levi A.C., 2012).

В рамках ограниченных клинических испытаний пяти пациентам с хореей Гентингтона (ХГ) были выполнены внутримозговые трансплантации фетальной нервной ткани во французском госпитале CHU Henri Mondor (Creteil, France). Клеточный материал получали из головного мозга легально абортированных эмбрионов человека 7,5-9 недель гестации. Ткань пересаживали стереотаксически билатерально через 4-5 треков в хвостатое ядро и скорлупу. Клиническое улучшение (двигательное и когнитивное) продемонстрировали трое пациентов через 30 месяцев после трансплантации (Bachoud-Levi A.-C. et al., 2002), один пациент умер через 4 года. 6-летнее наблюдение 3 пациентов, продемонстрировавших положительный результат через 2 года после трансплантации выявило значительное улучшение двигательной функции и стабилизация наблюдалось у 2 пациентов в течение всего времени (6 лет) и у одного пациента в течение первых 4 лет, однако после этого вновь появлялось усиление дистонии. Психомоторика и когнитивные функции по шкалам MDRS (Mattis Dementia Rating Scale) и MMSE (Mini-Mental State Examination) у всех пациентов сильно варьировали с периодами улучшения, стабилизации и ухудшения. Электрофизиологический тест показал стабилизацию заболевания в течение 5 лет с момента трансплантации. Гипосигнал, ассоциированный с трансплантатом в стриатуме, на магнитно-резонансной

томографии оставался неизменным в течение 6 лет. Накопление глюкозы, по данным позитронно-эмиссионной томографии, в этой области оставалось сниженным все время наблюдения, однако на таком же уровне, как и до трансплантации. Тем не менее, накопление глюкозы в коре области лобной доли улучшалось до нормального уровня через 2 года после процедуры и оставалось стабильным в течение всего времени наблюдения. Такая метаболическая гетерогенность после нейротрансплантации согласуется с данными S.Furtado (Furtado S. et al., 2005).

Авторы исследования делают вывод о долговременном терапевтическом эффекте метода нейротрансплантации у пациентов с ХГ. Улучшение и стабилизация процесса клинически и по инструментальным данным исследования активности головного мозга наблюдалась у трех пациентов из пяти в течение 6 лет. Авторы выделяют период значительного улучшения – первые 2 года после трансплантации и период стабилизации – последующие 3-4 года. После трансплантации наблюдалось быстрое восстановление области лобной коры, остальные области поражались при продолжающейся прогрессии заболевания.

В аналогичном пилотном исследовании другой группы (Hauser R.A. et al., 2002) наблюдали сходные изменения синдрома хореи через год после трансплантации. Хотя в исследовании не было контрольной группы, авторы экстраполировали статистические данные пациентов с ХГ, получающих стандартное лечение, и показали значительную разницу по сравнению с пациентами, получившими нейротрансплантат. Так, например, известно, что метаболическая активность области стриатума у таких пациентов стандартно снижается в среднем на 14% в год, следовательно, за 6 лет эта цифра приближается к 60%, однако у 3 анализируемых больных, получивших трансплантат, аналогичный показатель составил только 7% за 6 лет.

В ситуации с ХГ функционирующий трансплантат, внесенный с заместительной целью, не может противостоять прогрессу нейродегенерации в целом, поскольку причиной болезни является наследственный генетический дефект. Тем не менее, на аутопсийном материале было показано, что пересаженные нервные клетки длительно выживают и не подвергаются изменениям, характерным для ХГ. Таким образом, внутримозговая трансплантация фетальной нервной ткани пациентам с ХГ, по предварительным данным, мо-

жет обеспечить период улучшения и длительной стабилизации в течение заболевания. Положительный эффект может быть получен лишь у ряда пациентов, поэтому необходим тщательный отбор и отработка критериев для проведения трансплантации. Как и в онкологии, неврологам-клиницистам и пациентам в будущем, возможно, придется выбирать между степенью и продолжительностью ожидаемого терапевтического эффекта и рисками, связанными с хирургическим вмешательством, иммуносупрессией. Более информативные данные по клинической эффективности метода будут получены после продолжения испытаний на большей группе пациентов в нескольких центрах, проходящих в настоящее время (Берсенов В.А., 2006).

Дегенерация фетальных трансплантатов у больных хореей Гентингтона в отдаленном периоде. Болезнь (хорея) Гентингтона (ХГ) представляет собой неизлечимое и фатальное генетическое заболевание нервной системы, причиной которого является увеличение числа CAG повторов в гене хантингтина (huntingtin) (Gil J.M. et al., 2008). В результате мутантный белок с длинным полиглютаминовым «хвостом» активно вмешивается во многие внутриклеточные взаимодействия, приводя к дисфункции и гибели нейронов в области полосатого тела (corpus striatum), а также в коре головного мозга. Хотя хантингтин экспрессируется в организме повсеместно, наиболее чувствительными к патологическим изменениям оказываются так называемые проекционные шиповатые нейроны среднего размера (medium-sized spiny neurons), к которым относится около 95% всех нейронов стриатума.

Одна из стратегий лечения ХГ заключается в замещении погибших и пораженных стриальных нейронов фетальными трансплантатами (Dunnett S.B. et al., 2004). Многочисленные эксперименты с использованием *in vivo* моделей ХГ на грызунах и приматах оказались успешными, что позволило в конце 1990-х гг. начать клинические испытания на единичных больных. Правда, результаты таких трансплантаций оказались противоречивы. Так, в течение 2–4 лет после трансплантации у пациентов отмечалось относительное улучшение клинических показателей, после чего следовало прогрессивное обострение заболевания (Hauser R.A., 2002; Bachoud-Lévi A.C. et al., 2006). Надежду на эффективность такого подхода в будущем давал тот факт, что отростки трансплантиро-

ванных нейронов были способны формировать контакты с соответствующими нейронами реципиентной ткани, хотя полноценная функциональная интеграция трансплантатов так и не происходила. Тем не менее, жизнеспособные трансплантаты обнаруживались в corpus striatum спустя 1,5-6 лет (Keene C.D. et al., 2007), и поэтому дальнейшее прогрессирование заболевания связывали с проблемой образования синаптических связей между нейронами трансплантата и реципиента.

Исследовательская группа нейрохирурга Томаса Фримана (Thomas Freeman) из Университета Южной Флориды оценила долгосрочные результаты трансплантации фетальных графтов у трех больных БГ. Авторы сообщают, что спустя 10 лет после операции у пациентов отмечаются выраженные дегенеративные и воспалительные изменения в трансплантатах, что, в совокупности с сомнительными клиническими результатами, ставит под вопрос рациональность проведения дальнейших клинических испытаний. В качестве материала для трансплантации использовались образцы солидной ткани размером 0,5–1,0 мм³ из дальне-латеральной части выступа бокового желудочка 8–9-недельных эмбрионов. Эмбриональную нервную ткань симметрично трансплантировали в хвостатое ядро (caudate nucleus) и скорлупу (putamen) corpus striatum (5–8 эмбриональных образцов на один трансплантат; общее количество трансплантатов – от 10 до 16) (Cicchetti F. et al., 2009).

В работе F. Cicchetti и др. (2009) анализировались ткани головного мозга, полученные при аутопсии трех пациентов, участвовавших в клиническом исследовании (Hauser R.A. et al., 2002). Авторы провели морфологический и гистологический анализ тканей полосатого тела в зонах трансплантации, иммуногистохимическую оценку клеточного состава, в том числе инфильтрацию лимфоцитами, анализ экспрессии мутантного белка хантингтина (EM48), а также определение синаптических связей между нейронами трансплантата и окружающих его тканей.

Приживление трансплантатов было отмечено у двух из трех пациентов, при этом графты, трансплантированные в хвостатое ядро, не прижились ни у одного из больных. Более того, у пациентов с прижившимися трансплантатами наблюдалась выраженная (56,5 и 45%) атрофия putamen. Число проекционных нейронов в Р-зонах трансплантата (т.е. зонах, содержащих стриальные нейроны)

по сравнению с окружающей тканью corpus striatum было снижено, а сами клетки несли морфологические признаки дегенерации, не характерные для интернейронов. Кроме того, трансплантированные и реципиентные стриальные нейроны экспрессировали каспазу-3 – один из маркеров апоптотической гибели клеток. Таким образом, дегенерация нейронов в трансплантатах протекала намного интенсивнее, нежели в окружающем их corpus striatum.

По всей видимости, мутантный хантингтин вызывает дегенерацию трансплантированных нейронов опосредованно, поскольку в самом трансплантате экспрессия мутантного гена (EM48+) не наблюдается. Авторы полагают, что нейрональная дегенерация индуцируется за счет синтеза аномального белка в других частях corpus striatum и/или в иннервирующих его зонах. Действительно, маркер EM48 присутствует в слое V коры головного мозга, откуда полосатое тело иннервируют глутаматергические кортикальные нейроны (кортикостриальные проекции). Кроме того, corpus striatum получает сигналы от дофаминергических нейронов substantia nigra pars compacta (нигростриальные проекции) (Gil J.M. et al., 2008). Каким образом изменение иннервации стриатума может привести к гибели трансплантированных нейронов?

Согласно устоявшимся представлениям, один из основных механизмов гибели проекционных нейронов стриатума – так называемое «токсическое возбуждение» (excitotoxicity) (Gil J.M. et al., 2008; Cepeda C. et al., 2007). Токсическое возбуждение стриальных нейронов возникает в результате избыточного высвобождения глутамата терминалями аксонов, иннервирующих corpus striatum, что вызывает чрезмерное повышение концентрации внутриклеточного кальция, повреждение митохондрий, образование реактивных форм кислорода и азота и в итоге гибель клетки. Кроме того, нейротоксичность глутамата и его аналогов (NMDA, AMPA, каиновой и хинолиновой кислот) может быть связана с повышенной экспрессией и/или сенситизацией глутаматных рецепторов, недостатком ингибирующих ГАМК-ергических сигналов или снижением способности глиальных клеток поглощать избытки высвобожденного из терминалей глутамата. Известно также, что кортикостриальные проекции обеспечивают нейроны полосатого тела трофическими сигналами, недостаток которых может приводить к апоптозу. Более того, нарушение активности дофаминергического нигростриального пути тоже может при-

водить к гибели нейронов corpus striatum, вызывая окислительный стресс и повышая концентрацию внутриклеточного кальция.

F. Cicchetti и др. (2009) обнаружили, что оба афферентных пути могут быть вовлечены в процесс дегенерации трансплантатов. Так, по данным иммуногистохимического анализа, отростки дофаминергических нейронов формируют синаптические контакты с трансплантированными нейронами, а vGlut1+ терминали аксонов кортикостриальных проекций прилежат к проекционным нейронам corpus striatum.

Дополнительный вклад в дегенерацию аллогенных трансплантатов также вносят воспалительные реакции. F.Cicchetti и др. (2009) обнаружили, что трансплантаты индуцировали воспалительный ответ, о чем свидетельствовали присутствие CD4+, CD8+ и HLA-DR+ лимфоцитов в графтах и воспалительный ответ со стороны глиальных клеток – астроцитов и микроглиоцитов. GFAP+ клетки с морфологией реактивных астроцитов располагались вокруг трансплантатов, а непосредственно среди стриальных нейронов трансплантата обнаруживались активированные, фагоцитирующие микроглиальные клетки.

В трансплантатах спустя 10 лет отмечается снижение числа стриальных нейронов и характерные признаки клеточной дегенерации, в частности появление патологических агрегатов хроматина. Обнаруживаются активированные микроглиальные клетки, фагоцитирующие стриальные нейроны. Взаимодействие глутаматергических нейронов коры головного мозга со стриальными нейронами позволяет рассматривать глутамат-опосредованное «токсическое возбуждение» как один из вероятных механизмов гибели трансплантированных клеток.

Таким образом, авторы обнаружили:

- снижение количества нейронов полосатого тела;
- дегенеративные изменения в нейронах трансплантата;
- воспалительная реакция клеток микроглии;
- контакты терминалей трансплантата с терминалями кортикостриарных проекций.

Обнаруженные Т. Фриманом и его коллегами дегенеративные изменения фетальных трансплантатов у больных ХГ спустя 10 лет после операции, к сожалению, не позволяют рассматривать данную форму трансплантации в качестве перспективного метода лечения

хореи Гентингтона. Эти результаты отличаются от результатов, полученных при аналогичных трансплантациях пациентам с болезнью Паркинсона, у которых улучшение клинической картины наблюдалось на протяжении 11–12 лет (Kordower J.H., 2008; Kordower J.H. et al., 2008).

Низкая жизнеспособность стриальных проекционных нейронов донорской ткани указывает на то, что патологический процесс, схожий с ХГ, распространяется в итоге и на аллогенный трансплантат. Как результат, объем поражения corpus striatum в исследованных образцах не отличается от такового у больных ХГ, которым трансплантация не проводилась.

Из этого исследования можно сделать несколько выводов:

1 – corpus striatum и особенно хвостатое ядро – не лучшая мишень для трансплантации фетальных нейронов. Если патологический процесс начинается вне полосатого тела, то можно полагать, что и терапия должна быть направлена на первичный очаг поражения;

2 – патогенез ХГ таков, что отсутствие мутантного белка – причинного фактора этой патологии — не защищает здоровую ткань трансплантата от деструкции;

3 – следует отметить, что подобные трансплантации также сопряжены со значительным риском для пациентов. Так, у двух больных образовались субдуральные гематомы, что потребовало дополнительного хирургического вмешательства. При этом аналогичные трансплантации пациентам с болезнью Паркинсона, проводившиеся тем же хирургом, прошли успешно;

4 – полученные результаты указывают на необходимость разработки и развития альтернативных подходов в терапии ХГ, направленных на устранение негативных эффектов мутантного хантингина (Martin B. et al., 2008). В частности, действие новых лекарственных средств может быть ориентировано:

- на контроль токсичных для стриальных нейронов сигналов от нигростриальных и кортикостриальных путей;

- на повышение жизнеспособности стриальных нейронов за счет обеспечения трофических сигналов, восстановления функции митохондрий и предотвращения апоптотической гибели клеток;

- на блокирование агрегации хантингина и усиление его протеолитической деградации.

Особое место занимает генная терапия ХГ, с помощью которой можно добиться продукции нейротрофических факторов в зоне поражения либо непосредственного ингибирования экспрессии хантингина с помощью РНК-интерференции. Некоторые из этих лекарств «нового поколения» (преимущественно нейропротекторные агенты – креатин, ненасыщенные жирные кислоты) уже находятся на стадии клинических испытаний (Fulmer T., 2009; Лелявский А., 2009).

Трансплантация нейронов, полученных из репрограммированных фибробластов, при экспериментальной болезни Паркинсона. По причине ограниченности процессов репаративной регенерации в некоторых высокодифференцированных тканях из-за недостаточности естественных камбиальных резервов исследуется возможность лечения пациентов с патологией ЦНС или миокарда посредством клеточной терапии (Freed C.R. et al., 2001; Jawad H. et al., 2007; Lim J. et al., 2007; Wernig M. et al., 2008). Учитывая необходимость использования иммуносовместимых клеток-предшественниц, перспективным подходом является применение аутогенных iPS-клеток (iPS-cells, induced pluripotent stem cells), сходных с эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК) (Takahashi K. et al., 2007; Wernig M. et al., 2007).

Во многих работах по репрограммированию клеток авторы в качестве доказательства соответствия ЭСК и iPS-клеток применяют методики, позволяющие клеткам исследуемой культуры дифференцироваться в кардиомиоциты и нейроны (Takahashi K. et al., 2007; Yu J. et al., 2007; Zhang X-B., 2013). Логичным этапом дальнейшего исследования iPS-клеток является их использование в целях коррекции различных видов патологий у экспериментальных животных. Уже получены положительные результаты применения полученных из iPS-клеток ГСК при серповидно-клеточной анемии (Hanna J. et al., 2007).

Первый этап исследования M. Wernig и др. (2008) заключался в репрограммировании мышинных эмбриональных фибробластов посредством внедрения векторов на основе ретровирусов, содержащих Oct4, Sox2, c-Мyc, Klf4 (Wernig M. et al., 2008). При культивировании в среде без сыворотки с добавлением FGF2 полученные iPS-клетки по морфологии соответствовали предшественникам нейронов и экспрессировали белки, характерные для нейральных

стволовых клеток – нестин, Sox2 и Brn2. За последующую неделю культивирования без FGF2 полученные клетки дифференцировались в β -III-тубулин-позитивные нейроны, GFAP-положительные астроциты и O4-позитивные олигодендроциты.

Исследователи трансфецировали клетки-предшественники нейронов лентивирусными векторами с GFP, чтобы оценить спонтанную миграцию клеток в ЦНС при введении культуры в боковые желудочки головного мозга 13-14-дневных мышинных эмбрионов. Спустя 1-9 недель меченые клетки определялись в виде внутрижелудочковых скоплений, а также в ближайшей нервной ткани. Наибольшее количество GFP-позитивных клеток определялось в перегородке, полосатом теле, гипоталамусе и среднем мозге, меньшее – в обонятельных луковицах, коре и таламусе. Исследуемая популяция клеток характеризовалась экспрессией основных маркеров нейронов (β -III-тубулин, NeuN) и глиальных клеток (GFAP). Трансплантированные клетки давали начало различным подтипам нейронов – глутаматэргическим и катехоламинэргическим.

Иммунофлюоресцентный анализ меченых клеток выявил типичную для нейронов морфологию, а посредством конфокальной микроскопии авторы показали наличие многочисленных дендритных шипиков на нейролемме исследуемых клеток, а также непосредственный контакт с ними синаптофизин-позитивных GFP-клеток реципиента. Электрофизиологическое исследование срезов мозга, полученных от животных, перенесших трансплантацию, выявило проведение потенциалов действия между нативными и мечеными нейронами. Потенциал покоя дериватов введенных клеток укладывался в интервал от -55 мВ до -63 мВ, а потенциал действия достигал 70-82 мВ. Полученные данные свидетельствовали о морфофункциональной интеграции трансплантированных клеток и нейронов реципиента.

Исследователи экстраполировали успешные результаты начального этапа работы на идею лечения пациентов с дегенеративно-дистрофическими заболеваниями ЦНС. С этой целью взрослым крысам с моделью болезни Паркинсона, индуцированной введением 6-гидроксидофамина в полосатое тело, трансплантировали культуру дифференцированных нервных клеток численностью $1-3 \times 10^5$ в средний мозг. После 4 недель эксперимента было показано, что позитивные по тирозингидроксилазе клетки в группе опыта

выявлялись во всем объеме среднего мозга, а в контроле – животные с болезнью Паркинсона без трансплантации – положительная реакция на TH наблюдалась лишь в части черной субстанции и в дорсальном отделе полосатого тела. Кроме того, введенные нейроны экспрессировали также En1, VMAT2 и транспортер дофамина.

При стимуляции амфетамином движения крыс контрольной группы характеризовались вращением и уклоном в сторону, соответствующую стороне среднего мозга, в которой была нарушена функция дофаминовых нейронов посредством инъекции 6-гидроксидофамина. У большинства животных, перенесших трансплантацию нейронов, производных iPS-клеток, наблюдалось восстановление нормального характера движений.

Важно, что исследователи показали экспрессию Ki-67, маркера пролиферации, в области введения клеток, а также установили наличие тератом, источником которых, по мнению авторов, являлись многочисленные недифференцированные SSEA1-положительные клетки, содержащиеся в культуре трансплантируемых нейронов. Кроме того, опухолевая трансформация могла быть результатом реактивации с-Мус, которая наблюдалась в 20% случаев в работе К. Okita и др. (Okita K. et al., 2007). Наиболее вероятно, что присутствие недифференцированных клеток было связано с недостаточной индукцией дифференцировки части iPS-клеток по линии нейронов. С целью предупреждения формирования опухолей, исследователи в последующем проводили изъятие SSEA1-позитивных элементов из высокоспециализированной культуры с помощью FACS, что в конечном итоге предотвращало образование тератом.

Таким образом, исследователи продемонстрировали возможность применения высокоспециализированных аутогенных клеток, полученных путем репрограммирования, для коррекции патологии дегенеративно-дистрофического характера. В целом, этот подход является перспективным путем решения проблемы поиска клеточного материала, предназначенного для трансплантации (Бозо И.Я., 2008).

Болезнь Альцгеймера

Для болезни Альцгеймера характерна аккумуляция в мозге амилоидных белков. Они образуют бляшки, вокруг которых происходит накопление клеток микроглии - иммунных клеток центральной нервной системы. Однако клетки микроглии неэффективны в

борьбе с амилоидными белками, и болезнь Альцгеймера продолжает прогрессировать.

В противоположность микроглии головного мозга, клетки микроглии, полученные из стволовых клеток, способны инфильтрировать амилоидные бляшки и довольно эффективно разрушать их. Кроме того, стволовые клетки специфически привлекаются амилоидными белками, токсичными для нейронов.

После введения стволовых клеток у больных болезнью Альцгеймера улучшается память, постепенно начинаются процессы восстановления поврежденных болезнью тканей мозга.

В большинстве случаев клеточная терапия способна полностью остановить развитие болезни Альцгеймера, а в наиболее тяжелых случаях она используется для продления периода сохранения рассудка и независимости больных от членов семьи или медперсонала.

Представлены результаты I фазы клинических испытаний метода генотерапии болезни Альцгеймера. Аутогенные фибробласты трансфецировали конструкцией с NFG (фактор роста нервов) и вводили в головной мозг 8-пациентам с подтвержденным диагнозом БА. После 22 мес после терапии не наблюдали никаких побочных эффектов. Исследование психического статуса выявило замедление прогрессивного снижения когнитивной функции (Tuszynski M.H. et al., 2005).

Шизофрения

По данным современной литературы, препараты плаценты повышают неспецифическую иммунобиологическую реактивность организма. Предполагается, что подкожные имплантации плацентарной ткани у больных шизофренией приведут к нормализации нарушенной иммунобиологической реактивности, обмена веществ, преодолению устойчивости к фармакотерапии.

Авторы обследовали 39 больных шизофренией простой и параноидной форм с непрерывно-прогредиентным типом течения, резистентных к традиционным методам лечения, длительность болезни – от 2 до 18 лет. Доминирующими синдромами являлись: депрессивно-параноидный (13 чел., 33%), депрессивный (11 чел., 28%), галлюцинаторно-параноидный (9 чел., 23%), апато-абулический (5 чел., 12,8%).

Через 2–3 нед после начала стационарного лечения начинали имплантацию плацентарной ткани, обработанной по методу Крау-

зе, подкожно, в области 6–8 межрёберных промежутков. Вес имплантируемой ткани составлял от 1 до 4 г, количество подсадок 2–4 с интервалом в 3–7 дней.

Клинический эффект различной степени был отмечен у 10 больных (25,6%). Из них в 3 случаях преобладала депрессивная симптоматика, в 3 – депрессивно-параноидная, у 2 больных – апато-абулический синдром, у 2 – галлюцинаторно-параноидные проявления. Выявлено психоактивирующее влияние неспецифической тканевой терапии, потенцирование действия психотропных препаратов.

Авторы рекомендуют данный метод для применения в практической психиатрии при комплексном лечении резистентных больных шизофренией (Кутько И.И. и др., 1995).

3.5. Клеточная терапия при черепно-мозговой травме

3.5.1. Клеточные технологии для нейрорегенерации

Нейротравма сопровождается гибелью нейронов, дегенерацией аксонов, нарушением коммуникаций в нейронных сетях и контролируемых ими функций. Для предотвращения вторичной дегенерации и поддержания роста нервных волокон представляются перспективными подходы с применением клеточных и молекулярно-генетических технологий. Возможности клеточной терапии широко исследуют в эксперименте для преодоления посттравматических дефектов нервной ткани. В условиях трансплантации клетки должны решать следующие задачи:

- оказывать нейропротекторное действие;
- восстанавливать тканевый матрикс и формировать направляющие пути для роста аксонов;
- стимулировать рост аксонов;
- участвовать в процессе миелинизации.

Трансплантированные стволовые или прогениторные клетки могут экспрессировать нейроспецифические маркеры, что не является признаком установления этими нейронами связей с клетками-мишенями и, тем более, восстановления утраченной функции. В этом отношении наиболее надежны данные об экспрессии фермен-

тов, участвующих в синтезе медиаторов, например холинацетилтрансферазы.

Трансплантируемые нейральные предшественники преимущественно дифференцируются в глию. Для глии подобное замещение наиболее вероятно, как это показано в ряде работ с использованием в качестве маркеров белков миелина и меченых трансплантируемых клеток различных типов, например, стромальных клеток костного мозга или глиальных клеток обонятельных структур (OECs) (Sasaki M. et al., 2001).

Для трансплантации в область повреждения спинного мозга или периферического нерва применяют:

- предифференцированные эмбриональные стволовые клетки (Hendricks W.A. et al., 2006);

- стромальные клетки костного мозга (Sykova E. et al., 2004; Dezawa M. et al., 2005; Hofstetter C. et al., 2008 и др.);

- нейральные стволовые и прогениторные клетки (Hill W.D. et al., 2004; Cao Y. et al., 2005; Mothe A.J., Tator C.H., 2013);

- OECs;

- стволовые клетки кожи (Diel'tsova O.I. et al., 2013; Euler de Souza Lucena E. et al., 2014).

Результаты этих работ указывают на поддерживающее влияние клеточной терапии на восстановление чувствительной и, в меньшей мере, двигательной функции, но выраженность положительного эффекта в большинстве случаев незначительна. В этом отношении наибольший эффект ожидается при трансплантации OECs. Эти клетки продуцируют: 1) нейротрофические факторы (FGF1, FGF2, NGF, BDNF, GDNF и GGF2), 2) компонент внеклеточного матрикса ламинин, 3) молекулы адгезии NCAM и L1, 4) GFAP, проявляя признаки астроцитов.

Подобный фенотип этих клеток представляется достаточно ценным. По мнению ряда исследователей, OECs могут свободно мигрировать на значительные расстояния в белом и сером веществе мозга, соединительной ткани и сопровождать растущие аксоны через глиальный рубец. Фенотипические характеристики астроцитов в этой популяции прогениторных клеток дают основание предполагать их более высокую степень выживания при трансплантации в мозг и более выраженную способность, по сравнению с другими клетками, используемыми для трансплантаций, участвовать в формировании

оптимального матрикса для роста аксонов. Выбор OECs продиктован также соображениями достаточной адекватности их применения в клинической практике: пригодность для аутотрансплантации и, следовательно, предотвращение иммунологического конфликта, доступность клеток, сравнительно легкая выполнимость, безопасность и низкая инвазивность процедуры забора материала.

Эти свойства послужили основанием для рассмотрения OECs как наиболее перспективных для трансплантаций с целью улучшения результатов посттравматической регенерации спинного мозга и стимулировали проведение дальнейших исследований. Именно поэтому OECs посвящено наибольшее количество работ, по сравнению с другими клетками, тестируемыми для трансплантации при травме спинного мозга. Но по мере детальных исследований OECs и сравнения их поведения с клетками других типов на одних и тех же моделях были выявлены негативы.

Оказалось, что OECs обладают более низкой способностью к миелинизации, чем шванновские клетки, а миграционный потенциал OECs и их способность поддерживать рост аксонов в спинном мозге реципиента не выше, чем у стромальных клеток костного мозга или фибробластов (Lu C.Z. et al., 2006). Подобные нежелательные свойства, по-видимому, проявляют и другие клетки, используемые для трансплантации в нервную ткань, но из-за недостаточной изученности поведения подобных клеток они пока не выявлены.

Все это указывает на актуальность дальнейших экспериментальных исследований по клеточной терапии неврологических нарушений.

Для повышения эффективности доставки в область повреждения нервной ткани факторов, поддерживающих выживание нейронов и рост нервных волокон, активно исследуют возможности применения генетически модифицированных клеток с трансфицированными генами нейротрофических факторов (BDNF, NT-3, GDNF) (Taylor D.O. et al., 2006), эритропоэтина и молекул адгезии (Chen J. et al., 2005). Вместе с тем, проведены многочисленные исследования по прямой генной терапии, направленной на поддержание выживания нейронов и/или активацию ассоциированных с ростом аксона внутриклеточных сигнальных путей, т.е. без использования клеток в качестве носителей искусственных генетических конструкций.

Терапевтический эффект трансплантируемых клеток прямо пропорционален длительности их пребывания в ткани реципиента. Для увеличения сроков выживания трансплантируемых клеток оправдано применение фармакологических цито- и нейропротекторов. Достаточно перспективным направлением в реализации концепции нейропротекции является встраивание в трансплантируемые клетки малой интерферирующей РНК (siRNA) для деградации мРНК проапоптозных молекул. Оба этих подхода применительно к нейротравме не исследованы совсем.

В целом, рассматривая целесообразность применения клеточных технологий для улучшения результатов лечения нейротравмы и риски, возникающие при этом, следует отметить, что в аспекте только доставки биоактивных стимуляторов регенерации с клеточной терапией могут конкурировать другие способы подведения этих факторов, например, при использовании минипомп или наноносителей.

Важным аспектом в стратегии устранения последствий нейротравмы является создание адекватного замещающего матрикса нервной ткани. Актуальным направлением работ по конструированию биоматрикса, поддерживающего процессы нейрорегенерации, является разработка адекватных носителей для трансплантируемых клеток. Эффекты трансплантации клеток в составе трехмерных гидрогелевых носителей на основе синтетических биodeградируемых материалов изучены недостаточно. Появляются первые работы, свидетельствующие об эффективности подобных носителей. При культивировании OECs в трехмерном коллагеновом геле по сравнению с культивированием на подложке из коллагена зарегистрирована более высокая пролиферативная активность клеток и поддержание экспрессии в них нейротрофических факторов NGF и BDNF, а также рецептора фактора роста нервов (NGF) белка p75 (Wang Q.D. et al., 2006). На первый план выходит проблема адекватных носителей, поддерживающих выживание, пролиферативную активность, способность к миграции и фенотипические характеристики трансплантируемых клеток.

В эксперименте для стимулирования нейрорегенерации трансплантируемые клетки чаще всего инъецируют непосредственно в ткань. Однако подобные клетки после проведения процедуры трансплантации достаточно быстро погибают. Так, большинство

ОЕСs человека в спинном мозге крысы погибает уже к концу первых суток (Deng J. et al., 2006).

В связи с этим вовсе небезосновательной представляется идея формирования депо, в котором клетки в течение достаточно длительного времени поддерживали бы свой фенотип и могли бы высеяться в прилежащие ткани, стимулируя в них посттравматическое выживание нейронов и рост нервных волокон. Эксперименты в этом направлении с размещением клеток на полимерных гидрогелевых платформах уже начаты. Это стромальные клетки костного мозга на полиметакрилате (Sykova E. et al., 2006) или погруженные в альгинат неаутологичные генетически модифицированные фибробласты, экспрессирующие BDNF.

При этом также остается неясным, что эффективнее: введение в гидрогелевый носитель клеток с последующей имплантацией биоинженерного комплекса в область повреждения нервной ткани или непосредственное введение в имплантируемый гидрогелевый носитель стимулятора регенерации, чаще всего нейротрофического фактора, например, BDNF в биodeградируемом полиэфире, в небiodeградируемом полиметакрилате, агарозе или NT-3 в фибрине (Tsai E.C. et al., 2005; Taylor D.O. et al., 2006). Имплантация биodeградируемого матрикса на основе полиэфиров в комплексе с астроцитами или шванновскими клетками улучшает результаты регенерации.

Для стимуляции посттравматической регенерации седалищного нерва в эксперименте используется плазмида, экспрессирующая сосудистый эндотелиальный фактор роста и основной фактор роста фибробластов (Масгутов Р.В. и др., 2011; Greenberg D.A., Jin K., 2013).

Таким образом, для устранения последствий травмы, для целей нейропротекции и стимулирования регенерации нервных волокон в спинном мозге и периферическом нерве в эксперименте испытывают различные подходы: клеточную терапию; создание биоматрикса; их комбинацию (Diel'tsova O.I. et al., 2013; Euler de Souza Lucena E. et al., 2014).

Эффективность каждого подхода тестируется по множеству конкретных направлений: различные клеточные типы для трансплантаций, генетически модифицированные и немодифицированные клетки, варианты по срокам, количеству и способу введения

клеток (непосредственно в область травмы, в кровь, в биоматрикс и др.), применение различных материалов (биосовместимых, биodeградируемых и наноматериалов) и т.д. Для перехода к этапу клинических испытаний приходится учитывать еще один немаловажный фактор: положительные результаты, полученные на экспериментальных моделях, часто не воспроизводятся у человека (Челышев Ю.А. и др., 2007).

3.5.2. Влияние тяжелой политравмы на миграцию стволовых кроветворных клеток

Тяжелая политравма с повреждениями головного мозга, легких, печени, почек, кишечника, кожи из-за прямого или опосредованного ишемией воздействия приводит к активизации репаративных процессов. Изучение роли разных видов стволовых клеток в этих процессах представляет собой значительный интерес в связи с феноменами трансдифференцировки и клеточного слияния.

Обнаружено, что СКК способны *in toto* дифференцироваться в клетки различной линейной принадлежности, в частности, гепатоциты, нейроны и кардиомиоциты (Krause D.S. et al., 2001; Orlic D. et al., 2001). Тем не менее, более тщательно спланированные исследования *in vivo* показали, что так называемая трансдифференцировка СКК является чрезвычайно редким событием, если вообще имеет место (Murry C.E. et al., 2004). Кроме того, СКК могут сливаться с соматическими клетками, и такие гибриды несут маркеры обоих «родительских» клеток (Terada N. et al., 2002). Несмотря на то, что трансдифференцировка СКК остается предметом дискуссий, многие исследователи считают, что СКК могут играть значительную роль в репаративных процессах. Большое значение придается трансдифференцировке СКК в миогенные стволовые клетки при регенерации поперечно-полосатых мышц (Polesskaya A. et al., 2003), клеточному слиянию СКК с кардиомиоцитами и гепатоцитами при регенерации печени и сердца (Vassilopoulos G. et al., 2003), секреции СКК факторов роста и непосредственную дифференцировку в клетки эндотелия в васкулогенезе, участию СКК костного мозга в образовании сосудистой сети метастазов (Lyden D. et al., 2001).

Такие факторы и воздействия, как облучение, полихимиотерапия, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, пептидные

антагонисты хемокина SDF-1 (stromal-derived factor-1), гипербарическая оксигенация способны индуцировать миграцию СКК из костного мозга в кровь (Takeyama K. et al., 2004; Liles W.C. et al., 2005; Thorn S.R. et al., 2006). Учитывая изложенный выше материал, представляется, что биологическое значение феномена миграции СКК в постнатальном периоде заключается не только в поддержании функции гематопоза, но и в поддержании достаточного количества необходимых для физиологической и репаративной регенерации СКК в органах и тканях. Ранее показано, что инфаркт миокарда, некроз части печени могут сопровождаться миграцией СКК костного мозга в место повреждения (Dalakas E. et al., 2005). Другими исследователями получены противоположные результаты (Di Campli C. et al., 2005) и миграция СКК костного мозга при травмах/повреждениях внутренних органов остается предметом дискуссий.

Авторы провели три серии эксперимента.

В I серии опытным мышам наносилась тяжелая политравма и затем облучение в летальных дозах с экранированием части костного мозга, контрольным – только облучение в летальных дозах с экранированием части костного мозга.

Во II серии опытных мышей облучали в летальных дозах и затем трансплантировали клетки костного мозга травмированных мышей; контрольных – облучали в летальных дозах и затем трансплантировали клетки костного мозга от здоровых мышей.

В III серии опытным мышам наносили тяжелую политравму и затем облучение в сублетальных дозах; контрольным – только облучение в сублетальных дозах.

На 8-е сутки после облучения определяли число колоний на селезенке, образовавшихся за счет мигрировавших СКК экранированного участка костного мозга (серия I), трансплантированного костного мозга (серия II) или остаточных СКК костного мозга после сублетального облучения (серия III). В исследовании использовали самок мышей-гибридов F1(CBAxС57BL6) массой 16-18 г.

Травму вызывали по методу Нобла-Коллипа (Noble-Collip) вращением мышей в металлическом барабане множественными ударами при многократных падениях. Каждая новая партия животных получала травму тяжелой степени (летальность в первые двое суток, то есть в период первичных реакций, составляла 30-40%).

Мышей облучали в контейнерах на аппарате РУМ-17. Мощность дозы 108 рентген в мин. Доза облучения составляла 8,0 Гр при летальном и 6,5 Гр – при сублетальном облучении.

В серии I экспериментов мышам во время летального облучения экранировали участок костного мозга (1/2 голени). Учитывая возможность вымывания СКК из костного мозга в кровь при переломах, исключали перелом костей голени в обеих группах рентгенографическим исследованием.

Во II серии костный мозг получали сразу после цервикальной дислокации из интактных (без переломов) бедренных костей, вымывая и ресуспендируя инъекционной иглой 1А1-04х20-1. Клеточную суспензию вводили в боковую вену хвоста в объеме 0,3 мл среды RPMI 1640 в концентрации 1×10^5 клеток на мышь.

Миграцию СКК оценивали путем регистрации кроветворных колоний, вырастающих в селезенке облученных мышей из эндо- (I и III серии экспериментов) или экзогенных (II серия экспериментов) миелоидных стволовых клеток.

В результате исследования установлено, что СКК экранированного костного мозга мигрируют в большей степени у мышей, перенесших тяжелую политравму (I серия, опытная группа). В селезенке этих мышей формировалось достоверно больше кроветворных колоний по сравнению с их числом в селезенке контрольных животных – 32 ± 1 и 25 ± 3 соответственно ($p < 0,05$).

Костный мозг мышей, перенесших политравму, содержит меньшее количество способных к миграции СКК (II серия). Перенос дозированного количества клеток костного мозга травмированного донора сингенному летально облученному реципиенту сопровождается накоплением достоверно меньшего числа колоний. Количество кроветворных колоний у мышей II серии экспериментов опытной и контрольной групп составило соответственно 16 ± 1 и 25 ± 2 ($p < 0,05$) в расчете на 1×10^5 трансплантированных клеток костного мозга/

При сублетальном облучении остаточные СКК мигрировали в большей степени у травмированных мышей (III серия, опытная группа). В селезенке сублетально облученных травмированных мышей формируется достоверно больше эндоколоний, чем в селезенке нетравмированных сублетально облученных животных. Количество кроветворных колоний у мышей опытной и контрольной групп, соответственно, составило 31 ± 2 и 23 ± 2 колоний ($p < 0,05$).

Таким образом, эксперименты I и III серий показали, что в селезенках мышей опытных групп формируется достоверно большее количество эндоколоний в сравнении с мышами групп контроля. Следовательно, опыты с эндоклонированием указывают на стимулирующий эффект тяжелой политравмы в отношении миграции СКК костного мозга у сублетально/летально облученных мышей. В эксперименте II серии в селезенках мышей опытной группы отмечается достоверно меньшее количество экзоколоний в сравнении с мышами групп контроля. Следовательно, опыты с экзоклонированием СКК указывают на истощение костного мозга травмированных доноров в отношении способных к миграции СКК, что согласуется с индуцирующим эффектом тяжелой политравмы на миграцию исследуемых клеток. Таким образом, тяжелая политравма у мышей индуцирует миграцию СКК костного мозга в систему кровообращения.

В исследованиях у различных видов млекопитающих обнаружено наличие типичных по иммунофенотипу СКК в скелетных мышцах, легких, печени и головном мозге (Abe S. et al., 2004; Kotton D.N. et al., 2005). Трансплантация таких клеток, аналогично СКК костного мозга и периферической крови, приводит к восстановлению функций гемопоэза. По крайней мере, для СКК скелетных мышц показано, что они имеют гематопозитическое происхождение, а не являются результатом трансдифференцировки миогенных клеток-предшественников (McKinney-Freeman S.L. et al., 2002). Восстановление гемопоэза у летально облученных мышей при трансплантации меченых клеток костного мозга, в свою очередь, приводит к миграции СКК в скелетные мышцы (Issarachai S. et al., 2002). Таким образом, к настоящему времени СКК обнаружены во многих тканях и органах. Полученные данные о природе СКК скелетных мышц свидетельствуют о костномозговом их происхождении.

Ранее показано, что SDF-1 играет ключевую роль в направленной миграции CXCR4 (рецептор для SFD-1) СКК (Juarez J. et al., 2004). Благодаря высокому уровню экспрессии этого хемокина стромальными клетками происходит аккумуляция СКК в костном мозге в пре- и постнатальном периодах (Juarez J. et al., 2004). Интересно, что SDF-1 в сравнительно меньших количествах секретируется стромальными и эндотелиальными клетками других органов: сердца, скелетных мышц, печени, мозга, почек (Ratajczak M.Z.

et al., 2003.) Супернатант культуры фибробластов скелетных мышц содержит SDF-1 и способен индуцировать хемотаксис CXCR4 СКК (Ratajczak M.Z. et al., 2003).

Таким образом, представляется, что описанное выше динамическое равновесие между СКК костного мозга, крови и других тканей и органов обусловлено градиентами концентраций хемокина SDF-1, которые на локальном уровне обуславливают миграцию СКК из крови в ткани и органы, а на системном – к значительному смещению описанного выше равновесия в сторону костного мозга.

Искусственное увеличение концентрации SDF-1 в плазме приводит к значительной миграции СКК из костного мозга в кровь (Natori K. et al., 2001). С другой стороны, экспрессия данного хемокина может значительно возрастать в подвергшихся повреждению тканях (Dalakas E. et al., 2005). Локальная секреция значительных количеств SDF-1 в местах повреждения при тяжелых травмах, по-видимому, приводит к существенному изменению системного градиента концентрации SDF-1. В результате наблюдается показанная в данном исследовании миграция СКК из костного мозга в кровь. На локальном уровне высокие градиенты концентрации SDF-1, по-видимому, обуславливают миграцию СКК из крови в места повреждений, где они могут принимать участие в процессах репарации.

Динамическое равновесие между СКК костного мозга, крови и негематопоэтических тканей и органов в норме и патологии зависит от градиента концентрации SDF-1. В физиологических условиях равновесие значительно смещено в сторону костного мозга, что, по-видимому, обусловлено градиентом концентрации SDF-1. При травме (в данном случае мышц) происходит значительное смещение равновесия в сторону поврежденных органов, что опять же, возможно, обусловлено изменением градиента концентрации SDF-1. В негематопоэтических тканях и органах СКК, по-видимому, могут принимать участие в физиологической/репаративной регенерации посредством трансдифференцировки и/или клеточного слияния, и/или секреции необходимых факторов роста (Александров В.Н. и др., 2006).

У человека в первые 24-48 ч после ЧМТ достоверно увеличивается абсолютное количество циркулирующих CD34+CD45+ гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток (ГСК), а также относительное и абсолютное количество CD34+CD144+ эндотелиальных пред-

шественников (ЭП). Мобилизация ГСК была выше у пациентов в возрасте до 40 лет. Возрастание ГСК и ЭП регистрировалось как при легкой, так и среднетяжелой/тяжелой ЧМТ и не зависело от уровня сознания по шкале Глазго. У больных с отсутствием возрастания ГСК частота неблагоприятных исходов была выше. Положительная коррелятивная связь выявлена также между уровнем ранних ЭП, не экспрессирующих VE-кадгерин (CD3-CD34+CD144-), и тяжестью/исходом ЧМТ, что может быть использовано в качестве прогностического критерия, свидетельствующего о репаративном потенциале костномозговых предшественников (Черных В.А. и др., 2011).

3.5.3. Методы клеточной терапии

Травма головного мозга (ТГМ) является серьезной медицинской проблемой и может приводить к инвалидизирующим или несовместимым с жизнью физиологическим нарушениям. При ней всегда страдает не только ткань непосредственно в зоне повреждения, но и нейроны и их отростки, расположенные в незатронутых областях, что приводит к частичному или полному разрушению проводящих путей мозга, провоцирующему многочисленные отдаленные последствия повреждения. В отличие от различного рода патологических процессов, травма затрагивает все возрастные категории, в мирное время – по большей части детей и подростков, ведущих активный образ жизни (Lu D. et al., 2003).

Пациенты, выжившие после тяжелой ТГМ, нуждаются в интенсивной терапии. Выборочная стимуляция экспрессии некоторых генов (например, генов нейротрофических факторов) и активация репаративных процессов, таких как нейрогенез и синаптогенез, может способствовать репаративному ремоделированию нервной ткани и частичному улучшению поведенческих и когнитивных функций.

Ни один из общепринятых подходов к терапии ТГМ не приводит к полному выздоровлению пациентов, и в основном применяемые методы (фармакологические, физиотерапевтические и др) направлены на сохранение еще не затронутых разрушительными процессами структур, в частности, краевой зоны повреждения (пенумбры). Задача посттравматической терапии – активация компенсаторных и регенеративных процессов, таких как:

- препятствование апоптозу нейронов и глиальных клеток, располагающихся в пенумбре;
- миграция в зону повреждения и дифференцировка собственных нейральных предшественников, располагающихся в зубчатой извилине гиппокампа и субвентрикулярной зоне (Duan X. et al., 2008);
- способствование синаптогенезу;
- активация продукции клетками реципиента нейротрофинов и ростовых факторов, обладающих нейропротекторным эффектом;
- снижение в зоне повреждения активности воспалительных процессов.

Общепринятым клиническим методом вмешательства в процессы пластичности на сегодняшний день остается фармакотерапия. Существует несколько вариантов специфической (направленной на сохранение и возможную регенерацию нейронов и глии) фармакотерапии при инсультах и ТГМ и, соответственно, несколько классов применяющихся при этом препаратов (Stein D.G. et al., 2003). Все эти препараты, кроме нейротрофических и ростовых факторов, не показали эффективности в терапии у пациентов, страдающих от последствий ТГМ. Альтернативой фармакотерапии является трансплантация фетальной нервной ткани и клеточная терапия. Они стали также незаменимыми инструментами фундаментальных исследований структурно-функциональных связей в мозге, эмбрионального нейрогенеза, нейропластичности и регенерации нервной ткани. Сформулированы ряд преимуществ клеточной терапии перед фармакотерапией:

- трансплантаты способствуют анатомической реконструкции поврежденной ткани;
- клетки, содержащиеся в трансплантате, могут образовывать функциональные связи с тканью реципиента;
- клетки в трансплантате могут продуцировать большое количество различных нейротрофинов и ростовых факторов в физиологических концентрациях, необходимых для регенерации нервной ткани (Li Y. et al., 2002; Chen X., 2002);
- экзогенные клетки стимулируют собственные клетки реципиента к продукции нейротрофинов и ростовых факторов (Li Y. et al., 2002);
- взаимодействия собственных нейронов и глиальных клеток реципиента с трансплантированными клетками динамичны и зависят от микроокружения;

– трансплантированные клетки могут мигрировать в зону повреждения (Chen X., 2002; Sykova E. et al., 2007);

– некоторые типы клеток, такие как ММСК, при трансплантации могут снижать интенсивность воспалительной реакции в зоне повреждения (Vercelli A. et al., 2008).

Таким образом, клеточная терапия предполагает не только активацию эндогенных восстановительных механизмов. Трансплантированные клетки в данном случае сами активно взаимодействуют с тканью реципиента, обеспечивая пролонгированный лечебный эффект (Григорян А.С. и др., 2009).

Трансплантация тканей фетального мозга. Первые опыты по нейротрансплантации проводились с целью коррекции дефицита нейротрансмиттеров (таких как ацетилхолин, дофамин, норадреналин и серотонин), возникающего в процессе некоторых нейродегенеративных заболеваний, а также при травматических повреждениях мозга (Ерениев С.И., 2002а,б; Ерениев С.И. и др., 2001, 2005). Наиболее показательным примером можно считать трансплантацию фетальных дофаминэргических нейронов, получаемых из мезэнцефалона, в поврежденный стриатум для коррекции моторных дисфункций. При этом был показан высокий уровень выживаемости и функциональной активности трансплантированных клеток, в особенности у пациентов не старше 60 лет (Freed C.R. et al., 2001).

Нейротрансплантация весьма динамично развивается как в отношении заболеваний, так и ТГМ, так как травма может порождать целый спектр моторных и когнитивных расстройств, сходных с симптомами некоторых заболеваний ЦНС (например, синдром Паркинсона). Известно также, что травма часто приводит к расстройству передачи нервных импульсов, опосредованных ацетилхолином и норадреналином, что, в свою очередь, становится причиной потери пространственной памяти.

Ацетилхолин и норадреналин – основные нейромедиаторы, на уровни которых обращают внимание исследователи при фетальной нейротрансплантации. При трансплантации фетального неокортекса после экспериментального повреждения префронтальной коры у крыс трансплантированные нейроны образовывали связи с рядом подкорковых структур, включая черную субстанцию, голубое пятно и базальное крупноклеточное ядро. Эти образования характери-

зуются регенеративным потенциалом в случае повреждений мозга и высокой продукцией норадреналина и ацетилхолина, а также дофамина.

Известно, что в ответ на травму концентрация некоторых ростовых факторов возрастает, что способствует процессам восстановления разрушенных функциональных связей. Однако этого оказывается недостаточно для удовлетворительного восстановления пациента после травмы.

Нейротрансплантация корректирует дефицит нейротрофических и ростовых факторов, таких как NGF (nerve growth factor), BDNF (brain derived neurotrophic factor) и BFGF (basic fibroblast growth factor), возникающий при ТГМ. Все эти факторы в норме поддерживают выживание нейронов, рост аксонов и дендритов, регулируют процессы миграции нейрогенных клеток.

Гипотеза о нейротрофическом эффекте трансплантатов посредством продукции ростовых факторов возникла после опытов по трансплантации тканей фетального мозга крысам с аспирационным повреждением коры больших полушарий. Было показано, что трансплантаты хорошо сохраняются в зоне повреждения и продуцируют ряд нейротрофинов, а также ускоряют восстановление поведенческих функций. Использование фетальных тканей имеет ряд преимуществ перед использованием отдельных нейротрофинов:

- нейротрансплантат может секретировать широкий спектр нейротрофических факторов в физиологических концентрациях, адекватных происходящим в зоне повреждения изменениям;
- клетки производят нейротрофические факторы в течение долгого времени, что выгодно отличает трансплантацию от единичной инъекции ростовых факторов, обеспечивая пролонгированный эффект терапии;
- взаимодействие трансплантата с тканью реципиента может быть функциональным и динамическим.

Проведен эксперимент по трансплантации непосредственно в зону травмы криоконсервированных фетальных нейронов человека крысам с функциональной иммунной системой после повреждения коры больших полушарий (Wennersten A. et al., 2004). Через 2 и 6 недель после трансплантации было показано, что трансплантированные клетки располагаются в краевой зоне повреждения, гиппокампе, мозолистом теле мозга и в субэпендимной зоне ипсилатерального

полушария. Более того, эти клетки экспрессировали нейрональный маркер NeuN (neuron-specific nuclearprotein, ядерный белок дифференцированных нейронов) и астроцитарный маркер GFAP (glial fibrillary acidic protein). Была также проведена проверка на дифференцировку клеток в олигодендроциты (по маркеру NG2), но, как обнаружилось, в олигодендроциты трансплантированные клетки никогда не дифференцировались, и причина этого остается неясной.

С помощью проточной цитофлуориметрии была охарактеризована клеточная популяция, полученная из фетального мозга человека, показавшая, что нейральные клетки-предшественницы представляют собой гетерогенную популяцию, в которой сильно варьируют уровни различных нейрональных маркеров (Poltavtseva R.A. et al., 2002). Авторы считают, что для трансплантации подходит эмбриональный материал, характеризующийся следующим фенотипом: не менее 25% nestin⁺ клеток / не менее 25% vimentin⁺ / не более 10% GFAP⁺ / не более 15% NeuN⁺ / не более 15% CD56⁺ / не более 15% N-Cad⁺ клеток. Клеточные популяции с таким фенотипом на 7-е сутки культивирования *in vitro* формировали нейросферы, однако в дальнейшем авторы не проводили с охарактеризованными клетками никаких экспериментов *in vivo*. Таким образом, вопрос о детальной характеристике клеток, используемых в целях нейротрансплантации, требует дальнейшего изучения, но очевидно, что их использование при ТГМ обладает мощным терапевтическим эффектом.

В России имеется небольшой опыт применения нейральных стволовых клеток для лечения ТГМ (Семченко В.В., Ерениев С.И. и др., 2005). Проведен ряд трансплантаций малодифференцированных нейральных и кроветворных клеток больным с тяжелыми черепно-мозговыми травмами (Парлюк О.В. и др., 2008). Было показано, что клеточная терапия почти в 4 раза снижает число неблагоприятных исходов и обеспечивает хорошее восстановление почти у половины пациентов, участвовавших в клинических испытаниях (Григорян А.С. и др., 2009).

Трансплантация нейральных стволовых клеток. Трансплантация нейральных стволовых клеток наиболее привлекательна с той позиции, что клетки, предшественницы нервной ткани, с наибольшей вероятностью могут пролиферировать, мигрировать и дифференцироваться, образуя функциональные связи с нейронами реципиента, так

как в случае трансплантации попадают в физиологичное для них микроокружение. Известны успешные эксперименты по трансплантации НСК животным, не подвергавшимся предварительной иммуносупрессии. Показано, что аллогенные нейральные предшественники, полученные из ЭСК и обладающие способностью дифференцироваться в нейроны и глию, хорошо приживаются при трансплантации мышам с экспериментальной ТГМ в острой фазе развития симптомов (инъекции клеток проводились через трое суток после операции) (Riess P. et al., 2002). Поведенческие тесты выявили существенные улучшения восстановления когнитивных и моторных функций ЦНС у животных на фоне проведенной нейротрансплантации.

При этом трансплантация НСК как в ипсилатеральное, так и в контралатеральное полушарие улучшала функциональное восстановление животных с ТГМ, хотя и в разной степени, и в целом трансплантации в контралатеральное полушарие были более успешны. В ипсилатеральном полушарии и гиппокампе НСК дифференцировались в нейроны и астроцитарную глию, а в контралатеральном полушарии они демонстрировали исключительно нейрональный фенотип. Авторы предположили, что это связано с дефицитом в зоне повреждения как нейронов, так и глии. В более ранних работах было также показано, что при травме головного мозга основная потеря клеток происходит непосредственно в зоне повреждения, в зоне противоудара, в базальных ядрах, а также в гиппокампе (Raghupathi R., 2004). Работ по восстановлению этих областей в результате клеточной терапии, к сожалению, не проводилось, что, возможно, связано со сложностью анализа и интерпретации результатов. Вместе с тем это представляется крайне важным, так как неявные повреждения могут играть основную роль в отдаленных последствиях ТГМ (Григорян А.С. и др., 2009).

Трансплантация нейропрогениторных клеток гиппокампа. Гиппокамп, по предположениям многих исследователей, представляет наиболее благоприятное для трансплантированных НСК молекулярное микроокружение, так как содержит «взрослые» мультипотентные стволовые клетки нервной ткани, и в нем возможен процесс нейрогенеза как при повреждении, так и в условиях физиологической нормы. Преимущества использования для трансплантации взрослых НСК, в частности, клеток гиппокампа, перед трансплантацией фетальной ткани, следующие:

- способность НСК гиппокампа к самообновлению и дифференцировке в нейрональном и глиальном направлениях, осуществляя репопуляцию разрушенных тканей мозга;

- способность продуцировать растворимые (например, ростовые факторы) и нерастворимые (например, молекулы межклеточной коммуникации) факторы;

- возможность генетически модифицировать НСК, индуцируя продукцию ими факторов, таких как NGF, bFGF и IGF-1 (insulin-like growth factor-1), предотвращающих развитие тяжелых последствий ТГМ и обеспечивающих эффективную регенерацию поврежденной ткани (Philips M.F. et al., 2001).

Существует ряд работ, выполненных российской группой исследователей, по трансплантации клеток фетального гиппокампа в мозг экспериментальных животных (Ерениев С.И., 1992, 1997; Ерениев С.И. и др., 1991, 1993; Zhuravleva Z.N., 2005). Авторам удалось продемонстрировать интеграцию трансплантированных клеток в нервную ткань реципиента, формирование ими функциональных аксонов и дендритов, межнейронных контактов.

Несмотря на перечисленные положительные стороны, применение клеток гиппокампа имеет ограничения, сводящие данный метод нейротрансплантации к лабораторным экспериментам и фундаментальным исследованиям – это сложность получения донорского материала и недостаточное его количество (Григорян А.С. и др., 2009).

Трансплантация NT2-клеток. Отдельный интерес в отношении нейротрансплантации представляет трансплантация клеток коммерчески доступной линии NT2 (NTera2), получаемой путем дифференцировки клеток тератокарциномы человека в клетки с нейрональным фенотипом. *In vivo* эти клетки способны дифференцироваться в функциональные нейроны, а при трансплантации их в поврежденный мозг крыс с нормальной иммунной системой они выживают в течение более чем 4 недель экспрессируя характерные нейрональные маркеры. В случае иммуносупрессии их сохранность в тканях мозга продолжается до 12 недель, а при интеграции в нервную ткань мышей с экспериментально индуцированным иммунодефицитом гомогенная популяция NT2 клеток сохраняет свою функциональную активность более года. Эти клетки не формируют опухолей *in vivo* по крайней мере в течение года после трансплан-

тации как мышам, так и человеку (Kondziolka D. et al., 2000; Nelson P.T. et al., 2002). В 2005 г. было показано, что клетки NT2 при трансплантации крысам способствуют восстановлению поведенческих и когнитивных функций животных не больше, чем инъекция в краевую область повреждения фибробластов, служивших в качестве контроля. Негативных побочных эффектов также отмечено не было (Zhang C. et al. 2005).

Возможно, что NT2 клетки имеют определенные преимущества перед фетальными тканями и НСК, полученными путем дифференцировки эмбриональных клеток, поскольку, во-первых, представляют собой гомогенную популяцию, которая может интегрироваться в нервную ткань. Во-вторых, использование этих клеток снимает вопрос о допустимости использования фетальных тканей с этической точки зрения. Их также возможно трансфенировать генами нейротрофических факторов (Trojanowski J. Q., 1997) (Григорян А.С. и др., 2009).

Совместная трансплантация различных типов клеток.

Успех трансплантации после травмы во многом зависит от выживания трансплантированных клеток в зоне повреждения, где они с большой вероятностью подвергаются апоптозу (Bakshi A. et al., 2005). Известно о попытках совместной трансплантации нейронов, выделенных из среднего мозга, и фетальных мышечных клеток в поврежденный стриатум крыс (Kaddis F.G., 2000). В своей работе авторы сначала *in vitro* показали, что лизаты мышечных волокон скелетной мускулатуры повышают в нейронах среднего мозга (мезэнцефалона) уровень фермента тирозиновой гидроксилазы, опосредуя через нее защиту клеток от апоптотической гибели. *In vivo* этот эффект был подтвержден, и было показано, что смешанный трансплантат приводит к лучшему в сравнении с трансплантацией только нейральных клеток результату, с большим успехом корректируя поведенческие нарушения, возникающие из-за травмы.

Интересный эксперимент по совместной трансплантации нейросфер и ММСК костного мозга был выполнен исследователями из Оклендского университета (США) в 2002 году (Lu D. et al., 2002).

В эмбриогенезе предшественники нейронов находятся в специфическом микроокружении, необходимом для их пролиферации и дифференцировки, но которое отсутствует в дефинитивном мозге.

Для создания же оптимальных условий регенерации нервной ткани теоретически должны быть воссозданы условия ткани эмбриональной. Также известно, что ММСК костного мозга секретируют широкий спектр ростовых факторов, в том числе участвующих в нейрогенезе (Yurek D.M. et al., 2000). Основываясь на этих данных, D.Lu и др. (2003) предположили, что сокультивирование ММСК с нейросферами, полученными из фетальных предшественников нейронов, может способствовать выживанию и пролиферации, а также дифференцировке нейрогенных клеток, а совместная трансплантация этих клеток приведет к улучшению результатов терапии.

Эксперимент был спланирован следующим образом: нейросферы в течение 7 суток сокультивировали с ММСК крысы (соотношение ММСК: предшественники нейронов было при этом примерно 1:50). Затем такие ММСК-нейросферы трансплантировали непосредственно в область травмы спустя 24 ч после ее нанесения.

Результаты проанализированы поведенческими тестами, а также с помощью гистологического анализа (иммуногистохимической окраски на нейрональные и глиальные маркеры авторы не проводили, между тем, это могло бы позволить интерпретировать дифференцировку клеток нейросфер). Обнаружилось, что ММСК-нейросферы способствуют гораздо более быстрому восстановлению животных после травмы; были выявлены статистически значимые улучшения прохождения поведенческих тестов и лучшая сохранность нервной ткани. У 9 крыс, получивших трансплантацию обычных нейросфер, сохранность трансплантата была отмечена лишь в 3 случаях, в то время как у всех без исключения животных, получивших ММСК-нейросферы, трансплантаты оказались сохранены на всех сроках анализа.

Анализ обычных нейросфер и ММСК-нейросфер показал, что на четвертый день культивирования в обычных нейросферах начинается гибель (так называемая «кавитация», или образование «некротической» полости), а в ММСК-нейросферах такого не происходит. По-видимому, ММСК действительно предоставляли нейральным клеткам необходимое для их выживания и питания микроокружение, увеличивая шансы трансплантата на выживание и, соответственно, повышая его эффективность (Григорян А.С. и др., 2009).

Трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. В работе, выполненной в 1998 г., авторы провели

трансплантацию ММСК в неповрежденный мозг крыс и показали, что подобные трансплантаты по своим свойствам очень сходны с трансплантатами фетальных астроцитов (Azizi S.A., 1998). Для астроцитарных трансплантатов ранее было показано, что они способны к миграции в ткани реципиента и функциональной интеграции в них, то есть к образованию контактов с нейронами реципиента и участию в создании гематоэнцефалического барьера (Andersson C. et al., 1993). Сходным образом около 20% трансплантированных ММСК также приживаются в ткани реципиента, не вызывая воспалительной реакции, и активно мигрируют, обнаруживаясь в стриатуме, мозолистом теле и коре больших полушарий (Azizi S.A., 1998).

Одной из главных причин выбора ММСК для такого рода исследований является секреция этими клетками ряда ростовых факторов как *in vivo*, так и *in vitro* (Andersson C. et al., 1993; Chopp M. et al., 2002). С помощью иммуноферментного анализа исследователи проанализировали спектр ростовых факторов, содержащихся в питательной среде, где культивировали ММСК, и обнаружили в ней факторы HGF, NGF, BDNF, BFGF, и VEGF, необходимые для нейро- и глиогенеза. При этом добавление в среду некоторых веществ, например, ретиноевой кислоты, или изменение концентрации ионов кальция, могло изменять и концентрации продуцируемых ММСК факторов.

Для проверки влияния ММСК на продукцию ростовых факторов клетками реципиента в зоне повреждения после ТГМ, был проведен эксперимент по внутривенной трансплантации ММСК крысам через 24 ч после нанесения повреждения. Результаты были проверены посредством анализа экстрактов мозга экспериментальных животных. Через 4-7 суток было зарегистрировано существенное повышение концентрации NGF, через 7 суток – BDNF, а уровень BFGF не изменялся в сравнении с контрольной группой вовсе. Иммуногистохимический анализ показал, что на 14-е сутки после инъекции ММСК как трансплантированные клетки, так и нейроны реципиента в краевой зоне повреждения продуцируют повышенные уровни NGF, BDNF и BFGF. Положительный результат был подтвержден поведенческими тестами (тесты в водном лабиринте Морриса, тест «открытое поле») (Lu D. et al., 2003).

Существует много работ по трансплантации ММСК после ТГМ. Помимо экспериментов *in vitro* по продукции ростовых факторов было показано, что ММСК при внутривенной трансплантации крысам с повреждением мозга повышают продукцию NGF, BDNF и BFGF нейронами в краевой зоне повреждения (Mahmood A. et al., 2004), и, по-видимому, за счет этого активируют пролиферацию и способствуют миграции предшественников нейронов, изначально находящихся в нервной ткани (Mahmood A. et al., 2004a).

ММСК мигрируют в краевую зону повреждения как при системном, так и при местном способе инъекции, снижают в зоне травмы выраженность воспалительной реакции, в случае их аллогенного или ксеногенного происхождения не провоцируют иммунологического отторжения и в течение долгого времени сохраняются в организме реципиента, продолжая продуцировать ростовые факторы и цитокины (Lu D. et al., 2001; Mahmood A. et al., 2004, 2005).

Также существуют данные, касающиеся трансплантации ММСК, предварительно культивировавшихся в присутствии нейротрофинов, таких как NGF и BDNF, что увеличивало их пролиферативную активность и способность к миграции, а также повышало экспрессию нейрональных маркеров, таких как NeuN и MAP-2 (Lu D. et al., 2001a; Mahmood A. et al., 2001).

В область травматического повреждения коры головного мозга крысам инъецировали фибриновый гель, заселенный ММСК и содержащий ростовой фактор BFGF. При этом было отмечено значимое снижение апоптоза трансплантированных клеток, статистически значимое уменьшение объема посттравматической кисты в мозге, образовавшейся в результате травмы; значительно лучше была и сохранность пенумбры, где было снижено количество апоптотических телец. В сравнении с ММСК в фибриновом геле, трансплантация которых служила в качестве одной из групп контроля, BFGF улучшал результаты (Bhang S.H. et al., 2007). Этот подход интересен и тем, что в данном случае была сделана попытка частичного восстановления ткани, утраченной в результате травмы, которая в обычном случае навсегда остается невосполненной - иначе говоря, при любом методе лечения, кроме трансплантации некой трехмерной оформленной структуры, на месте зоны повреждения остается

киста, окруженная глиальным рубцом и заполненная ликвором. До настоящего времени не было предложено иных подходов, с помощью которых можно было бы полностью ее ликвидировать. Возможно, трансплантация клеток на каком-либо естественном либо искусственном носителе (трехмерном матриксе), должна стать в будущем решением данной проблемы.

Положительный эффект трансплантаций ММСК логично объяснить дифференцировкой этих клеток в функционирующие нейроны и глию, которые замещают погибшие в результате травмы клетки. Однако доказать справедливость подобного предположения на практике трудно. Некоторые авторы сообщают об успешной интеграции ММСК в нервную ткань *in vivo* и их дифференцировке в нейроны (Munoz-Flias G. et al., 2004), в то время как другие заявляют, что те немногие ММСК, которые интегрируются в нервную ткань при трансплантации, в действительности вовсе не дифференцируются в нейроны, но сливаются с клетками реципиента (феномен «cell fusion»), что также нельзя считать отрицательным результатом с точки зрения терапии (Alvarez-Dolado M et al., 2003 и др.).

Убедительно показано, что, во-первых, индукция морфологических изменений в ММСК различными «нейрогенными» агентами, такими, например, как ДМСО или бутилгидроксианизол, не специфична для ММСК, и первичные фибробласты под их действием демонстрируют такие же морфологические изменения. Во-вторых, с помощью анализа экспрессии генов было показано, что в стандартных условиях культивирования ММСК экспрессируют широкий спектр генов, считающихся маркерам большого числа специализированных клеточных популяций, в том числе нестин – маркер предшественников нейронов, а при «нейрональной дифференцировке» экспрессия генов в них изменяется не больше, чем в использованных в качестве контроля первичных гепатоцитах (Bertani N. et al., 2005).

В отношении спонтанной экспрессии нейрональных маркеров (нестин, тубулин, нейрофиламент-М и маркер олигодендроцитов S100-р) независимыми исследователями были получены идентичные результаты, хотя при трансплантации в латеральные желудочки мозга отдельные ММСК все же мигрировали в обонятельные луковицы, интегрируясь в нервную ткань без признаков слияния с клетками реципиента (Deng J. et al., 2006).

Относительно спектров экспрессии генов было показано, что при индукции нейрональной дифференцировки в ММСК статистически значимо в сравнении с исходным уровнем повышаются уровни экспрессии генов, продукты которых связаны с осуществлением характерных для нейронов функций (синаптотаксин, фосфолипаза D1, синтаксин 1A, BDNF), но в данной работе, выполненной значительно позже, не было контроля воздействия нейротрофических условий культивирования на другие клетки, помимо ММСК, что вынуждает усомниться в доказательности результата (Tondreau T. et al., 2004a).

Подтверждено, что ММСК в стандартных для них условиях культивирования экспрессируют некоторый спектр нейрональных маркеров, а также маркер астроцитарной глии GFAP. Небольшой процент ММСК экспрессирует также нестин, и при культивировании с нейрональными ростовыми факторами процент нестинположительных клеток увеличивался. Такие ММСК продуцировали факторы NGF, BDNF и GDNF и, после трансплантации крысам в латеральный желудочек мозга, прикреплялись к выстилающим полость желудочка эпендимоцитам, после чего мигрировали в ткань мозга. Выполняли ли они там какие-либо функции, характерные для нейронов или глии – неизвестно (Arnold S. et al., 2006).

Несмотря на несогласующиеся друг с другом результаты исследований в этой области, в последние годы появляется все больше работ, авторы которых пытаются доказать возможность дифференцировки ММСК в нейроны как *in vitro*, так и *in vivo*. В 2007 г. научная группа под руководством P.F. Choong (Choong P.F. et al., 2007) провела серию экспериментов по культивированию ММСК человека в среде с добавлением определенных ростовых факторов: BDNF, EGF (epidermal growth factor), и NGF. Исследователи сообщали, что после 10 суток культивирования в таких условиях «ММСК демонстрировали нейрональную форму» (что, как уже упоминалось, может быть следствием неспецифической перестройки цитоскелета) и экспрессировали характерные для нейронов маркеры: GAP-43 (growth associated protein-43), NeuN и neurofilament-200. Эти маркеры указывают на ранние стадии нейрональной дифференцировки, но, опять же, могут экспрессироваться ММСК и при обычных условиях культивирования. Похожие результаты были получены в том же году в другой лаборатории, где ММСК мышей

культивировали в характерных для НСК условиях. Более того, в цитоплазме таких клеток в ответ на нейростимуляцию возрастала концентрация ионов кальция, что указывает на возможность передачи ими нервного импульса, и это является уже более весомым доказательством нейрональной дифференцировки. Опубликована весьма убедительная работа, в которой с помощью метода «patch-clamp» была показана генерация такими «нейронами» потенциала действия на мембране после культивирования ММСК в присутствии ретиноевой кислоты (Cho K.J. et al., 2005).

Показано, что в стандартных для НСК условиях культивирования около 8% ММСК формируют структуры, похожие на нейросферы, экспрессируют нейрональные маркеры нестин и *musashi-1* и дифференцируются в нейроны, астроциты и олигодендроциты. При совместном культивировании их с первичными астроцитами они дифференцируются в нейроны, обладающие четко выраженными аксоном и дендритами. Было показано формирование дифференцированными клетками синапсов и образование в ответ на стимуляцию тетродотоксином потенциала действия на мембране. Дифференцировка оказалась частично обратимой: при повторном помещении в стандартные для ММСК условия культивирования, около 5% клеток возвращались в исходное состояние и переставали экспрессировать нейрональные маркеры (Shin C.C. et al., 2008).

Что касается возможности дифференцировки ММСК в олигодендроциты – клетки, образующие миелиновые оболочки аксонов нейронов, без которых невозможна нормальная передача нервного импульса, установлено, что ММСК крысы в соответствующих условиях культивирования способны экспрессировать маркеры олигодендроцитов: рецептор *LNGF*, *Krox-20*, *CD104* и белок *S100-r*. Более того, при трансплантации такие клетки образуют миелиновые оболочки вокруг регенерирующих аксонов, за три недели приводя к существенному в сравнении с контролем восстановлению функций поврежденного нерва (Keilhoff G. et al., 2006). Относительно применения подобной методики при экспериментальной ТГМ работ до 2009 г. выполнено не было.

Таким образом, наилучшие результаты применения клеточной терапии при травме головного мозга получают при трансплантации фетальных тканей и НСК, что легко объяснимо, так как фетальный материал, в большом количестве содержащий недифференциро-

ванные нейрональные клетки-предшественницы, и сами по себе НСК являются наиболее адекватной заменой погибших в результате травмы собственных клеток реципиента. Теоретически следует ожидать, что в условиях иммунологической изолированности тканей ЦНС аллогенные прогениторные клетки могут успешно формировать функциональные связи с нейронами реципиента и участвовать в генерации и проведении нервных импульсов, а также проявлять нейропротекторные и трофические эффекты. Но относительно применения фетальных тканей, как уже было сказано, существует ряд этических ограничений, а относительно НСК возникает проблема доступности донорского материала, а также его количества. Большая часть трансплантированных нейронов погибает путем апоптоза (Alvarez-Dolado M. et al., 2003), что, видимо, связано с патологическими процессами, спровоцированными травмой и вызывающими гибель собственных клеток реципиента, протекающей в зоне повреждения воспалительной реакцией, присутствием продуктов распада ткани и нарушением в ней ионного обмена между клетками и межклеточной средой.

Совместные трансплантации НСК и ММСК костного мозга обеспечивают наилучшую сохранность НСК в организме реципиента. Однако, данный метод также имеет ряд недостатков, связанных с этическими препятствиями применения НСК и сложностью их получения в достаточных для трансплантации количествах.

Альтернативой трансплантациям НСК и фетальных тканей являются трансплантации ММСК костного мозга – клеток, обладающих уникальными свойствами продукции широкого спектра нейротрофических факторов и иммуномодуляции. Кроме того, ММСК возможно трансплантировать не только непосредственно в ткань головного мозга, но и внутривенно, что исключает необходимость нанесения пострадавшему дополнительной травмы. Костный мозг представляет собой легкодоступный источник аллогенного донорского материала, использование которого не нарушает этических норм.

В то же время, относительно воздействия ММСК на поврежденную нервную ткань остается больше вопросов, нежели ответов. Большинство работ в этой области, помимо того, что выполняются весьма ограниченным числом исследователей, зачастую не содержат контрольных опытов по трансплантации других типов клеток, не

родственных ММСК по происхождению. Тем не менее, есть все основания полагать, что в будущем клеточная терапия может оказаться если не основным, то, по крайней мере, и не второстепенным по отношению к фармакотерапии методом лечения последствий травматических повреждений ЦНС (Григорян А.С. и др., 2009).

В последние годы опубликованы результаты изучения влияния трансплантации ММСК на сохранность нейронов и развитие глиального рубца в головном мозге крыс, перенесших тяжелую черепно-мозговую травму (Григорян А.С. и др., 2010).

Трансплантация стволовых клеток пуповинной крови. Выполнены экспериментальные работы по применению стволовых клеток пуповинной крови в постнейротравматическом периоде (Сычева Е.В. и др., 2006; Шаповалова В.В. и др., 2006). При сравнительном изучении структурно-функционального состояния коры большого мозга половозрелых белых крыс после внутримозговой алло- и ксенотрансплантации эмбриональной нервной ткани и внутривенного введения стволовых клеток пуповинной крови человека в различные сроки после диффузно-очаговой травмы головного мозга лучший церебропротективный эффект обнаружен при внутримозговой трансплантации эмбриональной нервной ткани на 7-е сутки посттравматического периода.

Трансплантация аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в остром периоде диффузной травмы головного мозга. В отличие от многих других тканей, нервная система имеет ограниченный потенциал самовосстановления. Высокодифференцированные нейроны не обладают способностью к полной регенерации, а присутствующие в головном мозге взрослого организма нейральные стволовые клетки имеют ограниченные возможности генерировать новые функциональные нейроны в ответ на повреждение. Поэтому актуальным является поиск новых методов терапии травм головного мозга с использованием трансплантации стволовых клеток. Многочисленные исследования по данному вопросу свидетельствуют, что необходимой пластичностью и терапевтическим потенциалом для нервной системы обладают ММСК из костного мозга взрослого организма.

По данным литературы, трансплантация ММСК способствует репарации поврежденной нервной системы и восстановлению неврологического статуса при фокальной церебральной ишемии и

локальной травме головного мозга. В эксперименте (Южаков В.В. и др., 2007) изучено влияние системной трансплантации ММСК из костного мозга взрослого организма на функциональную морфологию нейронов и репаративные процессы в нервной ткани крыс после закрытой черепно-мозговой травмы (ЗЧМТ). Исследования выполнены на головном мозге крыс самцов линии Вистар в возрасте 2 месяцев массой тела 140-150 г, разделенных на 5 групп. Моделирование травмы головного мозга осуществляли методом падающего груза. Груз весом 50 г свободно падал с высоты 110 см в полую трубку диаметром 1,2 см на теменную область головы. Площадь ударной поверхности импактора составляла 0,5 см². Из выживших животных (около 50% от общего количества) были сформированы группы сравнения. Группы были равноценны по степени тяжести травмы головного мозга, которую оценивали по комплексу симптомов и тестов в течение 30 мин после воздействия. Животные I экспериментальной группы (n=16) с травмой головного мозга лечение не получали. Крысам II группы (n=10) с травмой проводили базисную терапию на основе применения противоотечных, антигипоксических и противовоспалительных препаратов. Животным III группы (n=10) через сутки после травмы однократно внутривенно вводили 2×10^6 ММСК, суспендированных в 0,5 мл физиологического раствора. Крысам IV экспериментальной группы (n=10) проводили комплексное лечение путем сочетанного применения базисной терапии и введения ММСК. Контрольную группу составили 14 ложнотравмированных крыс.

Головной мозг для исследования брали у декапитированных под нембуталовым наркозом крыс через 1 ч, 1, 3 и 14 суток после нанесения травмы. Срезы препаратов на уровне роstralного отдела боковых желудочков, гиппокампа, среднего мозга и мозжечка, фиксированных в этаноле, окрашивали крезиловым фиолетовым и тионином по Нисслю. Для иммуноокрашивания пролиферирующих клеток использовали мышинные моноклональные антитела к PCNA (proliferating cell nuclear antigen) при разведении 1:50 (клон PC10, «Calbiochem»).

Результаты исследования показали, что ЗЧМТ вызывает у крыс диффузное повреждение головного мозга. Первичное повреждение сопровождается сосудистыми нарушениями и травматическим отеком, достигающим максимального развития на 1-е сутки. Форми-

рование отека ведет к ишемическим повреждениям нейронов коры и стволовой части мозга. Уже в ранние сроки после травмы запускаются реактивные и компенсаторно-регенерационные механизмы с инициацией пролиферации глии и клеток в зонах нейрогенеза. Однако фаза регенерации носит пролонгированный характер с медленно протекающими репаративными процессами поврежденных тканевых и клеточных структур головного мозга.

Патологические события, формирующиеся при повреждении взрослого мозга, стимулировали нейрогенез в паравентрикулярной зоне боковых желудочков и субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа. Лечебный эффект после базисной терапии по усилению пролиферативной активности клеток сосудистых сплетений, микроглии и, особенно, клеток эпендимы и субэпендимального слоя определялся на 3-и сутки после травмы. Через 2 недели у животных, получавших комплексное лечение, гистологический рисунок коры и других отделов головного мозга практически не отличался от вариантов нормы для животных контрольной группы. Тем не менее, несмотря на восстановление морфологии нейронов, в коре, мозолистом теле и промежуточном мозге сохранялись локальные очаги пролиферации клеток и повышенная активность зон нейрогенеза. С учетом этого можно считать, что полноценного восстановления поврежденных клеточных и тканевых структур мозга в данном периоде времени после травмы у животных, которым вводили ММСК на фоне базовой терапии, не происходит.

При диффузной травме головного мозга нейротропным действием ММСК было не только усиление в фазе регенерации репаративных процессов в целом (быстрое восстановление субстанции Ниссля в нейронах, ускорение глиогенеза и ангиогенеза), но и, возможно, активация герминативных зон нейрогенеза. Анализ данных по этому вопросу показывает, что лечебное действие ММСК при повреждении нервной ткани может реализовываться несколькими путями. Во-первых, есть сведения, что после миграции в поврежденную нервную ткань ММСК начинают экспрессировать нейрональные и астроцитарные маркеры и, не исключено, что они способны замещать погибшие клетки. Во-вторых, продукты экспрессии МСК могут оказывать стимулирующее действие не только на нервные стволовые клетки, но и на эндотелий сосудов. И, наконец, ММСК активируют клетки, которые дополнительно экспресси-

руют факторы роста в головном мозге. По данным литературы, после повреждений или дегенерации, обусловленной травмой, выживаемость нейронов и их восстановление промотируют нейротрофические факторы, которые экспрессируют глиальные клетки. Результаты авторов свидетельствуют, что индуцированную травмой пролиферацию глиальных клеток потенцирует базисная терапия и активизирует введение ММСК. Возможно, снижая развитие отека и восстанавливая микроциркуляцию, базовая терапия способствует более быстрому поступлению, накоплению и/или миграции ММСК в поврежденные участки головного мозга.

Таким образом, сравнительный анализ полученных результатов позволяет заключить, что системно введенные в сингенный организм мезенхимальные стволовые клетки обладают пролиферотропным, ангиогенным и, по-видимому, нейротрофическим эффектами. Косвенные данные свидетельствуют, что в период регенерации нервной ткани ММСК могут активировать пролиферацию клеток в зонах нейрогенеза. Визуально лечебный эффект определен на 2-е сутки после внутривенного введения ММСК. На фоне базисной терапии нейропротекторное действие ММСК усиливается. Можно предположить, что комплексное лечение при общемозговой диффузной травме, основанное на применении метаболической поддержки и внутривенного введения ММСК, создает предпосылки для активации механизмов компенсаторно-приспособительных процессов в период репаративной регенерации и усиления трофики нервной ткани, необходимых для восстановления функциональной морфологии поврежденных нейронов (Южаков В.В. и др., 2007).

Многочисленные экспериментальные исследования, демонстрирующие высокую пластичность ММСК, позволили перейти к испытаниям методов клеточной терапии для лечения различных заболеваний, в том числе и в неврологии (Bang O.Y. et al., 2005). Известно, что ММСК в подходящих *in vitro* условиях могут давать презумптивные нейроны, приобретая типичный нейрональный фенотип и экспрессируя характерные для нервной ткани маркеры. Поскольку ММСК считаются иммунопривилегированными клетками и обладают иммуносупрессивным эффектом (Сергеев В.С., 2005), исследователи изучают возможность трансплантации аллогенных клеток с терапевтической целью.

Показана способность аллогенных ММСК к дифференцировке в нейроны *in vivo* при трансплантации в развивающийся головной мозг крыс. Пересаженные донорские клетки начинали экспрессировать нейрональные маркеры и затем мигрировали в различные удалённые участки головного мозга. ММСК заселяли обширные участки фетального и неонатального мозга, экспрессируя сайт-специфические нейрональные гены и демонстрируя хорошую выживаемость (Munoz-Elias G. et al., 2004). Этот эксперимент показывает, что аллогенные ММСК способны к дифференцировке, миграции и длительному выживанию без иммунной реакции в эмбриональном головном мозге.

Эти же исследователи опубликовали новые данные по трансплантации аллогенных ММСК во взрослый, уже сформировавшийся головной мозг. Во взрослом мозге количество факторов, отвечающих за дифференцировку клеток, значительно снижено по сравнению с эмбриональным мозгом. Исследователи предположили, что ММСК, попав в мозг взрослых животных, не будут реализовывать свой потенциал так же успешно, как это происходило у эмбрионов. Однако известно, что и во взрослом мозге есть два региона, обладающих известной пластичностью. Это гиппокампальная зубчатая извилина и вентрикулярная субэпендимальная зона, клетки которых продолжают секретировать морфогенетические белки, отвечающие за пролиферацию, дифференцировку и выживание резидентных клеток-предшественников. Именно в эти области (гиппокамп и стриатум) авторы и выполняли трансплантации. Кроме того, они проверили иммуногенность аллогенных ММСК при их трансплантации. Взрослый головной мозг, в отличие от эмбрионального, обладает хорошо развитыми гуморальным и клеточным компонентами иммунной системы, которые могут повлиять на судьбу донорских клеток.

Оказалось, что в интактном взрослом головном мозге крыс в ответ на инфузию аллогенных ММСК возникает воспалительная реакция, приводящая к быстрому отторжению донорских клеток. Иммунная реакция стала основной преградой на пути выживания и стабильной интеграции в нервную ткань трансплантированных клеток.

Отторжение аллогенной донорской ткани обычно опосредуется адаптивным или приобретённым иммунитетом. Адаптивный иммунный ответ возникает на 10-14-е сутки после трансплантации,

именно столько времени требуется на презентацию антигена, селекцию и клональную экспансию Т-клеточных популяций. При гистологических исследованиях тканей, полученных от экспериментальных животных, было обнаружено, что в данном случае действует неприобретённый иммунитет. В области трансплантата присутствовало минимальное количество CD8⁺ цитотоксических клеток, к тому же отторжение завершалось уже к седьмым суткам от начала эксперимента. Это свидетельствует о том, что ММСК отторгались посредством воспалительной реакции, то есть реакции врождённого иммунитета. В ней главным образом участвовали клетки микроглии (специализированные макрофаги). Обычно при травмах мозга микроглиальные клетки быстро мигрируют в зону повреждения и формируют своеобразный барьер, отделяющий нормальные клетки от разрушенных. При трансплантации ММСК наблюдался сходный эффект.

Интрацеребральная трансплантация вызывает серьёзную механическую травму мозга, поскольку продвижение канюли через мозговую паренхиму ранит локальные нервные и сосудистые структуры, что, по-видимому, и провоцирует воспаление. Уже на третьи сутки вокруг донорских клеток начиналось быстрое развитие клеток микроглии – как в стриатуме, так и в гиппокампе. На 7-е сутки фибронектин-реактивный матрикс и макрофаги формировали вокруг ММСК барьер. Сходным образом отторгались и трансплантированные в мозг эндотелиальные клетки. В то же время фетальные нейральные трансплантаты вызывали иммунный ответ, опосредованный в основном Т-клетками, и отторгались в течение 3 недель. Это указывает на то, что характер иммунной реакции контролируется характеристиками донорских клеток.

ММСК и эндотелиальные клетки продуцируют гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) и другие цитокины, усиливающие пролиферацию и созревание гранулоцитов и макрофагов и, соответственно, микроглиальных элементов. Более того, ММСК экспрессируют молекулу SDF-1, которая служит фактором хемотаксиса для клеток миелоидного ряда. Возможно, именно экспрессия этих факторов *in situ* приводит к постоперационному воспалению и разрушению трансплантатов.

Хотя гистологические и иммуногистохимические данные (клетки выявлялись антителами к GFP) свидетельствовали о пол-

ном отторжении трансплантата, в нервной ткани были обнаружены BrdU и BBZ (другие 2 метки ММСК), что позволяло предположить выживание части ММСК и их созревание. Оказалось, что при трансплантации ММСК в сформировавшийся мозг происходит перенос их маркеров в клетки хозяина. В качестве контроля были использованы нежизнеспособные ММСК, прошедшие несколько циклов быстрой заморозки-разморозки, либо подвергнутые микроволновому облучению, а затем трансплантированные в гиппокамп и стриатум интактных крыс.

В течение 12 недель после трансплантации меченные BrdU и BBZ клетки широко распространились по обоим регионам трансплантации. Их фенотипические характеристики полностью соответствовали характеристикам клеток, обнаруженных после трансплантаций жизнеспособных ММСК – это были нейроны реципиента. Таким образом, происходил перенос маркеров из трансплантированных ММСК в клетки-предшественники нейронов хозяина, которые в дальнейшем дифференцировались. И хотя стриатум, в отличие от гиппокампа, не является нейрогенной областью, в последнее время появились данные об отдельных прогениторных клетках, присутствующих в нём. Возможно, именно с этим связана схожесть картин в обоих районах трансплантации.

Таким образом, это исследование противоречит как данным о пластичности ММСК при их инфузиях в интактный либо повреждённый мозг, а также данным об их иммунопривилегированности. Возможно, в ранних экспериментах исследователи ошибочно определяли выживание и пластичность ММСК, основываясь на обнаружении в тканях реципиента маркеров BrdU и BBZ. На самом деле, при трансплантации аллогенные ММСК отторгаются посредством воспалительной реакции, в которой участвуют клетки микроглии реципиента, а маркеры остаются в тканях в результате переноса. Явление переноса маркеров отрицает феномен трансдифференцировки ММСК *in vivo* в условиях подходящего микроокружения. Результаты этого исследования ставят под сомнение перспективу использования аллогенных ММСК в качестве источника нейронов при трансплантациях нервной ткани, а также авторы статьи призывают к осторожности при дальнейшем использовании BrdU и BBZ в качестве маркеров трансплантированных мезенхим-

ных стволовых клеток. Вместе с тем, использование этих маркёров может быть причиной артефактов (Григорян А.С., 2006).

Трансплантация фетальных нервных и кроветворных клеток в резидуальном периоде травмы головного мозга. Клеточная технология может быть эффективно использована не только в остром периоде ЧМТ, но и в лечении отдаленных последствий ТЧМТ. Известен опыт использования клеточной терапии у 65 пациентов с последствиями боевой травмы головного мозга. Показано, что такая терапия позволяет значительно уменьшить патологическую выраженность посттравматических исходов и расширить возможности последующей реабилитации (Гайдар Б.В. и др., 1998).

Положительное влияние субарахноидальной нейротрансплантации на реабилитационную коррекцию неврологического статуса больных с последствиями ЧМТ было также отмечено в других исследованиях. Представлены отдаленные результаты клеточной терапии 56 больных (19 женщин, 37 мужчин) в возрасте от 18 до 73 лет с последствиями ТЧМТ в виде выраженного психоорганического синдрома (Селедцов В.И. и др. 2006). На момент проведения лечения посттравматический период не превышал 2 года. У всех пациентов имел место кистозно-слипчивый арахноидит с явлениями атрофии больших полушарий и гидроцефалии. У 23 пациентов имелись субарахноидальные и у 11 – внутримозговые кисты, причем в пяти случаях они были порэнцефалическими. Имело место сочетание явлений внутричерепной гипертензии и нарушений интеллектуально-мнестических функций с очаговой органической симптоматикой. В 10 случаях имел место трудно купируемый генерализованный судорожный синдром.

Клеточную суспензию, состоящую из клеток, полученных из незрелых нервных и кроветворных тканей, трансплантировали субарахноидально 16 пациентам 1-кратно, 32 пациентам – 2-кратно и 8 пациентам – 3-кратно. Клинический эффект разной степени выраженности в виде регресса общемозговых симптомов, снижения экстрапирамидного тонуса и улучшения в психоэмоциональной сфере был отмечен у всех пациентов. У 4 пациентов прекратились эпилептические припадки, что дало возможность полностью отменить антиконвульсанты через 3-4 месяца после проведенного лечения. У остальных больных с эписиндромом в течение 1,5 лет доза антиконвульсантов была снижена в 2-3 раза. Все без исключения пациенты

объективно отмечали улучшение. Серьезных побочных эффектов клеточной терапии выявлено не было. Проведенное лечение позволило всем пациентам впоследствии значительно расширить круг реабилитационных мероприятий. В этом же исследовании было установлено, что у части пациентов клеточная терапия приводила к иммунной сенсibilизации по отношению к антигенам донора, выявляемой в тесте подавления миграции лейкоцитов. В то же время, признаков развития системных тканедеструктивных аутоиммунных реакций у пролеченных пациентов обнаружено не было. Опираясь на полученные данные, можно сделать вывод, что клеточная терапия – это относительно безопасный метод лечения, который может быть использован при лечении отдаленных последствий ЧМТ.

Эндолумбальное введение фетальных клеток незрелой нервной ткани может быть эффективным методом лечения последствий ЧМТ также и у детей (Кафанова М.Ю. и др., 2000).

В последнее время методом ¹H магнитно-резонансной спектроскопии изучается влияние клеточной терапии на уровни метаболитов в структурах мозга детей с последствиями тяжелой черепно-мозговой травмы (Семенова Н.А. и др., 2011).

3.5.4. Трансплантация стромальных клеток костного мозга для пластики костей мозгового черепа

Лечение дефектов костей черепа остается актуальной проблемой современной травматологии и нейрохирургии. Данные кости имеют низкие регенераторные свойства, следствием чего является снижение возможности гисто- и органотипического восстановления в случаях повреждений, возникает необходимость использования различных пластических материалов.

По современным данным, черепно-мозговые травмы мирного времени составляют до 40% от всех травм, причем до 40 из них сопровождается формированием дефектов, нуждающихся в оперативном лечении. По результатам анализа санитарных потерь во время Великой Отечественной войны и войны в Республике Афганистан ранения головы составляли соответственно 14,8 и 22,6%. Причем, в РА 46,5 и 32,9% ранений черепа приходились на лобную и теменную области соответственно, то есть на отделы мозгового черепа. В вооруженных конфликтах в Чеченской Республике количество ране-

ных и пострадавших с повреждениями черепа колебалось от 68,9 до 76,2% среди всех раненых нейрохирургического профиля (Гайдар Б.В. и др., 2002).

Имеющиеся в арсенале нейрохирургов методы пластики дефекта при помощи синтетических материалов (различные пластмассы) обладают рядом недостатков. Среди них следует отметить экзотермический эффект при полимеризации, что приводит к дополнительному повреждению тканей раны; канцерогенное действие; относительную хрупкость, ведущую к повторным переломам. Альтернативой этому является аллопластика трупной костью, костной крошкой, костным регенератом, пластика фрагментом живой аутокости с дальнейшей его дистракцией (Соловьев В.А. и др., 2004). Вместе с тем, данная проблема далека от своего окончательного разрешения. В последнее время дискутируется возможность краниопластики с использованием культивированных остеогенных клеток (Lendeckel S. et al., 2004).

В качестве носителей для остеогенных клеток предложены различные субстанции: альгинаты (Shang Q. et al., 2001), гидроксиапатит, трикальцийфосфат и иные керамические материалы (Mankani M.H. et al., 2001; Cancedda R. et al., 2003), деминерализованная костная ткань (Иванов С.Ю. и др., 2001; Xie C. et al., 2007). Перспективным представляется использование в качестве носителя пористых имплантатов из стеклокристаллических материалов, в том числе и биоситалла (Livingston T. et al., 2002). Получены положительные результаты по остеоинтегративным свойствам имплантатов из этого материала.

В качестве источника стромальных клеток использовали красный костный мозг, заключенный в крыльях подвздошных костей. С обеих сторон резецировали крылья подвздошных костей у подвздошно-позвоночного угла. Забранный фрагмент кости имел площадь не менее 1 см².

Манипуляция выполнялась с обеих сторон. Кусочки помещались в питательную среду DMEM (ISN, США) без сыворотки.

Из резецированных фрагментов костей тщательно выскабливали костный мозг. Полученную гомогенную тканевую массу центрифугировали в течение 10 мин при 1000 оборотах. Осадок костномозговых клеток трехкратно диссоциировали смесью трипсин-версен

(Difco, США) при +37°C. Далее фермент нейтрализовали сывороткой. Клеточную взвесь фильтровали через капроновый фильтр.

Клетки высевали в одноразовую пластиковую посуду (чашки Петри) из расчета $5-7 \times 10^5$ клеток на 1 см² площади дна. Культивирование происходило в СО₂-инкубаторе при концентрации углекислого газа 5% при +37°C.

Гранулы биоситалла размером 0,3-1,0 мм, представляющие собой фракцию препарата «Вносит», многократно промывали средой без сыворотки, стерилизовали автоклавированием и до использования хранили в среде без сыворотки. Культивирование клеток на гранулах осуществляли в 24-х луночных платах. Общий срок культивирования на гранулах составлял 10 суток.

У кроликов, от которых был получен костный мозг, латеральное сагиттального шва формировали фрезевое отверстие диаметром 1,0 см так, чтобы не повреждать твердую мозговую оболочку, оставив кровотечение, в образовавшийся дефект помещали гранулы костнопластического материала с мобилизованными на его поверхности клетками. Над материалом тщательно ушивали апоневротический шлем. Кожную рану ушивали наглухо.

Через 60 и 120 суток после операции материал, включавший фрагменты костей, твердую мозговую оболочку, апоневротический шлем, фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, а кусочки, предназначенные для изготовления препаратов для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) - в 2,5% растворе глутарового альдегида.

Для световой микроскопии препараты окрашивали гематоксилином по Майеру и эозином, а также по Маллори.

В результате исследования установлено, что культура стромальных клеток костного мозга кроликов после индукции направленной остеогенной дифференцировки обладает способностью адгезироваться к поверхности гранул из биоситалла. При длительном культивировании они попадают и на дно культурального сосуда, где сохраняют свою обычную отростчатую и веретеновидную форму. При перенесении таких гранул в коллагеновый гель и дальнейшем культивировании, они диффузно прорастают в гель, занимая все больший объем, и постепенно теряют связь с фрагментом биоситалла. Следовательно, биоситалл не обладает выраженным угнетающим действи-

ем на культуру клеток. В его присутствии клетки сохраняют способность к пролиферации.

В зависимости от рельефа поверхности гранулы клетки приобретали различную форму. На гладких пологих поверхностях клетки распластывались, сохраняя при этом отростчатую форму. На неровных поверхностях материала клетки располагались рядами, покрывая его монослоем, при этом их отростки фиксируются на дополнительных точках, находящихся в иных плоскостях. В течение 10 суток клетки покрывали монослоем практически все поверхности гранул.

В области костной раны гистологическая картина через 60 суток свидетельствовала о частичном зарастании дефекта костной тканью, при этом его размер уменьшился приблизительно на $2/3$. Морфология регенерата была различной в краевых и центральных участках дефекта. Так, в области краев дефекта наблюдался активный процесс остеогенеза вокруг гранул биоситалла. Следует, однако, отметить, что ни в одном случае не удалось наблюдать плотного контакта новообразованной кости с гранулами. Напротив, между ними всегда сохранялась прослойка волокнистой соединительной ткани, иногда с собственными кровеносными сосудами. Однако архитектура трабекул свидетельствовала о том, что они образуются вокруг беспорядочно лежащих гранул. Часть гранул оказались заключенными во вновь сформированную костную ткань. Со стороны краев наблюдался активный центростремительный рост костной ткани даже в тех участках, которые были лишены биоситалла.

Часто гранулы, находящиеся ближе к краю дефекта, были окружены богатой клеточными элементами тканью, которую в патогистологической литературе принято называть «остеогенной». В центральных участках дефекта гранулы были окружены в основном соединительной тканью с мощно развитым волокнистым компонентом. Часть коллагеновых фибрилл была плотно упакована и демонстрировала слабые признаки минерализации, что выявлялось при окраске по Маллори.

По данным СЭМ, к 60-м суткам костная ткань занимала не менее $2/3$ дефекта. Ее граница с исходной костью прослеживалась четко. Новообразованная ретикулофиброзная костная ткань имела неровную поверхность и большое количество отверстий, каналов и

полостей, в которых залежали гранулы биоситалла, обнаженные в результате деорганизации.

Через 120 суток после пересадки клеток на гранулах биоситалла целостность теменной кости была восстановлена полностью. Бывшая область дефекта заполнена ретикулофиброзной костной тканью, формирующей костные трабекулы, расположенные между гранулами материала. Следует отметить, что со стороны твердой мозговой оболочки и надкостницы уже была сформирована кость пластинчатого строения. Общие костные пластинки составляли наружную и внутреннюю поверхности бывшего регенерата. В самой кости происходили процессы ремоделирования – перестройки ретикулофиброзной костной ткани в пластинчатую.

Немаловажным является тот факт, что пространство между костью и биоситаллом стало значительно уже. Вместе с тем, признаков резорбции биоситалла или непосредственного замещения его костной тканью выявить не удалось. Гранулы были окружены минерализованными пластинками соединительной ткани, которую можно интерпретировать как костную.

Таким образом, использованный в работе в качестве носителя для клеток стеклокристаллический материал – биоситалл – может выполнять функцию доставки клеток в область дефицита костной ткани, то есть использоваться в качестве скаффолда (scaffold). Ранее показано, что биоситалл может служить источником необходимых элементов для минерализации волокнистого матрикса при остеогенезе, что доказано методами электроннозондового микроанализа у пациентов с имплантированными биоситалловыми блоками. Немаловажно, что биоситалл не только не подавляет пролиферацию и дифференцировку находящихся на нем клеток, но и способствует этим процессам. Установлено, что при культивировании остеогенных клеток на биоситалле почти в два раза увеличивается удельная активность щелочной фосфатазы, что свидетельствует об их прогрессивной остеогенной дифференцировке (Николаенко Н.С. и др., 2004).

При трансплантации культивированных стромальных клеток на носителе в рану возникают обоснованные сомнения относительно сохранения ими жизнеспособности в области активного воспаления и действия различных цитокинов. В некоторых работах показано,

что данные клетки сохраняют жизнеспособность и прямо или опосредованно участвуют в процессах остеогенеза (Деев Р.В., 2006).

Значимость использования данной методики для оптимизации процессов остеорепарации или пластики костей следует оценивать в сравнении с теми же процессами, происходящими естественным образом.

О сниженном регенераторном потенциале покровных костей черепа известно давно. Так, по данным различных авторов восстановление дефекта теменной кости у кролика либо не происходит вообще, либо происходит частично (Bidic S.M.S. et al., 2003). Результаты экспериментов показывают, что этот процесс может быть существенно ускорен. При использовании биоситалла в качестве носителя клеток данный процесс по срокам наступления полного восстановления целостности кости происходит быстрее, чем при использовании взвеси клеток или клеток в коллагеновом носителе. Так, по данным авторов, при трансплантации взвеси стромальных клеток в аналогичный дефект формирование полноценного костного регенерата наблюдается лишь на 120-е сутки, а в коллагеновом геле – на 90-е (Деев Р.В., 2006), в то время как по результатам настоящего эксперимента восстановление целостности костной ткани произошло в период от 60 до 120 суток. Сформированный в результате трансплантации клеток в культуральной среде или коллагене регенерат, видимо, отличается по прочности от регенерата с гранулами биоситалла, поскольку в этом случае в структуру костной ткани инкрустированы гранулы биоситалла, достаточно плотно охваченные костными трабекулами. Необходимо также отметить и более полное восстановление анатомических контуров теменной кости.

Несмотря на сниженный регенераторный потенциал, плоские кости черепа остаются весьма подверженными к индукции остеогенеза (Деев Р.В., 2006). Реализация индукционного воздействия выражается в изменении временного соотношения фаз посттравматической регенерации: первичной реакции на повреждение, репаративного остеогистогенеза и адаптивной перестройки (Гололобов В.Г. и др., 2002). В плоских костях черепа репаративный процесс отличается тем, что фаза адаптивной перестройки протекает атипично. Результаты морфометрических исследований свидетельствуют, что именно на 60-120-е сутки в регенерате наблюдается снижение доли костной ткани. Такие манипуляции, как пересадка клеток, в том числе и на био-

ситалловых носителях, являются тем индуктором, которые пролонгируют фазу собственно репаративного остеогистогенеза и способствуют нормальному протеканию фазы адаптивной перестройки. Об этом свидетельствуют и полученные авторами признаки перестройки ретикуло-фиброзной костной ткани регенерата в пластинчатую, полностью восстановившего целостность кости через 120 суток после формирования дефекта и пересадки клеток на гранулах биоситалла.

Данный материал, как в чистом виде, так и в сочетании с культурой клеток в форме гранул, очевидно, пригоден лишь при строго определенных показаниях, например, при лечении костных кист и полостей различного происхождения. Дефекты костей иной локализации могут потребовать использования не гранулированного материала, а создания трехмерных конструкций, по характеру и степени открытости пор имитирующих нативную кость (Деев Р.В., 2007; Волков А.В. и др., 2010).

3.5.5. Клеточная терапия травматических ком

В последние годы продолжается неуклонный рост количества пострадавших с тяжелой черепно-мозговой травмой (ТЧМТ). Одной из важных проблем в их лечении остаются длительные коматозные состояния, заканчивающиеся чаще всего глубокой инвалидностью пациентов, что создает значимые сложности для семьи, а также существенную социальную и экономическую нагрузку для государства.

В многочисленных исследованиях показано, что в патогенезе развития травматической комы и последующего вегетативного состояния важное значение имеет утрата активирующего влияния на кору мозга специфических структур (в частности, ретикулярной формации) и нарушение межнейронных связей. Собственные резервные возможности головного мозга в этом отношении ограничены; современная медикаментозная терапия зачастую дает неудовлетворительные результаты. В этой связи возникает проблема поиска способов эффективной стимуляции специфических структур мозга с целью восстановления их активирующих влияний.

Накоплен достаточный экспериментальный материал по использованию в рамках этой проблемы клеточной терапии. Поэтому

изучение вопроса в клинической практике представляется актуальным и своевременным (Ерениев С.И. и др., 2001).

Для изучения возможности использования клеточной терапии в лечении коматозных состояний у пострадавших в остром периоде тяжелой черепно-мозговой травмы клинические исследования с 2000 г. проводились в соответствии с Протоколом, утвержденным Ученым советом и этическим комитетом Института клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск) с письменного информированного согласия ближайших родственников каждого пациента, либо самого пациента. Ткань головного мозга, а также печеночную ткань получали от человеческих плодов 16-22 недель гестации после спонтанных или простагландин-индуцированных абортот. Из кусочков тканей, размером несколько миллиметров, готовили клеточные суспензии, которые криоконсервировали в соответствии со стандартной процедурой, используя культуральную среду RPMI 1640, с добавлением 50% сыворотки плодов коровы и 10% ДМСО и хранили в парах жидкого азота. Размораживание клеточной суспензии проводили в день трансплантации при температуре +37°C.

Жизнеспособность клеток оценивали стандартным способом с применением трипанового синего. Клеточную суспензию, предназначенную для трансплантации, формировали из равного количества клеток, полученных от трех разных доноров с целью снижения иммунологической нагрузки со стороны аллоантигенов каждого донора, а также минимизации вероятности одновременного отторжения всех трансплантированных клеток. Общее количество клеток в суспензии составляло $2,0-2,5 \times 10^8$. Соотношение клеток нервной ткани к клеткам печени было 10:1. Три образца от каждого донора тестировали на инфицированность. Антитела к ВИЧ, вирусам гепатитов В и С, а также реакция Вассермана (RW) определяли параллельно в двух разных сертифицированных лабораториях. Кроме того, кровь донора тестировали методом ПЦР на наличие вируса герпеса (2 типа), вирусов гепатитов В и С, цитомегаловируса, а также ВИЧ.

Клиническое исследование проведено у 76 пациентов в возрасте 18-65 лет, поступивших в нейрореанимационное отделение МУЗ ГKB № 34 в период с 2000 по 2005 г. в остром периоде ТЧМТ, в коме I-III степени. Тяжесть состояния пострадавших оценивалась по шкале ком Глазго (ШКГ).

Критерии включения: уровень сознания менее 8 баллов по ШКГ на момент поступления в клинику; возраст пострадавших 18-65 лет; стабилизация витальных функций; выход из комы с признаками перехода в вегетативное состояние; письменное согласие ближайших родственников.

Критерии исключения: уровень сознания более 8 баллов по ШКГ; тяжелая сочетанная травма (скелетная, абдоминальная, торакальная); тяжелая комбинированная травма (отравление, переохлаждение); окклюзия ликворных путей; неустраненная компрессия головного мозга; интракраниальные и тяжелые экстракраниальные инфекции. Исследуемая группа включала 38 пациентов (28 мужчин и 10 женщин). Средний возраст пациентов составил $37,7 \pm 1,8$ лет (18-63 года). В 23 случаях (60%) у пострадавших диагностировано диффузное аксональное повреждение головного мозга, сочетавшееся в 19 случаях (82%) с компрессией головного мозга, внутричерепной гематомой. У остальных 15 пациентов (40%) имел место ушиб головного мозга тяжелой степени, сочетавшийся в 13 случаях (86%) с компрессией головного мозга внутричерепной гематомой. Более половины пострадавших (60%) поступили в состоянии комы II степени. В состоянии комы I степени поступило 16% пациентов, в состоянии комы III степени – 24%. Средний балл по ШКГ равнялся $4,5 \pm 0,2$. Группой сравнения являлись 38 пациентов с ТЧМТ (28 мужчин и 10 женщин) в возрасте $37,6 \pm 1,9$ лет (от 19 до 60 лет). Средний балл по ШКГ – $4,6 \pm 0,2$. Группа была сформирована по парному принципу. Пациенты обеих групп получали стандартное лечение в одно и то же время и в одинаковых условиях.

Для визуализации головного мозга у пациентов с ТЧМТ использовался магнитный резонансный томограф (МРТ) «Tomikon» (Германия) с резистивным магнитом напряженностью магнитного поля 0,28Т. Мозговой кровоток исследовали методом ультразвуковой транскраниальной доплерографии (ТКУЗДГ) на аппарате MultiDop-T DWL, Electronische Systeme GmbH (Германия). Биоэлектрическую активность головного мозга исследовали методом электроэнцефалографии (ЭЭГ) на компьютерном электроэнцефалографе «Нейрон-Спектр-1» фирмы «НейроСофт» (Россия).

Устранение компрессии головного мозга и проводимая интенсивная терапия позволила стабилизировать гемодинамические показатели и дыхание пациентов, однако их сознание не восстанавли-

валось в течение 2-6 недель, после чего у всех пациентов начиналась реинтеграция сознания с признаками формирования вегетативного состояния. Показаниями к трансплантационному лечению являлись:

- стойкая утрата сознания в течение 2-6 недель и неэффективность традиционного лечения;
- диффузные атрофические изменения белого и серого веществ головного мозга по данным МРТ;
- признаки снижения функциональной активности мозга с выраженным угнетением или полным исчезновением а-ритма по данным ЭЭГ;
- снижение линейной скорости мозгового кровотока в магистральных сосудах и выраженные нарушения ауторегуляции по данным ТКУЗДГ.

Введение клеточной суспензии проводилось в положении пациента на боку, под местным обезболиванием 2% раствором лидокаина (2 мл), путем прокола субарахноидального пространства в промежутке между остистыми отростками L₃-L₄ позвонков одноразовой иглой (фирма «Braun» (США). Извлекалось 5 мл спинномозговой жидкости пассивно и шприцем, через ту же иглу, вводилось 5 мл клеточной суспензии. В течение 24 ч пациенты находились в положении без поднятия головного конца кровати. Процедура повторялась через 10 суток аналогичным способом.

Катамнез в группе исследования составил от 1,5 до 6 лет. Статистическая обработка результатов исследования проводилась по данным катамнеза 1,5 года (по максимальному количеству наблюдений за прошедший период). Клиническая оценка результатов лечения проводилась на основе Индекса независимости в сфере повседневной жизнедеятельности Бартела (Barthel ADL Index) (Mahoney F.I., Barthel D.W., 1965), шкалы Карновского (KPS) (Karnofsky D., Bucherval J., 1949) и шкалы исходов Глазго (GOS) (Jennett B., Bond M., 1975).

Для оценки влияния клеточной терапии на иммунологические показатели, исключив вероятные изменения, связанные с острым периодом ТЧМТ, проведено клиническое исследование у 34 пациентов (25 мужчин и 9 женщин) в возрасте 18-52 лет, получавших клеточную терапию по поводу последствий черепно-мозговой и позвоночно-спинномозговой травмы в клинике в период с 2002 по 2006 г. Средний

возраст в группе составил $32 \pm 1,8$ лет. Клеточную реактивность на антигены (донорские антигены и миелин) оценивали по торможению клеточной миграции в присутствии клеточных лизатов. Для этого использовали модифицированный метод учета реакции гиперчувствительности замедленного типа *in vitro*. Ядродержащие клетки периферической крови помещали по $2,0 \times 10^5$ в круглодонные лунки 96-луночного планшета BDSC (Великобритания) и культивировали 18 ч в среде RPMI1640 в присутствии 10% лизата, полученного от донорских клеток (2×10^7 /мл) при температуре $+37^\circ\text{C}$ в атмосфере с 5% CO_2 . Далее неадгезировавшие к пластику клетки убирали посредством промывания лунок теплой ($+37^\circ\text{C}$) средой. Количество адгезировавшихся клеток определяли по накоплению формазана.

Уровень сывороточных антител к миелину, ДНК, кардиолипину, тиреоглобулину и микросомальной фракции тиреоцитов определяли с использованием реагентов и коммерческих тест – наборов компании «Вектор-Бест» (Россия), согласно инструкциям производителя. Исследования проводили в лаборатории Института клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск).

В результате синдром «пробуждения» и выхода пациентов из вегетативного состояния наступал в промежутке между 3-5-ми сутками после проведения клеточной трансплантации и начинался с появления фиксации взгляда на предмете, а затем, и слежения за движущимся объектом. Через 7-12 суток после трансплантации появлялась возможность первого элементарного контакта с пациентами, выражавшегося в выполнении простейших команд. К концу этого периода наблюдались признаки узнавания близких, выражающиеся в появлении лакримации и соответствующей мимики. Пациенты начинали понимать обращенную речь, что выражалось в выполнении простых команд, а также произносили первые слова.

Через 15 суток после нейротрансплантации у пациентов отмечалась отчетливая динамика стволовых симптомов. Восстановление основных психических функций отмечалось через 15-24 суток после проведения клеточной трансплантации. К концу этого периода пациенты хорошо вступали в контакт, понимая обращенную речь, значительно расширялся спектр выполняемых инструкций, восстанавливалась (частично или полностью) речевая функция. В ходе исследования получены данные, показывающие, что при использовании клеточной терапии у пострадавших с нарушенным

сознанием при ТЧМТ, сроки «пробуждения» последних не зависят от глубины коматозного состояния. Дальнейшие наблюдения показали статистически достоверную зависимость степени травматической комы и динамики восстановления психического статуса пострадавших.

Восстановление основных психических функций у пострадавших с глубиной комы I степени наблюдалось в среднем через $14,8 \pm 0,3$ суток после трансплантации. Пациенты в коме II степени, достигали того же уровня психического статуса в среднем через $16,9 \pm 0,3$ суток после трансплантации. Пострадавшие в коме III степени восстанавливали свои основные психические функции спустя, в среднем, $19,6 \pm 1$ суток после клеточной терапии, то есть, почти на 5 суток позднее, чем пациенты в состоянии комы I степени ($p < 0,01$).

Хороший исход соответствовал коду I по GOS, удовлетворительный – коду II. Хороший и удовлетворительный исходы авторы объединили в группу благоприятных. Неудовлетворительный исход (код III, глубокая инвалидизация), код IV (вегетативный статус) и летальный исход (код V) авторы объединили в группу неблагоприятных. В группе исследования благоприятный исход был отмечен в 33 из 38 случаев (86,8%; в контроле в 39,5%). Хороший исход отмечался в 18 (47%; в контроле отсутствовал) случаях, а удовлетворительный – в 15 (40%; в контроле в 40%). Неблагоприятный исход наблюдался в 5 (13,2%; в контроле в 60,5%) случаях. Умерло 2 (5%; в контроле 10%) пациентов во время пребывания в клинике и ни одного – за период наблюдения в течение 1,5 лет (в контроле 8%), а неудовлетворительный исход в течение 1,5 лет был отмечен еще у 3 (8%; в контроле 50%) пациентов.

Таким образом, обращает на себя внимание существенное, почти в 4 раза снижение числа неблагоприятных исходов после проведения клеточной терапии и хорошее восстановление почти у половины пациентов после ее применения. Клеточная терапия также способствовала функциональной реабилитации пациентов. Через 1,5 года после травмы качество жизни пациентов, оцененное по шкале Карновского, составляло в среднем $75,8 \pm 3,9$ баллов в группе исследования против $39,0 \pm 4,3$ баллов в группе контроля ($p < 0,01$), оцененное по индексу Бартела – 89,114 баллов в группе исследования против $39,5 \pm 7$ баллов в группе контроля ($p < 0,01$).

При МРТ исследовании существенных изменений мозгового вещества в период лечения отмечено не было. Однако через 1,0-1,5 года у всех больных с хорошим и удовлетворительным результатом атрофические изменения регрессировали практически полностью.

При исследовании гуморальной аутореактивности после проведения клеточной терапии только у одного пациента миграционная проба показала повышенную реактивность на миелин. Эта реактивность не выявлялась в пролиферативной пробе и не ассоциировалась с развитием гуморального иммунного ответа. Индукции системных патологических аутоиммунных реакций после клеточной терапии не зарегистрировано. За весь период наблюдения каких-либо осложнений клеточной терапии выявлено не было.

Имеется положительный опыт применения клеточной терапии коматозных состояний вследствие тяжелой черепно-мозговой травмы в Омской городской больнице скорой медицинской помощи № 1 (Ерениев С.И. и др., 1999, 2001).

Опубликованы данные о применении клеточных технологий при лечении перинатальных повреждений головного мозга, геморрагических и ишемических инсультов (Семченко В.В., Ерениев С.И. и др., 2000, 2004; Брюховецкий В.А., 2003). Авторы в своем арсенале имеют обнадеживающий опыт лечения последствий спинальной травмы (Рабинович С.С. и др., 2003; Rabinovich S.S. et al., 2003). Показано, что незрелые нейральные клетки могут не только создавать микроокружение, благоприятное для аксонального роста, но и обеспечивать замещение поврежденных нейронов функционально полноценными клетками (Семченко В.В., Ерениев С.И. и др., 2000, 2004). Существует опыт использования клеточной терапии у 65 пациентов с последствиями боевой травмы головного мозга (Гайдар Б.В. и др., 1998).

Включение в состав используемого трансплантата клеток печени, принадлежащих главным образом к кроветворным линиям дифференцировки, обосновывается имеющимися данными, указывающими на то, что:

- кроветворные ткани содержат стволовые клетки, способные дифференцироваться в клетки, формирующие нервную ткань;
- способны вырабатывать медиаторы, поддерживающие рост и жизнеспособность различных клеток;

– способны супрессировать иммунные клеточные реакции, которые могут быть направлены на отторжение трансплантированных клеток;

– способны подавлять образование соединительнотканых рубцов, которые являются препятствием для аксонального роста (Викторов И.В. и др., 2002).

Важно также отметить, что в кроветворной ткани присутствуют клетки-предшественницы эндотелиоцитов, которые способны обеспечивать неоваскуляризацию ишемизированных тканей организма.

Полученные авторами результаты, по-видимому, связаны со способностью трансплантированных клеток «пробуждать» сознание пациентов и прерывать процессы, приводящие к развитию длительного вегетативного статуса. Поскольку эффект пробуждения наступает в течение первой недели после трансплантации фетальных клеток, он в большей степени может быть связан с дистанционным триггерным влиянием донорских клеток и продуктов их распада, содержащих комплекс биостимуляторов, на восходящую активирующую ретикулярную систему, а не с их непосредственным участием в формировании новых нейральных связей. Комплексность, сбалансированность, длительность и непрерывность такого влияния могут являться важными составляющими лечебного действия трансплантированных клеток.

Авторы приходят к выводам о том, что использование клеточной терапии в системе интенсивного лечения ТЧМТ обеспечивает раннее и стойкое восстановление сознания. Применение клеточной терапии в остром периоде ТЧМТ позволяет существенно сократить уровень инвалидизации пациентов. Для оценки перспектив внедрения клеточных технологий в ургентную нейрохирургическую практику необходимо проведение многоцентровых рандомизированных исследований в нескольких специализированных центрах (Парлюк О.В. и др., 2008).

В последних работах показано нейропротективное влияние мезенхимальных и нейральных стволовых и прогениторных клеток на сенсомоторное восстановление после травмы головного мозга (Полтавцева Р.А. и др., 2012).

3.6. Клеточная терапия при травмах позвоночника и спинного мозга

По данным разных авторов, частота повреждений позвоночника и спинного мозга составляет от 0,44 до 4% всех травм (от 320 до 654 пострадавших на 10 млн. населения). В РФ ежегодно более 8000 человек становятся инвалидами вследствие позвоночно-спинномозговой травмы (ПСМТ) (Леонтьев М.А., 2003). Экономические затраты на лечение и медико-социальную реабилитацию пациентов с последствиями ПСМТ значительны. К примеру, только в США они составляют 14,5 млрд долларов в год.

Лечение травмы спинного мозга (СМ) является одной из наиболее трудных проблем современной неврологии и нейрохирургии. За последнее время накоплены обширные экспериментальные данные и ограниченный клинический материал, свидетельствующий о принципиальной возможности регенерации в центральной нервной системе и возможном восстановлении ее нарушенных функций (Kakulas B.A., 2004; Young W., <http://sci.rutgers.edu>; Tsai E.C. et al., 2005).

Полагают, что будущее принадлежит технологиям регенераторной медицины. Основным инструментом регенераторной медицины являются различные клеточные технологии от трансплантации клеток (клеточная терапия) до генотерапии и тканевой инженерии (Брюховецкий А.С., 2003; Берсенев А.В., 2005).

3.6.1. Методы клеточной терапии

Трансплантация шванновских клеток. Способность продуцировать миелин и ряд нейротрофических факторов (BDNF, NGF, реснитчатый фактор) выявила возможность участия шванновских клеток в аксональной регенерации. Трансплантация шванновских клеток на модели неполного повреждения СМ у крыс приводила к регенерации аксонов в области повреждения и к ограниченному аксональному росту краниальнее и каудальнее нанесенной травмы. Однако в исследовании, опубликованном двумя годами раньше, спраутинга аксонов вне зоны повреждения отмечено не было. Есть мнение, что трансплантация шванновских клеток приводит к ремиелинизации аксонов СМ по периферическому типу (Kakulas B.A.,

2004). Описано несколько трансплантаций шванновских клеток больным с ТБСМ. Представлено частичное восстановление моторных функций СМ и чувствительности по шкале ASIA после хирургической трансплантации фетальных шванновских клеток 48 пациентам с ПСМТ не менее чем через год после повреждения (Hui Z. et al., 2005). Данные были подтверждены нейрофизиологическими методами исследования (ЭМГ, вызванные потенциалы). Никаких осложнений, связанных с трансплантацией клеток и проведением оперативного вмешательства отмечено не было. В другом исследовании также показано улучшение неврологических показателей по шкале ASIA после трансплантации шванновских клеток 37 пациентам (Ji-Hong S. et al., 2005).

В сравнительных экспериментальных исследованиях была продемонстрирована более выраженная возможность скопления в пределах СМ, увеличения роста аксонов и их ремиелинизации при трансплантации генмодифицированных шванновских клеток. Также наблюдалось частичное восстановление паретичных конечностей у экспериментальных животных.

Трансплантация активированных макрофагов. В экспериментах на крысах активация макрофагов путем контакта с периферическими нервами и последующей трансплантацией в СМ уменьшает повреждение ткани и способствует восстановлению функции СМ. Проведены I (Израиль и Бельгия) и II фазы (Израиль и США) клинических испытаний активированных макрофагов, которые предварительно показывают эффективность проводимой терапии в течение 2 недель после травмы (Lammertse D., 2003; Young W., 2005).

Трансплантация эмбриональных стволовых клеток и фетальных тканей. Все же основные исследования клеточной терапии связаны с применением различных типов СК. Клиническое применение трансплантации СК для лечения повреждения СМ началось в 90-х гг. XX столетия. Этому в первую очередь способствовало выделение ЭСК из бластоцисты мыши M.J. Evans и M.H. Kaufman, введение термина «эмбриональная стволовая клетка» G.R. Martin в 1981 г., выявление способности клеток человеческой эмбриональной карциномы дифференцироваться в нейроноподобные и другие типы клеток. В настоящее время свойства ЭСК (бесконечная пролиферация симметричным делением, клоногенность, плюрипотентность доста-

точно хорошо изучены (Викторов И.В., 2001; Репин В.С. и др., 2007; Faulkner S.D. et al., 2013; Jongkamonwiwat N., Noisa P., 2013; Nakamura M., Okano H., 2013; Qiu Z. et al., 2013; Compagnucci C. et al., 2014). При этом описаны случаи трансплантации как СК эмбриональных тканей, так и ЭСК (из бластоцисты).

Первую трансплантацию эмбриональной нервной ткани произвел G. Conte в 1907 году, а позднее – R. May (1957) (Брюховецкий А.С., 2003). Трансплантацию эмбриональной ткани на модели спинальной травмы представили A. Bjorklund и U. Stenevi в 1984 г. Была показана возможность использования эмбриональной ткани в качестве «моста» для регенерации центральных аксонов через дефект ткани СМ. Растущие аксоны регенерировали в эмбриональный трансплантат с формированием связей. Однако, несмотря на улучшение некоторых функций СМ, прорастания аксонов сквозь эмбриональные клетки отмечено не было.

Применение трансплантации ЭСК на модели спинальной травмы показало, что они способны встраиваться в поврежденные участки СМ, дифференцироваться в правильном направлении и принимать участие в нормальном развитии клеток СМ (Wichterle H. et al., 2002). В работах O. Brustle, G.E. Duncan и R. McKay была показана дифференцировка ЭСК в олигодендроциты с последующей миелинизацией аксонов у взрослых крыс (Lanza R. et al., 2005).

В России А.С. Брюховецкий в 90-х гг. XX столетия продемонстрировал возможность аксонального роста с прорастанием через глиальный рубец при трансплантации ЭСК в область хирургического пересечения СМ у крыс. При этом отмечалось некоторое восстановление утраченных функций СМ.

В настоящее время описано несколько клинических исследований по трансплантации фетальных тканей у больных с последствиями ПСМТ. Первая успешная трансплантация фетальных тканей у пациентов с ПСМТ и повреждениями ГМ была произведена А.С. Брюховецким и др. в 1993 г. в рамках закрытой программы Министерства обороны Российской Федерации. Позднее стали применять суспензию клеток эмбриона до 12 недель гестации, что также показало эффективность восстановления функций СМ и ГМ (Брюховецкий А.С., 2003; Станков Д.С. и др., 2003). С.С.Рабинович и др. в 2000 г. провели пересадки эмбриональной ткани у пациентов с последствиями ЧМТ и ПСМТ. Позже была показана не только

клиническая эффективность трансплантации, но и иммунологическая безопасность метода (Рабинович С.С. и др., 2004; Селедцов В.И. и др., 2006).

Не удалось обнаружить прорастание аксонов сквозь трансплантат более чем на 1-2 мм в каудальную часть СМ после трансплантации фетальной ткани. А трансплантация ЭСК на модели СМТ у новорожденных щенков показала спраутинг аксонов более чем на 4 мм дистальнее от места повреждения.

Трансплантация эмбриональных тканей и ЭСК может являться причиной неудовлетворительных результатов и различного рода осложнений. Наиболее важной проблемой трансплантации ЭСК является иммунологическое отторжение реципиентом («реакция хозяин против трансплантата»). Несмотря на то, что ЭСК изначально являются иммунотолерантными, по мере их «созревания» они приобретают иммуногенные свойства (Пальцев М.А., 2004). Независимо от подбора донора и реципиента по антигенам главного комплекса гистосовместимости и учитывая успехи иммуносупрессивной терапии, вероятность отторжения остается крайне большой. Кроме того, существует реальная угроза опухолевой опасности трансплантации ЭСК, что было показано в экспериментах на животных (формирование тератом после трансплантации ЭСК у крыс) (Fujikawa T. et al., 2005; Rubio D. et al., 2005).

Невозможность воспроизведения многочисленных факторов (механическое натяжение, разнообразные электрические поля, комплексы структурных микроокружений для нормальной активации необходимых генов, нормальная экспрессия генов) для корректной дифференцировки представляет высокий риск образования опухолей после трансплантации ЭСК (Пальцев М.А., 2004). Нельзя обойти вниманием и этические проблемы использования фетальных тканей и ЭСК. В связи с этим в США разрешено использовать только имеющиеся в наличии линии ЭСК (Kakulas B.A., 2004).

Таким образом, из-за иммунологических, религиозных и этических проблем, возможности образования опухолей трансплантация эмбриональной ткани и ЭСК не могут быть рекомендованы к широкому клиническому применению. Но только ЭСК имеют полный потенциал для репарации ЦНС. Именно ЭСК могут размножаться и дифференцироваться в клетки новых тканей, мигрировать и интегрироваться в существующие ткани, активировать

гены, стимулирующие репарацию, индуцировать дегенерирующие клетки к восстановлению.

Попытки решения проблемы иммунных реакций при использовании ЭСК в настоящее время связаны со способностью изменить характеристики ЭСК с помощью:

- генно-инженерных манипуляций;
- терапевтического клонирования;
- выращивания человеческих органов в организме животных;
- создания банка эмбрионов со специфическими иммунными характеристиками (Пальцев М.А., 2004).

Однако при использовании генно-инженерных манипуляций и клонирования высок риск появления генетических мутаций, которые сложно определить до трансплантации, а данных о функциональности клеток при выращивании человеческих органов в организме животных на сегодняшний день не получено. Создание банка ЭСК или эмбрионов связано с серьезными этическими и религиозными проблемами.

Разработана оригинальная технология лечения спинальной травмы, основанная на трансплантации фетальных клеток непосредственно в место повреждения спинного мозга (Urdzikova L. et al., 2006). Лечение состоит из трех этапов. На первом этапе жизнеспособные клетки помещаются в специальный плазматический сверток, в котором создается микроокружение, благоприятное для аксонального роста. На втором этапе выполняется операция, обеспечивающая доступ к дефекту спинного мозга. На заключительном этапе сверток с клетками помещается в дефект спинного мозга. Дальнейшее лечение включает в себя субарахноидальные клеточные трансплантации, назначение которых – усилить клинический эффект трансплантационного лечения (Koda M. et al., 2005). Под наблюдением авторов находятся более 150 пролеченных таким образом пациентов. Согласно предварительным данным, неврологические улучшения разной степени выраженности достигнуты более чем у половины пролеченных пациентов. Обусловленные клеточной терапией ощутимые улучшения неврологического статуса начинают проявляться у пациентов, как правило, не ранее, чем через 6 месяцев после трансплантационного лечения и развиваются постепенно в течение длительного периода времени (3 года и более). Поэтому, имеющиеся данные не являются окончательными.

Эффекты трансплантационного лечения являются устойчивыми – случаев их реверсии отмечено не было. Таким образом, клеточная технология открывает новые возможности для эффективного лечения пациентов с последствиями спинальной травмы. Представляется важным, что значительные неврологические улучшения могут быть достигнуты не только у Недавно травмированных пациентов, но также у пациентов с давностью заболевания 1,5 года и более, которые с позиций общепринятой медицины являются инкурабельными (Селедцова Г.В. и др., 2008, 2010).

Представлены отдаленные результаты лечения последствий спинальной травмы с использованием трансплантации фетальных клеток головного мозга и печени. В клиническое исследование было включено 43 пациента (11 мужчин, 32 женщины в возрасте от 17 до 55 лет). Давность травмы к моменту начала лечения варьировала в пределах от 9 месяцев до 6 лет. Клетки трансплантировали либо интраоперационно в виде плазматического сгустка, либо субарахноидально в виде суспензии посредством люмбальной пункции. Согласно шкале FIM (Functional Independence Measure), ощутимые неврологические улучшения были отмечены у 21 пациента (49%): у 13 (30%) на 1-10 и у 8 (19%) на 10-50 баллов. Улучшение функции тазовых органов, улучшение чувствительности и уменьшение спастичности отметили 18 (42%), 10 (27%) и 5 (14%) пациентов, соответственно. Из 20 пациентов с давностью травмы к моменту начала лечения до 2 лет значимые улучшения были отмечены у 14 (70%) человек. Из 23 пациентов с давностью травмы, превышающей 2 года, улучшения были достигнуты только у 7 (30%) человек. Таким образом, клеточные технологии могут быть эффективно использованы в лечении значительной части спинальных пациентов, лечение которых с позиций общепринятой медицины представляется малоэффективным (Селедцов В.И. и др., 2010).

Трансплантация нейральных стволовых клеток. Следующим направлением в регенераторной клеточной терапии является трансплантацию предшественников нейрональных клеток или нейрональных стволовых клеток, которые получают из нейроэпителия эмбриона (Цымбалюк В.И. и др., 2005). Это клетки, которые получили нейрональную дифференцировку путем направленного культивирования СК. НСК наиболее часто используются в экспериментальной трансплантации для лечения моделей неврологиче-

ских заболеваний (паркинсонизм, болезнь Кребба, болезнь Гентингтона, боковой амиотрофический склероз, инсульт и др.), в том числе и при повреждении СМ (Kakulas B.A., 2004; Rosser A.E., Bachoud-Levi A.C., 2012). Показана возможность их нейрональной дифференцировки НСК, аксонального роста с предположительным морфологическим доказательством образования нового синапса и иммунологическим доказательством образования холинергических, серотонинергических, ГАМК-ергических, глицинергических и глутаматергических нейронов (Lanza R. et al., 2005).

Первой демонстрацией успешного лечения и восстановления повреждения СМ были эксперименты J.W. McDonald et al. (2000). На модели постконтузионной кисты СМ была выявлена дифференцировка ЭСК в нейрональные клетки-предшественники, которые впоследствии были успешно пересажены. Трансплантированные клетки выжили, мигрировали на большие расстояния и дифференцировались на 3 основных типа клеток нервной ткани: нейроны, астроциты и олигодендроциты. У экспериментальных животных было отмечено значительное восстановление функций СМ.

Параллельно S. Liu et al. (2000). была показана возможность значительной ремиелинизации с правильными анатомическими характеристиками после трансплантации нейрональных клеток предшественников в поврежденную взрослую нервную систему. Имплантация, выживание и миграция более чем на 1 см от места введения были продемонстрированы с помощью магниторезонансной томографии с мечеными парамагнетическими агентами НСК и полимеразно-циклической реакции в реальном времени. После внутривенного введения НСК из фетального гиппокампа продемонстрирована их миграция в область повреждения СМ, дифференцировка в нейроны, астроциты и олигодендроциты и восстановление утраченных неврологических функций у иммунокомпетентных крыс (Fujiwara Y. et al., 2004). Показана возможность уменьшения неврологического дефицита после трансплантации НСК мартышкам с экспериментальной травмой СМ и иммуногистохимическими доказательствами дифференцировки этих клеток в нейроны, астроциты и олигодендроциты (Iwanami A. et al., 2005). Усиление регенераторного потенциала НСК связывают, в первую очередь, с направлением дифференцировки в нейроны и олигодендроциты путем различных генно-инженерных манипуляций (Setoguchi T. et al., 2004; Hofstetter C. et al., 2005).

Изучение применения трансплантации НСК должно быть продолжено, в том числе и с позиций доказательной медицины. НСК неспособны к неограниченному росту, так как подчиняются лимиту Хайфлика (40 делений *in vitro*) и, соответственно, теоретически имеют более низкий репаративный потенциал. Трансплантация НСК также не исключает иммунологическое отторжение, этические и религиозные проблемы (Kakulas B.A., 2004).

Таким образом, накоплен немалый опыт экспериментального и клинического применения трансплантации НСК при повреждении СМ. Однако широкое применение НСК сдерживается теми же проблемами, что и ЭСК. Попыткой обойти серьезные ограничения применения ЭСК и НСК явились исследования стволовых клеток, выделенных из дифференцированных тканей (постнатальные или соматические СК) взрослого организма (костный мозг, головной мозг, печень и др.).

Трансплантация соматических стволовых клеток. После обнаружения СК в различных органах, включая СМ, НСК стали получать из различных типов клеток (гемопоэтические и мезенхимальные клетки костного мозга, стволовые клетки пуповинной крови) (Kuehnle I. et al., 2002). Уникальной способностью соматических стволовых клеток (ССК) является пластичность, то есть способность дифференцироваться в клетки, характерные для других тканей (например, гемопоэтическая стволовая клетка при определенных условиях может превращаться в клетки с основными характеристиками нейронов). В отличие от ЭСК ССК имеют ограниченный пролиферативный потенциал с симметричным делением при самовоспроизведении и асимметричным делением при трансформации в клетки-предшественники, мульти- или унипотентность, ограниченную способность роста в культуре. Однако, в отличие от дифференцировочного потенциала, «терапевтический потенциал» ССК неограничен. К тому же, до конца не ясно различие между дифференцировочным потенциалом ЭСК и ССК. Имеется мнение, что этот потенциал у различных СК одинаков (Пальцев М.А., 2004).

В экспериментальных моделях на животных и в предварительных экспериментах на людях с заболеванием ЦНС показана эффективность трансплантации различного типа ССК (мезенхимальные клетки, обонятельные обкладочные клетки, гемопоэтиче-

ские клетки), так как данные клетки могут дифференцироваться в нейрогенном направлении.

Трансплантация нейрональных стволовых клеток из обкладочных обонятельных клеток. Клетки обонятельной выстилки (обкладочные клетки обонятельного анализатора, обкладочные обонятельные клетки нейронального эпителия, обонятельные оболочечные клетки, глиобонятельные клетки) – это особые глиальные клетки, схожие со шванновскими клетками и астроцитами. Они встречаются и в периферической нервной системе в ЦНС Совместно с обонятельными аксонами (Берсенев А.В., 2006). Нейроны обонятельного эпителия уникальны тем, что в течение жизни они постоянно обновляются и направляют рост аксонов из периферической нервной системы в ЦНС (Kakulas В.А., 2004). Природа НСК, полученных из биоптатов обонятельной области слизистой оболочки носа, остается неясной. Это могут быть как клетки обонятельного нейронального эпителия, так и клетки базального слоя «обонятельного эпителия». Однако, невзирая на это, для них характерно образование нейросфер независимо от возраста доноров, экспрессия нестина и нейрональных маркеров глии и нейронов (Murrell W. et al., 2005). Получить обкладочные нейроэпителиальные клетки (ОНК) можно как из эмбрионов (фетальные ОНК) (Zhuojing L. et al., 2005), так и непосредственно от человека или животного (аутогенные ОНК), которому будет проводиться трансплантация.

Впервые обкладочные нейроэпителиальные клетки (ОНК) из обонятельной области слизистой оболочки носа взрослого человека были выделены из биоптатов после септопластики и турбинэктомии (Roisen F. J. et al., 2001). Позже получены НСК из обонятельной области слизистой оболочки носа (Zhang X. et al., 2004). Показана возможность дифференцировки клеток базального слоя обонятельного эпителия в нейрональном направлении (Carter L.A. et al., 2004; Chen X. et al., 2004). ОНК обладают мультипотентностью, а их дифференцировка зависит от наличия в культуральной среде тканеспецифичных растворимых факторов (Murrell W. et al., 2005).

Применение трансплантации ОНК в экспериментальном лечении ТБСМ показало высокую эффективность аксональной регенерации. ОНК способны дифференцироваться в нейроны и олигодендроциты, мигрировать в близлежащие ткани, способствовать аксональному росту на длинные расстояния и миелинизировать

оголенные аксоны в культуре (Деев Р.В., 2005; Масгутова Г.А. и др., 2010; Шаймарданова Г.Ф. и др., 2012). На модели одностороннего повреждения пирамидного тракта у крыс показан аксональный рост в дистальную культуру СМ, дифференцировка в шванновские и фибробластоподобные клетки с формированием оболочки регенерирующих аксонов после пересадки ОНК с использованием трансплантата-проводника, формирование нормальных взаимосвязей с нейронами и последующим покрытием новых аксонов олигодендроцитами, восстановление условного рефлекса (Raisman G., 2003).

Наличие аксональной регенерации, миграции ОНК и выживания этих клеток спустя 6 месяцев после трансплантации также было обнаружено и другими исследователями (Huiyong S. et al., 2005; Shen H.Y. et al., 2005; Tiansheng S. et al., 2005) на модели экспериментального повреждения СМ у крыс. Продемонстрирована возможность уменьшения неврологического дефицита на модели полного перерыва СМ у крыс (Liu Y.J. et al., 2001; Ramer L.M. et al., 2004). Предполагается, что механизм действия ОНК может быть связан с выделением нейротрофических факторов (Bianco J.I. et al., 2004).

В России в клинике «НейроВита» проведено 18 оперативных трансплантаций аутогенных ОНК в специальном биodeградируемом геле «Сферогель» как чистой культуры, так и комбинации аутогенных ОНК с аутогенными гемопоэтическими стволовыми клетками (CD34+) (неопубликованные данные). Непосредственно от клеточной трансплантации осложнений выявлено не было (образования опухолей, «плюс»-ткань в месте трансплантации), но интра- и послеоперационные осложнения имели место (спинальный шок, массивная кровопотеря, ликворная гипертензия, ликворея). У 50% пациентов отмечалось частичное регрессирование неврологической симптоматики.

В последние годы были испытаны различные методы клеточной нейротрансплантации для коррекции ТСМ в клинике (Reie P.J., 2004). Для этого применяли трансплантацию поддерживающих клеток «обонятельного эпителия» (Huang H. et al., 2003). Трансплантация ОНК оперативным путем трем пациентам с ПСМТ на торакальном уровне не привела к развитию серьезных осложнений в периперационном периоде (Feron F. et al., 2005).

В нескольких странах мира сразу было запущено несколько

клинических испытаний различных методов клеточной трансплантации для лечения травмы спинного мозга (Park H.C. et al., 2005; Knoller N. et al., 2005; Guest J. et al., 2005; Берсенев А.В., 2005). Метод трансплантации обкладочных клеток обонятельного анализатора или обкладочных обонятельных клеток (ООК, olfactory ensheathing cells – ОЕС) при ТСМ, продемонстрировавший эффективность в нескольких десятках экспериментальных протоколов, проходил I-II фазу клинических испытаний в Китае (Huang H. et al., 2003), Португалии (Senior K., 2002), Австралии (Reie P.J., 2004) и России (Брюховецкий А.С. и др., http://www.neurovita.ru/reports/rus_report01_1.html). По неофициальным данным, этой процедуре подверглись около 500 человек. Большая часть из них лечилась в Китае клетками, выделенными из обонятельной луковицы абортированных плодов человека (Huang H. et al., 2003). Однако во всех этих исследованиях, группы пациентов значительно различались по возрасту, времени и локализации травмы, не были рандомизированы. Кроме того, нет данных по фенотипической характеристике клеточного материала (6). Результаты некоторых пилотных испытаний не публиковались и не обсуждались (Laurance J., <http://www.healingtherapies.info/OlfactoryTissue1.htm>; Брюховецкий А.С. и др., http://www.neurovita.ru/reports/rus_report01_1.html). Таким образом, до сих пор нельзя однозначно говорить о клинической эффективности данного метода.

ОЕС обонятельной луковицы или «нейроэпителия» обонятельной области слизистой оболочки носа имеют глиальную природу и способны пролиферировать в культуре. Многочисленные эксперименты показали, что эти клетки, подобно шванновским, через неясные механизмы способны стимулировать аксональную регенерацию и вызывать ремиелинизацию (Reie P.J., 2004) в области повреждения спинного мозга (Mothe A.J., Tator C.H., 2013).

Опубликованы результаты I фазы слепого, контролируемого клинического испытания метода аутотрансплантации ОЕС пациентам с ТСМ, проходившего в Австралии. Перед началом клинических испытаний авторами было показана возможность выделения необходимого количества ОЕС (Bianco J.I. et al., 2004) из слизистой оболочки носа пациентов, без нарушения обоняния. Более 50 опубликованных экспериментальных протоколов и собственный опыт

группы послужили основанием к началу клинических испытаний. Целью исследования явилась оценка осуществимости метода и его безопасности в течение года после трансплантации.

Из 600 рассматриваемых запросов в исследование включили 21 человека, из которых после тщательного отбора выполнили трансплантации троим. Ещё 3 пациента вошли в контрольную группу. Основными включающими критериями стали: повреждение спинного мозга травматического генеза с полным функциональным перерывом, уровень повреждения T4-T10, неврологически стабильное состояние ASIA (American Spinal Injury Association) класс A и адекватный психо-социальный статус пациентов (для возможности долговременного наблюдения).

ОЕС выделяли по описанному ранее протоколу из биоптатов обонятельной области слизистой оболочки носа пациентов и культивировали в течение 4-10 недель перед трансплантацией (Bianco J.I. et al., 2004). Через 1-2 недель ОЕС приобретали типичный «глиальный» фенотип – GFAP+ (> 95%), S100+/ β 75+ (76-88%) и не экспрессировали маркёр шванновских клеток – HNK-1 (что исключало контаминацию ими культуры).

Клетки вводили во время нейрохирургического вмешательства в несколько точек по разным траекториям в место повреждения и вокруг него. Общее количество вводимых клеток составляло 1,12, 2,24 и 3,28 млн. соответственно. Для точного дозированного введения применяли микрохирургическую технику и специально разработанный аппарат, состоящий из инъектора и микроманипулятора.

В результате исследования было показано, что метод не несёт в себе никаких побочных эффектов и осложнений как непосредственно во время трансплантации, так и в ближайший и отдалённый послеоперационный период. Это было подтверждено как клинически, так и с использованием магнитно-резонансной компьютерной томографии. Время наблюдения пока составило 1 год. Клиническую эффективность метода не оценивали.

Это исследование показывает современный подход к проекту клинического испытания метода клеточной трансплантации в рамках доказательной медицины. Тщательный отбор пациентов и разработка включающих и исключающих критериев, согласно международным рекомендациям к испытаниям при TCM (Steeves J. et al., 2004), позволяют достоверно оценить эффект метода и «стандарти-

зировать» процедуру. Авторы подчёркивают, что тщательная разработка методики забора клеточного материала, подготовки трансплантата и его пересадки позволила избежать таких возможных осложнений, как потеря обоняния, посттравматические кисты и синингомиелия.

Однако применение ОЕС остается дискуссионной темой в лечении ТСМ. Это связано с тем, что до сих пор нет единого мнения по идентификации и маркированию этих клеток. Проблема усугубляется ещё и тем, что ряд исследовательских групп заявляет о наличии другой популяции – мультипотентных стволовых клеток в обонятельной области слизистой оболочки носа человека (Murrell W. et al., 2005), в дополнение к ОЕС, которые не являются стволовыми.

В этой работе было показано, что все клетки не имели HNK-1, однако это не исключает контаминацию культуры шванновскими клетками на 100%, поскольку не все они несут этот маркер. Кроме того, было показано, что трансплантация шванновских клеток при ТСМ значительно эффективней, чем трансплантация ОЕС (Takami T. et al., 2002). В одной из работ (Collazos-Castro J.E. et al., 2005), не выявившей эффективности метода при ТСМ, дискутируется целесообразность трансплантации ОЕС больным людям и подчёркивается, что экспериментальных исследований выполнено явно недостаточно, чтобы перенести технологию в клинику. Эта дискуссия ещё раз показывает, что для оценки клинической эффективности метода необходима разработка и принятие единых протоколов испытаний, включающих характеристику клеточного материала и критерии отбора пациентов для трансплантации (Берсенев А.В., 2006).

II фаза испытаний, проведенная к настоящему времени в ряде центров, призвана ответить на вопрос о клинической эффективности метода и целесообразности продолжения внедрения технологии.

Таким образом, экспериментальные и клинические исследования свидетельствуют о возможной высокой эффективности трансплантации обкладочных обонятельных клеток нейронального эпителия у пациентов с ТБСМ в позднем периоде. Клинических данных трансплантации ОНК недостаточно, чтобы судить об их окончательной безопасности и эффективности.

Трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Эти клетки были впервые выделены А.Я. Фриденштейном в середине 70-х гг. XX века. Источником ММСК служат различные ткани организма, но наибольшая их популяция определяется в костном мозге. Альтернативой получения ММСК рассматривают жировую ткань, периферическую и пуповинную кровь (Мусина Р.А. и др., 2005).

Впервые в эмбриогенезе ММСК обнаруживаются в нервном гребне. В дальнейшем ММСК мигрируют с целью образования каркаса и управления развитием паренхимы будущих внутренних органов. В постнатальном онтогенезе ММСК служат источником соединительной, хрящевой, костной, мышечной, жировой тканей и др., участвуют в поддержании пролиферации прогениторных клеток. Выявлена возможность дифференциации ММСК в различные клетки организма (адипоциты, миофибробласты, строму кроветворной ткани, остециты и хондроциты) (Шумаков В.И. и др., 2002; Корочкин Л.И., 2004), в том числе и в нейрональные клетки. При этом показано, что ММСК могут спонтанно экспрессировать нейрональные маркеры (Tondreu T. et al., 2004).

Обнаружена дифференцировка ММСК костного мозга в глию и нейроны, которые впоследствии формировали аксоны, экспрессировали нейронспецифические маркеры (MAP2, NF, Nestin, GFAP) и отвечали на стимулы как функционально зрелые нейроны (Kohyama J. et al., 2001).

Индукцирована дифференцировка ММСК пуповинной крови в нейрональные клетки под действием ретиноевой кислоты и некоторых факторов роста (EGF, BDNF) (Buzanska L. et al., 2005).

Продемонстрирована эффективность трансплантации стромальных клеток костного мозга крысам с экспериментальной паралигией задних лап. Причем непосредственная трансплантация в область повреждения была более эффективной по сравнению с системным введением в хвостовую вену (Vanquero J. et al., 2006).

Показана невозможность миграции ММСК через гематоэнцефалический барьер (Borlogan C.V. et al., 2004). Однако ММСК стимулировали нейро- и ангиогенез. При экспериментальном повреждении СМ у крыс путем сжатия с помощью раздувания баллона, трансплантировали меченные оксидом железа ММСК (Urdzikova L. et al., 2006). Было отмечено накопление меченых клеток в области

повреждения при гистологическом исследовании и улучшение поведенческих функций по шкале Basso-Beattie-Bresnehan locomotor (BBB). Восстановление функции СМ после трансплантации ММСК крысам с экспериментальной моделью травмы СМ отмечали и другие исследователи (Koda M. et al., 2005; Cizkova D. et al., 2006).

С другой стороны, М.А. Александровой и др. не удалось обнаружить нейрональное развитие ММСК, не содержащих НСК ни в условиях культивирования, ни после трансплантации в ГМ крысам, подвергнутым гипоксии. Несмотря на существующее мнение о влиянии клеточного микроокружения на дифференцировку клеток, для ММСК этого отмечено не было. Также не было зафиксировано миграции трансплантированных культур ММСК по тканям ГМ. Трансплантация ММСК приводила к сильнейшему глиозу, инвазии макрофагов, а сами ММСК быстро резорбировались. Однако отмечалось прорастание отростков нейронов в область трансплантата, что указывает на стимуляцию аксонального роста после трансплантации (Александрова М.А. и др., 2006) и подтверждается многочисленными исследованиями, которые демонстрируют возможность выделения ММСК различных цитокинов, трофических и ростовых факторов, что, в свою очередь, приводит к аксональному росту и стимуляции роста сосудов (Wislet-Gendebien S. et al., 2004; Kurozumi K. et al., 2005).

Описано клиническое наблюдение восстановления моторной функции нижних конечностей и чувствительности после трансплантации ММСК пуповинной крови в область повреждения СМ на уровне Т_Х-Т_{ХII} после ламинэктомии (Берсенов А.В., 2006). Данные о снижении неврологического дефицита были подтверждены нейрофизиологическими методами исследования. Однако в данной работе не было проведено четкой дифференцировки принадлежности клеток к различным клеточным популяциям и, соответственно, нельзя исключить возможности действия других клеток, например, моноцитов и их предшественников.

Необходимо отметить, что после трансплантации ММСК существует угроза возникновения гетеротопических оссификатов (Деев Р.В. и др., 2005). Имеются данные об образовании диффузных кальцификатов легких у собак и кальцификатов в миокарде у крыс после трансплантации костного мозга. Однако результаты экспериментальных исследований по системной трансплантации

ММСК крысам и обезьянам не показали образования гетеротопических оссификатов (Devine S.M. et al., 2003). Также не было отмечено образования оссификатов после внутривенной трансфузии аллогенных ММСК человеку, хотя отдаленные результаты данных исследований неизвестны.

Кроме того, имеются данные о спонтанной онкогенной трансформации ММСК человека в культуре без участия факторов роста при длительном культивировании и о преобразовании этих клеток в саркому Юинга (Берсенев А.В., 2005). С другой стороны, имеются данные о прямом противоопухолевом действии ММСК при саркоме Капоши из-за подавления протеинкиназы-Akt (Khakoo A.Y. et al., 2006).

Еще одним свойством ММСК является их иммуномодулирующее действие (Кругляков П.В. и др., 2006). Экспериментальные ксенотенные и аллогенные трансплантации на модели инфаркта миокарда у крыс, иммунокомпетентных состояний различных животных, а также при несовершенном остеогенезе и различных лейкозах у людей показали отсутствие и возможность подавления реакции трансплантата против хозяина после применения ММСК (Григорян А.С., 2006). Такие иммунорегуляторные свойства ММСК выгодно отличают их от других видов СК (Cizkova D. et al., 2006). В настоящее время разработаны методы получения и применения аутогенного клеточного материала.

Таким образом, применение трансплантации ММСК с целью лечения ТБСМ в позднем периоде может приводить к регрессу неврологической симптоматики. Однако применение трансплантации ММСК не может в настоящее время быть рекомендовано к широкому клиническому применению из-за возможности развития гетеротопических оссификатов и опухолей. Поэтому необходимы дополнительные доклинические исследования.

Локальное и системное введение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Группа ученых из Испании выполнила сравнительное исследование эффективности двух способов введения клеток костного мозга при травме спинного мозга. В эксперименте у крыс моделировали паралигию задних лап, сохраняющуюся без признаков регресса в течение 3 месяцев, до момента системного или локального введения клеток. Для трансплантации использовали только пластик-адгезивные (стромальные) клетки

костного мозга. Одной группе животных вводили 3 млн. клеток в хвостовую вену, другой группе – локально в посттравматическую кисту. Животные наблюдались в течение 6 месяцев, проводились функциональные и поведенческие тесты. После вывода животных из эксперимента была произведена морфологическая и иммуногистохимическая оценка спинного мозга в области травмы. В результате было показано, что локальное введение клеток оказывало значительно лучший эффект, чем системное, по всем проводимым тестам – шкала BBB, поведенческие тесты, данные морфологии спинного мозга (Jesus V. et al., 2006).

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Трансплантация ГСК является наиболее изученной. Трансплантации ГСК открыли эру клинической клеточной трансплантологии, когда для лечения некоторых заболеваний крови были проведены пересадки костного мозга (Румянцев А.Г. и др., 2003). Первые трансплантации костного мозга были выполнены G. Mathe и E. Thomas в 1965-1968 гг. для лечения больных с ятрогенной гемопоэтической недостаточностью. В России первая трансплантация костного мозга была осуществлена А.Е.Барановым в 1974 г. Длительный опыт применения трансплантации ГСК в онкогематологии показал достаточную безопасность наряду с выраженной клинической эффективностью.

Наиболее часто ГСК определяют по экспрессии определенных поверхностных антигенов. Для человеческих ГСК фенотипический набор экспрессируемых маркеров определяется как CD34+, CD59+, Thy1+, CD38-, C-kitr, lin-. При этом в основном подсчет и выделение ГСК основывается на определении CD34+ клеток. Отсортированные на проточном флюориметре клетки кроме истинных самоподдерживающихся ГСК также содержат короткоживущие предшественники и небольшое количество нестволовых клеток (Пальцев М.А., 2004).

В настоящее время ГСК получают из костного мозга (CD34+ экспрессируют 1-4% клеточного состава), периферической (CD34+ экспрессируют 0,1% клеточного состава) и пуповинной/плацентарной крови (Румянцев А.Г. и др., 2003). Наряду с ММСК и ОНК стволовые клетки крови интересны с клинической точки зрения, так как при их трансплантации можно использовать аутогенную модель клеточной терапии. Способом получения ГСК

является их мобилизация в периферическую кровь с помощью гранулоцитарного (Г-КСФ) или гранулоцитарно-макрофагального (ГМ-КСФ) колониестимулирующего фактора за счет блокирования клеточного фактора I в костном мозге (Пальцев М.А., 2004). При этом количество ГСК из периферической крови в два раза больше, чем из пунктата костного мозга. Кроме того, они лучше приживаются при аллогенных трансплантациях, а использование аутогенного материала позволяет избежать иммунологических осложнений.

Исследования свойств ГСК показали их высокий пролиферативный потенциал, способность к мультилинейной дифференцировке и трансдифференцировке *in vivo* и *in vitro* (Викторов И.В., 2001). Открытие способности ГСК трансдифференцироваться в нейральные линии в сочетании с доступностью ГСК смесцествило фокус внимания на применение ГСК в качестве многообещающего подхода замещения клеток при поражении ЦНС (Mezey E. et al., 2003; Koda M. et al., 2005). Было проведено значительное число исследований, изучающих регенеративную способность ГСК при ишемическом повреждении ГМ путем мобилизации собственных ГСК (эндогенный подход), либо трансплантации ГСК (экзогенный подход) (Zhao Z.M. et al., 2004; Lu C.Z. et al., 2006).

Показано, что клетки костного мозга грызунов мигрируют в ГМ при трансплантации предварительно облученным реципиентам и дифференцируются на микроглию и астроциты (Willing A.E. et al., 2003). При этом внутривенный путь введения оказался более эффективным, чем интрастриарный. Большое количество взрослых ГСК человека, введенных в СМ эмбриона цыпленка, дифференцируется в нейроны (Sigurjonsson O.E. et al., 2005). Следовательно, в костном мозге человека есть популяция ГСК, которая имеет нейрогенетический потенциал и в соответствующем микроокружении может дифференцироваться в нейроны. Продемонстрировано, что трансплантация ГСК из костного мозга в поврежденный СМ мышей улучшила функциональное восстановление задних конечностей. Мыши после трансплантации могли ходить, частично распределяя свой вес на задних лапах, тогда как в контрольной группе животных этого не отмечалось. Некоторые трансплантированные ГСК, выжившие в месте повреждения, дифференцировались в глиальные клетки и нейрональные предшественники (Koshizuka S. et al., 2004).

Мобилизация ГСК предварительным введением Г-КСФ может оказывать нейропротективное воздействие при повреждениях ЦНС. Несколько преклинических исследований отметили функциональное улучшение у крыс с очаговой церебральной ишемией после подкожного введения Г-КСФ за счет мобилизации ГСК из костного мозга и антиапоптозного действия (Fujiki M. et al., 2005; Lu C.Z. et al., 2006; Urdzikova L. et al., 2006), что требует дальнейшего изучения.

На ежегодной конференции American Society for Neurotransplantation and Repair был представлен первый доклад по результатам аутологичной трансплантации клеток костного мозга для лечения TCM в Motol Hospital (Prague) (Sykova E. et al., 2004). От 10 до 147 млн. CD34+ клеток костного мозга вводили в позвоночные артерии девяти пациентам с различными уровнями повреждения. У 6 из 9 пациентов было отмечено улучшение через 3-6 месяцев после трансплантации клеток (Reie P.J., 2004; Sykova E. et al., 2004).

Опубликованы результаты клинического исследования по эффективности трансплантации клеток костного мозга в область повреждения спинного мозга в сочетании с терапией гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (ГМ-КСФ) (Yoon H.A., 2005).

В исследование было включено 6 пациентов с полным функциональным перерывом, «свежей» (до 14 суток) TCM в шейном отделе, с неврологическим классом А по шкалам ASIA (American Spinal Injury Association – Frankel) и AIS (American Impairment Scale). Мононуклеарные клетки выделяли из аспирата костного мозга (объёмом 100-150 мл), полученного перед операцией трансплантации. Клетки вводили через 7 дней после травмы непосредственно в спинной мозг в количестве около 2 миллиардов по периметру области повреждения в несколько точек. После операции подкожно вводили рекомбинантный ГМ-КСФ в 5 циклов в течение 5 месяцев. Время клинического наблюдения составило 6-18 месяцев.

Сразу после операции все пациенты отметили улучшение чувствительности. Восстановление чувствительности в тазовых сегментах отмечали через 1-7 месяцев после трансплантации. Моторика значительно улучшилась у 5 пациентов из 6. У 4 пациентов наблюдали значительное улучшение неврологического статуса по шкале AIS (от класса А до С), у 2 пациентов – без значительной динамики (от А до В).

Осложнений трансплантации, ухудшения неврологического статуса и самочувствия пациентов отмечено не было. Наблюдали типичные побочные эффекты терапии ГМ-КСФ (лихорадка, миалгии, лейкоцитоз). Магнитно-резонансная томография через 4-6 месяцев после травмы показала слабое увеличение объёма в области трансплантации клеток.

Таким образом, предложенный протокол трансплантации клеток Совместно с терапией ГМ-КСФ безопасен и предварительно клинически эффективен у пациентов с острой ТСМ с функциональным перерывом. Для изучения клинической эффективности метода необходимы дальнейшие доказательные исследования с группами контроля.

Механизм действия трансплантации клеток костного мозга и введения ГМ-КСФ неясен. Предполагаемые механизмы действия клеточно-терапевтического подхода, основанные на экспериментальных данных, следующие:

- способность к прямой дифференцировке некоторых популяций костного мозга в нейроны и/или миелин-продуцирующие клетки (Sasaki M. et al., 2001);

- введённые клетки выделяют факторы роста и белки экстрацеллюлярного матрикса, способствующие регенерации, ремиелинизации, ангиогенезу или стимуляции собственных прогениторных клеток в месте повреждения (Sasaki M. et al., 2001; Wu S. et al., 2003);

- ГМ-КСФ способен предотвращать апоптоз не только гемопоэтических, но и нейрональных клеток в области ТСМ (Ha Y. et al., 2005), вызывать мобилизацию прогениторных клеток из костного мозга в периферическую кровь; активировать макрофаги в зоне повреждения спинного мозга, элиминируя «миелиновый дебрис» и поддерживать аксональную регенерацию (Kim J.K. et al., 2004; Ha Y. et al., 2005). В пользу последних двух механизмов указывает и тот факт, что один пациент получал только курс ГМ-КСФ, без трансплантации клеток, продемонстрировав, однако, схожее улучшение с другими пятью пациентами.

Авторы сознательно выбрали моноклеарную фракцию клеток костного мозга в качестве трансплантационного материала, поскольку сразу несколько её популяций (гемопоэтические и стромальные клетки, макрофаги) могут оказаться полезными для регенерации в области повреждения.

С другой стороны, такой подход не даёт возможности идентифицировать действующую популяцию клеток и затрудняет понимание механизмов действия метода. Интересно также, что авторы вводили очень большое количество клеток (2 миллиарда в 1,8 мл раствора), представляющее собой даже не взвесь, а «пасту».

Нужно отметить, что прогноз для пациентов, отобранных для исследования (AIS класс А), при обычных методах лечения неблагоприятный. Около 90 из них обычно не восстанавливаются даже до класса В (по AIS) в течение первого года после травмы. Результаты, полученные корейской группой ученых позволяют надеяться, что предложенный метод лечения подтвердит свою эффективность в будущих исследованиях и подарит надежду на новое качество жизни больным с травмой спинного мозга (Берсенеv А.В., 2005).

В России в клинике «НейроВита» имеется опыт субарахноидальной трансплантации аутогенных ГСК более чем у 75 пациентов с ТБСМ в позднем периоде с оценкой неврологического статуса с помощью специально разработанных шкал, международных шкал (ASIA, ISCSCI-92, FIM) и нейрофизиологических методов исследования (электронейромиография, ССВП, транскраниальная магнитная стимуляция, ЭЭГ) (Зайцев А.Ю. и др., 2006). Результаты исследований показывают эффективность применяемой методики более чем у 50% пациентов. При этом серьезных осложнений ни у одного пациента отмечено не было.

В то же время есть ряд научных работ, которые показывают возможность участия ГСК в развитии формирования опухолей, усилении их ангиогенеза, образовании метастатической ниши и прогрессировании опухолевого роста (Берсенеv А.В., 2006). Однако длительный опыт клинического применения трансплантации ГСК в онкогематологии показывает их безопасность.

Ряд серьезных осложнений при трансплантации костного мозга и ГСК был отмечен в связи с токсичностью криопротектора ДМСО (Берсенеv А.В., 2006). У ряда пациентов отмечалось развитие энцефалопатии, комы, судорог и дыхательной недостаточности. Снижение концентрации ДМСО до 5 и «отмывка» ГСК перед трансплантацией позволяет избежать развития осложнений и не влияет на жизнеспособность CD34+ клеток.

Экспериментальные работы на модели повреждения головного и спинного мозга подготовили базу для возможности внедрения

трансплантации ГСК у пациентов с ТБСМ в позднем периоде. Длительный опыт применения трансплантации ГСК в онкогематологии показывает не только безопасность данной методики, но и дает реальные преимущества перед трансплантацией других видов стволовых клеток. Только для ГСК разработаны и проверены в течение длительного времени методы забора, культивирования и длительного хранения, которые широко применяются в клинической практике. Разработанные методы использования аутогенного материала исключают возможность появления иммунологических осложнений в виде реакции «трансплантат против хозяина» и сводят почти на нет этические, религиозные и многие правовые вопросы клинической клеточной трансплантологии. В то же время клинический опыт применения трансплантации ГСК при ТБСМ почти отсутствует.

Таким образом, многочисленные экспериментальные работы по исследованию свойств различных стволовых клеток и трансплантации на моделях повреждения СМ показывают возможность их применения в клинической практике. Если применение эмбрионального материала сдерживается в основном этическими и религиозными проблемами, то трансплантация ГСК может с успехом использоваться для лечения различных заболеваний, в том числе и у пациентов неврологического и нейрохирургического профилей. Даже частичное восстановление неврологического дефицита может существенно улучшить социальную адаптацию и качество жизни многих пациентов.

Искусственное сдерживание внедрения клеточных технологий, связанное с боязнью трансформации «взрослых» стволовых клеток в различного рода опухоли, в большей степени надуманно и без накопления клинического опыта никогда не будет преодолено. Тем более, что немногочисленные пилотные исследования показывают эффективность и безопасность трансплантации различных СК. Организация контролируемых рандомизированных исследований, а тем более – мультицентровых испытаний, к сожалению, сдерживается рядом морально-этических аспектов и иногда – отсутствием финансовых средств для их проведения.

В то же время, экспериментальные и клинические исследования не могут на сегодняшний день ответить на достаточно простые и актуальные вопросы, связанные с трансплантацией СК. Даже в проводимых на I-II стадиях разных рандомизированных

исследованиях в области клеточных технологий при ТБСМ не получен окончательный ответ:

- о необходимом количестве СК;
- клеточной структуре трансплантата;
- длительности терапии, необходимой для восстановления нарушенной функции СМ.

Это касается также способов и путей введения СК. Экспериментально показано, что трансплантация СК с той или иной степенью эффективности может осуществляться:

- внутривенным;
- субарахноидальным (интратекальным) введением;
- применением различных подходов тканевой инженерией СМ.

Учитывая строение гематоэнцефалического барьера человека и его защитные функции, внутривенные трансплантации не скоро найдут клиническое применение у пациентов с ТБСМ. Показания и противопоказания к субарахноидальному введению и, особенно, к тканевой инженерии СМ в настоящий момент четко не определены. Опыт клинического применения трансплантации ОНК демонстрирует, что показаниями для оперативной тканевой инженерии с реконструкцией позвоночника и СМ может быть:

- наличие у больного сдавления СМ;
- ликвородинамические нарушения;
- полный функциональный перерыв СМ при отсутствии эффекта от предыдущих субарахноидальных трансфузий СК в течение 1 года.

Расширение показаний допустимо, но необходимо учитывать постоянно существующий риск оперативного вмешательства, так как большое количество пациентов неоднократно оперировано до применения клеточных технологий. Последующие оперативные вмешательства на позвоночнике и СМ обычно сопровождаются типичными осложнениями:

- кровопотеря;
- трудность пластики твердой мозговой оболочки с развитием ликвореи;
- формирование грубого рубцово-спаечного процесса и и др.

Абсолютные и относительные противопоказания к субарахноидальной трансфузии АГСК также нуждаются в уточнении и обсуждении.

Остается неясным срок ПСМТ и возраст пациентов, у которых возможно применение клеточных технологий. Трансплантация ГСК в острейший, острый и, возможно, в ранний период ТБСМ, вероятно, не приведет к достижению желаемых результатов из-за выраженности процессов воспаления, перекисного свободнорадикального окисления липидов и связанной с ними гибелью клеток. Поэтому трансплантацию СК более целесообразно проводить через 2-6 месяцев после ПСМТ.

Уменьшение пула СК с возрастом ограничивает в настоящее время использование клеточных технологий у пациентов пожилого и старческого возраста. Однако, как было показано выше, это утверждение не относится к ММСК.

Вряд ли экспериментальные исследования на животных смогут дать ответы на эти и многие другие вопросы. Только клинические исследования покажут окончательную безопасность и эффективность трансплантации СК. С другой стороны, необоснованное и необдуманное применение клеточных технологий может навредить как пациенту, так и еще не до конца сложившейся методике.

Таким образом, в настоящее время созданы необходимые патофизиологические и экспериментальные предпосылки для начала применения трансплантации СК у пациентов с ТБСМ. Однако для доказательства безопасности и эффективности трансплантации СК, выработки клинических аспектов трансплантации необходимо быть крайне осторожными, глубоко изучать каждый случай клеточной трансплантации и ее осложнений, подключить современные методы медицинской генетики и молекулярной биологии (Зайцев А.Ю. и др., 2007).

В литературе имеются описания случаев эффективного применения трансплантационной технологии в лечении последствий спинальной травмы (Vanquero J. et al., 2006). Изучена эффективность метода трансплантации стволовых клеток костного мозга при травме спинного мозга в отдаленном периоде (> 3 лет) (Слынько Е.И. и др., 2010).

Проанализированы осложнения, побочные эффекты и особенности клинического применения мобилизованных аутологических гемопоэтических стволовых клеток в комплексной терапии пациентов с повреждением спинного мозга (Авдейкин С.Н. и др., 2011).

Трансплантация генетически модифицированных микроглия-подобных клеток. Г.А. Масгутова и др. (2010) оценивали эффективность внутривенной трансплантации микроглия-подобных клеток, полученных в результате дифференцировки эмбриональных стволовых клеток, генетически модифицированных нейротрофическим фактором NT3, при травме спинного мозга. Клетки были получены из эмбриональных стволовых клеток линии мышей линии C57/Bl6. Животным на уровне T8 осуществляли латеральную гемисекцию спинного мозга с правой стороны. Рану ушивали послойно. Через 7 суток после травмы животным опытной группы через хвостовую вену вводили 4 млн. микроглия-подобных клеток, животным контрольной группы – фосфатный буфер в том же объеме. Влияния трансплантированных клеток, секретирующих нейротрофический фактор NT3, на регенерацию спинного мозга оценивали гистохимическими методами (Масгутова Г.А. и др., 2010).

3.6.2. Морфологическая характеристика спинного мозга после торакальной сегментэктомии и трансплантации обкладочных нейроэпителиальных клеток

В клинко-экспериментальной практике наблюдается отчетливая тенденция к отходу от традиционно пессимистической оценки реабилитационных возможностей больных с травмой спинного мозга (Берсенов А.В., 2005). Известно, что основным препятствием на пути к клинически ценному восстановлению у спинальных больных является посттравматический глиальный рубец и обширные «пустые» пространства, которые необходимо преодолеть растущим аксонам для установления утраченных связей. С другой стороны, при отсутствии консолидирующей ткани рубца между краниальным и каудальным отрезками спинного мозга (в случае обширных повреждений), они подвергаются ретракции, что делает восстановление нервных связей невозможным. Поэтому важной задачей реконструктивной нейромедицины является выявление способов управления скоростью и качеством образующейся ткани, замещающей нейрональный дефект.

Значительным шагом в этом направлении стало использование биополимерных материалов, в большой степени решающих эту

задачу, а также создающих оптимальные условия для выживания трансплантированных клеточных культур и реализации их репаративных возможностей. В ряде экспериментов на животных было показано, что через имплантируемую биополимерную композицию, создающую своеобразный «мост» между концами рассеченного спинного мозга, возможно прорастание поврежденных аксонов и восстановление некоторых утраченных функций спинного мозга (Vacanti С.А., 2001). При этом, мультипотентные клеточные элементы, внесенные в гелевую полимерную среду, продолжают активно функционировать, направляя вектор своей дифференцировки в соответствии с условиями локального микроокружения (Raisman G., 2003). Это, в конечном итоге, способствует созданию благоприятных возможностей для регенерации нервных волокон, что во многом обусловлено секреторной нейротрофической деятельностью клеточных трансплантатов (Raisman G., 2003).

В настоящее время вопрос о выборе оптимального клеточного материала для биоинженерной терапии таких повреждений встает особенно остро. Нерешенность ряда как биомедицинских (иммунологический конфликт, онкологическая опасность), так и этических вопросов существенно ограничивает спектр допустимых для применения клеточных линий. В свете вышесказанного, использование обкладочных нейроэпителиальных клеток (ОНК) позволяет избежать проблем иммунного конфликта, а технология их получения не имеет этических, юридических и моральных ограничений. Использование только собственного донорского материала снижает (исключает) риск заражения пациента. ОНК могут быть в достаточном количестве получены из образцов ткани обонятельной выстилки носа, не формируя при этом непоправимого тканевого дефекта, поскольку их популяция находится в состоянии непрерывного самообновления (Chen X. et al., 2004).

В качестве основы для тканевой терапии современные исследователи предлагают использовать различные природные и синтетические материалы: коллаген, полиглюколевую кислоту, карбонильные нити и т. д. (Брюховецкий А.С., 2003; Career L.A. et al., 2004).

Описаны результаты экспериментального использования биоматрикса «Нейро-Гель»[™] (Vacanti С.А., 2001). В России разработан и запатентован универсальный гетерогенный коллагеновый мат-

рикс «Сферогель-Э»™, отработка способ его получения и использования. Помимо функции «моста» Сферогель-Э™ способен выполнять роль «питательной среды» для содержащихся в нем клеточных элементов, индуцирующих прорастание поврежденных аксонов нервных клеток через патологически измененные участки ткани спинного мозга (Брюховецкий А.С., 2003).

Авторы оценили тканевые перестройки, пролиферативные процесс и характер нейрохимических изменений в тканях рубца спинного мозга у крыс, перенесших торакальную сегментэктомию с последующей трансплантацией ОНК, инкорпорированных в биополимерный нейроматрикс «Сферогель-Э»™.

В эксперименте использованы половозрелые беспородные крысы самки массой не менее 300 г. Все животные были разделены на две группы – контрольную (n=12) и опытную (n=10). Использована экспериментальная модель полного анатомического перерыва спинного мозга с утратой целостности спинномозговых оболочек, разработанная S. Woerly (2001). После проведения торакальной сегментэктомии (иссечение фрагмента спинного мозга на уровне Th8-Th10) у крыс контрольной группы дефект спинного мозга заполняли гемостатической губкой и изолировали от окружающих тканей подкожно-жировой клетчаткой. У крыс опытной группы дефект спинного мозга заполняли препаратом «Сферогель-Э»™ с инкорпорированными в него ОНК. ОНК внедворяли в нейроматрикс непосредственно перед трансплантацией путем последовательного насаивания и центрифугирования (1000 об/мин, 10 мин) при температуре +10°C и вводили в количестве 250 тыс. каждому животному. Биополимерный нейроматрикс «Сферогель-Э»™ и культура обкладочных нейроэпителиальных клеток слизистой оболочки носа человека, полученная по методике X.Zhang и соавт. (Zhang X. et al., 2004), были доставлены из лаборатории ЗАО «НейроВита» (Россия, Москва).

Для проведения гистологического анализа изменений тканей спинного мозга в ранний (через 1-2 недель) и поздний (10-12 недель) послеоперационный период участок позвоночного столба длиной 2-2,5 см, содержащий фрагмент поврежденного спинного мозга, фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, декальцинировали, заключали в парафин. Продольные срезы тол-

щиной 4-5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и 1% раствором метиленового синего.

Для иммуногистохимического анализа использовались моноклональные антитела к GAP-43 (AntiGrowth Associated Protein 43, clone 9-1E12, P17677, 1:10) и MP-200 (Anti-Neurofilament H&M phosphorylated, clone NP1, P12036, 1:50). После депарафинирования и регидратации срезов прогреванием на водяной бане «демаскировали» антигены, затем блокировали неспецифическое связывание антител. Иммунологическое выявление мест связывания антител проводили с помощью непрямой стрептавидин-биотин-пероксидазной реакции с использованием стандартного набора VECTASTAIN Elite ABC Kit Universal.

В зависимости от сроков послеоперационного периода все животные были разделены на две группы: 1-2-я неделя (ранний период) и 10-12-я неделя (поздний период). Через 1 неделю после операции у животных контрольной группы консолидация пересеченных фрагментов спинного мозга была еще не завершена: полость между краниальной и каудальной культями была заполнена рыхлыми фибриновыми массами, которые перемежаются с очагами кровоизлияний и локальными воспалительными инфильтратами. В латеральных отделах рубца, примыкающих к мозговым оболочкам, отложения фибрина отграничены соединительно-ткаными пластами, которые создавали на границе с веществом СМ рыхлую капсулу, в которой содержатся расширенные микрососуды и клетки воспалительных инфильтратов.

В центре рубца нити фибрина формировали подобие клубка, в то время как на границе с нервной тканью начинается образование глиальной капсулы, толщина и структура которой имеет неоднородное строение. Наиболее типичным для этого периода являются локальные скопления астроцитов на границе рубца, расположенных, преимущественно перпендикулярно длинной оси спинного мозга. В результате между тканью еще не оформленного рубца и смежными зонами образуется отчетливый ограничительный валик, по обе стороны которого наблюдаются единичные или сгруппированные в небольшие кластеры макрофаги и нейтрофилы. В центральных зонах тканевого дефекта, в участках локальных гематом они превращаются в гемосидерофаги с цитоплазмой, наполненной продуктами распада эритроцитов.

В разреженном веществе спинного мозга, прилегающего к области травмы, как в краниальном, так и в каудальном направлениях, рисунок спинного мозга с резко очерченными границами серого и белого вещества практически не выявлялся. Здесь обнаруживались многочисленные пустоты, различной формы и величины. Скопления отечной жидкости вокруг капилляров, нейронов и глиальных клеток придавали ткани мозга сотовидный, ячеистый вид. Заполненные тканевой жидкостью пространства, приобретая сливной характер, разрывали нервную ткань на многочисленные обособленные фрагменты.

Гемодинамические нарушения, максимально выраженные в пограничных зонах, реализовались как путем облитерации и запустения мелких артериол, так и за счет избыточного их расширения и гиперемии. Клетки интимы набухали и выступали в просвет сосуда, а перикапиллярные пространства расширялись за счет выхода жидкой части крови через истонченные стенки сосуда. Вследствие некробиотических изменений сосудистой оболочки форменные элементы крови выходили за пределы сосуда, скапливаясь у наружной его границы или постепенно мигрировали вглубь мозговой паренхимы, приводя к образованию вторичных, диапедезных кровоизлияний.

В спинном мозге животных опытной группы в этот период обращают на себя внимание характерные изменения в области рубца. Его структура сформирована, большей частью, элементами соединительной ткани, в которой происходит образование новых капилляров. Соединительнотканые прослойки, окруженные фрагментами «Сферогеля», перемежались с участками ткани, заполненными глиальными элементами. Пролиферирующие астроциты здесь выстраивались в тонкие, длинные цепочки, пронизывающие всю толщу рубца и ориентированные вдоль оси спинного мозга. Сходный глиопролиферативный процесс протекал и в промежуточной зоне, в результате чего не наблюдалось формирование глиомезодермальной капсулы.

В этот период воспалительные процессы наиболее ярко протекали в промежуточной зоне и в прилегающих к ней участках рубца. Они морфологически проявлялись инфильтрацией большим количеством макрофагов, сидерофагов и некоторых лимфоидных клеток. Морфологические признаки изменений нейронов, глиальных клеток и элементов микроциркуляторного русла были сходны с та-

ковыми в контрольной группе и проявлялись в виде набухания, вакуолизации цитоплазмы или резкого сморщивания.

Через 10-12 недель у крыс обеих экспериментальных групп соединительнотканый рубец был полностью сформирован. В контрольной группе он был представлен глиомезодермальной тканью с большим количеством соединительнотканых волокон, ориентированных в различных направлениях. В стенке рубца пучки соединительнотканых волокон и расположенные между ними фибробластов и глиальных клеток (очевидно, пролиферирующих астроцитов) имели, преимущественно, перпендикулярное длиннику спинного мозга направление. Рубец у животных экспериментальной группы выглядел более рыхло. В его структуре встречались многочисленные полости, заполненные тканевой жидкостью и окруженные прослойками соединительной ткани, с большим числом капилляров. При окрашивании метиленовым синим в соединительнотканых тяжах наблюдалось большое число пучков миелинизированных нервных волокон.

При иммуногистохимическом исследовании на ОАР-43 в тканях рубца экспериментальных животных выявлялось большое количество иммунопозитивных клеток. Они имели веретеновидную форму тела, от которого отходят длинные неветвящиеся отростки. Максимальное скопление клеточных тел было расположено в центральных зонах мозгового рубца, в то время как на периферии (в области проекции белого вещества) доминирующими являлись GАР-43-позитивные нервные волокна. Они имели прямолинейный ход, четкие очертания, мало ветвились и не образовывали пучков. У животных контрольной группы в эти сроки выявлялись только единичные GАР-43-позитивные клеточные элементы и тонкие волокна, преимущественно расположенные в пограничной зоне рубца, краниальнее места повреждения.

Антителами на МР-200 у животных экспериментальной группы наблюдались только единичные МР-200 позитивные проводники в толще рубца, в отличие от животных контрольной группы, где большое количество проводников содержало этот белок.

Таким образом, характер тканевых перестроек в спинном мозге у животных контрольной группы на 1-2-й неделе полностью соответствовал классическому посттравматическому стереотипу, неоднократно описанному в литературе, который ведет к формирова-

нию через 10-12 недель типичного глиально-соединительно-тканного рубца, ограниченного от прилежащих тканей плотной капсулой. У животных, дефект спинного мозга которых заполнялся нейроматриksom «Сферогель-Э»TM с обкладочными клетками, к концу эксперимента рубец был полностью сформирован тканью, имеющий иную цитоархитектонику. Наряду с развитой сетью астроцитов, здесь присутствовали также элементы соединительной ткани фибробласты, пучки волокон и новообразованные микрососуды. Это свидетельствовало о более раннем начале ангиогенеза и, следовательно, лучшей оксигенации рубца. Отличительной особенностью данного способа реконструкции нервной ткани являлось обилие нервных волокон, сопровождающих прослойки ткани в области сформированного рубца.

Предпосылки к такого рода морфологическому эффекту наблюдались уже на раннем этапе эксперимента. Так, у животных опытной группы через 1-2 недель после операции, обращает на себя внимание иная архитектура пролиферирующих астроцитов, которые выстраивались в виде длинных клеточных тяжей направленных параллельно длиннику спинного мозга как внутри рубца, так и в пограничной зоне. В то же время астроцитарная реакция в контрольных образцах, протекала, преимущественно, в поперечном направлении и, очевидно, служила препятствием для развития соединительнотканых элементов и дальнейшего роста нервных волокон.

Использование «Сферогеля-Э»TM с инкорпорированной культурой ОНК позволило сформировать более качественную протезирующую ткань между каудальным и краниальным отрезками спинного мозга, что не только позволяло избежать их ретракции, но и создавало более благоприятные условия для регенерации аксонов, препятствуя образованию глиальной демаркационной линии. Необходимо отметить, что похожие результаты были получены рядом исследователей в эксперименте с использованием «Сферогеля-Э»TM и культуры эмбриональных нервных клеток из головного мозга крыс (Ярыгин В.Н. и др., 2006). Использование ОНК в эксперименте авторов продиктовано огромным вниманием к ним как наилучшему клеточному материалу для трансплантации. Существуют данные, что ОНК в определенных условиях способны дифференцироваться в нейроны и глиальные элементы, что делает их весьма привлекательным объ-

ектом клеточной терапии неврологической патологии (Chen X. et al., 2004; Richter W.M. et al., 2005). С этих позиций, обнаружение по результатам иммуногистохимического анализа у животных опытной группы GAP-43 – основного белка аксоногенеза и MP-200 – белка промежуточных нейрофиламентов, типичного для тканей нейронального происхождения, с достоверностью подтверждает широко обсуждаемую в литературе гипотезу о секреции обкладочными нейроэпителиальными клетками ряда нейротрофических факторов, способствующих ремиелинизации поврежденных нервных волокон, и способности этих клеток при создании соответствующих условий дифференцироваться в нейрональном направлении (Ярыгин В.Н. и др., 2006; Брюховецкий И.С. и др., 2008; Fall J.L., 2004; Richter W.M. et al., 2005).

3.6.3. Динамика соматосенсорных вызванных потенциалов у пациентов с хроническим повреждением спинного мозга при трансплантации аутогенных гемопоэтических стволовых клеток

При нейрорегенераторной клеточной терапии спинальной травмы динамика восстановления нарушенных функций, как правило, отличается индивидуальными особенностями. У разных пациентов в начале лечения преимущественный эффект воздействия стволовых клеток может проявиться в двигательной, чувствительной сферах, восстановлении контроля над функциями тазовых органов и др. Комплексная оценка динамики выздоровления имеет важное значение для получения максимально полной и своевременной информации о специфике репаративно-регенераторных процессов в спинном мозге, изучения различных аспектов влияния трансплантации стволовых клеток на нервные ткани (Jim P. et al., 2007).

В предыдущем исследовании авторами (Зайцев А.Ю. и др., 2006) были изучены клинические и электрофизиологические показатели улучшения моторной функции у больных с травматической болезнью спинного мозга (ТБСМ). Относительно сложной задачей является мониторинг состояния сенсорных функций. При физикальном обследовании стандартная оценка чувствительности (по ASIA) у больных с ТБСМ является достаточно грубой (Hayes K.G.

et al., 2002). Для более точной, количественной оценки необходимо было исследование соматосенсорных вызванных потенциалов.

В ряде работ опубликованы данные исследования соматосенсорных вызванных потенциалов (ССВП) при оценке эффективности восстановительной клеточной терапии у пациентов с ТБСМ (Knoller N. et al., 2005; Moviglia G.A. et al., 2006; Sykova E., 2006). Однако они в основном касаются применения трансплантации стволовых клеток в остром периоде (2-3 месяца после травмы). В это время бурное течение спонтанных восстановительных процессов не позволяет выделить эффекты, непосредственно связанные с действием стволовых клеток.

Методом ССВП изучен эффект нейрорегенераторной клеточной терапии у больных с ТБСМ. Для этого проводилось динамическое исследование ССВП у пациентов с хронической ТБСМ, основным методом лечения которых являлась интратекальная трансплантация аутогенных гемопоэтических стволовых клеток.

Анализ динамики ССВП проводился у 21 пациента (17 мужчин и 4 женщины), чей возраст составил от 18 до 60 лет ($33,48 \pm 13,32$). Давность травмы составляла от 1 до 19 лет ($4,57 \pm 3,74$). Уровень травмы были различный – СЗ-М. Ни одному из включенных в группу пациентов в период наблюдения не проводилось оперативных вмешательств.

Для трансплантации применялся только аутогенный клеточный биоматериал. Периферические гемопоэтические стволовые клетки были получены у каждого из обследованных пациентов методом афереза после мобилизации с помощью ростовых факторов (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, Г-КСФ). Материал был разделен на 15-20 аликвот объемом 6-8 мл с содержанием в пробирке $6-8 \times 10^6$ CD34+, лейкоцитов – $1,3-1,5 \times 10^9$. Одну из пробирок направляли на стандартизацию и сертификацию клеточного препарата, другие криоконсервировали в стерильных условиях по стандартной методике с 10% раствором ДМСО и полиглюкином.

При иммунологическом анализе клетки цитоконцентрата освобождали от эритроцитов, окрашивали прямыми конъюгатами моноклональных антител к антигену CD34 (клон НРСА-2) и докрашивали антителами к дифференцированным лейкоцитам человека. Полученный биоматериал исследовали методом проточной цито-

флюориметрии с использованием двойной и тройной флюоресцентной окраски аферезного продукта.

Криоконсервированный материал трансплантировали интратекально в субарахноидальное пространство во время стандартных люмбальных пункций каждые 3 месяцев в течение полутора лет. У каждого пациента (до начала клеточной восстановительной терапии) были зарегистрированы первичные нейрофизиологические данные. Затем исследование проводилось с интервалом в 3-4 месяца в процессе лечения. Период наблюдения составлял от одного до полутора лет. ССВП на стимуляцию большеберцового нерва исследовали у всех пациентов, срединного нерва – только при повреждении СМ на шейном уровне. ССВП регистрировались с поверхности головы с помощью обычных дисковых электродов диаметром 5 мм.

В результате исследования установлено, что за период наблюдения отмечалось полное восстановление отсутствовавших ранних компонентов в ССВП верхних конечностей у 2-х пациентов и в ССВП нижних конечностей у 4-х пациентов. Исчезновения ранних компонентов ССВП не отмечалось ни у одного из пациентов.

При отсутствии ССВП до лечения не было ни одного случая появления ранних компонентов, появление поздних компонентов отмечалось лишь у одного больного (T₁₁₋₁₂ уровень).

Через 12-18 месяцев от начала клеточной терапии отмечались уменьшение латентности и увеличение амплитуды ранних компонентов ССВП.

Выявленное нарастание амплитуды ранних компонентов в ССВП верхних конечностей в процессе клеточной терапии в целом характеризовалось стабильностью. У некоторых пациентов отмечалось резкое падение амплитуды (вплоть до исчезновения) ранних компонентов ССВП верхних конечностей через 3 месяца от начала клеточной терапии. Через 6-9 месяцев ранние компоненты полностью восстанавливались у всех больных. В результате амплитуда ранних компонентов в более поздних записях увеличивалась по сравнению с первоначальным значением. В дальнейших записях значение амплитуды стабилизировалось или продолжало постепенно увеличиваться.

Таким образом, в результате динамического исследования соматосенсорных вызванных потенциалов были выявлены три основ-

ных эффекта восстановительной клеточной терапии у больных с хронической травматической болезнью спинного мозга:

- 1) восстановление ранних компонентов ССВП;
- 2) увеличение амплитуды;
- 3) уменьшение латентности ранних компонентов.

Ранние компоненты ССВП являются потенциалами, генерируемыми в первичной сенсомоторной коре головного мозга вследствие поступления нервных импульсов по путям проприоцептивной чувствительности: периферический нерв – задние столбы спинного мозга – продолговатый мозг – кора больших полушарий головного мозга. Возникновение отсутствовавших ранних компонентов ССВП в процессе лечения трактуется как признак восстановления функции поврежденных путей проприоцептивной чувствительности (Moviglia G.A. et al., 2006). Этот эффект наблюдался у пациентов с шейным уровнем повреждения более чем в половине случаев в ССВП как верхних (66%), так и нижних (50%) конечностей. Исчезновения компонентов ССВП в процессе лечения не наблюдалось ни у одного больного.

Наращение амплитуды ранних компонентов может указывать на увеличение количества проводящих аксонов спинальных путей проприоцептивной чувствительности (Sykova E. et al., 2006). Данный эффект превалировал в ССВП, получаемых при стимуляции срединного нерва (амплитуда увеличивалась в среднем на 40%).

Увеличение амплитуды ранних компонентов ССВП нижних конечностей было незначительным, что, возможно, связано с одновременным восстановлением функции других афферентных систем спинного мозга, имеющих реципрокные взаимоотношения с проприоцептивной системой (Зенков Л.Р. и др., 2004).

В ряде случаев наблюдался двухфазный характер изменения амплитуды: уменьшение амплитуды ранних компонентов во втором исследовании (через 3 месяцев от начала клеточной терапии) и сравнительно большее увеличение амплитуды в следующие 6 месяцев. В последующих записях происходила стабилизация достигнутого эффекта или дальнейшее увеличение амплитуды. Можно предположить, что первоначальная негативная девиация является пролонгированным следовым эффектом, связанным с процедурой получения клеток. Дальнейшее изучение этого явления необходимо для понимания его патофизиологических механизмов. В любом

случае, возможность ухудшения показателей ССВП в сроки 3-6 месяцев после лечения необходимо учитывать при планировании повторных исследований ССВП и при оценке их результатов.

Уменьшение латентности ранних компонентов было характерно для ССВП нижних конечностей, что указывает на увеличение скорости прохождения нервного импульса и свидетельствует в пользу происходящей ремиелинизации нервных волокон, являющейся, вероятно, одним из результатов деятельности стволовых клеток.

Изменения параметров ранних компонентов ССВП указывают на улучшение функции спинальных путей проприоцептивной чувствительности. При этом отмечаются как признаки увеличения количества эффективно функционирующих аксонов, так и признаки ремиелинизации действующих аксонов. Признаков ухудшения функции спинальных проводников не отмечалось ни у одного больного.

Изучение поздних потенциалов также может иметь важное значение при диагностике спинальной травмы. Эти потенциалы наблюдались в значительном числе случаев до лечения при отсутствии ранних компонентов. Ни у одного больного ранние компоненты не наблюдались в отсутствие поздних компонентов. Наличие последних может быть одним из предикторов восстановления ранних компонентов ССВП.

У одного из пациентов поздние компоненты появились в процессе лечения. Появления ранних компонентов при этом не отмечалось. Однако наблюдалась стабильная динамика в виде постепенного уменьшения латентности этих компонентов, и, в ряде случаев, резкое увеличение амплитуды поздних потенциалов в процессе лечения.

Предполагается, что поздние компоненты ССВП отражают активацию ноцицептивных систем (вследствие возбуждения тонких, миелинизированных А-дельта и немиелинизированных С-волокон периферического нерва) (Горопина Г.Г. и др., 2004), что требует дальнейшего изучения.

Наличие поздних компонентов, даже низкоамплитудных, является благоприятным прогностическим фактором восстановления путей проприоцептивной чувствительности (Брюховецкий А.С. и др., 2008).

3.6.4. Международная экспертиза нейротрансплантации для лечения травмы спинного мозга

Клеточная нейротрансплантация считается новым и одним из самых привлекательных методов для лечения травмы спинного мозга (Станков Д.С. и др., 2003). В течение последних нескольких лет в китайских клиниках Chaoyang и West Hills (Xishan) в Пекине под руководством нейрохирурга Hongyun Huang было выполнено более 400 аллогенных трансплантаций фетальных нервных клеток пациентам с ТСМ. Несмотря на такое число операций, их результаты не признаются мировым сообществом (Cyranoski D., 2006). Hongyun Huang опубликовал данные о безопасности и эффективности метода только в китайском журнале (Huang H. et al., 2003). Результаты работы также докладывались на международных конференциях (Steeves J.D. et al., 2004), однако ведущие специалисты считают, что четких доказательств эффективности трансплантаций предоставлено не было и не видят оснований для дальнейшего применения методики в клинике (Cyranoski D., 2006). В интервью журналу Nature доктор Huang заявил, что уверен в безопасности и эффективности методики, однако ни один западный журнал не принимал его материалы для публикации (Cyranoski D., 2005).

Несмотря на недоказанную эффективность методики, все операции в клинике проводятся на коммерческой основе. Стоимость одной операции – 20 000 долларов США (Cyranoski D., 2005). Активная пропаганда такого метода лечения, запрет на использование тканей эмбрионов в некоторых странах и шумиха вокруг стволовых клеток привели к «международному туризму пациентов». На лечение в клинике было записано около 3000 пациентов из Китая и 1000 – из других стран (Cyranoski D., 2005). Все это не могло оставить равнодушным мировое научное сообщество. Эта ситуация неоднократно обсуждалась на страницах авторитетных журналов (Cyranoski D., 2005, 2006; Curt A. et al., 2006) и международных симпозиумах (Steeves J.D. et al., 2004). Необоснованная коммерциализация, миграция пациентов из США и появление негативных результатов длительного наблюдения послужили причиной для проведения независимой международной экспертизы метода, применяемого в китайской клинике доктором Huang. Результаты независимого исследования, проводимого специалистами из США,

Канады и Швейцарии, опубликованы в журнале *Neurorehabilitation and Neural Repair*.

Эксперты изучали долговременный эффект терапии и наличие побочных эффектов у 7 пациентов, прошедших трансплантационное лечение в клинике доктора Huang в 2004 году и находившихся под наблюдением западных специалистов, как минимум, в течение года после процедуры. Клиническое состояние пациентов до и после трансплантации оценивали по шкале ASIA.

У 5 из 7 пациентов были выявлены специфические осложнения в виде менингита и головной боли. Информация об общих осложнениях (инфицирование раны, осложнения наркоза, желудочное кровоотечение, пневмония) докторами не оглашалась. Эффективность лечения по шкале ASIA в течение года после трансплантации не была подтверждена ни у одного пациента.

В результате анализа деятельности клиники и публикаций Huang были выявлены грубые методические ошибки в оценке эффективности методики. Не было выработано четких критериев отбора пациентов (по возрасту, локализации, времени и тяжести травмы), не было контрольных групп и рандомизации. Для оценки функции не применяли общепринятую международную шкалу ASIA. место введения клеток часто не соответствовало области повреждения.

Неясен тип клеток, пересаживаемых пациентам. Авторы метода заявляют, что получают так называемые «обонятельные обкладочные клетки» (ООК) из обонятельных луковиц головного мозга абортированных плодов человека. Однако исследование иммунофенотипа клеток, пересаживаемых в клинику, показало, что большинство из них экспрессирует GFAP (глиальный маркер) и негативно по S-100 – основному известному маркеру ООК (Guest J. et al., 2006). Проблема заключается в том, что до сих пор нет единого мнения по идентификации и маркированию этих клеток. Кроме того, нет данных о заселении ООК обонятельной луковицы у плода 8-16 недель гестации. За все время ни один западный специалист не был допущен в лабораторию, где происходит выделение и культивирование клеток перед трансплантацией. Кроме того, нет данных по эффективности фетальных ООК в экспериментальных моделях TCM.

Эксперты пришли к заключению, что все заявленные результаты трансплантации ООК в клинике доктора Hongyun Huang недоосто-

верны. Метод имеет серьезные осложнения и может быть опасен для пациентов. Так, имеется прошлогоднее сообщение в Detroit Free Press, что, по крайней мере, 3 пациента с TCM и 10 пациентов с бовковым амиотрофическим склерозом умерли от осложнений метода, применяемого в Китае доктором Huang (Anstett P., 2005). Эксперты призывают клиницистов из других стран не направлять своих пациентов на лечение в клинику Huang.

Эффективность метода трансплантации ООК при TCM остается дискуссионной и должна быть показана в испытаниях, соответствующих международным критериям и стандартам для проведения клинических испытаний методов клеточной трансплантации при TCM, в частности (Rosenberg R.N., 2006), и в неврологии – вообще (Берсенев А.В., 2006).

3.6.5. Отдаленные результаты аллогенной клеточной трансплантации в лечении последствий травмы спинного мозга

Представлены отдаленные результаты лечения последствий спинальной травмы с использованием трансплантации фетальных клеток головного мозга и печени. В клиническое исследование было включено 43 пациента (11 мужчин, 32 женщины в возрасте от 17 до 55 лет). Давность травмы к моменту начала лечения варьировала в пределах от 9 месяцев. до 6 лет. Клетки трансплантировали либо интраоперационно в виде плазматического сгустка, либо субарахноидально в виде суспензии посредством люмбальной пункции. Согласно шкале FIM (Functional Independence Measure), ощутимые неврологические улучшения были отмечены у 21 пациента (49%): у 13 (30%) на 1-10 и у 8 (19%) на 10-50% баллов. Улучшение функции тазовых органов, улучшение чувствительности и уменьшение спастики отметили 18 (42%), 10 (27%) и 5 (14%) пациентов, соответственно. Из 20 пациентов с давностью травмы к моменту начала лечения до 2 лет значимые улучшения были отмечены у 14 (70%) человек. Из 23 пациентов с давностью травмы, превышающей 2 года, улучшения были достигнуты только у 7 (30%) человек. Таким образом, по мнению авторов, клеточные технологии могут быть эффективно использованы в лечении значительной части спинальных пациентов, лечение которых с позиций общепринятой медици-

ны представляется малоэффективным (Селедцов В.И. и др., 2010). Описаны осложнения, побочные эффекты и особенности клинического применения мобилизованных аутологичных гемопоэтических стволовых клеток в комплексной терапии пациентов с повреждением спинного мозга (Авдейкин С.Н. и др., 2011).

3.7. Клеточная терапия при острых нарушениях мозгового кровообращения

3.7.1. Субарахноидальная трансплантация фетальных клеток нервной ткани и кроветворной ткани из печени

Сосудистые заболевания головного мозга – одна из ведущих причин заболеваемости, смертности и инвалидизации населения пожилого возраста. Заболеваемость инсультом в России составляет 2,5-3,0 случая на 1000 человек в год. Частота мозговых инсультов в популяции лиц старше 50-55 лет увеличивается в 1,8-2,0 раза в каждом последующем десятилетии. Лечебные мероприятия, направленные на восстановление мозгового кровотока и нейропротекцию, дают определенный лечебный эффект в острый период заболевания. Медикаментозная терапия отдаленных последствий инсульта в подавляющем большинстве случаев малоэффективна, поскольку не оказывает существенного влияния на репаративные возможности нервной ткани (Гусев Е.И., 2003).

Имеются сообщения об эффективном применении субарахноидальной клеточной трансплантации в лечении единичных больных с последствиями мозгового инсульта (Аникин А.Ю. и др., 1998; Миронов Н.В. и др., 1996). Описаны случаи эффективного применения сочетания тканевой нейротрансплантации с реваскуляризационной операцией (Зозуля Ю.А. и др., 1999). Опубликованы данные по применению трансплантации культивированных нейральных клеток в лечении 12 пациентов в возрасте 44-75 лет с давностью мозгового инсульта от 6 месяцев до 6 лет. Отчетливый клинический эффект был получен в 6 случаях. Обращается внимание на безопасность данного вида лечения (Kondziolka D. et al., 2000).

Трансплантационное лечение, включающее в себя субарахноидальные трансплантации фетальных клеток нервной ткани и крове-

творной ткани из печени, было проведено 10 пациентам (5 мужчин, 5 женщин) в возрасте от 35 до 56 лет с последствиями геморрагического или ишемического инсультов, которые поступали в отделение через 4-24 месяцев после цереброваскулярной катастрофы. У всех больных была отмечена стойкая органическая симптоматика в виде нарушений памяти и снижения интеллектуально-мнестических функций. Имели место: гемипарез или гемиплегия (9 пациентов), выраженная сенсомоторная афазия (5 пациентов), а также нарушения статки и координации (4 пациента). У одной пациентки отмечались стойкие дизурические нарушения. До поступления в клинику всем больным проводили полноценную восстановительную терапию, однако ее эффект был несущественным. Контрольная группа была сформирована ретроспективно, случайным образом из 11 больных в возрасте от 45 до 65 лет. Эти больные были сопоставимы с пациентами опытной группы по тяжести мозгового поражения и времени наблюдения. Пациенты обеих групп получали одинаковый комплекс стандартной восстановительной терапии. Согласно полученным данным, после трансплантационного лечения (5 больным клетки трансплантировали однократно, остальным двукратно) у всех пациентов была выявлена положительная динамика, выразившаяся в существенном улучшении психического статуса, повышении силы в конечностях на 1-2 балла, восстановлении речи и нормализации функции тазовых органов. Положительные сдвиги в неврологическом статусе проявляли себя в течение 2-3 недель после трансплантации и нарастали в течение последующих 30-50 дней. Через 6 месяцев после проведенного лечения в группе исследования был выявлен статистически значимый прирост качества жизни пациентов, тогда как в контрольной группе такого прироста не наблюдалось. За весь период наблюдения серьезных осложнений клеточной терапии зарегистрировано не было (Рабинович С.С. и др., 2005).

Таким образом, имеющийся относительно небольшой опыт клеточной терапии последствий мозгового инсульта является весьма обнадеживающим. Он создает базовые предпосылки для проведения дальнейших расширенных клинических исследований в этом направлении (Селедцова Г.В. и др., 2008).

3.7.2. Трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

Известно, что головной мозг очень чувствителен к недостатку кислорода. Понижение скорости кровотока до 10 мл/100 г мозговой ткани в мин и ниже вызывает каскад биохимических реакций, приводящий к формированию инфаркта мозга. Так называемое «ядро» инсульта формируется через 3-6 ч после прекращения кровотока в мозговой артерии. «Доформирование» зоны повреждения продолжается 48-72 ч, а иногда и дольше. Лечение должно быть начато в течение 6 ч после проявления первых признаков заболевания – в период «терапевтического окна», пока возможно сохранение жизнеспособности нейронов в зоне ишемического повреждения – пенумбре. Однако на практике этого, как правило, не происходит. Первые часы после ишемического инсульта уходят на доставку больного в стационар, обследование, постановку диагноза и т. д. В связи с этим необходимо разрабатывать новые подходы к терапии ишемического инсульта, применение которых было бы отсрочено по времени хотя бы на несколько суток.

Клеточная терапия с помощью мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) – это один из перспективных методов лечения ишемического инсульта. ММСК – мультипотентные клетки, способные дифференцироваться в остеогенном, хондрогенном, адипоцитарном, миоцитарном, кардиомиоцитарном, а также в нейрональном и глиальном направлениях (Fukuda K., 2001). Разработаны и апробированы методики выделения ММСК из костного мозга (КМ) человека и животных, их дальнейшего культивирования и наращивания *in vitro* до необходимого количества с сохранением свойств. Это позволяет использовать для клеточной терапии аутогенный материал и, тем самым, избежать проблем с иммунной совместимостью трансплантата и реципиента. Кроме того, ММСК влияют на течение воспалительной реакции в зоне тканевого повреждения (Кругляков П.В. и др., 2004) и активируют ангиогенез в пограничной с поврежденной зоной (Зинькова Н.Н. и др., 2007; Chen J. et al., 2003).

Для оценки распределения эндогенных ММСК в мозге после ишемического инсульта, морфологического и поведенческого воздействия ММСК на животного и сравнения эффективности введения ММСК на разных сроках после инсульта авторы (Зинькова Н.Н. и

др., 2007; Соколова И.Б. и др., 2007) провели эксперименты на 3-4-месячных крысах-самцах (n=182) инбредной линии Вистар-Киото массой 150-170 г.

Суспензию КМ выделяли из диафизов бедренных костей животных сразу после декапитации, промывая их средой культивирования с 20% сыворотки крови эмбрионов коров и 100 мкг/мл пенициллина/стрептомицина. КМ высевали на пластиковые чашки Петри и, отмыв через 48 ч после эксплантации от форменных элементов крови с помощью раствора (20 мМ фосфатный буфер, pH 7,4; 0,1 М NaCl), культивировали ММСК в монослое при +37°C и 5% CO₂ в течение 6-7 суток. Для пересева культуры ММСК использовали раствор трипсина и ЭДТА. Замену питательной среды проводили каждые трие суток.

Фенотипирование ММСК крыс проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре FACSScan. ММСК окрашивали антителами против негативного маркера CD45 и антителами против позитивных маркеров CD90, CD106, CD44. Для этого клетки снимали с чашек раствором трипсина и ЭДТА, дважды промывали раствором буфера, на 1ч переносили в раствор моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромом, в разведении 1:20. Затем клетки дважды промывали раствором буфера и оценивали интенсивность свечения. Фенотипирование проводили после первого, второго и третьего пересевов культуры.

Для более полной характеристики полученных клеток их подвергали направленной дифференцировке *in vitro* в так называемых ортодоксальных (остеогенном, хондрогенном и адипоцитарном) и в нейрональном направлениях по описанным ранее протоколам (Кругляков П.В., и др., 2004; Зинькова Н.Н. и др., 2007).

Окрашивание ММСК флуорохромом РКН-26 проводили после третьего пересева культуры. Эффективность окрашивания ММСК оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа (Leica, Германия).

Экспериментальный ишемический инсульт у подопытных животных моделировали посредством окклюзии средней мозговой артерии (СМАО) электрокоагуляцией на протяжении 2-3 мм. В течение 6 недель после СМАО по 15 животных из групп № 1, 2 и 4 проходили поведенческое тестирование в водном лабиринте Морриса. Оценивали время, за которое животное было способно нахо-

дить скрытую под водой платформу, основываясь на внешних ориентирах. Тестирование начинали через 2 и 5 недель после СМАО, каждая сессия длилась одну неделю.

Животных декапитировали через 1, 2, 3, 5 суток и через 1, 2, 4 и 6 недель после СМАО. На всех сроках декапитации, кроме 6 недель, животных подвергали прижизненной фиксации – перфузии через левый желудочек сердца 4% раствором параформальдегида в фосфатном буфере, извлекали головной мозг и вырезали сегмент, включающий видимую зону повреждения и интактные краевые зоны. Половину блока фиксировали по стандартной методике в параформальдегиде, другую половину – криофиксировали.

Для морфометрического анализа через 6 недель после СМАО непосредственно после декапитации извлекали головной мозг и вырезали сегмент, включающий видимую зону повреждения и интактные краевые зоны. У 6 животных его фиксировали по стандартной методике в параформальдегиде, а у 4 – криофиксировали.

Детекцию флуоресцентно меченных ММСК в головном мозге проводили с помощью флуоресцентного микроскопа на гистологических срезах толщиной 7 мкм (криофиксация), изготовленных на криостатном микротоме Leica.

Объем повреждения головного мозга определяли на каждом 15-ом серийном срезе толщиной 7 мкм по площади ипсилатерального и контралатерального полушарий с помощью программы PhotoM.

Иммуногистохимический анализ проводили для изучения процесса пролиферации клеток в субэпендимной зоне боковых желудочков головного мозга; развития глиоза в зоне повреждения мозговой ткани; определения жизнеспособности нейронов в пограничной с повреждением области; активации ангиогенеза в ткани мозга. Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием первичных антител к Ki67 (ядерный маркер пролиферации), ГФКБ (глиальный фибриллярный кислый белок – маркерный белок астроцитов клеток), NeuN (маркерный белок ядер нейронов), vWF (фактор фон Виллебранда, выявляющийся в эндотелиальных клетках).

Для проведения реакции срезы головного мозга депарафинизировали в трех порциях ортоксилола, затем регидратировали, промывали в дистиллированной воде и переносили в 3% перекись

водорода для блокировки эндогенной пероксидазы, промывали в буфере и наносили на них первичные антитела, инкубировали во влажных камерах, двукратно промывали в буфере.

Затем наносили рабочий раствор хромогена DAB. Препараты докрашивали астровым синим, толуидиновым синим или гематоксилином. Для каждого антитела проводили положительный и отрицательный контроль окрашивания.

Количество сосудов подсчитывали на препаратах, окрашенных по методу vWF, в левом полушарии в неокортексе (первичная соматосенсорная кора) и головке хвостатого ядра по границе повреждения ткани в пределах 30 мкм под микроскопом Leica через 6 недель после СМАО. В правом полушарии сосуды были подсчитаны в симметричной области.

Анализ культуры ММСК методом проточной цитофлуориметрии показал, что она состояла из CD45+-клеток (клеток гемопоэтического ряда) – 3% и CD90+-клеток (собственно ММСК) – 97%, среди которых было 15% CD 106+-клеток. Полученные клетки были способны дифференцироваться в остеогенном, адипоцитарном, хондрогенном направлениях и в направлении нейронального ряда. В нейрональном направлении дифференцировалось около 70% ММСК (Зинькова Н. Н. и др., 2007).

Трансплантация ММСК животным после СМАО повысила уровень выживаемости примерно в 1,7 раза.

Когнитивная функция восстанавливалась практически до исходного уровня через 2 недели после СМАО при условии, что была проведена трансплантация ММСК. При этом у контрольных животных в течение всего периода наблюдения (6 недель) поведенческий статус не восстановился.

Меченые ММСК, трансплантированные внутривенно в день СМАО, появлялись в мозге на 3-и сутки. Они распределялись вокруг сосудов в обоих полушариях. В контралатеральном полушарии в течение 6 недель были выявлены единичные меченые клетки, в ипсилатеральном – практически вокруг всех сосудов. При внутривенной трансплантации через 3 суток (группа 4) меченые ММСК были выявлены в мозге также через 3 суток после введения. Единичные ММСК находили в субэпендимной зоне боковых желудочков и только у нескольких животных – в хвостатом ядре. Через 6 недель меченые клетки выявлялись только вокруг желудочков мозга.

На 1-3-и сутки после СМАо в головном мозге всех животных формировался некротический очаг. В пограничной с повреждением области вокруг сосудов появились скопления клеточных элементов – периваскулярные муфты, состоящие из лимфоцитов, плазматических клеток и иногда эозинофилов. При трансплантации ММСК в день СМАо по сравнению с контролем периваскулярные муфты были больше по объему, клетки в них располагались в несколько рядов.

Через 5 суток после СМАо у контрольных животных на границе некротического очага был выявлен хорошо выраженный лейкоцитарный вал. Распада ткани в центре повреждения еще не наблюдали. При трансплантации ММСК в день СМАо процесс распада и очищения ткани мозга от поврежденных фрагментов проходил заметно быстрее, чем в контроле. В неповрежденной области мозга наблюдали активацию астроцитов.

Через 1 неделю у контрольных животных в очаге некроза выявили большое количество макрофагов и распадающиеся клетки. Активированных астроцитов в пенумбре еще нет. В субэпендимной зоне желудочков были обнаружены редкие иммунопозитивные пролиферирующие клетки с антителами к белку Ki67.

Морфологическая картина постинсультных процессов в ткани мозга в группах клеточной терапии 3 и 4 через 1, 2, 4 и 6 недель после СМАо практически одинакова. Через 1 неделю в субэпендимной зоне животных с трансплантацией ММСК в день СМАо и через 3 дня после СМАо наблюдали митотически делящиеся клетки. Через 2 недели в контрольной группе выявлена четкая демаркационная линия между тканевым дефектом и неповрежденной тканью. В пенумбре наблюдалась клеточная инфильтрация и гибнущие нейроны. Продолжалось очищение ткани мозга от поврежденных фрагментов. У опытных животных между поврежденной и неповрежденной тканью появлялся рубец, состоящий из 1-3 рядов глиальных клеток, расположенный между тканевым дефектом и пограничной зоной. Процесс очищения тканей мозга от погибших клеток был уже полностью завершен.

Через 4 недели в ипсилатеральном полушарии контрольных животных наблюдали расширение желудочка. Большая часть неокортекса отсутствовала – на данном участке сформировалась ликворная киста. Глиальный рубец между поврежденной и неповрежденной тканью имел четко выраженную структуру. У опытных

животных в пределах неокортекса граница между поврежденной и неповрежденной тканью определялась четко, рубец был структурирован. Большая часть нейронов в сохранившейся коре мозга не была повреждена. При обширных дефектах ткани мозга (большая часть коры полушария, хвостатого ядра и наружная капсула) у животных, как и в контрольной группе, развивалось постинсультное осложнение – расширение желудочков.

Через 6 недель у контрольных животных с первоначально обширным инсультом выявлялись значительные повреждения ткани мозга, коснувшиеся первичной и вторичной соматосенсорной, пирiformной и инсुлярной коры. На месте дефекта сформировалась обширная ликворная киста с эпендимной выстилкой. Большинство нейронов в пограничной зоне было повреждено: при окраске тионином по Нисслю ядро и цитоплазма не определялись, иммуногистохимическая реакция на NeuN не давала характерного для ядер нейронов продукта окрашивания. Иммуногистохимическая реакция на ГФКБ выявила мощный глиоз в пенумбре, неокортексе и, частично, в хвостатом ядре. В мозге опытных животных с введением ММСК в день СМАо не было единой большой полости на месте дефекта ткани, выявлялись мелкие полости разной величины, перемежавшиеся с клеточными островками, состоящими из капилляров. У животных с введением ММСК через 3 дня после СМАо выявлялась киста в виде единой полости. Большинство нейронов в пограничной с зоной не были повреждены, астроциты в наружной капсуле активизировались и формировали капсулу, которая препятствовала расширению желудочков, гибели нервной ткани и не деформировала мозг.

Авторы приходят к выводу, что в качестве материала для клеточной терапии ММСК очень перспективны, так как для каждого пациента могут быть выделены аутогенные клетки с заданной чистотой популяции, имеющие четко охарактеризованные жизнеспособность, фенотип и дифференцировочный потенциал.

К настоящему времени показано, что ММСК, как клетки с высоким уровнем экспрессии CXCR4 – рецептора к SDF-1 (stromal cell derived factor), обладают тропностью к зонам тканевого повреждения, где повышается содержание SDF-1 (Bhakta S. et al., 2006). В настоящей работе ММСК, введенные в хвостовую вену в день СМАо или через 3 суток после СМАо, были выявлены в мозге не в

день, а спустя 3 суток после трансплантации. Показано, что и при инфаркте миокарда ММСК, введенные в вену в день операции, появлялись в тканях сердца в единичном количестве на 2-е сутки, а массово – на 3-и (Кругляков П. В. и др., 2004). По-видимому, ММСК не просто пассивно разносятся по организму током крови, а осуществляют направленную миграцию в области тканевого воспаления. Разницу в количестве меченых клеток и их распределении в ткани мозга у животных с введением ММСК в день СМАо и через 3 дня после СМАо авторы объясняют тем, что ММСК, введенные в день СМАо, успевают пройти в головной мозг до восстановления целостности ГЭБ, а через 4-6 суток после СМАо его целостность практически восстанавливалась (Гилерович Е.Г. и др., 2001).

Трансплантация ММСК в день СМАо привела к более раннему формированию глиального рубца между поврежденной и неповрежденной тканью мозга (на 5-е сутки в группе клеточной терапии и 7-е сутки – в группе контроля). Известно, что глиальный рубец препятствует прорастанию аксонов. Кроме того, его формирование способствует стабилизации ткани мозга после инсульта: митотически делящиеся астроциты окружают поврежденную зону и новообразованные сосуды, способствуя восстановлению ГЭБ, предупреждая сильную воспалительную реакцию, начало аутоиммунной реакции и ограничивая клеточную дегенерацию (Silver J. et al., 2004).

Через 6 недель после СМАо в группах клеточной терапии сформировался глиальный рубец, площадь которого была существенно меньше, чем в контроле. В контрольной группе мощный глиоз затрагивал пенумбру, неокортекс и хвостатое ядро. В группах клеточной терапии глиоз не деформировал ткань и локализовался преимущественно в пограничной с повреждением зоне.

У опытных животных выявлена более выраженная пролиферация клеток в субэпендимной зоне желудочков головного мозга. Ранее было показано, что СМАо вызывает деление клеток субэпендимной зоны желудочков мозга у крыс (Arvidsson A. et al., 2002; Darsalia V. et al., 2005; Thored P. et al., 2006), а также возможность миграции вновь образованных клеток из эпендимной зоны к области повреждения. Эти клетки окрашивались антителами против нейрональных маркеров, что свидетельствовало об их дифференцировке в нейрональном направлении. Вероятно, данный процесс можно расценивать как ограниченную репарацию нервной ткани.

Трансплантация ММСК как в день СМАО, так и через 3 суток после инсульта значительно ускорила течение воспалительной реакции: в группах клеточной терапии воспаление закончилось через 2 недели, в контрольной - через 4 недели. Как показано ранее, ММСК *in vitro* способны секретировать набор факторов, стимулирующих (IL-1, TNF – tumor necrosis factor), регулирующих (IL-11) и ингибирующих (bTGF – transforming growth factor) воспалительные процессы. Авторы предполагают, что и *in vivo* ММСК принимают участие в регуляции процессов воспаления посредством выделения вышеуказанных агентов (паракринная функция).

В обеих группах клеточной терапии зафиксирована активация ангиогенеза в пенумбре. Количество сосудов в анализируемой области головного мозга было больше в 1,4-1,8 раза по сравнению с контролем. Активация ангиогенеза способствует восстановлению микроциркуляции, а, следовательно, и метаболизма в ишемизированной ткани мозга до физиологического уровня. Вероятно, это одна из причин сохранения жизнеспособности нейронов в пограничной с повреждением зоне.

Авторы предполагают, что трансплантированные ММСК (независимо от времени трансплантации) оказывали нейротрофическое действие на нервную ткань, считают, что и в этом случае реализуется паракринная функция ММСК. Показано, что после добавления в клеточную культуру экстракта тканей поврежденного мозга ММСК продуцировали такие факторы, как VEGF, BDNF, NGF и bFGF (Chen X., 2002; Li Yi. et al., 2002), которые предотвращают апоптоз клеток в ткани, пограничной с областью некроза и активируют ангиогенез (Chen J., 2003; Chen J. et al., 2004). Окраска ядер этих клеток антителами NeuN показала, что в группах клеточной терапии жизнеспособные нейроны находились непосредственно рядом с границей повреждения.

Авторы заключают, что вследствие активации ангиогенеза и сохранения жизнеспособности нейронов в пограничной с повреждением зоне внутривенная трансплантация ММСК независимо от сроков введения способствовала уменьшению объема повреждения мозга в 1,6-1,3 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Положительный эффект клеточной терапии был выявлен не только на морфологическом уровне в мозге, но и при проведении поведенческого тестирования животных в водном лабиринте Мор-

риса. Животные контрольной группы затрачивали в несколько раз больше времени на поиск платформы как во время первого испытания, начатого через 2 недели после СМАО, так и во время второго испытания, начатого через 5 недель после СМАО по сравнению с ложнооперированными животными и крысами из группы клеточной терапии через 3 дня после СМАО. Животные из группы клеточной терапии уже к 5-му дню первой сессии обучения вырабатывали оптимальную стратегию поиска платформы (время выхода на плато) и успешно использовали ее после 2-недельного перерыва. Эти животные затрачивали столько же времени на поиск платформы, сколько и ложнооперированные. Животные же контрольной группы практически не достигали критерия обученности за 6 недель. Тест в водном лабиринте Морриса свидетельствует о том, что ишемический инсульт у крыс приводит к существенному нарушению когнитивных функций у животных: они не утрачивают способность к обучению, но за 6 недель не могут выработать оптимальную тактику поведения во время тестирования. Применение клеточной терапии позволило восстановить обучаемость, краткосрочную и долговременную память животных до уровня ложнооперированных крыс уже к концу 3-й недели после СМАО.

Все изложенные данные свидетельствуют, что в представленных экспериментах клеточная терапия ишемического инсульта у крыс с помощью ММСК дает положительные результаты:

- на 17% повышает постоперационная выживаемость животных;
- стимулирует ангиогенез в ткани, пограничной с повреждением, тем самым, способствует восстановлению метаболизма в ишемизированной области мозга;
- оказывает нейропротекторное воздействие – сохранение жизнеспособности нейронов по всему объему пограничной зоны;
- уменьшает объем тканевого дефекта мозговой ткани и целые мозговые структуры, например хвостатое ядро, сохраняют морфологическое строение;
- сохраняет когнитивные функции животных на нормальном физиологическом уровне.

По мнению авторов, важным моментом, имеющим отношение к практической медицине, является то, что внутривенная транс-

плантация ММСК инсультным животным может быть отсрочена на несколько дней. При этом полученный результат бывает не хуже, чем при трансплантации ММСК во время «терапевтического окна». Авторы полагают, что представленную работу можно расценивать как доклиническое исследование. На ее основе можно разработать рекомендации для проведения ограниченного клинического исследования (Зинькова Н.Н. и др., 2007; Соколова И.Б. и др., 2007).

Изучается использование ММСК в лечении очагового повреждения головного мозга вследствие нарушения венозного кровотока (Черных Е.Р. и др., 2011).

3.7.3. Трансплантация негемопозитических стволовых клеток пуповинной крови

Из пуповинной крови человека удалось выделить популяцию стволовых негемопозитических клеток (экспрессирующих Oct-4, Rex-1, Sox-2), которые способны положительно влиять на течение экспериментальной ишемии мозга у крыс. Механизм их действия – регуляторный, проявляется как при локальной трансплантации в ишемизированную зону, так и при внутривенном введении (Xiao J. et al., 2005).

3.7.4. Аутогенная трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

В основе ишемического инсульта (ИИ) лежит размягчение мозговой ткани – инфаркт мозга. Инфаркт мозга развивается при закупорке сосудов атеросклеротической бляшкой, тромбом или эмболом, а также за счет атерогенного сужения сосудов мозга или их спазма. Существует ряд нерешенных терапевтических задач при инсульте – восстановление структуры и функции после инсульта, ангиогенез в ишемизированной области.

Различные исследовательские группы на модели ишемического инсульта (ИИ) испытывали методы клеточной трансплантации нейронов, выделенных из тератокарциномы, фетальных нервных клеток животных (Dinsmore J.H. et al., 2002) и человека (Jeong S.W. et al., 2003), клеток пуповинной крови (Willing A.E. et al., 2003), стромальных клеток костного мозга (Chen J. et al., 2001; Li Y. et al., 2002;

Zhao L.R. et al., 2002; Chen J. et al., 2003) и подкожного жира (Kang S.K. et al., 2003). После успешных доклинических исследований эффективности методов клеточной трансплантации при ИИ некоторые протоколы были разрешены к клиническим испытаниям.

Лечение инсульта клетками начинает свою клиническую историю с 1998 г., когда врачи медицинского центра Питтсбургского университета (США) впервые выполнили нейротрансплантацию нейрональных клеток, выделенных из линии тератокарциномы (NT2N), в головной мозг больных, перенесших инсульт. В 2002 г. впервые опубликовано исследование по выживаемости пересаженных клеток больному после инсульта. Морфологические исследования головного мозга были выполнены после смерти больного (от сердечной патологии), которому за 27 месяцев до этого была выполнена операция по нейротрансплантации после ИИ (Nelson P.T. et al., 2002).

Результаты исследования показали, что нейроны, полученные из тератокарциномы, выживают в мозге человека более 2-х лет после трансплантации, без злокачественного перерождения (Nelson P.T. et al., 2002). Завершена II фаза клинических испытаний нейротрансплантации по «Питтсбургскому протоколу» Апробирован другой метод нейротрансплантации при ИИ – ксенографтинга фетальных нейронов свиньи (Savitz S.I. et al., 2005). Однако, FDA приостановила эти испытания в США после завершения I фазы.

В последнее время в связи с большим интересом к стволовым клеткам костного мозга и их применением в клинике для лечения ишемии конечностей (Tateishi-Yuyama E. et al., 2002) и миокарда (Strauer B.E. et al., 2002) подобные эксперименты были проведены и на модели ИИ. При этом была показана эффективность трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (ММСК) (Зинькова Н.Н. и др., 2007; Соколова Н.Б., 2007; Chen J. et al., 2001; Li Y. et al., 2002; Zhao L.R. et al., 2002; Chen J. et al., 2003). У крыс с моделью ИИ после трансплантации человеческих МСК улучшалось кровоснабжение в ишемизированных областях и восстанавливалась утраченная в результате инсульта функция мозга. Было доказано, что ведущую роль в функциональном восстановлении после инсульта играет ангиогенез и стимулирующее действие ростовых факторов, выделяемых клетками.

В журнале *Annals of Neurology* (2005) опубликованы результа-

ты I фазы клинических испытаний метода ауотрансплантации ММСК пациентам с ИИ в Ajou University Hospital (Южная Корея). Показана безопасность и эффективность такой клеточной терапии. Исследователи рандомизированно назначали либо стандартную программу реабилитации, либо эту же программу с дополнительным введением стволовых клеток пациентам с инфарктом мозга в бассейне средней мозговой артерии.

Клетки выделяли из костного мозга пациентов, затем культивировали в течение 30 дней. Перед инфузией клетки имели фенотип SH2+/SH4+/CD34-/CD45-. ММСК вводили внутривенно через 4-5 недель после развития инсульта, а также повторно, спустя 8-9 недель. В опытной группе (n=5) была проведена внутривенная инфузия 100 млн. МСК (дважды), в группу контроля вошло 25 пациентов. Динамика неврологического дефицита сравнивалась через год после лечения.

По данным нейровизуализационных методов было показано, что у пациентов, для лечения которых использовали ММСК, была отмечена существенная положительная динамика состояния по сравнению с контролем, а именно – уменьшалась область инсульта. Функциональные тесты при осмотре через 3, 6 и 12 месяцев у больных, получавших инфузию стволовых клеток, были существенно лучше, чем в группе контроля. Так, в течение всех 12 месяцев в группе с трансплантацией клеток показатели по шкале Barthel и модифицированной шкале Rankin были лучше. В то же время улучшение по шкале NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale) было незначительным.

Это исследование выгодно отличается от всех предыдущих клинических протоколов нейротрансплантации после ИИ. Авторами представлен первый клинический протокол лечения последствий ишемического инсульта методом аутогенной трансплатации ММСК. При этом авторы стремились решить сразу две задачи – индукция ангиогенеза и стимуляция выживаемости поврежденных нейронов мозга. В рамках I фазы клинических испытаний была продемонстрирована безопасность и эффективность метода. Использование собственных клеток пациента позволяет избежать этических проблем, возникающих при использовании эмбрионального и ксеногенного материала. Другим преимуществом является то, что испытания были рандомизированы и включали группу контроля.

Возможные механизмы положительного клинического эффекта трансплантации ММСК с ИИ, предполагаемые рядом авторов заключается в дифференцировке ММСК в нейрональные клетки, слияние с клетками хозяина, паракринной стимуляции нейро- и ангиогенеза факторами роста. Следует отметить, что способность ММСК к миграции в головной мозг и преодоление гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) дискуссионно. Это свойство доказано только для гемопоэтических клеток костного мозга (Massengale M. et al., 2005). Однако, в небольшом количестве (0,02 из 2 млн. введенных ММСК) обнаружены в зоне инфаркта после их интракаротидного введения, окрашивающиеся позитивно на нейрональные маркеры *in situ* (Li Y. et al., 2002). Это означает, что наиболее вероятным механизмом действия ММСК как стимулятора ангио- и нейрогенеза является паракринный, осуществляемый за счёт синтеза ими факторов роста. Так, было показано, что биохимические сигналы из зоны инфаркта мозга способны стимулировать ММСК к синтезу факторов роста (Chen X. et al., 2002).

Исследование по трансплантации клеток пуповинной крови на модели ИИ (Borlongan C.V. et al., 2004), подтверждает, что клетки не мигрируют через ГЭБ, а лишь стимулируют эндогенный нейро- и ангиогенез. Было выявлено повышение концентрации GDNF на 68% в головном мозге инсультных животных после введения клеток и маннитола (повышающего проницаемость ГЭБ) (Borlongan C.V. et al., 2004). Суммарно все эти данные ставят под сомнение миграцию клеток из периферической крови в головной мозг и их дифференцировку в нейроны, сколько либо значимую для терапевтического эффекта.

В итоге, из-за невозможности проведения морфологических исследований пациентов, можно только предполагать, что действие введенных клеток обусловлено либо миграцией и заселением ими области инсульта, либо за счет паракринной стимуляции ангиогенеза и нейрогенеза (Станков Д.С., 2005).

Возможность применения ММСК костного мозга при терапии экспериментального инсульта на сегодняшний день может считаться доказанной. Однако один из важных практических вопросов применения МСК при инсульте связан с выбором времени трансплантации клеточного материала.

Развитие ишемического инсульта сопровождается нарушением ГЭБ. По литературным данным известно, что максимальная проницаемость ГЭБ у экспериментальных животных регистрируется через 2–4 ч после окклюзии средней мозговой артерии. Через 5 ч проницаемость ГЭБ начинает снижаться и через 2 суток практически достигает первоначального уровня. К настоящему моменту мало известно о миграции ММСК в ЦНС, в том числе и о возможности этих клеток преодолевать ГЭБ и/или гематоликворный барьер.

Авторами проведены эксперименты на крысах инбредной линии Вистар-Киото. МСК выделялись из костного мозга животных, культивировались и окрашивались флуоресцентным красителем РКН26 *in vitro*. Ишемический инсульт смоделирован посредством СМАо. Внутривенную трансплантацию ММСК проводили в день операции (группа I) и через 3 суток после операции (группа II). Животным из группы негативного контроля внутривенно вводили среду культивирования. Забор материала проводили через 1, 2, 4 и 6 недель. Изучали распределение флуоресцентно меченых клеток. Оценивали морфологические особенности развития инсульта.

Через 6 недель после операции флуоресцентно меченые клетки были выявлены в мозге обеих групп. При введении ММСК в день операции клетки располагались вокруг сосудов в обоих полушариях мозга. Визуально большее количество меченых клеток наблюдали в поврежденном полушарии. При введении ММСК через 3 суток после СМАо меченые клетки располагались вблизи от эпендимной выстилки третьего и боковых желудочков. Через неделю после СМАо в группе негативного контроля наблюдали разрушение тканей мозга, инфильтрацию поврежденного участка воспалительными клетками. У животных из опытных групп на этом сроке уже шли процессы очищения от погибшей ткани. Через 2 недели после СМАо у животных с введением ММСК в день операции начинала формироваться образованная клетками глии граница между повреждением и пограничной с ним областью. На этом же сроке у животных с введением ММСК через 3 суток после СМАо граница уже была сформирована. У контрольных животных еще наблюдались процессы очищения от погибших тканей.

Через 4 недели после экспериментального инсульта в контрольной группе завершается образование ликворно-глиальных кист. У жи-

вотных обеих опытных групп кисты уже сформированы. На сроке 6 недель после СМАО во всех группах процесс образования глиального рубца и кист был завершен. Площадь дефекта тканей была наибольшей в контрольной группе. Минимальная площадь дефекта наблюдалась в опытной группе 2. У животных из обеих групп клеточной терапии отмечена большая по сравнению с контролем пролиферация клеток в субвентрикулярной зоне и лучшая сохранность нейронов в области ишемической полутени.

В итоге клеточная терапия у инсультных животных дала положительный результат при трансплантации ММСК как до, так и после закрытия ГЭБ. При этом авторы получили разные картины распределения ММСК по тканям головного мозга. Если трансплантация проведена в то время, когда нарушена целостность ГЭБ, то ММСК выявляются вокруг сосудов в обоих полушариях; если после закрытия ГЭБ, то в мозге обнаружены единичные клетки в боковых желудочках. Авторы предполагают, что ММСК секретируют определенные факторы, оказывающие нейропротекторное действие на клетки мозга. Возможность дифференцировки ММСК в нейрональном направлении непосредственно в инсультной области мозга пока не доказана и подлежит дальнейшему изучению (Зинькова Н.Н. и др., 2007).

3.7.5. Трансплантация стволовых клеток пуповинной крови

Показана эффективность препарата клеток пуповинной крови человека в отношении снижения выраженности как ранних, так отдаленных последствий ишемического поражения мозга.

Авторы проводили эксперименты по моделированию ишемического инсульта проводили на белых крысах-самцах линии Вистар. Ишемию воспроизводили путем постоянной окклюзии левой средней мозговой артерии (ПОСМА). Мононуклеры пуповинной крови человека вводились однократно внутривенно двух дозах: 2×10^4 или 2×10^6 клеток на животное.

К 10-й неделе животные с ПОСМА, получившие препарат, практически не отличались от ложнооперированных животных по степени неврологического дефицита.

Авторы заключают, что в клинике препарат может представлять собой эффективное средство профилактики и/или лечения последствий инсульта, для чего необходимы клинические испытания (Сурков К.Г. и др., 2007).

В последнее время представлены результаты внутривенной ксенорансплантации мезенхимальных стволовых клеток плаценты человека крысам и сравнительная оценка хоуминга в головном мозге в двух моделях ишемического инсульта (окклюзия СМА) (Холоденко И.В. и др., 2012).

3.7.6. Применение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора

В моделях на животных получены убедительные данные о том, что трансплантация аутологичных клеток-предшественников костного мозга, способна значительно улучшать кровоток в области ишемии, уменьшать зону рубца и восстанавливать утраченные моторные и сенсорные функции ЦНС. G-CSF стимулирует выброс стволовых клеток из костного мозга без последующей аутотрансплантации применялся в клиническом исследовании. Авторами получены данные, свидетельствующие о лучшем восстановлении нейральных функций у больных с первичным ишемическим инсультом. При этом рядом исследователей отмечается не только противовоспалительный эффект, но и уменьшение выраженности процессов апоптоза на фоне применения G-CSF у больных с острым ишемическим инсультом (Shu W. et al., 2000).

Использование гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в терапии ишемического инсульта представляется перспективным и доступным способом улучшения результатов лечения этой тяжелой группы больных. Предстоит изучить безопасность и эффективность применения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в сочетании с общепринятым медикаментозным лечением и общепринятого медикаментозного лечения при остром ишемическом инсульте у пациентов (Белкин А.А. и др., 2007; Дыгай А.М. и др., 2011).

3.8. Клеточная терапия при эпизодических и пароксизмальных расстройствах

Распространенность эпилептической болезни в развитых странах составляет 5-10 случаев на 1000 населения, причем в основном заболевание проявляется в детском возрасте. При этом около 30% больных детей имеют резистентные к медикаментозной терапии формы заболевания, а лечение различных форм пароксизмальных расстройств неудовлетворительно и требует разработки новых подходов (Дзяк Л.А., и др., 2001).

Для эпилепсии и сходных состояний характерно образование эпилептической системы (ЭС), объединяющей различные образования мозга (кора, миндалевидный комплекс, гиппокамп и др.), что позволяет хранить патологическую информацию о структуре эпилептических проявлений и осуществлять реализацию их в виде судорожных и не-судорожных припадков, неврологических и психических нарушений. Формирование ЭС – это образование специфических и неспецифических межнейронных взаимоотношений на фоне значительной редукции содержания нейронов и реинтеграции сохранившихся нейронов, перестройка синаптоархитектоники в структурах ЭС, после завершения формирования которых, медикаментозная и хирургическая коррекция эпилепсии затруднена (Ерениев С.И. и др., 1989).

Установлено, что основными структурными механизмами повышения судорожной готовности мозга у экспериментальных животных при очаговом (стереотаксическое разрушение участков СА₁ и СА₃ полей дорсального гиппокампа и участков базолатеральных отделов миндалевидного комплекса) и диффузном (клиническая смерть, нейросенсибилизация, пороговые звуковые стимуляции) повреждении мозга является избыточное усложнение синаптического устройства межнейронных контактов (увеличение содержания гипертрофированных, перфорированных контактов и сложных синаптических устройств) на фоне уменьшения численной плотности преимущественно мелких нейронов и деструкции части межнейронных контактов.

Повышение судорожной готовности нейронов сопровождается повреждением преимущественно дистальных отделов их дендритов, смещением афферентного входа на более крупные проксимальные отделы дендритов, компенсаторной гипертрофией аксо-дендритных

синапсов на сохранившихся крупных ветвях дендритного дерева. Деафферентация нейронов, наряду с гипертрофией сохранившихся межнейронных синапсов, приводит к активации собственных механизмов ауторитмичного синхронизированного функционирования нейронов и эпилептизации мозга (Ерениев С.И. и др., 1989; Семченко В.В. и др., 2014).

Кроме того, поиск принципиально новых методов коррекции высокой судорожной готовности головного мозга был обусловлен необходимостью предупреждения прогрессирования его атрофии (Ерениев С.И. и др., 1989; Генне Р.И. и др., 1990).

Идея использования клеточной терапии при эпилепсии и эпилептических синдромах различной этиологии появилась сразу после разработки методов трансплантации эмбриональной нервной ткани и укрепилась с открытием нейрогенных стволовых клеток (Цымбалюк В.И., Медведев В.В., 2005).

Гистофизиологическое и клинико-экспериментальное обоснование реконструктивно-функциональной терапии при эпилепсии и эпилептиформных припадках с помощью трансплантации клеток незрелой (эмбриональной, фетальной) нервной ткани, содержащей стволовые и прогениторные клетки, дано около четверти века назад омскими морфологами, неврологами и нейрохирургами (Ерениев С.И. и др., 1989, 1994; Генне Р.И. и др., 1990; Савченко Ю.Н. и др., 1993).

Основными способами увеличения концентрации естественных биологически активных веществ в головном мозге является нейротрансплантация эмбриональной нервной ткани, имплантация специально подготовленных моно- или поликлеточных смесей (включая и стволовые клетки), введение различных вытяжек эмбриональной нервной ткани, содержащих биологически активные вещества, в ткань мозга, желудочки, субарахноидальное пространство. В результате, в той или иной степени, достигается общий или локальный нейротрофический, нейротрофический и модулирующий эффекты. При этом нейротрансплантация эмбриональной нервной ткани, как метод, сменяется введением незрелых клеток высокой степени очистки – прогениторных, стволовых клеток (Полежаев Л.В. и др., 1993; Ерениев С.И., 1997; Krobot K. et al., 1997; Muhlbacher F., 1997; Zlokovic B.V., Apuzzo M.L., 1997; Reier P.J., 2004).

В настоящее время нейротрансплантация активно развивается в направлении совершенствования методов пересадки региональ-

ных и эмбриональных стволовых клеток в четко (стереотаксически) определенные зоны головного мозга (Гомазков О.А., 2006).

В ранних исследованиях было установлено, что при нейрохирургической внутримозговой трансплантации микрокусочка нервной ткани (специализированные клетки) структурно-функциональная интеграция нейронов трансплантата с окружающей нейронной сетью реципиента, прорастание аксонов трансплантата за его границы в той или иной степени характерны для всех видов успешной нейротрансплантации. Степень этой интеграции зависит от многих факторов (зрелость нейронов, объем трансплантата, место трансплантации), но факт существования подобной интеграции в настоящий момент уже не вызывает сомнения. В экспериментах на лабораторных животных были получены данные, свидетельствующие о том, что нейроны трансплантата могут проецировать свои аксоны в окружающую ткань мозга реципиента. После нейротрансплантации наблюдается реиннервация мозга реципиента с устойчивым выделением медиаторов на физиологическом уровне. При этом аксоны нейронов мозга хозяина образуют неспецифические и специфические связи с нейротрансплантатом. Между нейронами трансплантата и мозга реципиента образуются синапсы, устанавливается реципрокная иннервация и интеграция трансплантата с мозгом хозяина, образуются химерные нейронные сети. Существенным недостатком трансплантации нервной ткани является низкий процент успешного приживления (Campbell K. et al., 1995; Ebrahimi-Gaillard A. et al., 1995).

Влияние трансплантата на мозг реципиента осуществляется за счет:

- 1) острого влияния на поврежденный мозг цитокинов трансплантата;
- 2) хронического диффузного выделения нейрогормонов или нейротрансмиттеров в нейропиль реципиента;
- 3) реиннервации мозга реципиента со стабильным выделением медиаторов на физиологическом уровне;
- 4) использования трансплантата в качестве матрикса для прорастания нейронов, соединяющих разобщенные участки поврежденного мозга;
- 5) реципрокной иннервации и интеграции трансплантата с мозгом реципиента.

При этом возможно сочетание всех или нескольких механизмов воздействия трансплантата. Кроме того, введение фетальных клеток в организм взрослой особи, вероятно, активизирует специализированные и прогениторные клетки (Olson L., 1990; Messersmith D.T. et al., 1991).

По нашим данным, внутримозговая алло- и ксенотрансплантация фетальной нервной ткани у экспериментальных животных с аудиогенными судорожными параксизмами (крысы Крушинского-Молодкиной) уменьшает реактивный глиоз, сохраняет численную плотность нейронов, увеличивает количество функционально активных капилляров, активизирует неосинаптогенез, предупреждает гипертрофию и гиперактивность синапсов и повышение судорожной активности мозга, нормализует функции головного мозга (Ерениев С.И. и др., 1993, 1994, 2005; Семченко В.В. и др., 2014).

Аналогичным действием обладают субарахноидальная инъекция суспензии фетальных тканей. Ее положительное влияние обусловлено тем, что нейротрофические факторы, нейромедиаторы и ферменты незрелых тканей, могут переноситься с током крови, ретроградно транспортироваться в тела нейронов реципиента, стимулировать различные отделы мозга, ускорять резорбцию продуктов аутолиза в контузионных очагах и восстанавливать функцию головного мозга. Кроме того, в отличие от кусочков ткани, суспензия клеток обладает низкой иммуногенностью, значительно меньше повреждает ткань и гистогематические барьеры мозга реципиента, вызывает менее выраженную реакцию нейроглиальных клеток. Поэтому субарахноидальная инъекция суспензии фетальной ткани по эффекту не уступает нейрохирургической стереотаксической внутримозговой нейротрансплантации (Ерениев С.И. и др., 1993, 1994, 2005; Vinogradova O.S., 1990).

Нейротрансплантация оказывает существенное положительное влияние на морфофункциональные проявления синаптической пластичности (Ерениев С.И., 1997; Семченко В.В. и др., 2008; Ereniev S.I. et al., 1992), которая зависит от многих эндо- и экзоцеребральных факторов, очень чувствительна к изменениям регуляторного континуума поврежденного головного мозга (Calabresi P. et al., 2003; Carulli D. et al., 2004 и др.) и содержанию

нейротрофических факторов (Reier P.J., 2004 и др.). Обусловленная нейротрансплантацией активация механизмов репаративной синаптической пластичности и последующее восстановление межнейронных отношений, обеспечивая частичную нормализацию интегративно-пусковой деятельности нейронных сетей поврежденного мозга, снижает порог его судорожной готовности у животных, перенесших аудиогенные судорожные пароксизмы (Семченко В.В. и др., 2008).

Таким образом, результатом нейротрансплантации является нормализация интегративной функции поврежденного головного мозга и снижение вероятности образования гиперактивных патологических систем за счет восстановления поврежденных нейронов и реорганизации межнейронных взаимоотношений (Ерениев С.И., 1997).

Так, билатеральная интрагиппокампальная аллотрансплантация эмбриональной нервной ткани удлиняла период сохранения энграммы долговременной памяти и облегчала выработку условной реакции пассивного избегания у крыс с судорожными пароксизмами (Ерениев С.И. и др., 1993).

Характер, выраженность и длительность влияния внутримозговой алло- и ксенотрансплантации эмбриональной нервной ткани на структурно-функциональное состояние головного мозга, порог судорожной готовности мозга, показатели ВНД, зависят от причины повышения судорожной готовности мозга (генетически детерминированная, очаговая и диффузная нейротравма, клиническая смерть, нейросенсибилизация, kindling-эпилепсия), характера, топике и объема повреждения мозга, преимущественной нейромедиаторной (адренергическая, холинергическая, серотонинергическая, ГАМК-ергическая) специфичности взятой для трансплантации структуры эмбрионального мозга, от сроков нейротрансплантации после повреждения мозга, от сроков внутриутробного развития донора эмбриональной нервной ткани, от места введения трансплантата в головной мозг, от генетической совместимости донора и реципиента (Ерениев С.И. и др., 1993, 1994).

Подавление эпилептиформных пароксизмов при kindling-эпилепсии после трансплантации ЭНТ синего пятна в гиппокамп объясняют вращением норадренергических волокон и увеличением уровня норадреналина в гиппокампе (Lindvall O. et al., 1988; Wanscher B. et al., 1990), активацией постсинаптических α_2 -адренорецепторов (Bengzon J. et al., 1990), при трансплантации эм-

бриональных нейронов ядер шва – нормализацией поступления серотонина в гиппокамп (Camu W. et al., 1990; Richter-levin G. et al., 1990), при трансплантации клеток базальных отделов переднего мозга – прорастанием ацетилхолинэстераза-положительных волокон в неокортекс реципиента (Vanderwolf C.H. et al., 1990).

Снижение судорожной готовности мозга при трансплантации ЭНТ коррелирует с уменьшением выраженности дистрофических и некробиотических изменений нейронов, глиоцитов, кровеносных сосудов, реактивного глиоза, сохранением численной плотности синапсов в молекулярном слое коры большого мозга, предупреждением гипертрофии и усложнения пространственной организации синапсов и дендритных шипиков, активацией синаптогенеза (Ерениев С.И. и др., 1993, 1994; Семченко В.В. и др., 2014).

Влияние трансплантации эмбриональной нервной ткани на структурно-функциональное состояние головного мозга реципиента, на долговременную память и способность к обучению, вероятно, связано с нейротрофическим и нейромедиаторным действием нейротрансплантата (Полежаев Л.В., и др., 1993; Victorov I.V. et al., 1990; Lyjin A.A. et al., 1991), снижением перекисного окисления липидов в тканях мозга (Гуляева Н.В., 1988), установлением межнейронных связей нейронов трансплантата с мозгом реципиента (Александрова М.А., 1984), реконструкцией поврежденных межнейронных связей (Виноградова О.С., 1984).

Кроме того, внутримозговая гомо- и гетеротопическая аллотрансплантация эмбриональной нервной ткани у крыс линии Крушинского-Молодкиной, с генотипически детерминированным низким порогом судорожной активности мозга, снижает интенсивность перекисного окисления липидов в нервной ткани (Ерениев С.И., 1992; Батурин Е.В. и др., 1994; Ерениев С.И. и др., 1994), уменьшает выраженность аутоиммунных реакций мозгоспецифической направленности (Ерениев С.И. и др., 1995).

К настоящему времени получены данные, свидетельствующие о наличии скрытого резерва обновления соматических клеток в постнатальном онтогенезе, благодаря поддержанию пула стволовых клеток – родоначальниц различных линий клеточной дифференцировки (Репин В.С. и др., 2002; Егоров В.В. и др., 2003; Шахов В.П. и др., 2004). Нейральные стволовые и прогениторные клетки выявлены в субэпендимной зоне, зубчатой извилине гиппокампа,

обонятельной луковице головного мозга (Ritzke R.L. et al., 2001). Поэтому в последнее время широко обсуждается роль стволовых клеток донора и реципиента в поддержании структурного гомеостаза поврежденного головного мозга и феномене нейро-, синаптогенеза (Taupin P. et al., 2002).

Убедительно показано, что: 1) нейро- и глиогенез продолжают на протяжении всей жизни организма, 2) мультипотентные стволовые клетки выявляются в зрелом мозге, 3) нейротрофические и ростовые факторы являются ведущими элементами нишеобразующей среды и позволяют избирательно контролировать процесс нейрогенеза головного и спинного мозга через различные виды тирозинкиназных рецепторов, 4) нейрогенез и последующие этапы дифференцировки нейральных стволовых клеток могут быть стимулированы в рамках компенсаторно-адаптивной реакции токсическими, ишемическими и травматическими влияниями на мозг (Гомазков О.А., 2006).

Локализация незрелых клеток частично объясняет более выраженную эффективность трансплантации эмбриональной нервной ткани гиппокампа и паравентрикулярных (субэпендимных зон) областей мозга, полученную в наших экспериментальных исследованиях.

Имеются отдельные публикации, свидетельствующие о возможности эффективного использования нейротрансплантации эмбриональной ткани мозга для лечения больных эпилепсией в клинике (Акимова И.М. и др., 2001).

Имплантация эмбриональной нервной ткани проводилась с согласия больных или их родителей (если пациентами были дети). С 1996 по 1999 г. она была произведена 33 пациентам (17 женского и 16 мужского пола) в возрасте от 2 до 58 лет. Все они страдали разными формами эпилепсии и судорожными синдромами при органических поражениях головного мозга. Трансплантировали нервную ткань зачатков головного и спинного мозга 5-10-недельных эмбрионов человека, полученных во время легальных аборт. Имплантат вводили подкожно в область передней брюшной стенки.

Для имплантации отбирали терапевтически резистентных к медикаментозному лечению больных с длительными сроками заболевания и различными формами психических нарушений - аффективными расстройствами, нарушениями мышления, дефицитом

внимания, выраженным снижением интеллекта, гипервозбудимостью, расстройствами влечений.

Длительность послеоперационного наблюдения составляла от 8 месяцев до 3 лет. Авторы показали, что после трансплантации приступы эпилепсии не повторялись у 12 пациентов, а в 3 случаях наблюдалось значительное снижение частоты приступов и изменение их характера. Отмечено улучшение когнитивных функций, исследованных в процессе нейропсихологического обследования, уменьшение патологических неврологических проявлений, в том числе – снижение выраженности мозжечковых нарушений, пирамидной и экстрапирамидной симптоматики. Улучшение в речевой сфере и в области ручной моторики отмечали в 100% случаев. Выраженность синдрома психомоторной расторможенности уменьшилась у всех больных, полностью исчезли дистрофические состояния. Трансплантация повышала эффективность фармакотерапии, стабилизируя и удлиняя медикаментозную ремиссию.

Изменения на ЭЭГ были неоднородными, но всегда положительными. Во всех случаях имела место постепенная нормализация амплитуды биоэлектрической активности, сокращение эпилептиформной активности, уменьшение количества генерализованных вспышек и нормализация альфа-ритма. Такой эффект действия трансплантации наблюдали у больных с исходно отчетливо измененной биоэлектрической активностью, с выраженной пароксизмальной активностью, но с относительно сохранным альфа-ритмом, перемежающимся с острыми колебаниями. У больных отмечалось выраженное сокращение или полное прекращение припадков.

3.9. Астенический бульбарный паралич

Астенический бульбарный паралич – редкое нейромышечное аутоиммунное заболевание, при котором нарушается проведение нервных импульсов к мышцам, в результате чего мышцы не могут сокращаться. Симптомы нарастают постепенно, больным становится трудно ходить и выполнять обычные действия. Особенные страдания причиняет больным нарушение функции дыхательной мускулатуры.

Специалистам San Diego Medical Center удается облегчить состояние пациентов с астеническим бульбарным параличом при помощи трансплантации стволовых клеток костного мозга. Метод включает в себя химиотерапию, при которой уничтожаются агрессивные аутоиммунные клетки, и восстановление кровеносной и иммунной системы при помощи реимплантации очищенных стволовых клеток.

В настоящее время больные астеническим бульбарным параличом вынуждены раз в несколько дней проходить процедуры плазмафереза, несколько облегчающие их состояние. Однако эти процедуры не могут остановить прогрессирование заболевания.

Метод до 2007 г. применялся в США трижды, в чикагском Northwestern University Hospital. У пациентов предварительно выделяли стволовые клетки костного мозга и очищали их. После курса химиотерапии сохраненные стволовые клетки (около 8 млн.) возвращали пациенту. Трансплантированные клетки заново заселяли костный мозг и давали начало новым здоровым иммунным клеткам. Восстановление иммунной системы занимало около 3 месяцев; все это время пациентам вводили антибиотики, чтобы защитить их от возможных инфекций.

Кроме восстановления кроветворной системы стволовые клетки, возможно, восстанавливают и другие поврежденные ткани. Например, после лечения у пациентов восстанавливалась чувствительность в конечностях, таким образом, облегчалась периферическая полинейропатия (Medical News Today; University of California - San Diego; www.medlinks.ru).

Глава 4

КЛЕТОЧНЫЕ И ГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ИЗУЧЕНИИ ПАТОГЕНЕТИКИ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНЫХ РАССТРОЙСТВ

Умственная отсталость остается актуальной проблемой для современной медицины и общества. Это группа чрезвычайно гетерогенных состояний, проявляющихся в возрасте до 18 лет и характеризующихся снижением интеллекта (IQ ниже 70), нарушениями адаптивного и социального поведения ребенка, обусловленными недостаточным развитием его познавательных способностей. Частота интеллектуальных нарушений в популяции составляет 1-3%. Умственная отсталость может присутствовать у пациента как единственный изолированный клинический признак. В таком случае речь идет о несиндромальной форме умственной отсталости. Если же она встречается в сочетании с другими нарушениями развития, то говорят о синдромальной форме.

Причины развития умственной отсталости достаточно разнообразны, и включают в себя как наследственные, так и средовые факторы. Анализируя структуру генетической компоненты интеллектуальных нарушений, можно отметить, что она представлена, главным образом, различными вариантами хромосомных аномалий, моногенных мутаций, а также aberrантных эпигенетических модификаций хроматина. Хромосомные аномалии, такие как анеуплоидия, микроделеции, микродупликации и транслокации, встречаются примерно у 30-35% пациентов, особенно в случае синдромальных форм.

В последние годы с развитием биочиповых технологий и методов секвенирования генома в генетике достигнут заметный прогресс в идентификации новых наследственных синдромов, приводящих к развитию умственной отсталости (Slavotinek A.M., 2008; Najmabadi H. et al., 2011). Однако, заявлять о полной расшифровке генетической структуры интеллектуальных нарушений, пока еще преждевременно. И на это есть ряд оснований. Во-первых, большинство выявляемых моногенных или хромосомных нарушений у пациентов с недифференцированной умственной отсталостью диагностируется, как правило, в единичных случаях. Соответственно, пока еще не достаточно ни клинических, ни генетических данных

для интерпретации патогенетической значимости детектируемых мутаций. Во-вторых, число генов, задействованных в функционировании центральной нервной системы, по-видимому, настолько велико (а по некоторым оценкам, до 80% генов человека экспрессируется в мозге), что в определении генетической компоненты интеллектуальных нарушений в обозримом будущем еще сохранится довольно значительная неопределенность. По существу, недифференцированная умственная отсталость, являясь довольно распространенной в популяции, остается для каждого конкретного пациента орфанным заболеванием, требующим персонифицированного подхода, по крайней мере, к дифференциальной диагностике, а в перспективе, возможно, и к терапевтической коррекции. Комбинация современных геномных и клеточных технологий в некоторой степени позволяет решить поставленную задачу такого персонифицированного подхода. Рассмотрим в настоящей главе, какие возможности могут быть реализованы, по крайней мере, в отношении умственной отсталости, как одного из распространенных проявлений хромосомных болезней.

Хромосомные болезни занимают одно из ведущих мест в структуре врожденной и наследственной патологии человека. Они обусловлены числовыми и структурными нарушениями хромосом, большинство из которых приводят к летальным эффектам. Остальные же мутации оказываются совместимыми с постнатальным развитием организма и ведут к хромосомным болезням. Данная категория заболеваний имеет выраженный медицинский и социальный аспект, проявляясь тяжелыми инвалидизирующими состояниями, нарушениями физического и интеллектуального развития, онкологической патологией, бесплодием и невынашиванием беременности. Так, например, 15-20% беременностей спонтанно прерывается в течение первого триместра, при этом в половине случаев причиной внутриутробной остановки развития и гибели плода являются хромосомные аномалии. Другой пример связан именно с умственной отсталостью. Даже ранние цитогенетические оценки показали, что на долю хромосомных мутаций в структуре причин интеллектуальных нарушений в детском возрасте приходится до 18% (Cunyu S.J. et al., 1997).

Учитывая сложность клинической картины заболеваний, обусловленных хромосомными аномалиями, и фактическое отсутствие

терапевтических решений, принципиальное значение имеет профилактика хромосомных болезней. Современные технологии пренатальной, а в последнее время и преимплантационной генетической диагностики действительно внесли заметный вклад в профилактику хромосомных болезней через элиминацию плодов с аномалиями кариотипа на ранних сроках беременности, либо даже вовсе до ее наступления. Так, появление высокоразрешающих методов анализа кариотипа (в частности, матричной сравнительной геномной гибридизации – агау-CGH) позволило выявить довольно широкий спектр новых хромосомных синдромов, обусловленных микроструктурными аберрациями хромосом (микроудупликациями, микроделециями), размером, как правило, не превышающим 5 миллионов пар оснований (5 Mb), а поэтому неразличимыми при использовании стандартных диагностических тестов в клинической цитогенетике. Только за последние несколько лет список таких микроделеционных и микроудупликационных синдромов приблизился к 300 различным нозологическим формам (Visser L.E., Stankiewicz P., 2012) и продолжается ежегодно стремительно пополняться. Большинство из этих синдромов сопровождается классической клинической симптоматикой хромосомных болезней, а именно умственной отсталостью, нарушениями физического развития, лицевыми дисморфиями, множественными врожденными пороками развития и пороками внутренних органов.

Однако, по всей видимости, именно эта категория микроструктурных мутаций открывает новые перспективы в изучении патогенеза хромосомных болезней человека на клеточном и молекулярном уровне. В общих чертах, причиной формирования патологического фенотипа при хромосомных заболеваниях традиционно считается дисбаланс одновременно по большому числу генов, возникающий вследствие анеуплоидии по целой хромосоме или по какому-то из ее участков. Такой взгляд, а по сути, действительно, реальная непредсказуемость клинического проявления изменчивости по числу копий крупных участков генома, оставляла и оставляет открытым вопрос о ключевых пусковых механизмах формирования патологического процесса при хромосомных болезнях. Эта проблема остается, пожалуй, одной из центральных в цитогенетике онтогенеза, а может быть является и частью более общей генетической проблемы гено-фенотипических корреляций.

Основные положения концепции фенотипического проявления хромосомного дисбаланса в рамках гипотезы так называемого «клеточного синдрома», предложенной отечественным цитогенетиком К.Н. Гринбергом, могут быть сформулированы следующим образом (по Гринберг К.Н., Кухаренко В.И., 2013):

1. Изменения в числе хромосом, кроме специфических эффектов, связанных с дозой локализованных в данной хромосоме генов, сопровождаются неспецифическим эффектом, проявляющимся в угнетении роста и развития организма.

2. Пороки развития, наблюдаемые у человека при хромосомных аномалиях, представляют собой персистирующие образования, являющиеся нормальной стадией на более ранних этапах развития. Основные эффекты хромосомных аномалий являются гипоморфными. Вместе с тем эти пороки развития фактически не отличаются от пороков развития, вызванных отдельными генами и тератогенными факторами внешней среды.

3. В основе патогенеза фенотипического проявления хромосомного дисбаланса могут лежать нарушения основных и элементарных событий морфогенеза, происходящие на клеточном уровне. Такими событиями являются пролиферация клеток, миграция, специфическая рецепция и индукционные взаимоотношения.

4. Предполагается, что изменения метаболического гомеостаза в клетках с аномальным кариотипом способствуют проявлению скрытой изменчивости структур, обеспечивающих основные морфогенетические функции клеток. Хромосомные аномалии усиливают эволюционно обусловленную изменчивость в сторону замедления созревания клеточных и тканевых структур, что и является основным звеном патогенеза хромосомного дисбаланса.

Очевидно, что сформулированные в 70-х годах прошлого столетия положения, до сих пор представляются актуальными, в том числе и для объяснения патогенеза умственной отсталости, обусловленной хромосомным дисбалансом.

Микроделеционные и микродупликационные синдромы в этом отношении представляют особый интерес, поскольку, с одной стороны, они являются классическими примерами хромосомных заболеваний. С другой стороны, несмотря на то, что большинство таких болезней является смежными генными синдромами, обусловленными гаплонедостаточностью (или, напротив, гаплоизбыточно-

стью) определенного набора генов в регионе мутации, для некоторых из заболеваний все же удалось сузить круг кандидатных генов, ответственных за формирование основной клинической картины, до нескольких или в редких случаях даже до одного гена. Так, например, кандидатными генами для микроделеционного синдрома Потоки-Шаффер (del11p11.2) в настоящее время рассматриваются *EXT2* и *ALX4*, для ассоциации CHARGE (del8q12) – *CHD7*, а для синдромов Смит-Магенис и Потоки-Лупски (реципрокные микроделеции и микродупликации 17p11.2, соответственно) – *RAI1* (Visser et al., 2010). Последний пример привлекает особое внимание, поскольку изменение копийности одного гена в том или ином направлении (гаплонедостаточность вследствие микроделеции и гаплоизбыточность вследствие микродупликации) приводит к формированию двух клинически различных фенотипов. Такие варианты хромосомных болезней, многие из которых открыты сравнительно недавно, благодаря интенсивному использованию aCGH-технологии, предложено называть синдромами реципрокных микроделений и микродупликаций (Кашеварова А.А. и др., 2014). По своему клиническому проявлению они могут быть классифицированы на 4 основные категории:

1. С зеркальными фенотипами, когда микроделеции и микродупликации одного и того же хромосомного сегмента имеют противоположные клинические эффекты. Например, микроцефалия при дистальной микроделеции 1q21.1 и макроцефалия при микродупликации того же самого хромосомного субсегмента. Другой интересный обратный пример – макроцефалия при микроделеции 16p11.2, но микроцефалия при микродупликации 16p11.2. Очевидно, что наблюдаемые в данных случаях полярные проявления признака (микро- и макроцефалия) определяются генным составом хромосомных субсегментов, затронутых микроструктурными перестройками.

2. С идентичными фенотипами при микроделеции и микродупликации. Например, та же микроцефалия встречается у пациентов как с микроделециями 3q29, так и микродупликациями этого хромосомного сегмента. Дистальные микроделеции и микродупликации 22q11.2 одинаково сопровождаются глубоко посаженными глазами, готическим нёбом, микрогнатией и ретрогнатией, острым подбородком, отставанием в росте, задержкой развития речи.

3. С частично перекрывающимися клиническими признаками. Например, задержка развития, ретрогнатия и расщелина нёба встречаются у пациентов как с проксимальными, так и с дистальными микроделециями 22q11.2, выделенными в самостоятельные синдромы.

4. С уникальными неперекрывающимися фенотипами. Например, эпилепсия встречается у пациентов с микроделециями 16p11.2, но не описана при микродупликациях этого хромосомного субсегмента.

Существование категории дозо-зависимых генов в геноме человека, равно как и некоторые эволюционные особенности его организации, а именно наличие крупных блоков сегментных дупликаций, предрасполагающих к возникновению микроделций или микродупликаций путем неаллельной гомологичной рекомбинации, делают микроделеционные/микродупликационные синдромы, и особенно их реципрокные варианты, уникальной модельной системой для изучения патогенеза хромосомных болезней человека.

В крупном международном проекте, посвященном изучению генетики недифференцированной умственной отсталости, при поддержке гранта 7 Рамочной программы Евросоюза по теме «Улучшение диагностики умственной отсталости у детей в Центральной Восточной Европе и Центральной Азии через генетическую характеристику, биоинформатику и статистику» (CHERISH), соглашение о гранте № 223692) при непосредственном участии Научно-исследовательского института медицинской генетики (г. Томск), было обследовано 1457 пациентов с умственной отсталостью (Lebedev I.N. et al., 2013). С помощью матричной сравнительной геномной гибридизации, проведенной на базе 3 центров – Университета г. Болонья (Италия), Университета г. Тарту (Эстония) и НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск, Россия), был обследован кариотип 378 пациентов. Диагностированы как несколько уже известных в литературе микроделеционных/микродупликационных синдромов (del15q24, del16p11.2, del16p12.2, del22q11.2) (Кашеvarова А.А. и др., 2013), так и ряд новых, не описанных ранее хромосомных аберраций (Kashevarova A.A. et al., 2014), в том числе и реципрокных микроструктурных перестроек. Среди них особый интерес представляют два пациента, у одного из которых была обнаружена микроделеция (295 тысяч пар нуклеотидов, kb), а у дру-

гого микродупликация (766 kb) в одном и том же хромосомном субсегменте 3p26.3. Обе аберрации затрагивали единственный ген – *CNTN6*, мутации в котором ранее не были описаны в отношении формирования умственной отсталости. Вместе с тем, продукт гена белок контактин 6 является нейрональным мембранным протеином, вовлеченным в формирование аксонных взаимодействий при развитии центральной нервной системы, и может таким образом рассматриваться в качестве одного из кандидатных генов, повреждения которого ассоциированы с развитием интеллектуальных нарушений. Более того, мутации генов семейства контактинов, включая *CNTN6* и *CNTN4*, расположенного следом в том же самом хромосомном субсегменте, рассматриваются в настоящее время среди кандидатных факторов формирования расстройств аутистического спектра.

Кроме слабой и умеренной умственной отсталости (IQ 55 в случае микроделеции и IQ 47 в случае микродупликации) у обоих пациентов описан комплекс частично различающихся дисморфических, неврологических и поведенческих признаков, свидетельствующих о возможном открытии нового синдрома реципрокных микроделеций и микродупликаций. Однако, такое предположение может быть подтверждено только в случае обнаружения новых пациентов с аналогичными мутациями и сходной клинической картиной. Проведенный нами дальнейший анализ с целью установления происхождения хромосомных аномалий, показал, что у пациента с микроделецией 3q26.3 имеется сестра с более тяжелой степенью умственной отсталости, агрессивным, конфликтным поведением, рядом дисморфических признаков. Результаты исследования копийности участка 3q26.3, проведенного с помощью количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, указали на уменьшение числа копий ДНК в анализируемом регионе, свидетельствуя о возможном носительстве микроделеции. Последующий анализ с помощью высокоразрешающей aCGH показал, что сестра имеет абсолютно идентичную по локализации и протяженности микроделецию, что и ее больной брат. Оба ребенка воспитываются в детском доме, мать умерла, отец лишен родительских прав и не доступен для анализа происхождения мутации. Тем не менее, наличие семейного случая носительства редкой хромосомной перестройки, затрагивающей единственный ген, представляет несомненный интерес. Этот интерес

затрагивает, в том числе, и вопрос о происхождении мутации. Наличие абсолютно идентичной мутации у двух сибсов с высокой степенью вероятности указывает на возможное ее наследование от одного из родителей, к сожалению не доступных для проведения молекулярно-генетического исследования.

Однако, весьма интересно, что некоторые особенности наследования дефекта гена *CNTN6* удалось установить во второй, неродственной семье с пациентом, имеющим микродупликацию 3p26.3. Как оказалось, микродупликация у ребенка с умственной отсталостью была унаследована от клинически здорового отца и соответственно от бабушки по отцовской линии. Наличие здоровых индивидов с носительством микродупликации поднимает вопрос о неполной пенетрантности данной мутации.

В то же время, механизм наследования мутации указывает на возможный импринтированный статус гена *CNTN6* и его экспрессию с хромосомы отцовского происхождения. Действительно, в таком случае, бабушка могла передать хромосому с мутацией сыну без каких либо клинических последствий, т.к. ген не активен на хромосоме материнского происхождения. Но при передаче от отца к сыну (соответственно к внуку от рассмотренной бабушки), мутация будет проявляться. В литературе не обнаружено прямых данных об импринтинге гена *CNTN6*, хотя феномен геномного импринтинга в центральной нервной системе и его связь с наследственными синдромами (Прадера-Вилли, Энгельмана), проявляющимися интеллектуальными нарушениями, хорошо документирована. Вместе с тем, обращают на себя внимание сообщения о двух родословных, в которых на протяжении двух (Van Esch H. et al., 2009) или даже четырех поколений (Moghadasi S. et al., 2014) было продемонстрировано бессимптомное наследование микродупликации 3p26.3 по материнской линии, что косвенно может указывать на импринтированный статус данной хромосомной области. Выявлена же эта перестройка была изначально только у пациентов с клинической манифестацией, имеющих дополнительные хромосомные аномалии в кариотипе – микроделецию 15q24, обуславливающую недавно описанный одноименный микроделеционный синдром, и микродупликацию 6q16.3, соответственно.

Таким образом, описанные нами пациенты представляют несомненный интерес для изучения роли гена *CNTN6* в патогенезе

умственной отсталости. Здесь же следует отметить, что традиционно диагностика хромосомных мутаций проводится с использованием лимфоцитов периферической крови, которые являясь прекрасной и удобной системой для решения диагностических задач, оказываются абсолютно неинформативными для анализа патогенетических механизмов нарушения развития различных систем органов при хромосомных aberrациях. Долгое время это обстоятельство оставалась непреодолимым, однако с разработкой технологии получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSCs, ИПСК) (Takahashi K. et al., 2007), отмеченной Нобелевской премией по физиологии и медицине 2012 года, появилась принципиальная возможность создания линий пациент-специфичных стволовых клеток с их последующей направленной дифференцировкой практически в любой интересующей исследователя тип клеток – нейрональные, мышечные, эпителиальные и др.

На конференции Американского общества генетики человека в 2012 году на примере синдрома Дауна, одного из самых распространенных хромосомных заболеваний, сопровождающегося умственной отсталостью, впервые была продемонстрирована принципиальная стратегия использования iPSCs для изучения патогенеза хромосомных болезней и даже перспектив их лекарственной терапии. От монозиготных близнецов, один из которых имел трисомию по хромосоме 21, а второй – нормальный кариотип, были получены индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Далее запускали дифференцировку этих клеток *in vitro* в нейрональном направлении. В результате было установлено, что при трисомии 21 имеется сниженное число нейропрогениторных клеток, отмечаются нарушения плотности нейронов, а также снижение пролиферативной активности клеток и увеличение апоптоза. Анализ дифференциальной экспрессии генов в культурах клеток с трисомией 21 и с нормальным кариотипом продемонстрировал гиперэкспрессию гена тирозин-киназы *DYRK1A*, локализованного в критическом регионе синдрома Дауна на хромосоме 21 (21q22.13) и рассматривающегося в качестве кандидатного гена, ассоциированного с умственной отсталостью и нарушениями обучения при данном заболевании. Оказалось, что введение в культуру клеток галлата эпигаллокатехина (EGCG, одного из основных компонентов экстракта зеленого чая), ингибирующего гиперэкспрессию *DYRK1A*, приводило к нормализации морфоло-

гических отклонений в нейронах и к снижению уровня апоптоза в клетках с трисомией 21. Сходный эффект был достигнут с помощью интерферирующих РНК. Кроме технологического решения и возможности анализа патогенетических механизмов формирования самого известного и распространенного хромосомного заболевания, данное исследование представило и пока еще выглядящими фантастическими перспективами подходы к терапевтической коррекции, по крайней мере, некоторых клинических признаков при данном синдроме. Результаты работы опубликованы в журнале *EMBO Molecular Medicine* (Hibaoui Y. et al., 2014).

Таким образом, разработка технологии получения пациент-специфичных линий ИПСК с хромосомными (а в принципе и со всеми другими типами наследственных мутаций) находится в сфере приоритетных задач современной фундаментальной медицины, генетики и клеточной биологии. Целями создания таких линий просматриваются фундаментальные исследования, направленные на изучение патогенеза наследственных заболеваний на молекулярном, клеточном и тканевом уровне, а также открывающиеся уникальные перспективы для разработки и тестирования фармакологических препаратов, способных корректировать дозу генов. Следует отметить активность и отечественных научных коллективов в этом направлении. Так, сотрудниками Института общей генетики им Н.И. Вавилова РАН, Института молекулярной генетики РАН и Научного центра неврологии РАМН были получены индуцированные плюрипотентные стволовые клетки от пациентов с болезнью Гентингтона, имеющих экспансию тринуклеотидных повторов CAG в кодирующей области гена *HTT* (Некрасов Е.Д. и др., 2012).

Возвращаясь к микроделециям и микродупликациям гена *CNTN6*, нами в сотрудничестве с коллегами из Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 14-15-00772) получены линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от пациентов с данными микроструктурными хромосомными перестройками с целью их дальнейшей дифференцировки в нейрональном направлении для изучения эффектов реципрокных хромосомных мутаций на клеточном и молекулярном уровне.

В завершении нельзя не отметить еще одно историческое событие, связанное с индуцированными плюрипотентными стволо-

выми клетками. 12 сентября 2014 года в Медицинском центре госпиталя г. Кобе (Япония) была проведена первая аутологичная трансплантация клеток ретинального пигментного эпителия, полученных из ИПСК 70-летней пациентки с возрастной макулярной дегенерацией, приводящей к стойкой и необратимой утрате зрения (Cyranoski D., Nature News, 2014). Автору работы – офтальмологу Masayo Takahashi в альянсе с Нобелевским лауреатом S. Yamanaka удалось получить клетки ретинального пигментного эпителия из ИПСК, репрограммированных, в свою очередь, из фибробластов кожи пациентки. Сообщается, что операция по трансплантации фрагмента эпителия размером $1,3 \times 2,0$ мм была проведена в течение 2 часов тремя офтальмологами под руководством доктора Yasuo Kurimoto. Научная и медицинская общественность с вниманием следит за результатами этой трансплантации. То, что еще десятилетие назад считалось научной фантастикой теперь входит в нашу жизнь.

Данная глава подготовлена доктором биологических наук И.Н. Лебедевым и её издание осуществлено за счет средств гранта Российского научного фонда № 14-15-00772.

Глава 5

ПСИХИЧЕСКИЕ РАССТРОЙСТВА И РАССТРОЙСТВА ПОВЕДЕНИЯ

При описании эффектов нейротрансплантации основное внимание уделяется динамике неврологических симптомов, практически «не замечая» изменений различных психических функций. В то же время известно, что даже незначительные изменения нейрохимических взаимодействий мозга и тем более любые нейроморфологические изменения влекут за собой изменения (чаще патологические) тех или иных психических функций (Галанин И.В. и др., 2007).

5.1. Трансплантация аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при медикаментозно- резистентных психических заболеваниях

Несмотря на появление новых, всё более совершенных психотропных препаратов, процент больных, остающихся резистентными к терапии сохраняется высоким (до 30%). Ситуация принципиально не меняется с 60-х годов прошлого века, времени появления первых антидепрессантов и нейролептиков. При этом у значительной части психических расстройств, встречающихся при нейродегенеративных заболеваниях мозга, выраженных формах умственной отсталости, обсессивно-компульсивных расстройствах, затяжных депрессивных состояниях и ряда других заболеваний, медикаментозная терапия ещё менее эффективна.

Одним из способов решения этой проблемы является применение принципиально новых методов лечения таких больных и, в частности, лечения резистентных больных с помощью методик клеточной терапии. Эти бурно развивающиеся методы уже завоевали твёрдые позиции в различных областях медицины.

Авторы исследовали влияние нейротрансплантации на психические и социально-бытовые функции больных, страдающих выраженными формами умственной отсталости (идиотия и имбецильность). Одной из клинических особенностей этого состояния, считается его необратимость. В качестве трансплантата использовались аутологичные ММСК с фенотипом CD34-, CD45-, CD44+,

CD90+, CD 105+, CD106+. Введение аутологичных ММСК проводилась как эндоваскулярно, так и интрапаренхиматозно в сочетании с системным применением. При интрапаренхиматозном методе аутологичные ММСК интегрировались в специальный стент, который помещался в заранее определённые, функционально ответственные участки коры головного мозга с учетом данных комплексного обследования больных и применением методов нейровизуализации (МРКТ, ПЭТ).

В исследование вошли 8 больных в возрасте от 5 до 23 лет. Все больные были инвалидами. Многочисленные госпитализации и постоянный прием лекарств не оказывал на их состояние видимого эффекта. После трансплантации МСК у больных наблюдалось отчетливое улучшение, в первую очередь в изменении уровня социально-бытовой адаптации, для оценки которого авторами применялась модифицированная методика «Социограмма» по Х.С. Грингеру (форма РАС – S/P). Она отражает уровень развития основных бытовых навыков, самообслуживания, восприятия и речи.

За первые 6 месяцев, прошедшие после трансплантации ММСК, изменения в результатах этих тестов демонстрировали отчетливую положительную динамику ($p < 0,02$). Такие же результаты были получены по данным ПЭТ. Помимо этого, сформировались позитивные изменения в клиническом состоянии больных: исчезла неадекватность эмоций, появилась осмысленность в играх, элементы самообслуживания, появились признаки способности к обучаемости. Несмотря на относительно небольшую длительность наблюдения за этими больными, динамика развития положительных изменений позволяет говорить о выраженном позитивном эффекте у ранее безнадежных больных.

Эти изменения заставляют пересмотреть устоявшиеся представления об умственной отсталости, как о «конечном, застывшем» состоянии.

Помимо выше описанных больных, авторы применяли ауто-ММСК при синдроме хронического висцерального галлюциноза, психоорганическом синдроме. Во всех случаях был получен положительный эффект. Полученные результаты позволяют говорить о выраженной положительной динамике, зафиксированной у исследуемых больных после применения аутологичных ММСК (Галанин И.В. и др., 2007).

5.2. Трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток для коррекции ориентировочно-исследовательского дефицита

Повреждение сенсомоторной коры головного мозга неизбежно приводит к нарушению поведенческого и неврологического статуса. Высокая степень инвалидизации после черепно-мозговых травм, особенно среди мужчин моложе 35 лет, требует интенсивной разработки новых методов лечения и реабилитации. Ранее было показано, что клеточная терапия ишемического инсульта головного мозга с помощью ММСК приводила к практически полному восстановлению поведения животных примерно через 4 недели (Соколова И.Б. и др., 2008) и к частичному улучшению неврологического статуса к этому же сроку после травмы (Mahmood A. et al., 2001; Bhang S. et al., 2007). Трансплантация ММСК после инсульта стимулировала ангиогенез в ткани, пограничной с областью ишемии, оказывала нейропротекторное воздействие, активировала эндогенные репаративные процессы, уменьшала объем повреждения (Соколова И. Б. и др., 2007).

Для изучения влияния внутривенной трансплантации аллогенных ММСК на ориентировочно-исследовательское поведение крыс после повреждения сенсомоторной коры авторы (Соколова И.Б. и др., 2009) провели эксперименты на нелинейных половозрелых крысах-самках (n=110) массой тела 250-300 г.

Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище.

Костный мозг выделяли из диафизов бедренных костей животных сразу после декапитации. КМ высевали на пластиковые чашки Петри, отмыв через 48 ч после эксплантации от форменных элементов крови с помощью раствора фосфатного буфера, культивировали ММСК в монослое при +37°C и 5% CO₂ в течение 6-7 суток. Замену питательной среды проводили через каждые 3 суток.

Фенотипирование ММСК крыс проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре Epics XL. ММСК инкубировали с антителами против маркера CD45 и антителами против маркеров CD90, CD10B. Фенотипирование проводили после первого, второго и третьего пересева культуры.

Окрашивание ММСК флуорохромом РКН2Б проводили после третьего пересева культуры. Эффективность окрашивания ММСК оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMRX.

Крыс наркотизировали золетилом (Zoletil 100, Франция) (30 мкл раствора) интраперитонеально. С помощью бормашины в теменной кости высверливали отверстие диаметром 3 мм, удаляли твердую мозговую оболочку. Специальной ложечкой отбирали 1 мм³ сенсомоторной коры головного мозга в задне-лобной области сенсомоторной коры (от брегмы -1,0-1,5). Кожную рану ушивали.

Поведение животных в тесте «открытое поле» изучали за несколько дней до нанесения мозговой травмы и через 2 и 4 недели после операции: эмоциональное состояние – по актам «груминг», «движение на месте», «вертикальные стойки»; локомоторное поведение — по актам «локомоция», «сидит», «движение на месте». Для регистрации длительности и последовательности всех актов поведения, демонстрируемых животными, использовали оригинальную программу «open field» для IBM PC, разработанную Е.С.Петровым и В.В.Шабаетым (1990).

Выведение животных из эксперимента было проведено через 1, 2 и 4 недели после нанесения травмы. Под наркозом по 11 крыс из каждой группы подвергли паравитальной фиксации – перфузии через левый желудочек сердца 4% раствором параформальдегида в фосфатного буфера со скоростью 3 мл/мин. Животных декапитировали, извлекали головной мозг и вырезали сегмент, включающий видимую зону повреждения и интактные краевые зоны. 8 образцов мозга из каждой группы фиксировали по стандартной методике в параформальдегиде, а 3 – криофиксировали. Перед криофиксацией фиксированные сегменты ткани мозга помещали в раствор криопротектора (сахарозы) на 1 суток. Затем их охлаждали в парах азота в течение 10 с, погружали в жидкий азот на 1 ч и помещали в холодильную камеру с температурой -70°C.

Детекцию флуоресцентно меченных ММСК в головном мозге проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMRX на гистологических срезах толщиной 7 мкм (криофиксация), изготовленных на криостате Leica CM 1510.

С помощью иммуногистохимического анализа изучали пролиферацию клеток в субэпендимной зоне боковых желудочков головного мозга, жизнеспособность нейронов в пограничной с повре-

ждением области; активацию ангиогенеза в нервной ткани. Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием первичных антител к PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток), NeuN (маркерный белок ядер нейронов), vWF (фактор фон Виллебранда, тромбоцитарно-эндотелиальный фактор свертывания крови, синтезирующийся в эндотелиоцитах и тромбоцитах).

Количество жизнеспособных нейронов подсчитывали на препаратах после окраски антителами против NeuN в ипсилатеральном полушарии в неокортексе в пограничной с повреждением зоне через 4 недели после нанесения травмы.

Количество микрососудов подсчитывали на препаратах после окраски антителами против vWF в ипсилатеральном полушарии в неокортексе (первичная соматосенсорная кора) по границе повреждения ткани в пределах 30 мкм под микроскопом Leica DM 1000 через 4 недели после нанесения травмы.

Количество пролиферирующих клеток определяли на препаратах после окраски антителами против PCNA через 1 неделю после операции в субэпендимной зоне боковых желудочков; в глубокой части хвостатого ядра ипсилатерального полушария – через 1 и 2 недели после повреждения сенсомоторной коры.

Анализ культуры ММСК беспородных крыс методом проточной цитофлуориметрии показал, что она состояла из CD 45⁺-клеток (клеток гемопоэтического ряда) – 3% и CD90⁺-клеток (собственно ММСК) – 97%, среди которых было 15% CD 106⁺-клеток. Полученные клетки были способны дифференцироваться в остеогенном, адипоцитарном, хондрогенном и в нейрональном направлении.

При первичном поведенческом тестировании все животные продемонстрировали выраженную локомоторную и поисковую активность. Травмирование головного мозга привело к изменению индивидуального поведения животных. Через 2 недели после травмы контрольные животные (травма без инфузии ММСК) были заторможены, и исследовательская активность была значительно снижена. Применение клеточной терапии существенно улучшало поведение животных. При этом большинство показателей у животных в группе клеточной терапии соответствовало аналогичным показателям у интактных животных. Через 4 недели после операции соотношение количества ключевых актов поведения между животными контрольной группы и группы клеточной терапии было при-

мерно таким же, как через 2 недели. Кроме того, контрольные животные большую часть времени находились на одном месте (акты «движение на месте» и «сидит») или занимались грумингом, что в совокупности можно расценить как значительное снижение двигательной активности.

Исследование распределение ММСК в головном мозге криосрезов мозга животных из групп клеточной терапии с помощью флуоресцентного микроскопа показало, что меченые ММСК, трансплантированные внутривенно в день нанесения травмы, распределялись непосредственно в ткани, пограничной с зоной повреждения. Флуоресцентно меченных клеток не было выявлено ни в контрлатеральном полушарии, ни в областях ипсилатерально полушария, удаленных от мозгового дефекта.

Нанесенная минимальная травма локализовалась в неокортексе, не затрагивая другие структуры мозга.

У животных группы контроля через 1 неделю отмечена отсроченная дегенерация прилежащих к хирургической травме и не поврежденных механически глубоких слоев коры.

При иммуногистохимическом исследовании на PCNA в субэпендимной зоне ипсилатерального и контрлатерального боковых желудочков обнаружены пролиферирующие клетки.

Единичные пролиферирующие клетки выявлены в проводящих путях глубокой части хвостатого ядра ипсилатерального полушария.

Через 2 недели в ткани по границе повреждения и в глубоких слоях поврежденной коры был выявлен воспалительный инфильтрат. В проводящих путях ипсилатерального хвостатого ядра также выявлены пролиферирующие клетки.

К 4-й неделе значительная часть нервных клеток в пограничной зоне дегенерировала. Травматическая полость снаружи мозга закрыта разрастанием менингоцитов, астроцитов, фибробластов. Наружная глиальная мембрана не определялась. В поврежденной тканевой области сформировались кисты, в которых выявлено незначительное число клеток фибробластов.

У животных опытной группы (травма + инфузия ММСК) через 1 неделю в погибших участках неокортекса выявлены лейкоциты и небольшое количество макрофагов. Непосредственно в зоне некроза видны полости, что свидетельствует о начале распада ткани.

В субэпендимной зоне боковых желудочков выявлены пролиферирующие клетки. Отдельные пролиферирующие клетки были обнаружены в хвостатом ядре.

Через 2 недели в пограничной с повреждением области наблюдались, в основном, глиальные клетки (астроциты и микроглия), а также большое число мелких сосудов. В хвостатом ядре выявлены единичные пролиферирующие клетки.

Через 4 недели в коре головного мозга образовался рубец из 1-2 рядов клеток, среди которых определялись астроциты и фибробласты. В пограничной области практически все нейроны были морфологически сохранены. Выявлено большое количество сосудов. Травматическая полость снаружи мозга закрыта разрастанием менингоцитов, астроцитов, фибробластов. Наружная глиальная мембрана не определялась. В полости кист видны зернистые шары и незначительное число клеток, преимущественно фибробластов.

Удаление минимального участка сенсомоторной коры головного мозга приводило к значительному нарушению ориентировочно-исследовательского поведения животных. Примерно в 2 раза уменьшалось количество перемещений по установке «открытое поле» и исследовательских актов (обнюхивание, стойки с упором, вертикальные стойки, обследование норок). При этом значительно возрастало время, проведенное животным на одном месте – движение на месте, груминг, сидение. В течение 4 недель не произошло спонтанного восстановления поведения, наоборот, еще более значительную часть времени животные стали проводить сидя на одном месте.

Применение ММСК кардинальным образом изменило картину восстановления поведения животных после травмы. Животные в группе клеточной терапии восстановили свое двигательное и исследовательское поведение гораздо быстрее, чем в контрольной группе. Уже через 2 недели после повреждения головного мозга у животных, которым была проведена трансплантация ММСК, количество основных актов в тесте «открытое поле» было в 1,5-1,7 раза больше, чем у контрольных. Через 4 недели поведение крыс из группы клеточной терапии полностью восстановилось до уровня интактных животных, а контрольные животные оставались малоподвижными и заторможенными.

Что касается механизма влияния внутривенной трансплантации ММСК на восстановление ориентировочно-исследовательского по-

ведения животных, известно, что даже минимальное механическое повреждение коры головного мозга разрушает гематоэнцефалический барьер. Для ММСК, введенных в хвостовую вену сразу после операции, нет препятствий для проникновения в мозг. Авторы выявили флуоресцентно меченые клетки непосредственно в ткани, окружающей место повреждения. В других участках мозга флуоресцентно меченых клеток не было обнаружено. Такое же распределение ММСК, трансплантированных в вену, было зарегистрировано и в ранее проведенных работах (Mahmood A. et al., 2001, 2004).

ММСК *in vitro* выделяют большое количество факторов, стимулирующих (IL-1, IL-2, IL-B, IL-8, IL-12, GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, TNF — tumor necrosis factor), регулирующих (IL-11) и ингибирующих (IL-4, IL-10, bTGF — transforming growth factor) воспалительные процессы (Du Y. et al., 2008; Kang J. et al., 2008), активирующих ангиогенез и предотвращающих апоптоз: VEGF (vascular endothelial growth factor), BDNF (brain — derived neurotrophic factor), NGF (nerve growth factor), EGF (epidermal growth factor) и bFGF (basic fibroblast growth factor) (Chen L. et al., 2008). Вероятно, что паракринная функция ММСК имеет место и *in vivo*, когда клетки находятся в пограничной с повреждением зоне или в ткани пораженного органа. Действительно, авторы выявили, что в самом месте тканевого дефекта быстрее протекали процессы воспаления и образования рубцовой ткани. В группе клеточной терапии к 4 неделе в пограничной с повреждением области головного мозга количество микрососудов и жизнеспособных нейронов было больше, чем в контроле в 1,6 и 1,7 раза соответственно. Следовательно, внутривенная трансплантация ММСК привела к уменьшению объема отсроченной дегенерации клеток в неокортексе.

Ранее было показано, что травмирование коры головного мозга активирует пролиферацию клеток в субэпендимной зоне боковых желудочков (Kang J. et al., 2008). В данных экспериментах авторы также выявили пролиферирующие клетки в этой области мозга. На модели ишемического инсульта у крыс было показано, что эндогенные клетки, пролиферирующие в субэпендимной зоне, затем мигрировали в направлении места повреждения головного мозга (Arvidsson A. et al., 2002). Эти клетки окрашивались антителами против нейрональных маркеров, таких как NeuN, Dcx, Tuj 1, что свидетельствует об их дифференцировке в нейрональном направлении

(Darsalia V. et al., 2005). Вероятно, пролиферация эндогенных стволовых клеток в субэпендимной зоне, их миграция к месту повреждения и дифференцировка в нейрональном направлении представляют собой ограниченную регенерацию во взрослом головном мозге. Предполагают, что экзогенные ММСК, трансплантированные животному с ишемическим повреждением головного мозга, стимулируют пролиферацию эндогенных стволовых клеток в субэпендимной зоне посредством выделения ряда нейтрофинов (BDNF, NGF, bFGF, EGF, NT3, NT4 -neurotrophin 3, 4) и ростовых факторов, таких как PDGF (platelet-derived growth factor), SCF (stem cell factor), LIF (leukaemia inhibitory factor) (Chen X. et al., 2002; Chen L., 2008).

Трансплантация ММСК после минимального повреждения сенсомоторной коры не привела к стимуляции данного процесса, как это происходило при ишемическом инсульте (Mahmood A. et al., 2001): количество пролиферирующих клеток в субэпендимной зоне у животных контрольной группы и группы клеточной терапии было примерно одинаковым. Возможно, при столь незначительной травме не происходит стимуляции эндогенных ММСК к выделению выше-названных нейтрофинов и ростовых факторов, а, следовательно, пролиферация клеток в субэпендимной зоне обусловлена только повреждением головного мозга.

Через 2 недели после травмы в области проводящих путей глубокой части хвостатого ядра у животных контрольной группы были обнаружены пролиферирующие клетки. У животных из группы клеточной терапии пролиферации в этой зоне авторы не выявили. Хвостатое ядро получает нисходящие пути от неокортекса через подмозолистый пучок. Повреждение нейронов сенсомоторной коры вызывает дегенерацию нижележащих проводящих путей, проходящих через глубокую часть хвостатого ядра. В месте гибели нейронов или их отростков значительно увеличивается количество пролиферирующих астроцитов. Вероятно, авторы данной работы выявили пролиферацию именно этих клеток.

Внутривенная трансплантация ММСК предотвращала разрушение проводящих путей. Авторы показали, что после трансплантации сохраняется жизнеспособность нейронов в пограничной с повреждением зоне, следовательно, сохраняются и аксоны, идущие от этих нервных клеток. Аксоны от нейронов сенсомоторной коры могут идти как непосредственно в хвостатое ядро, так и к вставоч-

ным нейронам неокортекса. Вероятно, что после травмирования погибают и вставочные нейроны в пограничной с повреждением области на уровне от -1 до -1,5 от брегмы, не затронутые механически. Клеточная терапия приводит к сохранению вставочных нейронов и их аксонов. Следовательно, в группе клеточной терапии в проводящих путях хвостатого ядра дегенерируют только волокна, отходящие непосредственно от нейронов, которые механически удаляются из коры. Авторы предполагают, что доля таких волокон относительно общего объема проводящих путей незначительна и, вероятно, их гибель не стимулирует пролиферацию астроцитов.

Сохранение проводящих путей хвостатого ядра, в свою очередь, имеет большое значение для восстановления ориентировочно-исследовательского поведения у крыс. Действительно, аксоны нейронов хвостатого ядра проецируются на нервные клетки черной субстанции и интерпедункулярного ядра. С другой стороны, имеются связи хвостатого ядра с двигательной и премоторной зоной фронтальной коры через кортико-спинальный и кортико-бульбарный тракты. Известно, что хвостатое ядро, Совместно со своими проводящими путями, входят в экстрапирамидную систему мозга, которая осуществляет регуляцию непроизвольных компонентов моторики: мышечного тонуса, координации движений, позы. В случае нарушения морфологической структуры этих проводящих путей следует ожидать негативного изменения в поведении животных, что и было выявлено авторами в тесте «открытое поле».

Таким образом, внутривенная трансплантация ММСК после удаления минимального участка сенсомоторной коры привела к сохранению микроциркуляции и жизнеспособности части нейронов в пограничной с повреждением зоне, а, следовательно, процессами вторичной дегенерации затронут меньший объем ткани мозга. Сохранение нейронов в сенсомоторной коре позволило минимизировать количество дегенерирующих волокон в проводящих путях экстрапирамидной системы, тем самым сохранив моторику животных, что способствовало полному восстановлению ориентировочно-исследовательского поведения (Соколова И.Б. и др., 2009; 2011).

В последних работах показано нейропротективное влияние мезенхимальных и нейральных стволовых и прогениторных клеток на сенсомоторное восстановление после травмы головного мозга (Полтавцева Р.А. и др., 2012).

5.3. Синдром хронической усталости

Синдром хронической усталости – вирусное заболевание. Проявляется хронической усталостью, выраженной физической слабостью, быстрой утомляемостью. При синдроме хронической усталости отмечаются пониженная физическая активность, эмоциональная неустойчивость, раздражительность, расстройства сна, депрессия, похудание, боли по ходу нервов, в мышцах и суставах. Часто – высыпания на слизистых рта, глотки, миндалин, коже. У больных синдром хронической усталости вне зависимости от пола могут регистрироваться клинические проявления урогенитальных инфекций, воспалительные заболевания органов малого таза, бесплодие, врожденные уродства и болезни новорожденных. Наблюдаются также симптомы поражения внутренних органов.

Причиной синдрома хронической усталости является герпес-вирус человека. Важная особенность герпес-вирусов – ускользание от защитных реакций организма и пожизненное сохранение в тканях инфицированного человека. Обострение и развитие синдрома хронической усталости регистрируется только при снижении клеточного иммунитета.

Ведущий механизм развития синдрома хронической усталости – функционирование иммунной системы в режиме длительного перенапряжения. Лабораторное тестирование больных выявляет иммунодефицит по клеточному типу, интерферонодефицит, нарушения функций печени, обмена веществ, снижение антиоксидательной активности сыворотки и перекисное окисление липидов, клеточных структур, изменения состава крови.

Лечение синдрома хронической усталости направлено на подавление размножения герпес-вируса, восстановление защитных сил организма и поддержание иммунитета с помощью иммуномодулирующих препаратов.

Однако только с помощью клеточной терапии возможно навсегда избавиться от синдрома хронической усталости. Попадая в организм, стволовые клетки восстанавливают иммунную систему, очищают кровь, избавляя ее от герпес-вирусов, тем самым происходит лечение синдрома хронической усталости.

В результате терапии стволовыми клетками у больных синдромом хронической усталости нормализуется сон, улучшается

самочувствие, повышается работоспособность, появляется бодрость, исчезает депрессивное настроение.

5.4. Аутизм

В Journal of Translational Medicine группой американских ученых опубликован обзор о возможностях клеточной терапии аутизма. Аутизм и подобные ему неврологические расстройства в настоящее время стали распространенным явлением - они отмечаются у одного из 166 детей. С этими заболеваниями связаны определенные нейрофизиологические отклонения, наиболее широко распространенными из которых являются иммунные нарушения и гипоперфузия мозга.

В преклинических и клинических испытаниях метода клеточной терапии различных заболеваний, связанных с нарушением иммунитета, показано, что мезенхимальные стволовые клетки нормализуют иммунные реакции. В других испытаниях было показано, что гемопоэтические стволовые клетки CD34+, в том числе выделенные из пуповинной крови, стимулируют ангиогенез, что позволяет эффективно использовать их в случаях, когда заболевание связано с гипоперфузией и ишемией.

Комбинированное применение МСК и ГСК пуповинной крови дает хороший эффект при лечении аутизма, улучшая перфузию мозга и нормализуя иммунитет, что подтверждается отдельными сообщениями, хотя клинического материала на момент публикации было еще недостаточно, чтобы достоверно оценить эффективность метода (Ichim T.E. et al., 2007: www.cmbt.su).

Глава 6

БОЛЕЗНИ ГЛАЗА И ЕГО ПРИДАТОЧНОГО АППАРАТА, БОЛЕЗНИ УХА И СОСЦЕВИДНОГО ОТРОСТКА

6.1. Восстановление роговицы

В настоящее время единственным эффективным методом восстановления зрения пациентам с тяжелыми осложненными бельмами является кератопротезирование. Однако риск отторжения кератопротезов остается очень высоким (до 75 и более) в связи с кератомаляцией иммуновоспалительного генеза. Распространенным подходом в инжиниринге тканей является создание биопротезов, содержащих аллогенные фибробласты в комбинации с полимерными матрицами, интегрированными в организм реципиента. По мнению авторов, использование аутофибробластов для конструирования биокератопротезного комплекса является более перспективным направлением с точки зрения профилактики развития посттрансплантационных реакций. Авторы разработали технологию изготовления конструкции биокератопротезного комплекса на основе аллогенного роговичного матрикса и прокультивированных аутофибробластов кожи реципиента для лечения осложненных бельм (Борзенко С.А., Васильев А.В. и др., 2010).

В связи с ростом числа повторных пересадок и малой эффективностью медикаментозных средств посттрансплантационной иммуносупрессии в настоящее время пристальное внимание стало уделяться свойствам мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), способных формировать иммунную толерантность при их сотрансплантации с донорским органом.

Это положение актуально и для офтальмологии, так как в связи с развитием «болезни трансплантата роговицы» у пациентов, входящих в группу «кератопластики высокого риска», доля повторных пересадок достаточно высока и составляет 25-37%.

Также известно, что в лимбальной зоне глаза локализуются клетки, обладающие фенотипом ММСК, которые могут быть объектом выбора для сотрансплантации с донорской роговицей в качестве клеточных индукторов локальной иммуносупрессии.

Авторы разработали технологию выделения и культивирования аллогенных лимбальных мезенхимальных ММСК человека для

сотрансплантации с донорской роговицей при кератопластике высокого риска (Борзенко С.А. и др., 2010).

Клеточная терапия в офтальмологии остается терапией выбора при тяжелых поражениях, когда существующие «классические» методы лечения себя исчерпали или оказались недостаточно эффективными. В НИИ глазных болезней РАМН был предложен и с успехом используется метод лечения больных с различными поражениями тканей переднего отдела глаза, основанный на введении непосредственно в зону патологического процесса аутогенных лейкоцитов пациента, активированных *in vitro*. Герпетические поражения роговицы наряду с буллезной кератопатией показали высокую эффективность на данную клеточную терапию. Авторы попытались определить механизмы терапевтической эффективности данной клеточной терапии (Суббот А.М. и др., 2010; Blenkinsop T.A. et al., 2012).

Проблема лечения язв роговицы при тяжелых ожогах роговицы до сих пор остается до конца нерешенной. Одним из перспективных методов закрытия дефектов различных тканей в настоящее время признается трансплантация культивированных клеток.

Для изучения в эксперименте перспективы применения трансплантации культивированных аллогенных клеток в лечении тяжелой ожоговой травмы роговицы проведен эксперимент на 15 кроликах. На обоих глазах моделировали тяжелый щелочной ожог роговицы. На опытных глазах культивированные фибробласты на микроносителях, включенных в коллагеновый гель, представляющие собой эквивалент дермы, после предварительной некрэктомии укладывали на дефект и фиксировали мягкой контактной линзой (МКЛ). На контрольных глазах также использовали МКЛ. В 1-й серии трансплантации культивированных клеток (ТКК) проводили спустя 12 дней после травмы, во 2-й серии – на 2-е сутки и спустя 10 дней после травмы с последующей некровавой блефарорафией.

Клинически ТКК приводила к ускорению закрытия дефекта роговицы. Во 2-й серии на всех глазах к 10 суткам сформировалось десцеметоцеле, эффект проявлялся в снижении частоты случаев перфорации роговицы, однако для усиления эффекта потребовалась повторная ТКК. Гистологически ТКК на микроносителях в коллагеновом геле приводит к формированию нормальной структуры роговицы.

По мнению авторов, ТКК в эксперименте более эффективна при ее проведении спустя 12 дней после тяжелого ожога роговицы. Повторные ТКК усиливают эффект метода. Предварительные положительные результаты исследования свидетельствуют о перспективности применения ТКК в лечении глубоких ожоговых дефектов роговицы и необходимости дальнейших экспериментальных исследований в этом направлении, в том числе и одновременной трансплантации культивированных фибробластов и эпителиальных клеток (Макаров П.В. и др., 2007).

Предпочтение в лечении заболеваний кожи и слизистых отдается аутологичным, а не аллогенным фибробластам (Ткачук В.А., 2010; Аветисов С.Э. и др., 2012).

6.2. Восстановление сетчатки

Среди причин частичной или полной утраты зрения значительная доля приходится на патологию фоторецепторного аппарата: врожденных аномалий, отслойку сетчатки различного генеза, пигментную дистрофию сетчатки и др. Существующие способы лечения не всегда эффективны, а при ряде заболеваний радикальные методы коррекции вообще отсутствуют.

Одним из критериев успешной трансплантации фоторецепторного аппарата является формирование синаптических связей между фоторецепторами и нейронами реципиента, чего удавалось добиться лишь в единичных случаях (Aramant R.B. et al., 2004; MacLaren R., Nature R.R., 2006).

Исследователи из Британии R.MacLaren и R.R.Aliet al. (2006) считают, что пересаживать следует не ранние предшественники палочек и колбочек, а постмитотические прекурсоры – на стадии начала образования межклеточных синаптических связей. В ходе эксперимента, выполненного на мышах, страдающих генетическим дефектом – дегенерацией сетчатки, показано, что пересаженные клетки, полученные от трансгенных (GFP^+ , CFP^+) реципиентов на сроках от 1 до 15 дня постнатальной жизни, способны колонизировать сетчатку в пределах наружного ядерного слоя и дифференцироваться в фоторецепторы. Наибольший успех был достигнут с применением клеток, полученных от мышат в возрасте 3-5 дней. Реципиентам инъецировали от 300 до 1000 клеток в субретинальный слой. Пере-

саженные клетки дифференцировались в морфологически идентифицируемые палочки и колбочки. Они формировали функционирующие синаптические связи с биполярными клетками, что было доказано возникновением и проведением электрических потенциалов в ответ на освещение и поведением ранее слепых мышей.

Вероятность слияния пересаженных клеток с фоторецепторами реципиента была сведена к минимуму посредством пересадки GFP⁺ клеток CFP⁺ реципиентам. При конфокальной микроскопии кофлюоресценция не была обнаружена ни в одном из наблюдений. Кроме того, ядра пересаженных клеток были маркированы BrdU, что также подтвердило донорское происхождение сформированных фоторецепторных клеток в сетчатке реципиента. Показано, что клетки, полученные от животных в возрасте до 3-х дней, еще способны делиться, позже они мигрируют в область наружного ядерного слоя.

Авторы указывают, что установленные на мышах закономерности открывают перспективы для дальнейших исследований в области лечения заболеваний сетчатки у человека. По степени морфофункциональной зрелости предшественники фоторецепторов 3-5-го дня жизни у мышей соответствуют таковым у человека во втором триместре внутриутробной жизни. По понятным причинам данный клеточный материал не может рассматриваться как перспективный для пересадок. Вместе с тем, сотрудники той же исследовательской группы показали, что прогрессивное развитие постмитотических предшественников палочек и колбочек ассоциировано с началом функционирования транскрипционного фактора Nr1. Пересаженные клетки, находящиеся на этой стадии развития, характеризовались лучшим приживлением и дифференцировкой в фоторецепторы. Активацию данного фактора наблюдали и в культуре эмбриональных стволовых клеток человека. Вероятно, ЭСК, отобранные на стадии активации данного фактора, способны к прогрессивной дифференцировке в фоторецепторные клетки сетчатки, что, по мнению исследователей, приведет в ближайшие 5 лет к созданию клеточной биотехнологии лечения патологии сетчатки у человека (Деев Р.В., 2007).

Исследовательская группа Li Y. (University of Louisville, KY, USA) изучила возможную роль стволовых/прогениторных клеток костного мозга в репарации повреждения пигментного эпителия сет-

чатки у мышей. Установлено, что при повреждении в клетках пигментного эпителия многократно возрастают экспрессия мРНК для факторов хоуминга стволовых/прогениторных клеток (C3, hepatocyte growth factor, leukemia inhibitory factor) и секреция C3, stromal-derived factor-1 (SDF-1). В результате в очаг повреждения мигрируют позитивные по антигену Sca-1 мононуклеарные клетки костного мозга. Мигрирующие клетки характеризовались высокой степенью экспрессии мРНК ранних маркеров -MITF, Pax-6, Six-3, Otx. На основании полученных данных сделан вывод, что костный мозг может служить источником коммитированных в направлении пигментного эпителия стволовых/прогениторных клеток (Li Y. et al., 2006).

Применение клеточных технологий, а именно, трансплантация нейральных стволовых/прогениторных клеток (НСПК) и клеток пигментного эпителия (ПЭ), в современной офтальмологии дало возможность восстанавливать утраченное зрение после необратимых повреждений сетчатки (Blenkinsop T.A. et al., 2012).

Однако полученные как в клинике, так и в эксперименте данные наблюдения за репарацией дефектов сетчатки после клеточной трансплантации часто носят противоречивый характер и не позволяют добиться желаемого результата. Остается бесспорной решающая роль нового микроокружения на судьбу трансплантированных клеток, однако наглядно продемонстрировать зависимость активности участия введенных в организм клеток от места и способа инъекции удастся при сравнении экспериментов *in vivo* и *in vitro* с применением модели органотипического эксплантационного культивирования.

Авторами предложены модели трансплантации GFP+ НСПК 4-го пассажа и клеток ПЭ 6-го пассажа мышей линии C57BL/6-Tg(ACVB-EGFP)/0sb/J в эксплантационную культуру сетчатки (+37°C, 5%CO₂ DMEM/F12, + глутамин, +dFGFn EGF (10 нг/мл), B27, N2 и 10% Fetal clone) и их инъекции интравитриально (10 000 кл/2 мкл), ретробульбарно (300000 кл./10 мкл) и супрахориоидально (300000 кл./2 мкл) крысам линии Campbell в возрасте 14 суток (Сергеев С.А. и др., 2010).

Травма органа зрения занимает одно из ведущих мест среди причин инвалидности по зрению. При этом более половины случаев потери зрения связано с травматической патологией глазного дна, такой как отек и ишемия сетчатки, разрывы и отрывы сетчатки

от зубчатой линии, отслоение сетчатки, токсические и посттравматические дистрофические изменения сетчатки. Несмотря на использование современных хирургических и медикаментозных методов лечения, возвращения утраченных функций сетчатки достигнуть не удается.

До 80-х годов XX века торможение восстановительных процессов в нервной ткани при травме связывали с глияльным рубцом, который препятствует прорастанию аксонов. Позднее, с совершенствованием техники исследования в данной области, блокирование регенеративных процессов стали объяснять ранним развитием в зоне травмы дисбаланса тканевых пептидов – дефицитом белковых рост-стимулирующих нейротрофических факторов и опережающим появлением белков – ингибиторов роста.

В начальный период – от момента травмы до первых суток – вслед за механическим первичным повреждением ткани сетчатки уже через несколько минут начинается этап вторичного метаболического повреждения. Здесь играют роль механизмы ишемического повреждения вследствие нарушения кровообращения, спазма и нарушения проницаемости капилляров вокруг очага первичной травмы с последующим вазогенным и позднее цитотоксическим отеком ткани сетчатки. Высвобождение метаболитов арахидоновой кислоты, простагландинов, а также нейтрофильная инфильтрация, сопровождающаяся выбросом в ткань миелопероксидазы и эластазы, расширяют ареал повреждения с формированием в соседних с первичной травмой участках сетчатки новых очагов некроза. Позднее зона некроза очищается макрофагами и нейтрофилами. В прилегающей к месту травмы сетчатке продолжается гибель отдельных нейронов за счет апоптоза. Завершающим этапом является организация дефекта путём формирования глияльного рубца за счет гиперплазии микроглии и астроцитов.

В конце XX века стали появляться предположения о возможности восстановления структурной целостности сетчатки с помощью клеточных технологий. Одним из наиболее перспективных видов клеточного материала для трансплантации с целью лечения заболеваний сетчатки являются НСПК, выделенные из обонятельной области слизистой оболочки носа взрослого человека.

НСПК из обонятельной области слизистой оболочки носа человека впервые выделили в 2001 году. Отдельную субпопуляцию в

обонятельной части слизистой оболочки носа человека образуют так называемые обкладочные нейроэпителиальные клетки, обладающие свойствами нейральных стволовых клеток. «Обонятельный эпителий» и гломерулярный слой обонятельных луковиц млекопитающих содержат специализированные глиальные клетки, стимулирующие аксональную регенерацию нейронов центральной и периферической нервной системы (Roisen F.J., 2001; Barnett S. C. et al., 2004; Dieltsova O.I. et al., 2013; Euler de Souza Lucena E. et al., 2014). В англоязычной литературе эти клетки получили название «olfactory ensheathing cells» (OECs), «обкладочные» («оболочечные») клетки «обонятельного эпителия». В отечественной гистологической терминологии аналога этому понятию не существует. Известно, что OECs выделяют различные нейротрофические факторы: фактор роста нервов, нейротрофический фактор, синтезируемый в головном мозге и реснитчатый нейротрофический фактор. Эти факторы, так же как внеклеточные матричные молекулы могут играть значительную роль в регенерации сетчатки после повреждения. Имеются также сведения, что клетки базального слоя «обонятельного эпителия» мыши могут дифференцироваться и в экстра-нейрональном направлении.

Е.В.Ченцова и др. (2007) выполнили исследования на 15 кроликах (30 глаз) породы Шиншилла массой тела 2,5-3,0 кг. Острую ишемию сетчатки вызывали транспупиллярной лазеркоагуляцией ретинальных сосудов с помощью аргонной лазерной установки Visulas Argon II (Karl Zeiss, Германия) под местной анестезией (1% раствор дикаина) и под контролем фундус линзы. На следующий день после лазеркоагуляции в супрахориоидальное пространство глаз опытной группы животных вводили 500 тыс. НСПК в 0,02 мл сбалансированного физиологического раствора (СФР), в контрольной группе вводили 0,02 мл СФР.

НСПК выделяли из обонятельной области слизистой оболочки носа человека по стандартной методике, культивировали до монослоя. Первичные культуры пересевали через 10-15 суток. Для трансплантаций использовали клетки после 6-8 пассажей.

Клиническое наблюдение осуществлялось с помощью биомикроскопии, офтальмоскопии и фоторегистрации.

Всем кроликам выполняли регистрацию электроретинограммы (ЭРГ) при расширении зрачка 1% раствором мидриацила и анесте-

зии роговицы 0,5% раствором дикаина. Исследования проводили после предварительной 20-минутной темновой адаптации до и через 1 суток после лазерной фотокоагуляции сосудов (через 15 мин после введения НСПК и СФР), а также через 7, 14 и 30 дней после моделирования ишемии сетчатки.

При биомикроскопии как в контроле, так и в опыте отмечались умеренная гиперемия и отек конъюнктивы преимущественно в зоне вмешательства, постепенно проходящие на 5-й день после трансплантации. За время наблюдения со стороны переднего отрезка воспалительных явлений не наблюдалось. Оптические среды глаза сохраняли прозрачность. При офтальмоскопии после лазеркоагуляции отмечалось сужение всех сосудов с полной или почти полной остановкой кровотока, сохраняющееся на протяжении 2-5 мин, после чего кровоток несколько восстанавливался, но сосуды оставались резко суженными.

На следующий день после коагуляции на глазном дне у некоторых кроликов наблюдалась незначительная гиперемия, ступенчатость границ диска зрительного нерва из-за отека окружающей сетчатки, сужение артерий с полным прекращением кровотока в некоторых из них. Отмечались ампулообразное расширение вен, застои, отек сетчатки по ходу сосудов. На периферии патологические изменения не выявлены.

В последующие 7 суток кровоток в сосудах сетчатки постепенно улучшался. Сохранялся неравномерный калибр артерий с участками их полной окклюзии. В венах увеличился застой, они становились более широкими, появилась патологическая извитость. Отечность сетчатки по ходу сосудов уменьшалась. В местах лазеркоагуляции по ходу сосудистого пучка появились дистрофические хориоретинальные очаги разной величины. На периферии также обнаруживались участки очагового некроза сетчатки.

На более поздних сроках наблюдения (14-20 дней) отмечалось медленное восстановление кровотока в ретинальных сосудах, развитие коллатералей. Просвет сосудов становился более равномерным на всем протяжении, но восстановления их калибра до исходного уровня не отмечалось. В венах сохранялись застойные явления, на сетчатке прежние дистрофические очаги. В опытной группе при офтальмоскопии выявлялось меньшее количество дистрофических очагов сетчатки, чем в контрольной группе, однако провести количе-

ственное их сравнение не представлялось возможным из-за вариабельности размеров и форм очагов.

При электроретинографии через сутки после лазерной коагуляции сосудов сетчатки (I-III порядка) у животных опытной и контрольной групп отмечалась гиперреакция сетчатки. В среднем по группе амплитуда α -волны ЭРГ (корнео-негативного потенциала, источником генерации которого являются фоторецепторные клетки) через сутки составляла 129% от исходных значений для опытной и контрольной групп соответственно. Гиперреакция сетчатки в первые сутки после лазеркоагуляции вызвана раздражением фоторецепторов в ответ на острую ишемию.

Корнео-позитивный компонент ЭРГ – волна-b, которая генерируется клеточными элементами внутреннего ядерного слоя сетчатки (при доминирующем вкладе ON-биполярных клеток, а также глиальных клеток Мюллера), через 1 сутки после лазеркоагуляции практически не отличалась от исходных значений в контроле (в среднем, 96%), но в глазах с НСПК она резко возрастала (до 138%). Через 1 неделю после моделирования ретинальной ишемии амплитуды всех биопотенциалов в контрольной группе достоверно снижались, причем наибольшему угнетению подвергалась α -волна ЭРГ. В глазах контрольной группы животных амплитуды α - и b-волн ЭРГ и РЭРГ с частотой 30 Гц составляли в среднем 47, 53 и 43% от индивидуальной нормы. В течение последующих 2 недель при введении СФР на фоне ретинальной ишемии происходило медленное восстановление биоэлектрической активности сетчатки, что соответствовало наблюдаемой при офтальмоскопическом обследовании тенденции к нормализации кровотока. Неравномерный калибр сосудов, сохранение застойных явлений в ретинальных венах и наличие дистрофических очагов коррелировало с динамикой ЭРГ, и даже в конце периода наблюдения амплитуды α -, b-волн ЭРГ и РЭРГ в глазах контрольной группы животных составляли только 80, 96 и 70% соответственно.

В глазах животных опытной группы после моделирования ретинальной ишемии и введения НСПК через 7 дней у 2/3 животных амплитуды α - и b-волн ЭРГ резко превышали исходные значения, а у 1/3 – оставались в пределах нормальных или умеренно сниженных значений. В среднем, значения α -, b-волн ЭРГ и РЭРГ через неделю достигали 90, 118 и 82% от индивидуальной исходной нормы. Через

14 дней амплитуды волн ЭРГ в глазах животных опытной группы умеренно превышали норму и выраженная гиперреакция сетчатки сохранялась до конца срока наблюдения. Наиболее резко возрастала b-волна ЭРГ, значения которой достигали 153%, что может отражать активизацию глиальных клеток Мюллера, возможно компенсаторно-приспособительного характера. Через месяц наблюдения средняя по группе амплитуда α - и b-волн ЭРГ составляла 133 и 140% от нормы. Амплитуда РЭРГ соответствовала нормальным значениям и составляла в среднем 108% от исходных величин.

Следует отметить, что при моделировании ретинальной ишемии в отдаленные сроки наблюдения в глазах животных опытной группы и контрольной ритмическая ЭРГ на 30 Гц практически всегда имела субнормальные значения при минимальной амплитуде через 7 суток после лазеркоагуляции. Изменения РЭРГ на мелькающий стимул были статистически достоверными, но менее выраженными, чем начальные альтерации волн ЭРГ на одиночные вспышки. Биопотенциалы сетчатки на высокочастотные мелькания имеют чисто нейральную (в большей степени фоторецепторную) природу генерации. Учитывая также данные литературы о селективной чувствительности РЭРГ с частотой 30–40 Гц к развитию в сетчатке человека изменений дистрофического характера, угнетение ритмических ответов, по-видимому, следует рассматривать как отражение очагов органических нарушений, что подтверждали данные наших офтальмоскопических наблюдений.

На фоне лечения НСПК через месяц амплитуда РЭРГ в глазах животных опытной группы соответствовала нормальным значениям (108% от исходных величин), в то время как в глазах животных контрольной группы на поздних сроках эксперимента она оставалась сниженной на 30%.

Авторы приходят к выводу, что трансплантация НСПК на фоне ишемии обладает нейропротекторным действием, что выражается в больших величинах ЭРГ и РЭРГ в опытной группе. В ранние сроки после лазерного воздействия трансплантация НСПК способствовала сохранению ретинальной функции и снижению выраженности ишемических и дистрофических изменений на глазном дне. В более поздние сроки, когда происходило частичное восстановление кровообращения сетчатки, эффект НСПК в опытной группе проявлялся в лучшей динамике восстановления ретинального электроге-

неза по сравнению с контролем. Супрахориоидальная трансплантация НСПК проявила себя безопасным и эффективным способом введения клеток с целью лечения заболеваний сетчатки в эксперименте на кроликах (Ченцова Е.В. и др., 2007).

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) является одним из наиболее распространенных заболеваний органа зрения как в нашей стране, так и за рубежом. Патологические изменения, связанные с ВМД, приводят к стойкой и необратимой утрате зрительных функций, что в свою очередь значительно ухудшает качество жизни пациентов.

Одним из перспективных методов лечения дистрофической патологии сетчатки может явиться применение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). Для разработки комбинированной технологии лечения ВМД, включающей использование низкоинтенсивного лазерного излучения и внутривенного (системного) введения аутологичных ММСК под наблюдением авторов находилось 3 пациента (3 глаза) с «сухой» формой ВМД в возрасте от 64 до 75 лет. Острота зрения до лечения варьировала от 0,2 до 0,5. За 3 ч до введения аутологичных культивированных ММСК костного мозга проводили транспупиллярное лазерное облучение макулярной области сетчатки низкоинтенсивным лазерным излучением с длиной волны 660 нм, диаметром пятна 6 мм, в дозе 0,3-1,0 Дж/см². Облучение проводили на аппарате «АЛОД-01» («Алком-Медика», СПб).

Для получения клеток костного мозга с целью последующего культивирования ММСК, содержащихся в костномозговой популяции, пациентам под местной новокаиновой анестезией проводили пункцию грудины или подвздошной кости и извлекали в строго стерильных условиях примерно 1 мл костного мозга, выделенные клетки отмывали, центрифугировали, осадок ресуспендировали в ростовой среде RPMI-1640.

Культивирование проводилось в стерильных пластиковых флаконах Карреля. При достижении сливного (конфлюэнтного) монослоя клетки пересеивали.

Такой метод позволял к концу 5-6-й недели добиться получения популяции аутологичных ММСК в количестве $1-2 \times 10^8$ клеток, необходимых для трансплантации в организм донора исходного костного мозга. После заключительного снятия трипсином с поверхности

культуральных флаконов и отмывки физиологическим раствором ММСК взвешивали в 200 мл стерильного физиологического раствора с прибавлением гепарина в концентрации 10 ед/мл и вводили в/в капельно в течение 40-60 мин.

Для оценки эффективности предлагаемого способа до и после лечения проводилось определение остроты зрения, фовеальной чувствительности сетчатки, исследование электрофизиологических показателей, глазной и регионарной гемодинамики.

Через месяц после проведенного лечения в 2 случаях острота зрения повысилась (на 0,2 и 0,32, соответственно) и в 1 – осталась прежней. Во всех случаях отмечено повышение фовеальной светочувствительности сетчатки по данным компьютерной периметрии, а также увеличение амплитуды α -волны и β -волны по данным макулярной электроретинограммы, которое свидетельствовало о повышении функциональной активности сетчатки.

При исследовании гемодинамики у всех пациентов отмечалось увеличение средней скорости кровотока в глазничной артерии, центральной артерии сетчатки и в задних коротких цилиарных артериях. Полученные результаты оставались стабильными в сроки от 6 до 12 месяцев

По мнению авторов, полученные предварительные клинко-функциональные данные указывают на перспективность применения предлагаемой технологии в лечении возрастной макулярной дегенерации (Конопляников А.Г. и др., 2007).

Разработан метод получения аутогенных лейкоцитов из периферической крови для лечения заболеваний роговицы. При персонализированной клеточной терапии в офтальмологии учитывается цитокиновый профиль аутогенного клеточного материала (Аветисов С.Э. и др., 2011, 2012).

До настоящего времени остаются открытыми вопросы о взаимодействии трансплантированных клеток с новым микроокружением реципиента и их выживаемости. В качестве модели влияния трофических факторов и трансплантированных клеток на сетчатку была выбрана органотипическая эксплантационная культура сетчатки новорожденной крысы, так как при этом сохраняется citoархитектоника сетчатой оболочки глаза и клеточных взаимосвязей, что существенно облегчает микрохирургические процедуры введения клеток, дает возможность строго контролировать число и место

введения клеток, визуализировать их распространение и выживаемость в сетчатке, вести прижизненные микроскопические наблюдения с любым интервалом времени и четко контролировать условия выращивания клеток.

В работе использованы прикрепленные культуры сетчатки новорожденных крыс Wistar, служившие моделью развивающейся нейросетчатки. Культивирование эксплантатов сетчатки проводили в стандартных условиях в модифицированной среде DMEM/F12 с добавлением ростовых факторов, 10% сыворотки и антибиотиков. На 10-е сутки в культуры сетчаток инъецировали ксеногенные клетки мышей линии C57Bl/B-Tg(ACVB-EGFP)/Osb/J (ММСК, НСПК субвентрикулярной зоны, клетки ПЭ глаза). Производили прижизненные наблюдения за выживаемостью инъецированных клеток, за их миграцией на различных сроках с последующим иммуногистохимическим окрашиванием на маркеры дифференцировки клеток в глиальном и нейрональном направлениях (GFAP и β -III-тубулин соответственно).

Обнаружены достоверные отличия в выживаемости различных типов клеток в новом микроокружении, показана наибольшая миграционная активность ММСК и НСПК в первые часы после инъекции и проанализированы морфологические изменения введенных типов клеток (Семенова М.Л. и др., 2010).

К настоящему времени изучены гистогенез эмбриональных стволовых клеток человека *in vitro* в компоненты сетчатки глаза (Лагарькова С.В. и др., 2011) и сравнительный анализ экспрессии генов, ассоциированных с нейральными стволовыми клетками, в развитии неокортекса мозга и сетчатки глаза человека (Вердиев Б.И. и др., 2012).

6.3. Восстановление зрительного нерва

Исследования последних лет показали, что криоконсервированные препараты плаценты при их трансплантации выступают в роли естественных стимуляторов защитных сил организма, оказывают иммунокорригирующее, радиопротекторное, противоопухолевое, противовоспалительное действие. В то же время, механизм противовоспалительного эффекта криоконсервированной плаценты изучен недостаточно. Авторы изучили влияние транс-

плантации криоконсервированной плаценты на морфофункциональное состояние зрительного нерва крыс при остром асептическом неврите в отдаленные сроки эксперимента (Шепитько В.И. и др., 2010).

6.4. Восстановление слуха

Более 250 миллионов людей в мире страдают от глухоты. Обычно этот процесс связан с потерей чувствительных рецепторов, которые называются волосковыми клетками за их специфические выросты.

Под руководством доктора Марчелло Риволты из Шеффилдского университета, удалось выделить стволовые клетки из эмбриональной улитки и выяснить, что эти клетки способны дифференцироваться в волосковые клетки органа слуха.

Клетки 9-11-недельных эмбрионов человека были выдержаны и размножены в пробирках в течение года. Затем они были подвергнуты контролируемому росту в течение 7-8 месяцев, включавшему в себя 30-кратное увеличение популяции, что является нормальным показателем для неэмбриональных популяций стволовых клеток. Генетический анализ показал, что во всех клеточных линиях были найдены признаки развития из данных клеток тканей внутреннего уха. Такие же признаки были найдены и в эмбриональных стволовых клетках.

Авторы создали условия для дифференцировки стволовых клеток в волосковые, которые не отличались по своим электрофизиологическим характеристикам от аналогичных волосковых клеток, присутствующих в организме человека. Предполагается, что результаты функционирования первой системы возобновляемых стволовых клеток, полученных из органа слуха человека, могут иметь множество точек приложения, начиная с формирования волосковых клеток, заканчивая созданием эффективных моделей лечения глухоты. Несмотря на то, что клетки, подобные волосковым, не показали типичного формирования клеточных тяжей, авторы исследования считают, что будущие разработки помогут улучшить процессы клеточной дифференцировки. Лечение слуховых нарушений с помощью стволовых клеток может стать полезным для миллионов слабо слышащих людей (www.medkrug.ru; Shi F., Edge A.S.B., 2013).

Причины нарушения слуха могут быть различны, в том числе генетические, возрастные, по причине различных заболеваний и травмам. В случае повреждения чувствительных клеток внутреннего уха — кохлеарных фиброцитов — восстановление слуха практически невозможно. Поскольку кохлеарные фиброциты в некоторой степени способны к регенерации после повреждения, эта их особенность может привести к частичному восстановлению утраченного слуха.

Перед учеными стояла задача найти возможность стимулирования естественных процессов регенерации кохлеарных фиброцитов при помощи стволовых клеток. Опыты проводились на крысах, у которых медикаментозным путем вызвали гибель фиброцитов, которая привела к острой сенсоневральной тугоухости. Частичное восстановление слуха происходит только в течении первых недель, однако в большинстве случаев нарушение слуха продолжает оставаться проблемой. В процессе исследования половине крыс во внутренне ухо вводили стволовые клетки. Было отмечено, что трансплантированные клетки самостоятельно мигрировали от места введения к области повреждения. Они начинали быстро делиться, происходил программируемый геномом процесс биосинтеза белков — экспрессия генов — характерный для кохлеарных клеток. Следовательно можно говорить о тканеспецифичной дифференцировке. Кроме того, по форме эти клетки оказались похожи на кохлеарные фиброциты. У таких крыс слух восстанавливался лучше, чем у крыс контрольной группы, которым инъекции стволовых клеток проведены не были. Результатом исследования явилось повышение чувствительности к высоким звукам в экспериментальной группе, которая была на 23% выше, чем таковая в контрольной группе.

Результаты исследования могут быть положены в основу разработки методов клеточной терапии некоторых форм тугоухости (Kamiya et al.; www.akystik.ru).

6.5. Восстановление барабанной перепонки

Восстановление барабанной перепонки после хронических воспалительных заболеваний среднего уха или травматических повреждений актуальная проблема современной отоларингологии.

Актуальность темы обусловлена неудовлетворительными результатами, получаемыми от применения синтетических биосовместимых материалов для тимпаноластики, таких как амниотическая мембрана или коллагеновые пленки.

Применение же аллогенного клеточного материала в сочетании с биоматериалом обеспечивает органотипическую регенерацию органа, что можно наблюдать при трансплантации эквивалентов кожи ожоговым пациентам. Механизм регенерации основан на мощном стимулирующем воздействии трансплантата на регенеративные процессы организма, что выражается в случае с кожными дефектами в стимуляции краевой эпителизации и замещением трансплантата собственными тканями. Примером использования данной методики в клинической практике может служить клеточный продукт Dermagraft®, в основе которого лежат аллогенные фибробласты на коллагеновом носителе.

В настоящее время для решения данной проблемы идут активные работы по созданию тканеинженерных конструкций и технологий для восстановления барабанной перепонки. В данной области можно выделить несколько основных направлений, среди которых использование хрящевой ткани и дермальных эквивалентов. Поскольку использование эквивалентов хрящевой ткани для тимпаноластики, вероятно, сводится лишь к попытке закрытия дефекта, без учета восстановления нормального слуха, то перспектива использования дермальных эквивалентов дает надежду на органотипическую регенерацию барабанной перепонки.

Опубликованы сравнительные результаты использования биотрансплантата на основе аллогенных фибробластов и полимерной пленки толщиной 0,1 мм (Карбоксил II) с плотностью посева 20 тыс. клеток на см². 17 пациентам с сочетанной минно-взрывной травмой в остром периоде и подостром периоде (3-17 дней) после травмы производилась дезэпидермизация краев дефекта и имплантация клеточного препарата. Перфорация барабанной перепонки составляла от ¼ площади до субтотальной перфорации барабанной перепонки. Пленка фиксировалась марлевой турундой с мазевым препаратом «Tampogras», обеспечивающим удаление экссудативной жидкости и обладающим ранозаживляющими свойствами. Группы сравнения составили пациенты с тимпанопластикой амниотической мембраной куриного эмбриона (9), пленкой «Корбаксил II»

(6) и пациенты, которым никаких манипуляций не производилось (12). Повязка удалялась на 7-е сутки. Полимерная пленка удалялась на 21-е сутки.

Эффективность метода определялась визуально по характеру заживления, а также применением аудиометрии. В результате исследования в основной группе после имплантации мембраны с аллогенными фибробластами показатели заживления превосходили группы сравнения, и было отмечено сокращение сроков лечения на 14 дней, кроме того, на фоне сохраняющейся сенсорной тугоухости, возникшей в результате травмы внутреннего уха, функциональные показатели барабанной перепонки нормализовались.

По всей видимости лечебный эффект основан на стимуляции краевой регенерации фибробластами на пленке, которая в свою очередь играет роль каркаса по которому идет заживление. Данная методика позволяет начать и завершить лечение повреждения барабанной перепонки в кратчайшие сроки после травмы, что позволяет ускорить реабилитацию пациентов с минно-взрывной травмой и избежать вторичных расстройств звукового восприятия в дальнейшем (Туманов В.П. и др., 2006; www.tissue-engineering.ru).

Глава 7

ТЕРМИНАЛЬНЫЕ СОСТОЯНИЯ

Имеются экспериментальные данные, свидетельствующие о положительном действии интрагиппокампальной аллотрансплантации фрагментов эмбрионального неокортекса на структурно-функциональное состояние коры большого мозга, а также на способность к обучению, долговременную память, тревожно-фобическое поведение и выживаемость животных после клинической смерти (Маковецкий К.К., 1994; Маковецкий К.К. и др., 1992, 1995; Ерениев С.И., 1997). Найденные эффекты сходны с таковыми при нейротрансплантации культивируемых нейральных и мезенхимальных стволовых клеток человека в мозг крыс, выявленные после гипоксии (Лосева Е.В. и др., 2011).

Вполне вероятно, что нейротрансплантация после перенесенной клинической смерти оказывает стимулирующее воздействие на многочисленные участки продолжающегося нейрогенеза в зрелом мозге реципиента. У человека стволовые нейрональные клетки находятся в перивентрикулярных участках и коре мозга на протяжении его развития, они сохраняются в ряде участков и во взрослом возрасте (в зубчатой извилине гиппокампа, черной субстанции, обонятельной луковице). Существование клеток прогениторов в головном мозге и возможность обновления нейронов, глиальных и сосудистых клеток дают основание полагать, что в постреанимационном периоде возможен существенный ангио- и нейрогенез. Содержащиеся в нейротрансплантатах пептидные факторы роста могут быть вовлечены в управление делением и дифференцировкой мозговых стволовых клеток, которые в свою очередь оказывают действие на эндогенные прогениторы (Полтавцева Р.А. и др., 2003; Корочкин Л.И., 2004; Гафиятуллина Г.Ш., Хананашвили Я.А., 2011).

Усиление влияния этих естественных нейрогенных факторов путем экзогенного введения может оказаться эффективным лечебным подходом для реабилитации функций головного мозга в постреанимационном периоде.

В настоящее время все вышесказанное свидетельствует только о существовании некоторых предпосылок решения поставленных задач нейропротекции и структурно-функциональной регенерации

нервной ткани (Корочкин Л.И., 2004; Берсенев А.В., 2005; Александрова М.А., 2007; Исламов Р.Р. и др., 2007; Никка Г., Пирот Т., 2010; Аниськович Н.В., 2011). С скромными успехами объясняются очень сложной структурно-функциональной организацией нервной системы и ее интеграции с организмом (Угрюмов М.В., 2010).

Тем не менее, клеточные технологии (имплантация в соответствующие отделы мозга биологически активных клеток, обладающих нейротрансмиссивным и трофическим потенциалом) считаются одним из наиболее перспективных направлений восстановления утраченных функций в условиях селективной гибели отдельных групп нейронов. Необходимо учитывать, что уже сейчас области возможного клинического использования нейротрансплантации весьма широки и включают различные дегенеративные заболевания центральной нервной системы (болезнь Паркинсона, хорей Гентингтона, болезнь Альцгеймера), сосудистые заболевания мозга, последствия черепно-мозговой травмы, последствия спинальной травмы с повреждением аксонов проводящих путей, заболевания периферических нервов и другие состояния. В последнее время наибольший интерес вызывают работы, связанные с возможностью нейротрансплантации стволовых клеток мезенхимального и эмбрионального происхождения (Суслина З.А. и др., 2007; Rosser A.E., Bachoud-Levi A.C., 2012).

Несомненно, решение главных общих проблем нейротрансплантологии (приживаемость и стабильная интеграция донорских клеток, целенаправленная модификация фенотипа, трансдифференцировка в заданном направлении, поддержание культур стволовых клеток мезенхимального и эмбрионального происхождения) позволит открыть новую эру в клинической неврологии, связанную с возможностью целенаправленного воздействия на процессы регенерации нервной системы (репаративная неврология).

В настоящее время данных о доказанной эффективности клинического использования клеточных технологий для лечения постреанимационной энцефалопатии в доступных информационных базах (PubMed, elibrary) не найдено. С точки зрения доказательной медицины последнее может быть связано с чрезвычайной сложностью организации полноценного рандомизированного клинического испытания эффективности метода нейротрансплантации для этой категории больных и существованием нерешенных общих проблем нейротрансплантологии (Бочков Н.П., 2006).

Тем не менее, имеются данные об эффективности клинического применения нейрональных унипотентных клеток в лечении травматических ком, что близко к терминальным состояниям (Парлюк О.В. и др., 2008).

Прогнозы в науке не всегда осуществляются полностью, однако они задают ориентиры, помогают лучше понять дальнейшие пути развития исследований, способствуют концентрации усилий на наиболее значимых научных направлениях. В этой связи клеточные биотехнологии могут стать одним из наиболее эффективных направлений репаративной неврологии.

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АГМ – аорта-гонады-мезонефрос
ВМД – возрастная макулярная дегенерация
Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
ГСК – гемопоэтические стволовые клетки
ГФКБ – глиальный фибриллярный кислый белок
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
ДМСО – диметилсульфоксид
ДЦП – детский церебральный паралич
ЗЧМТ – закрытая черепно-мозговая травма
ИС – индекс стимуляции
КМ – костный мозг
КСФ – колониестимулирующий фактор
МДБ – мышечная дистрофия Беккера
МДД – мышечная дистрофия Дюшенна
МКЛ – мягкая контактная линза
ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки
МРТ – магнитно-резонансная томография
НСК – нейральные стволовые клетки
НСПК – нейральные стволовые/прогениторные клетки
ОНК – обкладочные нейроэпителиальные клетки
ООК – обкладочные обонятельные клетки
ПОСМА – постоянная окклюзия левой средней мозговой артерии
ПСМТ – позвоночно-спинномозговая травма
САМ – судорожная активность мозга
СатК – сателлитные клетки
СК – стволовые клетки
СМ – спинной мозг
СМАо – окклюзия средней мозговой артерии
ССВП – соматосенсорные вызванные потенциалы
ССК – соматические стволовые клетки
СФР – сбалансированный физиологический раствор
СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
ТКК – трансплантация культивированных клеток
ТЧМТ – тяжелая черепно-мозговая травма
ЦНС – центральная нервная система
ЧМТ – черепно-мозговая травма
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭНМГ – электронейромиография
ЭНТ – эмбриональная нервная ткань
ЭСК – эмбриональные стволовые клетки
ЭФППАК – эмбрио-фето-пуповино-плацентарно-амниотический комплекс
ЭЭГ – электроэнцефалография

AIS – (от American Impairment Scale) – шкала
 AMPA и AMPA-рецептор - (рецептор α -амино-3-гидрокси-5-метил-4- изокса-
 золпропионовой кислоты) – ионотропный рецептор глутамата
 APC – (adenomatous polyposis coli gene mutant mice) - мутантные мыши
 ASIA – (от American Spinal Injury Association) – шкала
 BDNF – (от brain-derived neurotrophic factor) – мозг-производный нейротрофи-
 ческий фактор
 bFGF – (от basic fibroblast growth factor)
 BMP – (от bone morphogenetic protein)
 BrdU – 5-бромдезоксисуридина
 bTGF – (от transforming growth factor)
 CXCR4 – рецептор к SDF-1
 EGF – (от epidermal growth factor)
 Eno2 – нейронспецифическая енолаза
 EPCs – (от endothelial progenitor cells) – предшественники эндотелиоцитов
 FACS – (от fluorescence-activated cell sorting) – флуорисцентно-активированная
 сортировка клеток
 FGF – (от fibroblast growth factor) – фактор роста фибробластов
 FIM – (от Functional Independence Measure) – шкала
 FISH – флуоресцентная гибридизация in situ
 GAP-43 – (от growth associated protein-43)
 G-CSF – (от granulocyte colony-stimulating factor) – гранулоцитарный колоние-
 стимулирующий фактор
 GDNF – (от glial cell line derived neurotrophic factor) – глиапроизводный нейро-
 трофический фактор
 GFAP – (от glial fibrillary acidic protein) – глиальный фибриллярный кислый
 белок
 GFP – зелёный флуоресцентный белок
 GM-CSF – (от granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
 hEGF – эпидермальный фактор роста
 HLA-DR – (от Human Leukocyte Antigens) – антиген лимфоцитов человека,
 поверхностный клеточный рецептор (МНС, класс II), кодируется в хромосоме
 6 region 6p21.31
 IBMX-(от Isobutylmethylxanthine) – изобутилметилксантин
 IGF-1 – (от insulin-like growth factor-1) – инсулиноподобный фактор роста-1
 IL – интерлейкин
 Ki67 – ядерный маркер пролиферации
 LIF – (от leukaemia inhibitory factor) – фактор, ингибирующий лейкомию
 MDRS – Mattis Dementia Rating Scale
 MMSE – Mini-Mental State Examination
 NeuN – (от neuron-specific nuclearprotein) – нейрональный ядерный белок
 NGF – (от nerve growth factor)
 NMDA – (NMDAR; НМДА-рецептор) — ионотропный рецептор глутамата,
 селективно связывающий N-метил-D-аспартат (NMDA)

NO – оксид азота
 NT2 – (от NTera2) – клетки тератокарциномы человека с нейрональным фенотипом
 NT-3 – (от neurotrophin 3)
 NT-4 – (от neurotrophin 4)
 ОЕС – (от olfactory ensheathing cells) – обкладочные обонятельные клетки
 ОЕСs – глиальные клетки обонятельных структур
 PCNA – (от Proliferating Cell Nuclear Antigen) – ядерный антиген пролиферирующих клеток
 PDGF – (от platelet-derived growth factor)
 qRT-PCR – полимеразная цепная реакция в реальном времени
 RA – (от retinoic acid) – ретиноевая кислота
 SCF – (от Stem Cell Factor) – фактор роста стволовых клеток
 SCID – врождённый иммунодефицит
 SDF-1 – (от stromal cell derived factor 1) – фактор стромальных клеток-1
 siRNA – малая интерферирующая РНК
 SNP-анализ – (от single nucleotide polymorphism) – единичные нуклеотидные полиморфизмы
 SP – (от side population) – сторонняя популяция
 TGF- β – (от transforming growth factor beta) – трансформирующий ростовой фактор β
 TNF – (от tumor necrosis factor) – фактор некроза опухоли
 VEGF – (от vascular endothelial growth factor) – сосудистый эндотелиальный фактор роста
 vWF – фактор фон Виллебранда
 Wnt – один из сигнальных путей клетки животных, регулирующий эмбриогенез, дифференцировку тканей и развитие раковых опухолей

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Авдейкин С.Н., Брюховещкий А.С. Осложнения, побочные эффекты и особенности клинического применения мобилизованных аутологичных гемопоэтических стволовых клеток в комплексной терапии пациентов с повреждением спинного мозга // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 4. – С. 104-110.
2. Аветисов С.Э., Суббот А.М., Антохин А.И. и др. Персонализированная клеточная терапия в офтальмологии. I. Метод получения и цитофенотип аутогенного клеточного продукта // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. VI, № 2. – С. 38-42.
3. Аветисов С.Э., Суббот А.М., Антохин А.И. и др. Персонализированная клеточная терапия в офтальмологии (II): цитокиновый профиль аутогенного клеточного материала // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. VII, № 1. – С. 49-53.
4. Акимова И.М., Гурчин Ф.А., Королева Н.Ю. и др. Клиническое применение трансплантации эмбриональных зачатков мозга при заболевании эпилепсией // Биомедицинский журнал Medline.ru. – 2001. – Т. 2, № 7. – С. 41-46.
5. Александрова М.А. Нейротрансплантация для терапии мозга? // Природа. – 2007. – № 10. – С. 18-23.
6. Александрова М.А., Сухих Г.Т., Чайлахян Р.К. и др. Сравнительный анализ дифференцировки и поведения нейральных и мезенхимальных стволовых клеток человека *in vitro* и *in vivo* // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2006. – № 1. – С. 44-52.
7. Аникин А.Ю., Древаль О.Н., Акатов О.В. и др. Состояние проблемы применения нейротрансплантационных технологий в клинике // Бюл. эксп. биол. и мед. – 1998. – Т. 126, прил. № 1. – С. 32-35.
8. Анискович Н.В. Нейрореставрация: помощь стареющему мозгу? // Психиатрия, психотерапия и клиническая психология. – 2011. – № 1. – С. 82-95.
9. Барашнев Ю.И. Принципы реабилитационной терапии перинатальных повреждений нервной системы у новорожденных и детей первого года жизни (с помощью фетальной терапии) // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 1999. – № 1. – С. 7-13.
10. Батурин Е.В., Ерениев С.И., Конвай В.Д. Перекисное окисление липидов в мозге крыс с низким порогом судорожной активности мозга при внутри-мозговой аллотрансплантации эмбриональной нервной ткани // Структурно-функциональные механизмы патологических и компенсаторно-восстановительных реакций: Сб. науч. тр. Омского мед. ин-та. – Омск, 1994. – С. 8-11.
11. Белкин А.А., Спектор С.И., Леонтьев С.Л., Лейдерман И.Н. Эффективность и безопасность стимуляции выброса стволовых клеток при остром ишемическом инсульте. Британско-российское совещание о сотрудничестве с Европейской Комиссией «Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации. Международные перспективы сотрудничества» (М., 15 марта 2007): Тез. докл. // Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» <http://www.cbio.ru/>. – С. 13.

12. Берсенов А.В. Аутотрансплантация обкладочных клеток обонятельного анализатора для лечения травмы спинного мозга – австралийское исследование // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – № 1. – С. 33-35.
13. Берсенов А.В. Выделение и характеристика нейральных стволовых клеток из обонятельной области слизистой оболочки носа млекопитающих // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2005. – № 1. – С. 13-14.
14. Берсенов А.В. Клеточная трансплантология – история, современное состояние и перспективы // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2005. – № 1. – С. 49-56.
15. Берсенов А.В. Метод эндоскопического получения биоптата головного мозга и выделения из него нейральных стволовых клеток для ауто-трансплантации // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – Т. 1, № 3. – С. 32-33.
16. Берсенов А.В. Нейрональная дифференцировка и применение клеток ПК в неврологии // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – № 1(3). – С. 42-48.
17. Берсенов А.В. Нейротрансплантация для лечения травмы спинного мозга в Китае – результаты международной экспертизы // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – № 3(5). – С. 29-30.
18. Берсенов А.В. Трансплантация клеток костного мозга пациентам с травмой спинного мозга – результаты пилотного клинического исследования в Южной Корее // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2005. – № 2. – С. 35-37.
19. Берсенов А.В. Трансплантация клеток пуповинной крови в область повреждения спинного мозга – анализ первого клинического наблюдения // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – № 1(3). – С. 30-31.
20. Берсенов А.В. Трансплантация фетальной нервной ткани при хорее Гентигтона – результаты шестилетнего наблюдения // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – № 3(5). – С. 27-28.
21. Берсенов В.П., Степанова Т.С., Овечко В.Н. Лечение больных с эпилептическим и цереброорганическим синдромом с использованием метода трансплантации эмбриональной нервной ткани. Материалы V Международного симпозиума "Повреждения мозга". – СПб., 1999. – С. 298-303.
22. Брюховецкий А.С., Менткевич Г.Л., Зайцев А.Ю. и др. Лечение травматической болезни спинного мозга с использованием клеточных технологий. http://www.neurovita.ru/reports/rus_report01_1.html.
23. Брюховецкий А.С. Трансплантация нервных клеток и тканевая инженерия мозга при нервных болезнях. – М.: ЗАО "Клиника восстановительной интервенционной неврологии и терапии "НейроВита". – 2003. – С. 398.
24. Брюховецкий А.С., Фролов А.А., Коваленко Н.И. Динамика соматосенсорных вызванных потенциалов у пациентов с хроническим повреждением спинного мозга при лечении аутогенными гемопоэтическими стволовыми клетками // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. III, № 2. – С. 68-73.

25. Брюховецкий И.С., Дюйзен И.В., Мотавкин П.А. Морфохимическая характеристика спинного мозга крыс после торакальной сегментэктомии и трансплантации полимерного коллагенового нейроматрикса «Сферогель-Э»TM с инкорпорированными обкладочными нейроэпителиальными клетками // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. III, № 2. – С. 57-62.
26. Вердиев Б.И., Милюшина Л.А., Подгорный О.В. и др. Сравнительный анализ экспрессии генов, ассоциированных с нейральными стволовыми клетками, в развитии неокортекса мозга и сетчатки глаза человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. – № 4. – С. 183-192.
27. Викторов И.В. Стволовые клетки мозга млекопитающих: биология стволовых клеток in vivo и in vitro // Известия АН. Серия Биологическая. – 2001. – № 6. – С. 646-55.
28. Викторов И.В., Сухих Г.Т. Медико-биологические аспекты применения стволовых клеток. – Вестник РАМН. – 2002. – № 4. – С 24-30.
29. Волошин П.В., Грищенко В.И., Черненко В.Г. и др. Предварительная оценка результатов метода трансплантации эмбриональных тканей в неврологии // Бюл. эксп. биол. мед. – 1998. – Т. 126, прил. № 1. – С. 78-79.
30. Гайдар Б.В., Брюховецкий АС, Шумаков В.И. Результаты и перспективы применения трансплантации клеток нервной ткани человека при боевой травме мозга // Бюл. эксп. биол. мед. – 1998. – Т. 126, прилож. 1. – С. 133-134.
31. Гайдар Б.В., Парфенов В.Е., Тегза В.Ю. и др. Особенности оказания специализированной нейрохирургической помощи в современных локальных военных конфликтах // Военно-медицинский журнал. – 2002. – № 12. – С 28-32.
32. Галанин И.В., Скоромец Т.А., Бухарцев Н.Н. и др. Применение стволовых клеток в психиатрии и неврологии. // Ежег. Всерос. и междунар. науч. конф. «Стволовые клетки и перспективы их использования в здравоохранении» (М., 30-31 мая 2007): Тез. докл. – М., 2007. – С. 79.
33. Галанин И.В., Скоромец Т.А., Бухарцев Н.Н. и др. Эффективность комплексного применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток при лечении психических медикаментозно резистентных заболеваний. Британско-российское совещание о сотрудничестве с Европейской Комиссией «Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации. Международные перспективы сотрудничества» (М., 15 марта 2007): Тез. докл. – Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» <http://www.cbio.ru/>. – С. 32-33.
34. Гафиятулина Г.Ш., Хананашвили Я.А. Принципы организации эмбрионального нейротрансплантата коры головного мозга // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – Т. 18, № 1. – С. 100-104.
35. Генне Р.И., Ерениев С.И., Никель А.Э. Реконструктивно-функциональная хирургия мозга при эпилепсии и эпилептиформных припадках (клинико-экспериментальное обоснование) // 3-й междунар. Тбилисский симпозиум «Функциональная нейрохирургия»: Тез. докл. – Тбилиси, 1990. – С. 74-76.
36. Гилерович Е.Г., Отеллин В.А. Трансплантация эмбриональной нервной ткани как модель изучения ранних этапов становления центральной нервной системы // Успехи физиологич. наук. – 2001. – № 1. – С. 38-47.

37. Гомазков О.А. Нейротрофическая регуляция и стволовые клетки мозга – М.: Издательство ИКАР, 2006. – 332 с.
38. Григорян А.С. Иммунное отторжение мезенхимальных стромальных стволовых клеток при трансплантации во взрослый головной мозг // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – № 2(4). – С. 14-15.
39. Григорян А.С., Гилерович Е.Г., Павличенко Н.Н. и др. Влияние трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на сохранность нейронов и развитие глиального рубца в головном мозге крыс, перенесших тяжелую черепно-мозговую травму // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – № 4. – С. 233.
40. Григорян А.С., Кругляков П.В. Клеточная терапия при травме головного мозга // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. IV, № 1. – С. 35-42.
41. Гринберг К.Н., Кухаренко В.И. Реализация фенотипического эффекта хромосомных аномалий у человека // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17, № 1. – С. 32-39.
42. Гусев Е.И. Проблемы инсульта в России // Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова. – 2003. – № 9. – С. 3-7.
43. Деев Р.В. Научное наследие Александра Максимова и современность // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2005. – № 1. – С. 4-8.
44. Деев Р.В. Трансплантация фоторецепторных клеток для коррекции слепоты в эксперименте // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. II, № 1. – С. 13-14.
45. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н. Клеточная терапия: новые подходы // Наука в России – Москва: Изд-во «Наука», 2009. – Т. 169. – № 1. – С. 4-8.
46. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. и др. Регуляция функций прогениторных клеток с помощью гиалуронидазы // Вестник РАМН. – 2009. – № 11. – С. 6-9.
47. Дыгай А.М., Артамонов А.В., Бекарев А.А. и др. Нанотехнологии в фармакологии. – М.: Изд-во РАМН, 2011 (а). – 136 с.
48. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. и др. Фармакологические свойства пегилированного с помощью нанотехнологии электронно-лучевого синтеза гранулоцитарного колониестимулирующего фактора // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011 (б). – № 3. – С. 146-151.
49. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. Регенеративная медицина: в поисках «эликсира жизни» // Наука из первых рук. – Изд-во СО РАН, типография ООО «ИНФОЛИО», 2013. – № 3 (51). – С. 31-37.
50. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. и др. Влияние иммобилизированной с помощью нанотехнологии электроннолучевого синтеза гиалуронидазы на чувствительность прогениторных клеток к регуляторным факторам // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011 (б). – № 1. – С. 47-51. Не внесена.
51. Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н., Жданов В.В. и др. Гепатопротекторные эффекты иммобилизированной с помощью нанотехнологии электроннолучевого синтеза гиалуронидазы и механизмы их развития // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 2011 (в). – № 1. – С. 86-90.

52. Дыгай А.М., Верещагин Е.И., Жданов В.В. и др. Механизмы гранулоцитопозстимулирующей активности иммобилизованного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора при цитостатической миелосуспензии // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 2009 (6). – № 7. – С. 60-64.
53. Егоров В.В., Иванов А.А., Пальцев М.А. Стволовые клетки человека // Молекулярная медицина. – 2003. – № 2. – С. 3-14.
54. Есениев С.И. Влияние микротравматизации мозга трансплантационной иглой и внутримозговой трансплантации эмбриональной нервной ткани на иммунные реакции мозгоспецифической направленности крыс линии Крушинского-Молодкиной с высокой судорожной готовностью мозга // 11-я всерос. конф. «Нейроиммунология». Науч.-пр.конф. неврологов (С-Пб., 15-18 мая 2002). – СПб., 2002. – С. 93-95.
55. Есениев С.И. Влияние стереотаксической трансплантации ткани эмбриональной закладки синего пятна, ядер шва и черной субстанции в участки СА1 и СА3 полей гиппокампа аудиогенные судорожные припадки // Структурно-функциональные механизмы патологических и компенсаторно-восстановительных реакций: Сб. науч. тр. – Омск: Омский мед. ин-т, 1994. – С.18-22.
56. Есениев С.И. Коррекция судорожных состояний в экспериментальной и клинической неврологии с помощью трансплантации незрелой нервной ткани // Эпилепсия. Патогенез, принципы лечения, механизмы адаптации. Выпуск 9. – Омск: ООО «Издатель-Полиграфист», 2000. – С. 7-26.
57. Есениев С.И. Нарушение противосудорожных механизмов мозга и их коррекция с помощью внутримозговой аллотрансплантации фрагментов эмбриональной нервной ткани // Нарушение механизмов регуляции при экстремальных и терминальных состояниях: Сб. науч. тр. – Омск: Омский мед. ин-т, 1991. – С. 22-32.
58. Есениев С.И. Синаптоархитектоника слоя I коры сенсомоторной области мозга крыс при коррекции судорожной готовности с помощью трансплантации эмбриональной нервной ткани // III междунар. конф. по функц. нейроморф. «Колосовские чтения – 97»: Тез. докл. (С-Пб., 7-8 апр, 1997). – С-Пб., 1997. – С. 33.
59. Есениев С.И. Структурно-функциональные механизмы повышения судорожной готовности мозга и ее коррекция с помощью трансплантации эмбриональной нервной ткани: Дис. ... докт. мед. наук. – Омск, 1997. – 460 с.
60. Есениев С.И., Акулинин В.А., Степанов С.С. и др. Эффект трансплантации эмбриональной нервной ткани на реорганизацию межнейронных отношений после механического повреждения сенсомоторной коры // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 2001. – Т. 131, № 3. – С. 219-222.
61. Есениев С.И., Батурин Е.В., Конвай В.Д. и др. Влияние внутримозговой аллотрансплантации эмбриональной нервной ткани на перекисное окисление липидов в мозге крыс с низким порогом судорожной активности // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 1994. – Т. 117, № 2. – С. 205-206.
62. Есениев С.И., Батурин Е.В., Семченко В.В. и др. Иммунные реакции мозгоспецифической направленности при коррекции высокой судорожной ак-

тивности мозга с помощью трансплантации эмбриональной нервной ткани // Патогенез и фармакокоррекция экстремальных и терминальных состояний. – Омск: Омская мед. академия. – 1995. – С. 20-23.

63. Ерениев С.И., Генне Р.И., Маковецкий К.К. и др. Гистофизиологическое обоснование коррекции высокой судорожной активности мозга с помощью имплантации эмбриональной нервной ткани // Матер. III съезда анатомов, гистологов, эмбриологов РФ. – Тюмень: Тюменская мед. академия, 1994. – С. 70.

64. Ерениев С.И., Генне Р.И., Савченко Ю.Н. и др. Модуляция судорожной активности мозга и высшая нервная деятельность при внутримозговой трансплантации ткани эмбрионального мозга животного и человека // Структурно-функциональные механизмы патологических и компенсаторно-восстановительных реакций: Сб. науч. тр. – Омск: Омская мед. академия, 1994. – С. 22-27.

65. Ерениев С.И., Генне Р.И., Семченко В.В. и др. Закономерности изменения синаптоархитектоники конечного мозга человека при эпилепсии и эпилептическом синдроме // Журн. невропатол. и психиатр. – 1990. – Т. 90, вып. 10. – С. 45-48.

66. Ерениев С.И., Генне Р.И., Степанов С.С. и др. Клинико-экспериментальное обоснование реконструктивно-функциональной терапии при эпилепсии и эпилептиформных припадках // Структурное обеспечение и стимуляция компенсаторно-восстановительных реакций: Сб. науч. тр. – Омск, Омский мед. ин-т, 1989. – С. 27-30.

67. Ерениев С.И., Маковецкий К.К. Структурно-функциональные механизмы депилептизации мозга при трансплантации эмбриональной нервной ткани // Макро- и микроуровни организации мозга в норме и патологии: Сб. науч. тр. – М.: НИИ мозга РАМН, 1992. – С. 57.

68. Ерениев С.И., Мамонтов В.В. / Ред. Клинические аспекты клеточной и тканевой терапии. Матер. II межрегион. науч.-пр. конф. (Омск, 27-28 июня 2000). – Омск, 2000. – 201 с.

69. Ерениев С.И., Савченко Ю.Н., Семченко В.В. и др. Судорожная активность мозга, долговременная память, способность к обучению и эмоциональные реакции животных при трансплантации тканей эмбрионального мозга человека // Патогенез, клиника и терапия экстремальных и терминальных состояний: Сб. науч. тр. – Омск: Омский мед. ин-т, 1994. – С. 1923.

70. Ерениев С.И., Селедцов В.И., Сеников В.В. и др. Первый опыт трансплантации фетальной нервной ткани в лечении коматозных состояний после тяжелой черепно-мозговой травмы // Механизмы функциональной активности организма: Матер. респ. науч.-пр. конф. – Омск: ОмГМА, 1999. – С. 46-48.

71. Ерениев С.И., Семченко В.В., Генне Р.И., Маковецкий К.К. Долговременная память и способность к обучению крыс с высокой судорожной активностью мозга при аллотрансплантации эмбриональной нервной ткани // Журн. высш. нерв. деят. – 1993. – Т. 43, вып. 5. – С. 987-993.

72. Ерениев С.И., Семченко В.В., Генне Р.И., Маковецкий К.К. Порог чувствительности к эпилептогенному раздражителю при внутримозговой ал-

лотрансплантации эмбриональной нервной ткани различной эргичности // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 1993. – Т. 115, вып. 1. – С. 71-74.

73. Есениев С.И., Семченко В.В., Матвеев А.С. и др. Трансплантационная субаракноидальная трансплантация незрелой нервной ткани в лечении коматозных состояний после тяжелой черепно-мозговой травмы // Неврология-иммунология. Десятая конференция «Нейроиммунология». Науч.-пр. конф. неврологов (С-Пб., 28-31 мая 2001): Матер. конф. – С-Пб., 2001. – С. 80-82.

74. Есениев С.И., Семченко В.В., Селедцов В.И. и др. Трансплантация фетальной нервной ткани при коматозных состояниях после тяжелой черепно-мозговой травмы // Диагностика и лечение политравм: Матер. всерос. конф. (Ленинск-Кузнецкий, 8-10 сент. 1999). – Ленинск-Кузнецкий: Изд. отдел ГНКЦОЗ, 1999. – С. 225-226.

75. Есениев С.И., Семченко В.В., Сычева Е.В. и др. Влияние алло- и ксенотрансплантации эмбриональной нервной ткани и стволовых клеток крови пуговицы на структурно-функциональное состояние коры большого мозга белых крыс в посттравматическом периоде // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2006. – Т. 140, № 5. – С. 612-615.

76. Есениев С.И., Степанов С.С., Семченко В.В., Щербаков П.Н. Структурно-функциональная характеристика неокортекса при очаговой травме мозга и внутримозговой гетеротопической трансплантации эмбриональной нервной ткани // Сибирский медицинский журнал. – 2005. – № 1. – Т. 20. – с.26-31.

77. Жуковский А.В., Мелерзанов А.В. Проблемы контроля качества продукции клеточных технологий // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. V, № 3. – С. 29-29.

78. Зайцев А.Ю., Брюховецкий А.С. Нейрорегенераторная терапия травматической болезни спинного мозга: роль и перспективы использования трансплантации стволовых клеток // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. II, № 1. – С. 36-44.

79. Зайцев А.Ю., Красавин И.В., Брюховецкий А.С. и др. Динамика клинико-электронейромиографических показателей у пациентов с хроническим повреждением спинного мозга при лечении аутогенными гемопоэтическими стволовыми (CD34) клетками // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – № 3(5). – С. 48-53.

80. Зенков Л.Р., Ронкин М.А. Функциональная диагностика нервных болезней. – М.: Медпресс-информ; 2004 – 312 с.

81. Зинькова Н. Н., Гилерович Е. Г., Соколова И.Б. и др. Терапия ишемического инсульта головного мозга у крыс с помощью мезенхимных стволовых клеток // Цитология. – 2007. – № 7. – С. 566-575.

82. Зинькова Н.Н., Гилерович Е.Г., Соколова И.Б. и др. Влияние сроков трансплантации МСК на эффективность терапии экспериментального инсульта головного мозга. Британско-российское совещание о сотрудничестве с Европейской Комиссией «Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации. Международные перспективы сотрудничества» (М., 15 марта 2007): Тез. докл. – Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» <http://www.cbio.ru/>. – С. 69-70.

83. Зинькова Н.Н., Гилерович Е.Г., Соколова И.Б. и др. Терапия ишемического инсульта головного мозга у крыс с помощью мезенхимных стволовых клеток. Британско-российское совещание о сотрудничестве с Европейской Комиссией «Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации. Международные перспективы сотрудничества» (М., 15 марта 2007): Тез. докл. – Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» <http://www.cbio.ru/>. – С. 68.

84. Зинькова Н.Н., Соколова И.Б., Кругляков П.К., Польшинцев Д.Г. Клеточная терапия ишемического инсульта у крыс. Ежег. Всерос. и междунар. науч. конф. «Стволовые клетки и перспективы их использования в здравоохранении» (М., 30-31 мая 2007): Тез. докл. – М., 2007. – С. 64-65.

85. Зозуля Ю.А., Цимейко О.А., Цымбалюк В.И. и др. Аллотрансплантация эмбриональной нервной ткани в сочетании с реваскуляризационными операциями в восстановительном лечении больных ишемическим инсультом // Нейрохирургия. – 1999. – Т. 24. – С. 36-40.

86. Зюзьков Г.Н., Суслов Н.И., Дыгай А.М. и др. Роль стволовых клеток в адаптации к гипоксии и механизмы нейропротективного действия гранулоцитарного колониестимулирующего фактора // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2005. – № 4. – С. 202-208.

87. Исламов Р.Р., Ризванов А.А., Гусева Д.С., Киясов А.П. Генная и клеточная терапия нейродегенеративных заболеваний // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. 2, № 3. – С. 29-39.

88. Кафанова М.Ю., Рабинович С.С., Селедцов В.И. и др. Нейротрансплантация в лечении неврологических расстройств у детей. Матер. 2-й Межрегиональной научно-практической конференции «Клинические аспекты клеточной и тканевой терапии» (Омск, 27-28 июня 2000). – С. 140-142.

89. Кашеварова А.А., Лебедев И.Н., Назаренко Л.П. Архитектура генома и хромосомные болезни. Синдромы реципрокных микроделений и микроудупликации: атлас / Под ред. акад. РАН, проф. В.П. Пузырёва. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2014. – 56 с.

90. Кашеварова А.А., Скрыбин Н.А., Черемных А.Д. и др. Клинико-генетическая характеристика недифференцированной умственной отсталости на основе матричной сравнительной геномной гибридизации // Журн. неврол. и психиатр. им. С.С. Корсакова. – 2013. – Т. 113, № 9. – С. 70-74.

91. Квачева З.Б., Пыко И.В., Вотяков В.И. и др. Разработка оптимальных условий культивирования и дифференцировки стволовых и прогениторных клеток ЦНС человека и животных // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. IV, № 4. – С. 73-77.

92. Корочкин Л.И. Стволовые клетки в нейрогенетике // Генетика. – 2004. – Т. 40, № 6. – С. 787-793.

93. Кутько И.И., Михайлов Б. В., Павленко В. В. Новый подход к применению неспецифической тканевой терапии у больных резистентными формами шизофрении // Шизофрения: новые подходы к терапии: Сборник научных работ Украинского НИИ клинической и экспериментальной неврологии и психиатрии и Харьковской городской клинической психиатрической больницы №

15 (Сабуровой дачи) / Под общ. ред. И.И.Кутько, П.Т.Петрюка. – Харьков, 1995. – Т. 2. – С. 55–56.

94. Лагарькова С.В., Шилов А.Г., Губанова Н.И. и др. Гистогенез эмбриональных стволовых клеток человека *in vitro* в компоненты сетчатки глаза // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 4. – С. 203-206.

95. Лелявский А. Дегенерация фетальных трансплантатов у больных хореей Гентингтона: долгосрочные результаты // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. IY, № 4.

96. Леонтьев М.А. Эпидемиология спинальной травмы и частота полного анатомического повреждения спинного мозга. // Актуальные проблемы реабилитации инвалидов. – Новокузнецк, 2003. – С. 37-38.

97. Лопатина Т.В., Калинина Н.И., Ревещин А.В. и др. Индукция нейральной дифференцировки стромальных клеток жировой ткани // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. IY, № 3. – С. 50-54.

98. Лосева Е.В., Подгорный О.В., Полтавцева Р.А. и др. Эффекты нейротрансплантации культивируемых нейральных и мезенхимальных стволовых клеток человека на обучение и состояние мозга крыс после гипоксии // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2011. – Т. 97, № 2. – С. 155-168.

99. Макаров П.В., Гундорова Р.А., Ходжабекян Г.В. и др. Трансплантация аллогенных культивированных клеток в лечении экспериментальных глубоких ожоговых дефектов роговицы у кроликов. Британско-российское совещание о сотрудничестве с Европейской Комиссией «Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации. Международные перспективы сотрудничества» (М., 15 марта 2007): Тез. докл. – Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» <http://www.cbio.ru/>. – С. 123.

100. Маккирини П., Кондратьева Е. Особенности этической экспертизы при планировании и проведении клинических исследований в регенеративной медицине // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6, № 4. – С. 111-118.

101. Маковецкий К.К. Влияние трансплантации фрагментов эмбрионального неокортекса на способность к обучению, долговременную память и поведенческие реакции крыс, перенесших клиническую смерть // Структурно-функциональные механизмы патологии и компенсаторно-восстановительных реакций: Сб. науч. тр. – Омск: Омская мед. академия, 1994. – С. 39-42.

102. Маковецкий К.К., Десятниченко А.К. Функционально-реконструктивная хирургия постишемических судорожных пароксизмов и нарушений высшей нервной деятельности в постреанимационном периоде с помощью трансплантации эмбриональной нервной ткани // Актуальные проблемы неотложных состояний: Матер. регион. науч.-пр. конф. молодых ученых и специалистов. – Омск: Омская мед. академия, 1995. – С. 92-93.

103. Маковецкий К.К., Ерениев С.И., Семченко В.В. Влияние трансплантации эмбрионального неокортекса на порог судорожной активности мозга и высшую нервную деятельность крыс после клинической смерти // Медицин-

ские аспекты изучения организма в норме и патологии: Сб. науч. тр. молодых ученых и специалистов. – Омск: Омский мед. ин-т, 1992. – С. 61-63.

104. Масгутов Р.Ф., Салафутдинов И.И., Богов А.А. и др. Стимуляция посттравматической регенерации седалищного нерва крысы с помощью плазмиды, экспрессирующей сосудистый эндотелиальный фактор роста и основной фактор роста фибробластов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6, № 3. – С. 67-70.

105. Масгутов Р.Ф., Салафутдинов И.И., Масгутова Г.А. и др. Аутогенные мультипотентные мезенхимные стромальные клетки из жировой ткани при лечении дефектов мягких тканей: результаты клинического исследования фазы I // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. V, № 3. – С. 40.

106. Масгутова Г.А., Масгутов Р.Ф., Ризванов А.А., Челышев Ю.А. Микроглия-подобные клетки, полученные в результате дифференцировки эмбриональных стволовых клеток и генетически модифицированные нейротрофическим фактором ИМТЗ, при посттравматической регенерации спинного мозга мыши // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. V, № 3. – С. 40-41.

107. Масгутова Г.А., Савченко Е.А., Викторов И.В. и др. Реакция олигодендроглии на повреждение спинного мозга крысы и трансплантацию клеток обонятельной выстилки человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – № 1. – С. 27-32.

108. Мелихова В.С. Постнатальный овогенез и стволовые клетки – продолжение дискуссии // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. II, № 2. – С. 20-21.

109. Миронов Н.В., Шмырев В.И., Бугаев В.С., Аникин А.Ю. Применение нейротрансплантации фетальных клеток головного мозга человека в лечении некоторых неврологических заболеваний // Трансплантация фетальных тканей человека. – М., 1996. – С. 50-52.

110. Некрасов Е.Д., Лебедева О.С., Васина Е.М. и др. Платформа для изучения болезни Гентингтона на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток // Анналы клин. и эксп. неврол. – 2012. – Т. 6., № 4. – С. 30-35.

111. Никель А.Э., Ерениев С.И., Сергеева Е.Д. Организация межнейронной интеграции в гиппокампе при эпилептизации мозга в постреанимационном периоде // Макро- и микроуровни мозга: Сб. науч. тр. – М.: НИИ мозга АМН СССР, 1990. – С. 144-146.

112. Никка Г., Пирот Т. Терапия нейро-дегенеративных заболеваний: возможности и перспективы // Медицинский совет. – 2010. – № 7-8. – С. 86-89.

113. Пальцын А.А., Колокольчикова Е.Г., Константинова Н.Б., Романова Г.А., Шакова Ф.М., Кубатиев А.А. Образование гетерокарионов как способ регенерации нейронов при постишемическом повреждении коры мозга у крыс // Булл. экпер. биол. и мед. – 2008. – Т. 146, № 10. – С. 467-470.

114. Парлюк О.В., Селедцов В.И., Рабинови С.С. и др. Применение нейрональных унипотентных клеток в лечении травматических ком // Вестник

Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2008. – Т. 6, № 3-2. – С. 114-119.

115. Парлюк О.В., Селедцов В.И., Рабинович С.С. и др. Результаты клеточной терапии, примененной в системе интенсивного лечения травматических ком // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. III, № 3. – С. 51-55.

116. Парфенова Е.В., Трактуев Д.О., Цоколаева З.И. и др. Стромальные клетки жировой ткани – ангиогенные свойства и терапевтический потенциал. Британско-российское совещание о сотрудничестве с Европейской Комиссией «Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации. Международные перспективы сотрудничества» (М., 15 марта 2007): Тез. докл. – Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» <http://www.cbio.ru/>. – С. 140-141.

117. Полежаев Л.В., Александрова М.А., Витвицкий В.Н. и др. Трансплантация ткани мозга в биологии и медицине. – М.: Наука, 1993. – 239 с.

118. Полтавцева Р.А., Ревущин А.В., Александрова М.А. и др. Нейральные стволовые и прогениторные клетки эмбрионов и плодов человека – основа новых биомедицинских технологий // Онтогенез. – 2003. – Т. 34, № 3. – С. 211-215.

119. Полтавцева Р.А., Силачев Д.Н., Павлович С.В. и др. Нейропротективное влияние мезенхимальных и нейральных стволовых и прогениторных клеток на сенсорное восстановление после травмы головного мозга // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. – № 2. – С. 116.

120. Рабинович С.С., Селедцов В.И., Астраков С.В. и др. Клеточная терапия в системе реанимации больных с тяжелой черепно-мозговой травмой // Вестник интенсивной терапии. – 2004, № 4. – С. 24-27.

121. Рабинович С.С., Селедцов В.И., Банул Н.В. и др. Клеточная терапия мозгового инсульта // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2005. – № 1. – С. 25-28.

122. Рабинович С.С., Селедцов В.И., Повещенко О.В. и др. Трансплантация стволовых кроветворных клеток в лечении спинномозговой травмы // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2003. – № 2. – С. 121-126.

123. Ревущин А.В., Александрова М.А., Подгорный О.В. и др. Нейральные стволовые плода человека в мозге крыс: влияние предварительного культивирования и трансплантации // Бюл. эксперимент. биол. и медицины. – 2005. – Т. 139. – С. 181-184.

124. Репин В.С., Ржанинова А.А., Шаменков Д.А. Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная биология и медицина. – М.: Реметэкс.– 2002. – С. 175.

125. Репин В.С., Сабурова И.Н. Обратимые эпителио-мезенхимальные трансформации клеток в эмбриогенезе и постнатальном обновлении тканей // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. III, № 3. – 64-73.

126. Ризванов А.А., Гусева, Д.С., Салафутдинов И.И. и др. Доклинические исследования терапии бокового амиотрофического склероза с помощью генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. 7, № 2. – С. 63-70.

127. Савченко С.А. Восстановительная хирургия спинного мозга при его травматическом повреждении (экспериментально-клиническое исследование): Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Москва, 2005. – 26 с.

128. Савченко Ю.Н., Ерениев С.И., Генне Р.И., Семченко В.В. Функцио-нально-реконструктивная хирургия при фено- и генотипически обусловленной высокой судорожной готовности мозга с использование эмбриональной нервной ткани // Актуальные вопросы стереонейрохирургии эпилепсии: Сб. науч. тр. – СПб.: Изд-во РНХИ, 1993. – С. 160-166.

129. Савченко Ю.Н., Ерениев С.И., Генне Р.И., Семченко В.В. Динамика фенотипически и генотипически обусловленной высокой судорожной активности мозга при внутримозговой аллотрансплантации эмбриональной нервной ткани // Журн. невропатол. и психиатр. – 1993. – Т. 93, вып. 1. – С. 3-7.

130. Селедцов В.И., Белгородцев С.Н., Парлюк О.В. и др. Применение аллогенной клеточной трансплантации в лечении последствий травмы спинного мозга: отдаленные результаты // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. V, № 4. – С. 85-91.

131. Селедцов В.И., Кафанова М.Ю., Рабинович С.С. и др. Клеточная терапия детского церебрального паралича // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2005. – № 2. – С. 84-88.

132. Селедцов В.И., Рабинович С.С., Кафанова М.Ю. и др. Клеточная трансплантационная технология в лечении тяжелых неврологических расстройств. Тезисы VI Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 300-летию Санкт-Петербурга и 205-летию Военно-медицинской академии «Актуальные вопросы клиники, диагностики и лечения в многопрофильном лечебном учреждении» (СПб., 22-23 апреля 2003). – СПб., 2003. – С. 275-277.

133. Селедцов В.И., Рабинович С.С., Парлюк О.В. и др. Клеточная терапия коматозных состояний // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2006. – № 3. – С. 146-149.

134. Селедцов В.И., Рабинович С.С., Кащенко Э.А. и др. Иммунологические и клинические аспекты применения клеточной терапии в лечении последствий черепно-мозговой травмы // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2006. – № 1. – С. 12-14.

135. Селедцова Г.В., Иванова И.П., Селедцов В.И. Т-клеточная вакцинация в лечении рассеянного склероза // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. III, № 4. – С. 31-35.

136. Селедцова Г.В., Рабинович С.С., Белгородцев С.Н. и др. Отдаленные результаты трансплантации фетальной нейрогенной ткани у больных с последствиями травмы спинного мозга // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – № 2. – С. 98-103.

137. Селедцова Г.В., Селедцов В.И., Рабинович С.С. и др. Трансплантация фетальных клеток в лечении неврологических расстройств // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. III. № 1. – С. 49-56.

138. Семенова Н.А., Сидорин С.В., Ахадов Т.А. и др. Влияние клеточной терапии на уровни метаболитов в структурах мозга детей с последствиями

тяжелой черепно-мозговой травмы: исследование методом ¹H магнитно-резонансной спектроскопии // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 2. – С. 38-41.

139. Семченко В.В., Степанов С.С. Структурные механизмы эпилептизации мозга в постреанимационном периоде // Анестезиология и реаниматология. – 1994. – № 5. – С. 340 с.

140. Семченко В.В., Ерениев С.И. Коррекция высокой судорожной готовности мозга крыс линии Крушинского-Молодкиной с помощью интрагиппокампальной аллотрансплантации ткани эмбриональной перегородки // 3-й съезд физиологов Сибири и Дальнего Востока: Тез. Докл. – Новосибирск, 1997. – С. 205-206.

141. Семченко В.В., Ерениев С.И., Маковецкий К.К. Порог судорожной активности мозга и показатели высшей нервной деятельности в постреанимационном периоде при внутримозговой аллотрансплантации ткани эмбрионального неокортекса // Бюл. exper. биол. и медицины. – 1996. – Т. 121, № 2. – С. 234-237.

142. Семченко В.В., Ерениев С.И., Степанов С.С. и др. Нейротрансплантация. – Омск: Омская областная типография. – 2004. – 308 с.

143. Семченко В.В., Ерениев С.И., Степанов С.С. и др. Регенеративная биология и медицина. Книга 1. Генные технологии и клонирование / Под ред. В.П.Пузырева, К.Н.Ярыгина, В.Н.Ярыгина, В.В.Семченко. – Омск-Москва-Томск: Омская областная типография, 2012. – 296 с.

144. Семченко В.В., Ерениев С.И., Степанов С.С., Сергиенко Г.Г. Трансплантация незрелой нервной ткани в экспериментальной и клинической неврологии. – Омск: ГУИПП Омский дом печати, 2000. – 340 с.

145. Семченко В.В., Степанов С.С., Боголепов Н.Н. Синаптическая пластичность головного мозга (фундаментальные и прикладные аспекты). 2-е издание. – М.: Директ-Медиа, 2014. – 499 с.

146. Сергеев С.А., Кошелева Н.В., Сабурин И.Н., Семенова М.Л. Оптимизация результатов трансплантации клеток в сетчатку, поврежденную лазерным излучением на модели эксплантационной культуры // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. V, № 3. – С. 47-48.

147. Сериков В.Б., Куйперс Ф. Плацента человека как источник гемопоэтических стволовых клеток // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. III, № 2. – С. 51-56.

148. Скворцова В.И., Губский Л.В., Таирова Р.Т. и др. Применение мезенхимальных (стромальных) клеток костного мозга при экспериментальном ишемическом инсульте у крыс // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2008. – № 1. – С. 14-20.

149. Слынько Е.И., Прудников И.В. Результаты применения стволовых клеток костного мозга при травматических повреждениях спинного мозга // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. V, № 3. – С. 48-49.

150. Смолянинов А.Б., Хурцилава О.Г., Тыренко В.В. и др. Современная стратегия регенеративной терапии и безопасность применения аллогенных ство-

ловых клеток пуповинной крови при нейродегенеративных заболеваниях // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. VI, № 4. – С. 14-20.

151. Соколова И. Б., Зинькова Н. Н., Билибина А. А. и др. Возможности применения клеточной терапии при лечении ишемического инсульта в эксперименте // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. II, № 4. – С. 54-62.

152. Соколова И.Б., Гилерович Е.Г., Павличенко Н.Н., Полинцев Д.Г. Морфологические изменения в гиппокампе крыс после травмы головного мозга // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 4. – С. 196-200.

153. Соколова И.Б., Федотова О.Р., Гилерович Е.Г. и др. Коррекция ориентировочно-исследовательского дефицита у крыс с помощью мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. IV, № 4. – С. 65-72.

154. Соколова И.Б., Федотова О.Р., Зинькова Н.Н. и др. Влияние трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на когнитивные функции крыс после ишемического инсульта. – Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2008. – № 4. – С. 202-205.

155. Соколова И.Б., Федотова О.Р., Зинькова Н.Н. и др. Эффект трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на когнитивную функцию у крыс с инсультом // Бюлл. экспер. биол. мед. – 2006. – Т. 142, № 4. – С. 511-514.

156. Соколова И.Б., Федотова О.Р., Цикунов С.Г., Полинцев Д.Г. Восстановление ориентировочно-исследовательского поведения крыс после травмы головного мозга с помощью мезенхимальных стволовых клеток // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 1. – С. 26-29.

157. Станков Д.С. Аутогенная трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток для восстановления после ишемического инсульта результаты I фазы клинических испытаний // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2005. – № 2. – С. 32-34.

158. Станков Д.С., Катунян П.И., Крашенинников М.Е., Онищенко Н.А. Нейротрансплантация в лечении травмы спинного мозга. – Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2003. – № 1. – С. 44-52.

159. Сукач А.Н. Перспективы использования генной и клеточной терапий для лечения мышечных дистрофий // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – № 2(4). – С. 44-50.

160. Сурков К.Г., Белова Л.А., Красняков В.К. Экспериментальное исследование антиишемического эффекта препарата стволовых клеток пуповинной крови. Британско-российское совещание о сотрудничестве с Европейской Комиссией «Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации. Международные перспективы сотрудничества» (М., 15 марта 2007): Тез. докл. – Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» <http://www.cbio.ru/>. – С. 180.

161. Суслина З.А., Иллариошкин С.Н., Пирадов М.А. Неврология и нейронауки – прогноз развития // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2007. – Т. 1, № 1. – С. 5-9.

162. Сухих Г.Т. Трансплантация фетальных клеток в медицине: настоящее и будущее // Бюл. эксп. биол. мед. – 1998. – Т. 126, прил. № 1. – С. 3-13.
163. Сычева Е.В., Семченко В.В., Есенин С.И. и др. Структурно-функциональное состояние коры мозга белых крыс в посттравматическом периоде после ксенотрансплантации стволовых клеток пуповинной крови // Морфология. 2006. – Т. 129, № 4. – С. 122.
164. Ткачук В.А. Редакционная статья // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. V, № 1. – С. 2-5.
165. Ткачук О.В., Маковецкий К.К., Семченко В.В. и др. Трансплантация эмбриональной нервной ткани при фено- и генотипически обусловленной высокой судорожной активности мозга (морфо-функциональная характеристика // Профилактика и экспериментальная терапия экстремальных и терминальных состояний: Матер. науч. конф. – Омск: Омский мед. ин-т, 1992. – С. 188-190.
166. Торопина Г.Г., Егоров О.Е., Яхно Н.Н. Нейрофизиологические корреляты боли и чувствительных расстройств у больных сирингомиелией // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2004. – Т. 104, № 3. – С. 42-51.
167. Угрюмов М.В. Регуляторные функции мозга: от генома до целостного организма // Вестник Российской академии наук. – 2010. – Т. 80, № 5. – С. 415-424.
168. Холоденко И.В., Холоденко Р.В., Таирова Р.Т. и др. Способность мезенхимальных клеток, выделенных из амниона человека, дифференцироваться в нервные клетки *in vitro* и *in vivo*. // Ежег. Всерос. и междунар. науч. конф. «Стволовые клетки и перспективы их использования в здравоохранении» (М., 30-31 мая 2007): Тез. докл. – М., 2007. – С. 57-58.
169. Холоденко И.В., Ярыгин К.Н., Губский Л.В. и др. Внутривенная ксенотрансплантация мезенхимальных стволовых клеток плаценты человека крысам: сравнительная оценка хоуминга в головном мозге в двух моделях экспериментального ишемического инсульта // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. – № 3. – С. 123-128.
170. Цыб А.Ф., Рошаль Л.М., Юшаков В.В. и др. Морфофункциональное изучение терапевтического эффекта аутологичных мезенхимальных стволовых клеток при экспериментальном диффузном поражении головного мозга у крыс // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2006. – Т. 142, № 1. – С. 140-147.
171. Цымбалюк В.И., Медведев В.В. Нейрогенные стволовые клетки. – Киев, 2005. – 596 с.
172. Чельшев Ю.А., Богов А.А., Гельфанд Л.З. и др. Клеточные технологии для нейрорегенерации. Британско-российское совещание о сотрудничестве с Европейской Комиссией «Стволовые клетки: законодательство, исследования и инновации. Международные перспективы сотрудничества» (М., 15 марта 2007): Тез. докл. – Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» <http://www.cbio.ru/>. – С. 225-228.
173. Ченцова Е.В., Купрашвили И.Т., Зуева М.В. и др. Влияние ксенотрансплантации нейтральных стволовых/прогениторных клеток из «обонятель-

ного эпителия» на функциональную активность сетчатки после моделирования ишемии // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. II, № 4. – С. 33-35.

174. Черных В.А., Пронкина Н.В., Ступак В.В. и др. Циркулирующие гемопозитические и эндотелиальные предшественники в периферической крови пациентов с черепно-мозговой травмой // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. VI, № 2. – С. 33-35.

175. Черных Е.Р., Ступак В.В., Васильев И.А. и др. Мезенхимальные клетки в лечении очагового повреждения головного мозга крыс, индуцированного нарушением венозного кровотока // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 2. – С. 77-83.

176. Чертков И.Л., Дризе Н.И., Воробьев Ф.И. Схема кроветворения // Тер. архив. – 2005, № 7. – С. 5-12.

177. Чехонин В.П., Лебедев С.В., Волков А.И. Активация экспрессии мозгового нейротрофического фактора в зоне имплантации аллогенных и ксеногенных стволовых (прогениторных) клеток нервной ткани у крыс с ишемическим корковым инсультом // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – № 4. – С. 195-199.

178. Шаймарданова Г.Ф., Челышев Ю.А., Лебедев С.В. и др. Посттравматические реакции спинного мозга крысы при трансплантации клеток обонятельной выстилки человека // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. 7, № 2. – С. 92-96.

179. Шаманская Т.В., Астрелина Т.А., Подколзина Э.А. и др. Использование пуповинной крови при проведении аллогенной трансплантации гемопозитических стволовых клеток у детей (опыт работы Московского банка стволовых клеток) // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. V, № 2. – С. 29-35.

180. Шаповалова В.В., Сычева Е.В., Семченко В.В. и др. Особенности реорганизации гиппокампа белых крыс после ксенотрансплантации стволовых клеток пуповинной крови в посттравматическом периоде // Морфология. – 2006. – Т. 129, № 4. – С. 129.

181. Шепитько В.И., Якушко Е.С. Влияние трансплантации криоконсервированной плаценты на течение экспериментального неврита зрительного нерва // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. V, № 3. – С. 54-55.

182. Южаков В.В., Коноплянников А.Г., Цыб А.Ф. и др. Действие аутологичных мезенхимальных стволовых клеток на репаративные процессы в нервной ткани при диффузной травме головного мозга крыс // Ежег. Всерос. и междунар. науч. конф. «Стволовые клетки и перспективы их использования в здравоохранении» (М., 30-31 мая 2007): Тез. докл. – М., 2007. – С. 16-18.

183. Яблонская М.И., Алферова В.В., Гребенникова Н.Н. и др. Изменение психофизиологических функций у детей раннего возраста с синдромом Дауна под влиянием терапии фетальными тканями человека // Бюл. экп. биол. мед. – 1998. – Т. 126. прил. № 1. – С. 47-53.

184. Ярыгин В.Н. Динамика компенсаторных процессов в популяции симпатических нейроцитов // Цитологические механизмы гистогенезов. - М.: Наука, 1979. – С. 186-196.
185. Ярыгин В.Н. Тканевые клеточные системы – основа биомедицинских клеточных технологий нового поколения: контуры идеологии // Вестник РАМН. – 2004 - № 9. – С. 12-19.
186. Ярыгин В.Н., Банин В.В., Ярыгин К.Н., Брюховецкий А.С. Регенерация спинного мозга крыс после торакальной сегментэктомии: рост и восстановление нервных проводников // Морфология. – 2006. – Т. 129, № 1. – С. 30-43.
187. Ярыгин К.Н. Роль резидентных и циркулирующих стволовых клеток в физиологической и репаративной регенерации // Патол. физиол. эксп. тер. – 2008. - № 1. – С. 2-8.
188. Allen E. The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat // J. Comp. Neurol. – 1912. – V. 22. – P. 547–568.
189. Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? // Science. – 1962. – V. 135. – P. 1127-1128.
190. Altman J., Das G.D. Post-natal origin of microneurons in the rat brain // Nature. – 1965. – V. 207. – P. 953–956.
191. Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J.M. et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes // Nature. – 2003. – V. 425. – P. 968-973.
192. Anderson D.J., Gage F.H., Weissman I.L. Can stem cells cross lineage boundaries? // Nat. Med. – 2001. – N 7. – P. 393-395.
193. Anolik J., Sanz I., Looney R.J. B cell depletion therapy in systemic lupus erythema-tosus // Curr. Rheumatol. Rep. – 2003. – V. 5, N 5. – P. 350-356.
194. Aramant R.B., Seiler J. Progress in retinal sheet transplantation // Prog. Retin/ Eye Res. – 2004. V. 23, N 5. – P. 475-494.
195. Arvidsson A., Collin T., Kirik D. et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke // Nature medicine. – 2002. – V. 8, N 9. – P. 963-970.
196. Arzoo K., Sadeghi S., Liebman H. et al. Treatment of refractory antibody mediated autoimmune disorders with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) // Ann. Rheum. Dis. – 2002. – V. 61. – P. 922-924.
197. Ashjian P.H., Elbarbary A.S., Edmonds B. et al. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors // Plast. Reconstr. Surg. – 2003. – V. 111, N 6. – P. 1922-1931.
198. Avwenagha O., Campbell G., Bird M.M. The outgrowth response of the axons of developing and regenerating rat retinal ganglion cells in vitro to neurotrophin treatment // J. of Neurocytology. – 2003. – V. 32. – P. 1055-75.
199. Azanchi R., Bernal G., Gupta R., Keirstead H.S. Combined demyelination plus Schwann cell transplantation therapy increases spread of cells and axonal regeneration following confusion injury // J. Neurotrauma. – 2004. – V. 21. – P. 775-88.
200. Azari M.F., Mathias L., Ozturk E. et al. Mesenchymal stem cells for treatment of CNS injury // Curr. Neuropharmacol. – 2010. – V.8, N 4. – P. 316-323.

201. Azizi S.A., Stokes D., Augelli B.J. et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats similarities to astrocyte grafts // *PNAS*. – 1998. – V. 95, N 7. – P. 3908-3913.
202. Bachoud-Levi A.-C., Hantraye P., Peschanski M. Fetal neural grafts Huntington's disease: a prospective view // *Mov. Disord.* – 2002. – V. 17. – P. 439-444.
203. Bachrach E., Li S., Perez A.L. et al. Systemic delivery of human microdystrophin to regenerating mouse dystrophic muscle by muscle progenitor cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2004. – V. 101. – P. 3581-3586.
204. Balmer J.E., Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid // *Lipid Res.* – 2002. – V. 43, N 11. – P. 1773-1808.
205. Bang O.Y., Lee J.S., Lee P.H., Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients // *Ann. Neurol.* – 2005. – V. 57, N 6. – P. 874-882.
206. Barker R.A., de Beaufort I. Scientific and ethical issues related to stem cell research and interventions in neurodegenerative disorders of the brain // *Prog Neurobiol.* – 2013. – V. 110. – P. 63-73.
207. Barnett S. C., Riddell J. S. Olfactory ensheathing cells (OECs) and the treatment of CNS injury: advantages and possible caveats // *J. Anat.* – 2004. – V. 204. – P. 57-67.
208. Barry F.P., Murphy J.M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2004. – V. 36. – P. 568-584.
209. Belachew S., Chittajallu R., Aguirre A.A. et al. Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons // *J. Cell. Biol.* – 2003. – V. 161, N 1. – P. 169-186.
210. Ben-Hur T., Fainstein N., Nishri Y. Cell-based reparative therapies for multiple sclerosis // *Curr Neurol Neurosci Rep.* – 2013. – V. 13, N 11. – P. 397.
211. Bennett L., Yang M., Enikolopov G., Iacovitti L. Circumventricular organs: a novel site of neural stem cells in the adult brain // *Mol. Cell Neurosci.* – 2009. – V. 41, N 3. – P. 337-347.
212. Benraiss A., Chmielnicki E., Lerner K. et al. Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain // *J. Neurosci.* – 2001. – V. 21. – P. 6718-6731.
213. Bernardo M.E., Zaffaroni N., Novara F. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms // *Cancer Res.* – 2007. – V. 67, N 19. – P. 9142-9149.
214. Berninger B., Costa M.R., Koch U. et al. Functional properties of neurons derived from in vitro reprogrammed postnatal astroglia // *J. Neurosci.* – 2007. – V. 27. – P. 8654-8664.
215. Bernreuther C., Dihne M., Johann V. et al. Neural cell adhesion molecule L1 -transfected embryonic stem cells promote functional recovery after excitotoxic lesion of the mouse striatum // *J. Neurosci.* – 2006. – V. 26, N 45. – P. 1153-1129.

216. Bertani N., Malatesta P., Volpi G. et al. Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray // *Journal of Cell Science.* — 2005. — Vol. 118, Pt. 17. — P. 3925-3936.
217. Bhakta S., Hong P., Koc O. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 in vitro but does not decrease apoptosis under serum deprivation // *Cardiovasc. Resusc. Med.* — 2006. — N 7. — P. 19-24.
218. Bhang S., Lee Y., Cho S-W. et al. Basic fibroblast growth factor promotes bone marrow stromal cell transplantation-mediated neural regeneration in traumatic brain injury // *Biochem. Biophys. Res. Com.* — 2007. — N 359. — P. 40-45.
219. Bianco J.I., Perry C, Harkin D.G. et al. Neurotrophin 3 Promotes Purification and Proliferation of Olfactory Ensheathing Cells From Human Nose // *Glia.* — 2004. — V. 45. — P. 111-123.
220. Bicknese A.R., Goodwin H.S., Quinn CO. et al. Human umbilical cord blood cells can be induced to express markers for neurons and glia // *Cell Transplant.* — 2002. — V. 11, N 3. — P. 261-264.
221. Bidic S.M.S., Calvert J.W., Marra K. et al. Rabbit Calvarial Wound Healing by Means of Seeded Caprotite® Scaffolds // *J. Dent. Res.* — 2003. — V. 82, N 2. — P. 131-135.
222. Bjerkvig R., Tysnes B.B., Aboody K.S. et al. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights // *Nat. Rev. Cancer.* — 2005. — N 5. — P. 899-904.
223. Blau H.M., Brazelton T.R., Weimann J.M. The evolving concept of a stem cell: entity or function? // *Cell.* — 2001. — V. 105. — P. 829-841.
224. Blenkinsop T.A., Corneo B., [...], and Jeffrey H. Stem ophthalmologic stem cell transplantation therapies // *Regen Med.* — 2012. — V. 6, N7. — P. 32-39.
225. Boda E., Buffo A. Glial cells in non-germinal territories: insights into their stem/progenitor properties in the intact and injured nervous tissue // *Arch. Ital. Biol.* — 2010. — V. 148, N 2. — P. 119-136.
226. Bonab M.M., Alimoghaddam K., Talebian F. et al. Aging of mesenchymal stem cell in vitro // *BMC Cell Biology.* — 2006. — N 7. — P. 14.
227. Borlongan C.V., Hadman M., Sanberg C.D., Sanberg P.R. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke // *Stroke.* — 2004. — V. 35. — P. 2385-2389.
228. Brandt M.D., Jessberger S., Steiner B. et al. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice // *Mol. Cell Neurosci.* — 2003. — V. 24. — P. 603–613.
229. Breedveld F., Agarwal S., Yin M. et al. Rituximab pharmacokinetics in patients with rheumatoid arthritis: B-cell levels do not correlate with clinical response // *Clin. Pharmacol.* — 2007. — V. 47. — P. 1119-1128.
230. Browning J.L. B cell move to centre stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment // *Nat. Rev. Drug Disc.* — 2006. — N 5. — P. 564-576.
231. Bruni J.E. Ependymal development, proliferation, and functions: A review // *Microsc. Res. Tech.* — 1998. — V.41. — P. 2–13.

232. Brzoska M., Geiger H., Gauer S., Baer P. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – V. 330, N 1. – P. 142-150.
233. Buffo A., Rite I., Tripathi P. et al. Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – V. 105. – P. 3581-3586.
234. Butt A.M., Kiff J., Hubbard P., Berry M. Synantocytes: new functions for novel NG2 expressing glia // *J. Neurocytol.* – 2002. – V. 31. – P. 551-565.
235. Buzanska L., Machaj E.K., Zablocka B. et al. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro // *J. Cell Sci.* – 2002. – V. 115, Pt. 10. – P. 2131-2138.
236. Buzanska L., Machaj E.X., Zablocka B. et al. Human cord blood derived neurons, astrocytes and oligodendrocytes // *Toxicol. In Vitro.* – 2005. – V. 19, N 7. – P. 991-999.
237. Cai Y., Xiong K., Chu Y., Luo D. W. et al. Doublecortin expression in adult cat and primate cerebral cortex relates to immature neurons that develop into GABAergic subgroups // *Exp. Neurol.* – 2009. – V. 216. – P. 342-356.
238. Calabresi P., Centonze D., Pisani A. et al. Synaptic plasticity in the ischaemic brain // *Lancet Neurol.* – 2003. – V. 2, N 10. – P. 622-629.
239. Cameron H.A., McKay R.D. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus // *J. Comp. Neurol.* – 2001. – V. 435, N 4. – P. 406-417.
240. Cao L., Jiao X., Zuzga D.S., Liu Y. et al. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory // *Nat. Genet.* – 2004. – V. 36. – P. 827-835.
241. Cao Y., Hong A., Schulten H. et al. Update on therapeutic neovascularization // *Cardiovasc. Res.* – 2005. – V. 65. – P. 639-648.
242. Cao Y., Sun Z, Liao L. et al. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – V. 332. – P. 370-379.
243. Carbone P.P., Kaplan H.S., Musshoff K. et al. Report on the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification // *Cancer Res.* – 1971. – V. 31. – P. 1860-1861.
244. Career L.A., MacDonald J.L, Roskams A.J. et al Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype // *J. Neurosci.* – 2004. – V. 24, N 25. – P. 5670-5683.
245. Carlson B.M. Principles of regenerative biology. Elsevier Inc., Amsterdam, Boston, 2007.
246. Carr A.J., Smart M.J., Ramsden C.M. et al. Development of human embryonic stem cell therapies for age-related macular degeneration // *Trends Neurosci.* – 2013. – V. 36, N 7. – P. 385-395.
247. Carter L.A., MacDonald J.L., Roskams A.J. et al. Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype // *J. Neurosci.* – 2004. – V. 24. – P. 5670-5683.

248. Castro R.F., Jackson K.A., Goodell M.A. et al. Failure of BM cells to transdifferentiate into neural cells in vivo // *Science*. – 2002. – V. 297, Issue 5585. – P. 1299.
249. Cattaneo E., Mc Kay R. Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor // *Nature*. – 1990. – V. 347. – P.762-765.
250. Cavazos J.E., Cross D.J. The role of synaptic reorganization in mesial temporal lobe epilepsy // *Epilepsy Behav.* – 2006. – V. 8, N 3. – P.483-493.
251. Cepeda C., Wu N., André V.M. et al. The corticostriatal pathway in Huntington's disease // *Prog.Neurobiol.* – 2007. – V. 81, N 5–6. – P. 253–271.
252. Chen J., Bernreuther C, Dihne M., Schachner M. Cell adhesion molecule 11-transfected embryonic stem cells with enhanced survival support regrowth of corticospinal tract axons in mice after spinal cord injury // *J. Neurotrauma*. – 2005. – V. 22, N 8. – P. 896-906.
253. Chen J., Li Y., Wang L. et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats // *Stroke*. – 2001. – N 32. – P. 1005-1011.
254. Chen J., Li Yi, Wang L., et al. Combination therapy of stroke in rats with a nitric oxide donor and human bone marrow stromal cells enhances angiogenesis and neurogenesis // *Brain Res.* – 2004. – V. 1005. – P. 21-28.
255. Chen J., Sanberg P.R., Li Y. et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats // *Stroke*. – 2001. – V. 32, N 11. – P. 2682-2688.
256. Chen J., Zhang G. Z., Li Y. et al. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats // *Circ. Res.* – 2003. – V. 92. – P. 692-699.
257. Chen X., Armstrong M., Li G. Mesenchymal stem cells in immunoregulation // *Immunol. Cell Biol.* – 2006. – V. 84, N 5. – P. 413-421.
258. Chen X., Fang H., Schwob J. Multipotency of purified, transplanted globose basal cells in olfactory epithelium // *J. Comp. Neurol.* – 2004. – V. 469, N 4. – P. 457-474.
259. Chen X., Katakowski M., Ki Y. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production // *J. Neurosci. Res.* – 2002. – V. 69, N 5. – P. 687-691.
260. Chen X., Li Yi, Wang L., et al. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production // *Neuropathology*. – 2002. – V. 22. – P. 275-279.
261. Chmielnicki E., Benraiss A., Economides A.N., Goldman S.A. Adenovirally expressed noggin and brain-derived neurotrophic factor cooperate to induce new medium spiny neurons from resident progenitor cells in the adult striatal ventricular zone // *J. Neurosci.* – 2004. – V. 24. – P. 2133–2142.
262. Choong P.F., Mok P.L., Cheong S.K. et al. Generating neuron-like cells from BM-derived mesenchymal stromal cells in vitro // *Cytherapy*. – 2007. – Vol. 9, №2. – pp. 170-183.
263. Chopp M., Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells // *Lancet Neurology*. 2002. – Vol. 1, №2. – P. 92-100.

264. Cicchetti F., Fodor W., Deacon T.W. et al. Immune parameters relevant to neural xenograft survival in the primate brain // *Xenotransplantation*. – 2003. – N 10. – P. 41-49.
265. Cizkova D., Rosocha J., Vanicky I. et al. Transplants of Human Mesenchymal Stem Cells Improve Functional Recovery After Spinal Cord Injury in the Rat // *Cell. Mol. Neurobiol.* – 2006. – V. 26, N 7-8. – P. 1165-1178.
266. Clarke M., Dick J., Dirks P. et al. Cancer Stem Cells-Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells // *Cancer Res.* – 2006. – V. 66. – P. 9339-9344.
267. Cohen S.B., Greenwald M., Dougados M.R. et al. Efficacy and safety of rituximab in active RA patients who experienced an inadequate response to one or more anti-TNF- α therapies (REFLEX study) // *Arthr. Rheum.* – 2005. – V. 52. – P. 677.
268. Collazos-Castro J.E., Muneton-Gomez V.C., Nieto-Sampedro M. Olfactory glia transplantation into cervical spinal cord contusion injuries // *J. Neurosurg. Spine*. – 2005. – V. 3, N 4. – P. 308-317.
269. Collin T., Arvidsson A., Kokaia Z., Lindvall O. Quantitative analysis of the generation of different striatal neuronal subtypes in the adult brain following excitotoxic injury // *Exp. Neurol.* – 2005. – V. 195. – P. 71–80.
270. Colucci-D'Amato L., Bonavita V., di Porzio U. The end of the central dogma of neurobiology: stem cells and neurogenesis in adult CNS // *Neurol. Sci.* – 2006. – V. 27. – P. 266–270.
271. Compagnucci C., Nizzardo M., Corti S., Zanni G., Bertini E. In vitro neurogenesis: development and functional implications of iPSC technology // *Cell Mol Life Sci.* – 2014. – V. 71, N 9. – P.1623-1639.
272. Cramer A.O., MacLaren R.E. Translating induced pluripotent stem cells from bench to bedside: application to retinal diseases // *Curr Gene Ther.* – 2013. – V. 13, N 2. – P. 139-151.
273. Crisostomo P.R., Markel T.Д., Wang M. et al. In the adult mesenchymal stem cell population, source gender is a biologically relevant aspect of protective power // *Surgery*. – 2007. – V. 142, N 2. – P. 215-221.
274. Cullen B.R. Does RNA interference have a future as a treatment for HIV-1 induced disease? // *AIDS Rev.* – 2005. – V. 7, N 1. – P. 22-25.
275. Curry C.J., Stevenson R.E., Aughton D. et al. Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics // *Am. J. Med. Genet.* – 1997. – V. 72. – P. 468-477.
276. Curt A., Dietz V. Controversial treatments for spinal cord injuries – first reply correspondence // *Lancet*. – 2005. – N5. – P. 841.
277. Curtis M.A., Monzo H.J., Faull R.L. The rostral migratory stream and olfactory system: smell, disease and slippery cells // *Prog. Brain Res.* – 2009. – V. 175. – P. 33-42.
278. Cyranoski D. Paper chase // *Nature*. – 2005. – V. 437. – P. 810-811.
279. Cyranoski D. Patients warned about unproven spinal surgery // *Nature*. – 2006. – V. 440. – P. 850-851.

280. Cyranoski D. Japanese woman is first recipient of next-generation stem cells // *Nature News*. doi:10.1038/nature. 2014.15915.
281. Daneman D. Type I diabetes // *Lancet*. – 2006. – V. 367(9513). – P. 847-858.
282. Darsalia V., Heldmann U., Lindvall O., Kokaia Z. Stroke-induced neurogenesis in aged brain // *Stroke*. – 2005. – V. 36, N 8. – P. 1790-1795.
283. Dawson M.R.L., Polito A., Levine J.M., Reynolds R. NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS // *Mol. Cell. Neurosci.* – 2003. – V. 24. – P. 476-488.
284. de Munter J.P., Melamed E., Wolters E.Ch. Stem cell grafting in parkinsonism-why, how and when // *Parkinsonism Relat Disord.* – 2014. – V. 20, N 1. – P. 150-153.
285. Delgado R., Regueiro B.J. The future of HIV infection: gene therapy and RNA interference. – *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* – 2005. – V. 23, Suppl. II. – P. 76-83.
286. Dell'Agnola C., Wang Z., Storb R. et al. Hematopoietic stem cell transplantation does not restore dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy dogs // *Blood*. – 2004. – V. 104, N 13. – P. 4311-4318.
287. Deng J., Petersen B.E., Steindler D.A. et al. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation // *Stem Cells*. 2006. – Vol. 24, N 4. – P. 1054-1064.
288. Deng W., Aimone J.B., Gage F.H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2010. – V. 11, N 5. – P. 339-350.
289. Devine S.M., Cobbs C., Jennings M. et al. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates // *Blood*. – 2003. – V. 101, N 8. – P. 2999-3001.
290. Devine S.M., Peter S., Martin B.J. et al. Mesenchymal stem cells: stealth and suppression // *Cancer J.* – 2001. – V. 7, Suppl. II. – P. 76-82.
291. Diel'tsova O.I., Herashchenko S.B., Chaikovskiy I.B. The stem cells and a problem of regeneration of peripheral nerves // *Klin Khir.* – 2013. – N.7. – P. 65-68.
292. Dinsmore J.H., Martin J., Siegan J. et al. CNS grafts for treatment of neurologic disorders. // *Methods of tissue engineering*, Ed 1, – San Diego: Academic Press, 2002 – P. 1127-1134..
293. Doetsch F. The glial identity of neural stem cells // *Nat. Neurosci.* – 2003. – N 6. – P. 1127-1134.
294. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stem cells: The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy*. – 2006. – N 8. – P. 315-317.
295. Duan X., Kang E., Liu C.Y. et al. Development of neural stem cell in the adult brain // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2008. – V. 18, N 1. – P. 108-115.
296. Dunnett S.B., Rosser A.E. Cell therapy in Huntington's disease // *NeuroRx*. – 2004. – V. 1, N 4. – P. 394-405.
297. Durbeej M., Campbell K.P. Muscular dystrophies involving the dystrophinglycoprotein complex: an overview of current mouse models // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2002. – N 12. – P. 349-361.

298. Dutta S., Singh G., Sreejith S. et al. Cell therapy: the final frontier for treatment of neurological diseases // *CNS Neurosci Ther.* – 2013. – V. 19, N 1. – P. 5-11.
299. Ebrahimi-Gaillard A., Beck T., Gaillard F. et al. Transplants of embryonic cortical tissue placed in the previously damaged frontal cortex of adult rats: local cerebral glucose utilization following execution of forelimb movements // *Neuroscience.* – 1995. – V. 64, N 1. – P. 49-60.
300. Emery A.E. The muscular dystrophies // *Lancet.* – 2002. – V. 359. – P. 687-695.
301. English D., Sharma N.K., Sharma K., Anand A. Neural stem cells-trends and advances // *J Cell Biochem.* – 2013. – V. 114, N4. – P. 764-72.
302. Ereniev S.I., Semchenko V.V., Mikhel G.V. et al. The effect of the embryonic nervous tissue transplants on the phenotypically and genotypically determined high seizure readiness of the brain // *Soviet-Indian symposium on neuro-transplantation and developmental neurobiology (Juli 1-5, 1991): Abstracts.* – Puschino, 1991. – P. 6-7.
303. Ereniev S.I., Stepanov S.S., Semchenko V.V. Synaptic architectonics of the molecular layer of the cerebral cortex of rats during audiogenic epileptiform attacks against the background of regulation of the level of cerebral convulsive readiness // *Neuroscience and Behavioral Physiology.* – 1992. – V. 22, N 6. – P. 533-536.
304. Euler de Souza Lucena E., Guzen F.P., Lopes de Paiva Cavalcanti J.R. et al. Experimental considerations concerning the use of stem cells and tissue engineering for facial nerve regeneration: a systematic review // *J Oral Maxillofac Surg.* – 2014. – V. 72, N 5. – P. 1001-1012.
305. Evans J.R., Mason S.L., Barker R.A. Current status of clinical trials of neural transplantation in Parkinson's disease // *Prog Brain Res.* – 2012. – V. 200. – P. 169-198.
306. Facchiano F., Fernandez E., Mancarella S. et al. Promotion of regeneration of corticospinal tract axons in rats with recombinant vascular endothelial growth factor alone and combined with adenovirus coding for this factor // *J. Neurosurg.* – 2002. – V. 97, N 1. – P. 161-168.
307. Fall J.L., Perry C., Harkin D.G. et al. Neurotrophin 3 Promotes Purification and Proliferation of Olfactory Ensheathing Cells From Human Nose // *Glia.* – 2004. – V. 45, N 2. – P. 111-213.
308. Fanning G., Amado R., Symonds G. Gene therapy for HIV/AIDS: the potential for a new therapeutic regimen // *J. Gene Med.* – 2003. – N 5. – P. 645-563.
309. Faulkner S.D., Vawda R., Fehlings M.G. Adult-derived pluripotent stem cells // *World Neurosurg.* – 2013.
310. Fe'ron F., Perry C., Cochrane J. et al. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury // *Brain.* – 2005. – V. 128. – P. 2951-2960.
311. Ferrari G., Stornaiuolo A., Mavilio F. Failure to correct murine muscular dystrophy // *Nature.* – 2001. – V. 411. – P. 1014-1055.
312. Fischer A. et al. AntiTh/To-positivity in a cohort of patients with idiopathic pulmonary fibrosis // *J. Rheumatol.* – 2006. – V. 33. – P. 1600-1605.

313. Freed C.R., Greene P.E., Breeze R.E. et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease // *N. Engl. J. Med.* – 2001. – V. 344. – P. 710-719.
314. Fu Y.S., Shih Y.T., Cheng Y.C., Min M.Y. Transformation of human umbilical mesenchymal cells into neurons in vitro // *J. Biomed. Sci.* – 2004. – N 11. – P. 652-660.
315. Fujiki M., Furukawa Y., Kobayashi H. et al. Geranylgeranylacetone limits secondary injury, neuronal death, and progressive necrosis and cavitation after spinal cord injury // *Brain Res.* – 2005. – V. 1053, N 1-2. – P. 175-184.
316. Fujimura J., Ogawa R., Mizuno H. et al. Neural differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – V. 333, N 1. – P. 116-121.
317. Fujiwara Y., Tanaka N., Ishida O. et al. Intravenously injected neural progenitor cells of transgenic rats can migrate to the injured spinal cord and differentiate into neurons, astrocytes and oligodendrocytes // *Neurosci. Lett.* – 2004. – V. 366, N 3. – P. 287-291.
318. Fulmer T. Low-Rhes approach to Huntington's // *SciBX.* – 2009. – V. 2, N 25. – doi:10.1038/scibx.2009.993.
319. Furtado S., Sossi V., Hauser R.A. et al. Positron emission tomography after fetal transplantation in Huntingtons disease // *Ann. Neurol.* – 2005. – V. 58. – P. 331-337.
320. Gage F. Mammalian Neural Stem Cells // *Science.* – 2000. – V. 287. – P. 1433–1442.
321. Gage F.H., Kempermann G., Song H., eds. *Adult Neurogenesis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2008.
322. Galvez B.G., Sampaolesi M., Brunelli S. et al. Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability // *J. Cell Biol.* – 2006. – V. 174. – P. 231-243.
323. Ganat Y.M., Silbereis J., Cave C. et al. Early postnatal astroglial cells produce multilineage precursors and neural stem cells in vivo // *J. Neurosci.* – 2006. – 26. – P. 8609-8621.
324. Geiger J.D., Hutchinson R.J., Hohenkirk L.F. et al. Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression // *Cancer Res.* – 2001. – V. 61. – P. 8513-8519.
325. Geinisman Y., Berry R.W., Disterhoft J.F. et al. Associative learning elicits the formation of multiple-synapse boutons // *J. Neurosci.* – 2001. – V. 21. – P. 5568-5573.
326. Geinisman Y., de Toledo-Morrell L., Morrell F. et al. Synapse restructuring associated with the maintenance phase of hippocampal long-term potentiation // *J. Comp. Neurol.* – 1996. – V. 36, N 3. – P. 413-423.
327. Gekas C., Dieterlen-Lievre F., Orkin S., Mikkola H. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells // *Dev. Cell.* – 2005. – N 8. – P. 365-375.

328. Gelber AC et al. Distinct recognition of antibodies to centromere proteins in primary Sjogren's syndrome compared with limited scleroderma // *Ann Rheum Dis.* – 2006. – V. 65. – P. 1028-1032.
329. Gil J.M., Rego A.C. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease // *Eur. J. Neurosci.* – 2008. – V. 27, N 11. – P. 2803–2820.
330. Gil-Perotin S., Duran-Moreno M., Cebrián-Silla A. et al. Adult neural stem cells from the subventricular zone: a review of the neurosphere assay // *Anat Rec (Hoboken).* – 2013. – V. 296, N 9. – P. 1435-1452.
331. Godin L., Cumano A. The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race // *Nat. Rev. Immunol.* – 2002. – N 2. – P. 593-604.
332. Goldschlager T., Oehme D., Ghosh P. et al. Current and future applications for stem cell therapies in spine surgery // *Curr Stem Cell Res Ther.* – 2013. – V. 8, N 5. – P. 381-393.
333. Gomez-Climent M.A., Guirado R., Varea E., Nacher J. “Arrested development”. Immature, but not recently generated, neurons in the adult brain // *Arch. Ital. Biol.* – 2010. – V. 148, N 2. – P. 159-172.
334. Gould E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2007. – N 8. – P. 481–488.
335. Grade S., Bernardino L., Malva J.O. Oligodendrogenesis from neural stem cells: perspectives for remyelinating strategies // *Int J Dev Neurosci.* – 2013. V. 31, N7. – P.692-700.
336. Greenberg D.A., Jin K. Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke // *Cell Mol Life Sci.* – 2013. – V. 70, N 10. – P. 1753-1761.
337. Guest J., Herrera L.P., Qian T. Rapid recovery of segmental neurological function in a tetraplegic patient following transplantation of fetal olfactory bulb-derived cells // *Spinal Cord AOP*, 6 September – 2005.
338. Hack M.A., Saghatelian A., de Chevigny A. et al. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis // *Nat. Neurosci.* – 2005. – N 8. – P. 865-872.
339. Hamasaki T., Hirakawa K., Toyama K. Electrophysiological and histological study of synaptic connections between late ral geniculate transplant and host visual cortex // *Appl. Neurophysiol.* – 1987. – V. 50. – P. 463-464.
340. Hanahan D. and Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer // *Cell.* – 2000. – V.100 – P. 57-70.
341. Haraoui B., Bokareva M., Kallmeyer I., Bykerk V. ACR and DAS 28 response over 24 weeks in RA patients treated with rituximab after an inadequate response to one TNF inhibitor // *Ann. Rheum. Dis.* – 2008. – V. 67 (Suppl. II). (ABO360).
342. Hauser R.A., Furtado S., Cimino C.R. et al. Bilateral human fetal striatal transplantation in Huntingtons disease // *Neurology.* – 2002. – V. 58. – P. 687-695.
343. Hauser R.A., Sandberg P.R., Freeman T.B., Stoessl A.J. Bilateral human fetal striatal transplantation in Huntington's disease // *Neurology.* – 2002. – V. 58, N 11. – P. 1704.

344. Hayashi S., McMahon A.P. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse // *Dev. Biol.* – 2002. – V. 244, N 2. – P. 305–318.
345. Hayes KG, Wolfe D.L, Hsieh J.T. et al. Clinical and electrophysiologic correlates of quantitative sensory testing in patients with incomplete spinal cord injury // *Arch Physical Med. Rehabil.* – 2002. – V. 83, N 11. – P. 1612-1619.
346. Heins N., Malatesta P., Cecconi F. et al. Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6 // *Nat. Neurosci.* – 2002. – N 5. – P. 308-315.
347. Hendricks W.A., Pak E.S., Owensby J.P. et al. Predifferentiated embryonic stem cells prevent chronic pain behaviors and restore sensory function following spinal cord injury in mice // *Mol. Med.* – 2006. – V. 12, N 1-3. – P. 34-46.
348. Hermann A., Storch A. Induced neural stem cells (iNSCs) in neurodegenerative diseases // *J Neural Transm.* – 2013 – V.120, N 1. – P. 19-25.
349. Hesselstrand R et al. The association of antinuclear antibodies with organ involvement and survival in systemic sclerosis // *Rheumatology (Oxford).* – 2003. – P. 534-540.
350. Hibaoui Y., Grad I., Letourneau A. et al. Modelling and rescuing neurodevelopmental defect of Down syndrome using induced pluripotent stem cells from monozygotic twins discordant for trisomy 21 // *EMBO Mol. Med.* – 2014. – V. 6. – P. 259-277.
351. Hitoshi S., Shimizu T., Ikenaka K. Regenerative strategy for autoimmune neurological diseases using neural stem cells // *Nihon Rinsho.* – 2013. – V. 71, N5. – P. 795-800.
352. Ho T.K., Rajkumar V., Black D.C. et al. Critical Limb Ischemia Classification and Therapeutic Angiogenesis // *International J. Angiology.* – 2005. – V. 14. – P. 49-59.
353. Hochedlinger K., Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – V. 349. – P. 275-286.
354. Hodge R.D., Kowalczyk T.D., Wolf S.A. et al. Intermediate progenitors in adult hippocampal neurogenesis: Tbr2 expression and coordinate regulation of neuronal output // *J. Neurosci.* – 2008. – V. 28, N 14. – P. 3707-3717.
355. Hofstetter C., Holmstrom N., Lilja J. et al. Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts and directed differentiation improves outcome // *Nat. Neurosci.* – 2008. – V. 8, N 3. – P. 259-260.
356. Horner P.J., Power A.E., Kempermann G. et al. Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord // *Neurosci.* – 2000. – V. 20. – P. 2218-2228.
357. Hsu Y-C., Chen S-L, Wang D-Y, Chiu I-M. Stem Cell-Based Therapy in Neural Repair // *Biomedical Journal.* 2013. – V. 36, N 3. – P. 98-105.
358. Huang H., Chen L., Wang H. et al. Influence of patients' age on functional recovery after transplantation of olfactory ensheathing cells into injured spinal cord injury // *Chin. Med. J. (Engl).* – 2003. – V. 116. – P. 1488-1491.

359. Ichim T.E. et al. Stem Cell Therapy for Autism // *Journal of Translational Medicine*, 2007: www.cmbt.su.
360. Ikeda Y., Fukuda N., Wada M. et al. Development of angiogenic cell and gene therapy by transplantation of umbilical cord blood with vascular endothelial growth factor gene // *Hypertens. Res.* – 2004. – V. 27, N 2. – P. 119-128.
361. Ikenaga S. et al. Autologous bone marrow implantation induced angiogenesis and improved deteriorated exercise capacity in a rat ischemic hindlimb model // *J. Surg. Res.* – 2001. – V. 96. – P. 277-283.
362. Imaizumi Y., Okano H. Modeling human neurological disorders with induced pluripotent stem cells // *J Neurochem.* – 2014. – V.129, N3. – P. 388-399.
363. Imayoshi I., Sakamoto M., Ohtsuka T. et al. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain // *Nat. Neurosci.* – 2008. – N 11. – P. 1153-1161.
364. Islamov R.R., Chintalgattu V., Pak E.S. et al. Induction of VEGF and its Flt-1 receptor after sciatic nerve crush injury // *Neuroreport.* – 2004. – V. 15, N 13. – P. 2117-2121.
365. Issarachai S., Priestley G.V., Nakamoto B. Cells with hemopoietic potential residing in muscle are itinerant bone marrow-derived cells // *Exp. Hematol.* – 2002. – V. 30. – P. 366-373.
366. Iwanami A., Kaneko S., Nakamura M. et al. Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates // *J. Neurosci. Res.* – 2005. – V. 80, N 2. – P. 182-190.
367. Jaber M., Benoit-Marand M., Prestoz L., Gaillard A. Cell transplantation in the damaged adult brain // *Rev Neurol (Paris).* – 2013. – V. 169, N 11. – P. 838-843.
368. Jaenisch R. Human cloning – the science and ethics of nuclear transplantation // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – V. 351. – P. 2787-2791.
369. Jang Y.K., Park J.J., Lee M.C. et al. Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells // *J. Neurosci. Res.* – 2004. – V. 75, N 4. – P. 573-584.
370. Jeong J.A., Gang E.J., Hong S.H. et al. Rapid neural differentiation of human cord blood-derived mesenchymal stem cells // *Neuroreport.* – 2004. – V. 15, N 11. – P. 1731-1734.
371. Jeong S.W., Chu K., Jung K.H. et al. Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with experimental intracerebral hemorrhage // *Stroke.* – 2003. – V. 34. – P. 2258-2263.
372. Jesus V., Zurita M., Oya S., Santos M. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: Systemic or local administration? // *J. Neurosci. Lett.* – 2006. – V. 394, N 1. – P. 1-6.
373. Jiang M., Rubbi C.P., Milner J. Gel-based application of siRNA to human epithelial cancer cells induces RN Ai-dependent apoptosis // *Oligonucleotides.* – 2004. – V. 14, N 4. – P. 239-248.
374. Jiang W., Gu W., Brannstrom T. et al., Cortical neurogenesis in adult rats after transient middle cerebral artery occlusion // *Stroke.* – 2001. – V. 32, N 5. – P. 1201-1207.

375. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow // *Nature*. – 2002. – V. 418(6893). – P. 41-49.
376. Ji-Hong S., Hui Z., Yan-Sheng L. et al. Rudimentary study on transplantation of Schwann cells for the repair of acute complete spinal cord injury. First International Spinal Cord Injury Treatment and Trials Symposium. Abstracts and free papers. – Hong-Kong. – 2005.
377. Jim P., Taw A. Recovery and Regeneration after spinal cord injury: A Review and Summary of Recent Literature // *Ann. Acad. Med. Singapore*. – 2007. – V. 36. – P. 49-57.
378. Jin H.K., Carter J.E., Huntley G.W. et al. Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells into acid sphingomyelinase-deficient mice delays the onset of neurological abnormalities and extends their life span // *J. Clin. Invest.* – 2002. – V. 109. – P. 1183-1191.
379. Jin K., Minami M., Xie L. et al. Ischemia-induced neurogenesis is preserved but reduced in the aged rodent brain // *Aging Cel.* – 2004. – N 3. – P. 373-377.
380. Jin K., Wang X., Xie L. et al. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2006. – V. 103. – P. 13198-13202.
381. Joels M., Karst H., Alfarez D. et al. Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus // *Stress*. – 2004. – V. 7, N 4. – P. 221-231.
382. Johansson C.B., Momba S., Clarke D.L. et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system // *Cell*. – 1999. – V. 96. – P. 25-34.
383. Jongkamonwiwat N., Noisa P. Biomedical and clinical promises of human pluripotent stem cells for neurological disorders // *BioMed Research International*. – 2013. – 10 P. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/656531>
384. Josephson R. Molecular cytogenetics: making it safe for human embryonic stem cells to enter the clinic // *Expert. Rev. Mol. Diagn.* – 2007. – V. 7, N 4. – P. 395-406.
385. Josephson R., Sykes G., Liu Y. et al. A molecular scheme for improved characterization of human embryonic stem cell lines // *BMC Biology*. – 2006. – N 4. – P. 28.
386. Jurga M., Markiewicz I., Sarnowska A. et al. Neurogenic potential of human umbilical cord blood: neural-like stem cells depend on previous long-term culture conditions // *J. Neurosci. Res.* – 2006. – V. 83, N 4. – P. 627-37.
387. Kaddis F.G., Clarkson E.D., Bell K.P. et al. Co-grafts of muscle cells and mesencephalic tissue into hemiparkinsonian rats: behavioral and histochemical results. // *Brain Research Bulletin*. – 2000. – Vol. 51, №3. – P. 203-211.
388. Kakulas B.A. Neuropathology: the foundation for new treatments in spinal cord injury // *Spinal Cord*. – 2004. – V. 42, N 10. – P. 549-563.
389. Kaneko Y., Dailey T., and Borlongan C.V. The battle of the sexes for stroke therapy: Female- versus male-derived stem cells // *CNS Neurol Disord Drug Targets*. – 2013. – V. 12, N 3. – P. 405-412.

390. Kang J., Kang K., Koo H. et al. Soluble factors-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells // *Stem cells dev.* – 2008. – V. 17. – P. 681-694.
391. Kang K.-S., Kim S.W., Oh Y.H. et al. A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study // *Cytherapy.* – 2005. – N 7. – P. 368-373.
392. Kang S.K., Lee D.H., Bae Y.C. et al. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats // *Exp. Neurol.* – 2003. – V. 183. – P. 355-66.
393. Kanno H. Regenerative therapy for neuronal diseases with transplantation of somatic stem cells // *World J Stem Cells.* – 2013. – V. 5, N4. – P. 163-171.
394. Kaplan M.S., McNelly N.A., Hinds J.W. Population dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb // *J. Comp. Neurol.* – 1985. – V. 239, N 1. – P. 117-125.
395. Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., Skryabin N.A. et al. Array CGH analysis of a cohort of Russian patients with intellectual disability // *Gene.* – 2014. – V. 536. – № 1. – P. 145-150.
396. Kaslin J., Ganz J., Brand M. Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* – 2008. – V. 363. – P. 101-122.
397. Keene C.D., Sonnen J.A., Swanson P.D. et al. Neural transplantation in Huntington disease: long-term grafts in two patients // *Neurology.* – 2007. – V.68, N 24. – P. 2093-2098.
398. Keilhoff G., Goihl A., Langnase K., Fansa H., Wolf G. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells // *European Journal of Cell Biology.* 2006. – Vol. 85, N 1. – P. 11-24.
399. Kelsen J., Larsen M.H., Sorensen J.C. et al. Neuronal precursor cell proliferation in the hippocampus after transient cerebral ischemia: a comparative study of two rat strains using stereological tools // *Experimental & Translational Stroke Medicine.* – 2010. – V/ 2:8, <http://www.etsmjournal.com/content/2/1/8>.
400. Kempermann G., Fabel K., Ehninger D. et al. Why and how physical activity promotes experience-induced brain plasticity // *Front. Neurosci.* – 2010. – N 4, Article 18.
401. Kempermann G., Wiskott L., Gage F.H. Functional significance of adult neurogenesis // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2004. – V. 14. – P. 186-191.
402. Kernie S.G., Parent J.M. Forebrain neurogenesis after focal ischemic and traumatic brain injury // *Neurobiol Dis.* – 2010. – V. 37, N 2. – P. 267-274.
403. Kerr D.A., Llado J., Shamlott M.J. et al. Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury // *J. Neurosci.* – 2003. – V. 23, N 12. – P. 5131-5140.
404. Kim B.J., Seo J.H., Buben J.K., Oh Y.S. Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells in vitro // *Neuroreport.* – 2002. – V. 13, N 9. – P. 1185-1188.

405. Kim J.K., Choi B.H., Park H.C. et al. Effects of GM-CSF on the neural progenitor cells // *Neuroreport*. – 2004. – V. 15. – P. 2161-2165.
406. Kim S.U., Lee H.J., Kim Y.B. Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases // *Neuropathology*. – 2013. – V. 33, N5. – P. 491-504.
407. Kirov S.A., Harris K.M. Dendrites are more spiny on mature hippocampal neurons when synapses are inactivated // *Nat Neurosci*. – 1999. – V. 2, N10. – P. 878-883.
408. Kirov S.A., Petrak L.J., Fiala J.C., Harris K.M. Dendritic spines disappear with chilling but proliferate excessively upon rewarming of mature hippocampus // *Neuroscience*. – 2004. – V. 127. – P. 69-80.
409. Klassen H., Ziaieian B., Kirov II. et al. Isolation of retinal progenitor cells from post-mortem human tissue and comparison with autologous brain progenitors // *J. Neurosci. Res*. – 2004. – V. 77. – P. 334-343.
410. Knoller N., Auerbach G., Fulga V. et al. Clinical experience using incubated autologous macrophages as a treatment for complete spinal cord injury: phase I study results // *J. Neurosurg. Spine*. – 2005. – V. 3, N 3. – P. 173-181.
411. Knoth R., Singec I., Ditter M. et al. Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years // *PLoS ONE*. – 2010. – V. 5, N 1. – P. 880-889.
412. Koda M., Okada S., Nakayama T. et al. Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice // *Neuroreport*. – 2005. – V. 16, N 16. – P. 1763-1767.
413. Kohyama J., Abe H., Shimazaki T. Brain from bone: Efficient «meta-differentiation» of marrow stromaderived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent // *Differentiation*. – 2001. – V. 68. – P. 235-244.
414. Komitova M., Ericsson P.S. Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain // *Neurosci. Lett*. – 2004. – V. 369. – P. 24-27.
415. Kondo T., Raff M. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells // *Science*. – 2000. – V. 289. – P. 1754-1757.
416. Kondziolka D., Wechsler L., Goldstein S. et al. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke // *Neurology*. – 2000. – V. 55, N 4. – P. 565-569.
417. Kong K.Y., RenJ., KrausM. et al. Human umbilical cord blood cells differentiate in to muscle in sjl muscular dystrophy mice // *Stem Cells*. – 2004. – V. 22. – P. 981-983.
418. Kordower J.H., Chu Y., Hauser R.A. et al. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease // *Nat. Med*. – 2008. – V. 14, N 5. – P. 504-506.
419. Kordower J.H., Chu Y., Hauser R.A. et al. Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: a second case report // *Mov. Disord*. – 2008. – V. 23, N 16. – P. 2303-2306.
420. Kornack D.R., Rakic P. The generation, migration and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2001. – V. 98. – P. 4752-4757.

421. Koshizuka S., Okada S., Okawa A. et al. Transplanted hematopoietic stem cells from bone marrow differentiate into neural lineage cells and promote functional recovery after spinal cord injury in mice // *J. Neuropathol. Neurol.* – 2004. – V. 63, N 1. – P. 64-72.
422. Kranz A., Wagner D.C., Kamprad M. et al. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stromal cells upon experimental stroke in rats // *Brain Res.* – 2010. – V. 1315. – P. 128-136.
423. Kriegstein A., Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2009. – V. 32. – P. 149-184.
424. Krobert K., Lopez-Colberg I., Cunningham L.A. Astrocytes promote or impair the survival and function of embryonic ventral mesencephalon co-grafts: effects of astrocyte age and expression of recombinant brain-derived neurotrophic factor // *Exp. Neurol.* – 1997. – V. 145, N 2. – P. 511-523.
425. Kuehnle I., Goodell M.A. The therapeutic potential of stem cells from adults // *BMJ.* – 2002. – V. 325. – P. 372-376.
426. Kuhlmann T., Lingfeld G., Bitsch A. et al. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time // *Brain.* – 2002. – V. 125(Pt10). – P. 2202-2212.
427. Lammertse D. Clinical trials in spinal cord injury: the Proneuron activated macrophage trial. Proceedings of the 49th Annual Conference of the American Paraplegia Society. – 2003.
428. Lanza R., Gearhart J., Hogan B. et al. Essentials of Stem Cell Biology. – 2005. – P. 548.
429. Lapidot T., Dar A., Kollet O. How do stem cells find their way to home? // *Blood.* – 2005. – V. 106, N 6. – P. 1901-1910.
430. Laurance J. Olfactory tissue transplantation for spinal cord injury. <http://www.healingtherapies.info/OlfactoryTissue1.htm>
431. Laywell E.D., Rakic P., Kukekov V.G. et al. Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – V. 97. – P. 13883-13888.
432. Lebedev I.N., Kashevarova A.A., Nazarenko L.P. et al. Genomic technologies for diagnosis of intellectual disability: results of the CHERISH project // *Bull. SB RAMS.* – 2013. – V. 33, № 5. – P. 25-36.
433. Leite J.P., Neder L., Arisi G.M. et al. Plasticity, synaptic strength, and epilepsy: what can we learn from ultrastructural data? // *Epilepsia.* – 2005. – V. 46, N 5. – P. 134-141.
434. Lemmens R., Steinberg G.K. Stem cell therapy for acute cerebral injury: what do we know and what will the future bring? // *Curr Opin Neurol.* – 2013. – V. 26, N6. – P. 617-625.
435. Lendekel S., Jadicke A., Christophis P. et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report // *J. Cranio-Maxillofacial. – Surgery.* – 2004. – V. 32, N 6. – P. 370-373.

436. Lepore A.C., Bakshi A., Swanger S.A. et al. Neural precursor cells can be delivered into the injured cervical spinal cord by intrathecal injection at the lumbar cord // *Brain Res.* – 2005. – V. 1045. – P. 206-216.
437. Levesque MC, St Clair EW. B cell-directed therapies for autoimmune disease and correlates of disease response and relapse // *Allergy Clin. Immunol.* – 2008. – V.121. – P. 13-21.
438. Li J., Lepski G. Cell Transplantation for Spinal Cord Injury: A Systematic Review // *Biomed Res Int.* – 2013. – 38 p.
439. Li Y., Chen J., Chen X.G. et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery // *Neurology.* – 2002. – V. 59. – P. 514-523.
440. Li Yi., Chen J., Chen X.J. et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat // *Neurology.* – 2002. – V. 59. – P. 514-523.
441. Liew C.G., Draper J.S., Walsh J. et al. Transient and stable transgene expression in human embryonic stem cells // *Stem Cells.* – 2007. – V. 25, N 6. – P. 1521-1528.
442. Lin Y.C., Ko T.L., Shih Y.H. et al. Human umbilical mesenchymal stem cells promote recovery after ischemic stroke // *Stroke.* – 2011. - May 12.
443. Lindvall O., Sawle G., Widner H. et al. Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease // *Ann. Neurol.* – 1994. – V. 35, N 2. – P. 172-180.
444. Lopez W.O., Nikkhah G., Kahlert U.D. et al. Clinical neurotransplantation protocol for Huntington's and Parkinson's disease // *Restor Neurol Neurosci.* – 2013. – V. 31, N5. – P. 579-595.
445. Lu C.Z., Xiao B.G. G-CSF and neuroprotection: a therapeutic perspective in cerebral ischaemia // *Biochem. Soc. Trans.* – 2006. – V. 34, N 6. – P. 1327-1333.
446. Lu D., Li Y., Mahmood A., Wang L. et al. Neural and marrow-derived stromal cell sphere' transplantation in a rat model of traumatic brain injury // *J. of Neurosurgery.* 2002. – Vol. 97, N 4. – P. 935-940.
447. Lu D., Li Y., Wang L., Chen J. et al. Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury // *J. of Neurotrauma.* – 2001. – Vol. 18, N 8 – P. 813-821.
448. Lu D., Mahmood A., Chopp M. Biologic transplantation and neurotrophin-induced neuroplasticity after traumatic brain injury // *J. Head Trauma. Rehabil.* – 2003. – V. 18. – P. 357-376.
449. Lu D., Sanberg P.R., Mahmood A. et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces neurological deficit in the rat after traumatic brain injury // *Cell Transplant.* – 2002. – V.11, N 3. – P. 275-281.
450. Lu L., Zhao C., Liu Y. et al. Therapeutic benefit of TH-engineered mesenchymal stem cells for Parkinson's disease // *Brain Res. Brain Res. Protoc.* – 2005. – V. 1, N 1. – P. 46-51.
451. Lu P., Blesch A., Tuszynski M.H. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: Differentiation, transdifferentiation, or artifact? // *J. Neurosci. Res.* – 2004. – V. 77. – P. 174-191.

452. Lu P., Jones L.L., Snyder E.Y., Tuszynski M.H. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury // *Exp. Neurol.* – 2003. – V. 181. – P. 115-129.
453. Lucassen P.J., Heine V.M., Muller M.B. et al. Stress, depression and hippocampal apoptosis // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* – 2006. – V. 5, N 5. – P.531-546.
454. Luo J., Daniels S.B., Lenington J.B. et al. The aging neurogenic subventricular zone // *Aging Cell.* – 2006. N 5. – P. 139–152.
455. Luzzati F., Bonfanti L., Fasolo A., Peretto P. DCX and PSA-NCAM expression identifies a population of neurons preferentially distributed in associative areas of different pallial derivatives and vertebrate species // *Cereb. Cortex.* – 2009. – V. 19. – P. 1028–1041.
456. Ma D.K., Bonaguidi M.A., Ming G.L., Song H. Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system // *Cell Res.* – 2009. – V.19. – P. 672-682.
457. Macas J., Nern C., Plate K.H., Momma S. Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain // *J. Neurosci.* – 2006. – V. 26. – P. 13114–13119.
458. Magavi S.S., Leavitt B.R., Macklis J.D. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice // *Nature.* – 2000. – V. 405. – P. 951-955.
459. Mahmood A., Lu D., Chopp M. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury // *J. Neurotrauma.* 2004. – Vol. 21, N 1. – P. 33-39.
460. Mahmood A., Lu D., Chopp M. Marrow stromal cell transplantation after traumatic brain injury promotes cellular proliferation within the brain // *Neurosurg.* – 2004. – V. 55, N 5. – P. 1185-1192.
461. Mahmood A., Lu D., Qu C., Goussev A. et al. Human marrow stromal cell treatment provides long-lasting benefit after traumatic brain injury in rats // *Neurosurgery.* 2005. – V. 57, N 5. – P. 1026-1031.
462. Mahmood A., Lu D., Wang L. et al. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells // *Neurosurg.* – 2001. – V. 49, N 5. – P. 1196-1203; discussion 1203-1204.
463. Mak G.K., Enwere E.K., Gregg C. et al. Male pheromone pheromone stimulated neurogenesis in the adult female brain: possible role in mating behavior // *Nat. Neurosci.* – 2007. – N 10. – P. 1003–1011.
464. Martínez-Morales P.L., Revilla A., Ocaña I. et al. Progress in stem cell therapy for major human neurological disorders // *Stem Cell Rev.* – 2013. – V. 9, N 5. – P. 685-699.
465. Maslov A.Y., Barone T.A., Plunkett R.J., Pruitt S.C. Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice // *J. Neurosci.* – 2004. – V. 24. – P. 1726–1733.
466. Massengale M., Wagers A.J., Vogel H., Weissman I.L. Hematopoietic cells maintain hematopoietic fates upon entering the brain // *J. Exp. Med.* – 2005. – V. 201. – P. 1579-1589.

467. Massough M., Saghatelian A. De-routing neuronal precursors in the adult brain to sites of injury: role of the vasculature // *Neuropharmacology*. – 2010. – V. 5, N6. – P. 877-883.
468. Matsubara H. Therapeutic angiogenesis for patients with critical limb ischemia using autologous bone marrow cell transplantation // *Nippon Naika Gakkai Zasshi*. – 2003. – V. 92, N 5. – P. 877-883.
469. Mattis V.B., Svendsen C.N. Induced pluripotent stem cells: a new revolution for clinical neurology? // *Lancet Neurol*. – 2011. – V. 10, N 4. – P. 383-394.
470. Mazzini L, Fagioli F., Boccaletti R. et al. Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans. *Amyotroph. Lateral. Scler // Other Motor Neuron Disord*. – 2003. – V. 4, N 3. – P. 158-161.
471. McKay R. Stem cells in the central nervous system // *Science*. – 1997. – V. 276, N 5309. – P. 66-71.
472. McKinney-Freeman S.L., Jackson K.A. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin // *PNAS*. – 2002. – V. 99. – P. 1341-1346.
473. Mendoza-Torreblanca J.G., Martinez-Martinez E. et al. The rostral migratory stream is a neurogenic niche that predominantly engenders periglomerular cells: in vivo evidence in the adult rat brain // *Neurosci. Res*. – 2008. – V. 60. – P. 289-299.
474. Menn B., Garcia-Verdugo J.M., Yaschine C. et al. Origin of oligodendrocytes in the subventriculoventricular zone of the adult brain // *J. Neurosci*. – 2006. – V. 26. – P. 7907-7918.
475. Messersmith D.J., Fabrizio M., Mocchetti I., Kromer L.F. Effects of sciatic nerve transplants after fimbria-fornix lesion: examination of the role of nerve growth factor // *Brain Res*. – 1991. – V. 557, N 1-2. – P. 293-297.
476. Messier B., LeBlond C.P., Smart I. Presence of DNA synthesis and mitosis in the brain of young adult mice // *Exp. Cell Res*. – 1958. – V. 14. – P. 224-226.
477. Mezey E., Key S., Vogelsang G. et al. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. – V. 100. – P. 1364-1369.
478. Ming G.L., Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system // *Ann. Rev. Neurosci*. – 2005. – V. 28. – P. 223-250.
479. Miranville A., Heeschen C, Sengenès C. et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells // *Circulation*. – 2004. – V. 110, N 3. – P. 349-355.
480. Mirescu C., Gould E. Stress and adult neurogenesis // *Hippocampus*. – 2006. – V. 16. – P. 233-238.
481. Mochizuki H., Choong C.J., Yasuda T. The promises of stem cells: stem cell therapy for movement disorders // *Parkinsonism Relat Disord*. – 2014. – V. 20, N 1. – P. 128-131.
482. Modo M., Mellor K., Cash D. et al. Mapping transplanted stem cell migration after a stroke: a serial, in vivo magnetic resonance imaging study // *Neuroimage*. – 2004. – V. 21. – P. 311-317.

483. Moghadasi S., van Haeringen A., Langendonck L. et al. A terminal 3p26.3 deletion is not associated with dysmorphic features and intellectual disability in a four-generation family // *Am. J. Med. Genet. Part A.* – 2014. – V. 164. – P. 2863-2868.
484. Mothe A.J., Tator C.H. Proliferation, migration, and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord injury in the adult rat // *Neuroscience.* – 2005. – V. 131. – P. 177-187.
485. Mothe A.J., Tator C.H. Review of transplantation of neural stem/progenitor cells for spinal cord injury // *Int J Dev Neurosci.* – 2013. – V.31, N7. – P. 701-713.
486. Moviglia G.A., Fernandez R., Brizuela J.A. et al. Shuster Combined protocol of cell therapy far chronic spinal cord injury. Report an the electrical and functional recover' of two patients // *Cytother.* – 2006. – V. 8, N 3. – P. 202-209.
487. Muraoka K., Shingo T., Yasuhara T. et al. Comparison of the therapeutic potential of adult and embryonic neural precursor cells in a rat model of Parkinson disease // *J. Neurosurg.* – 2008. – V. 108. – P. 149-159.
488. Murrell W., Feron F., Wetzig A. et al. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa // *Dev. Dyn.* – 2005. – V. 233, N 2. – P. 496-515.
489. Najmabadi H., Hu H., Garshasbi M. et al. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders // *Nature.* – 2011. – V. 478. – P. 57-63.
490. Nakamura M., Okano H. Cell transplantation therapies for spinal cord injury focusing on induced pluripotent stem cells // *Cell Res.* – 2013. – V. 23, N1. – P.70-80.
491. Neirinckx V., Coste C., Wislet-Gendebien S. Concise Review: Adult mesenchymal stem cells, adult neural crest stem cells, and therapy of neurological pathologies: A State of play // *Stem Cells Transl Med.* – 2013. –V. 2, N4. – P.284-296.
492. Ng T.K., Fortino V.R., Pelaez D., Cheung H.S. Progress of mesenchymal stem cell therapy for neural and retinal diseases // *World J Stem Cells.* - 2014. – V. 6, N2). – P. 111-119.
493. Ning H., Lin G., Lue T.F., Lin C.S. Neuron-like differentiation of adipose tissue-derived stromal cells and vascular smooth muscle cells // *Differentiation.* – 2006. – V. 74, N 9-10. – P. 510-518.
494. Nishiyama A., Komitova M., Suzuki R., Zhu X. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2009. – V. 10, N 1. – P. 9-22.
495. Nishiyama A., Watanabe M., Yang Z., Bu J. Identity, distribution, and development of polydendrocytes: NG2-expressing glial cells // *J. Neurocytol.* – 2002. – V. 31. – P. 437-455.
496. Nolan D., Ciarrocchi A., Mellick A. et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization // *Genes Dev.* – 2007. – V. 21. – P. 1546-1558.
497. Nunes M.C., Roy N.S., Keyoung H.M. et al. Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain // *Nat. Med.* – 2003. – N 9. – P. 439-447.

498. Olson L. Grafts and growth factors in CNS. Basic science with clinical promise // *Stereotactic and Funct. Neurosurgery*. – 1990. – V. 54-55. – P. 250-267.
499. Pak H.N., Qayyum M., Kim D.T. et al. Mesenchymal stem cell injection induces cardiac nerve sprouting and increased tenascin expression in a swine model of myocardium infarction // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* – 2003. – V. 14. – P. 841-848.
500. Palma V., Lim D., Dahmane N. et al. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain // *Development*. – 2005. – V. 132. – P. 335-344.
501. Panchision D., McKay R. The control of neural stem cells by morphogenic signals // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2002. – N 12. – P. 478-487.
502. Park H.C., Shim Y.S., Ha Y. et al. Treatment of complete spinal cord injury patients by autologous bone marrow cell transplantation and administration of granulocyte-macrophage colony stimulating factor // *Tissue Eng.* – 2005. – N 11. – P. 913-922.
503. Park J.H., Cho H., Kim H., Kim K. Repeated brief epileptic seizures by pentylenetetrazole cause neurodegeneration and promote neurogenesis in discrete brain regions of freely moving adult rats // *Neuroscience*. – 2006. – V. 140. – P. 673–684.
504. Paton A., Nottebohm F.N. Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits // *Science*. – 1984. – V. 225. – P. 1046-1048.
505. Pawliuk R., Westerman K.A., Fabry M.E. et al. Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy // *Science*. – 2001. – V. 294. – P. 2368-2371.
506. Pellegrini L., Bennis Y., Guillet B. et al. Cell therapy for stroke: from myth to reality // *Rev Neurol (Paris)*. – 2013. – V. 169, N4. – P. 291-306.
507. Pera M.F. Human pluripotent stem cells: a progress report // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2001. – V. 11. – P. 595-599.
508. Perin E.C., Geng Y. J., Willerson J.T. Adult stem cell therapy in perspective // *Circulation*. – 2003. – V. 107. – P. 935-938.
509. Peterson D.A. Umbilical cord blood cells and brain stroke injury: bringing in fresh blood to address an old problem // *J. Clin. Invest.* – 2004. – V. 114, N 3. – P. 312-314.
510. Petreanu L., Alvarez-Buylla A. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction // *J. Neurosci.* – 2002. – V. 22. – P. 6106–6113.
511. Philips M.F., Mattiasson G., Wieloch T. et al. Neuroprotective and behavioral efficacy of nerve growth factor-transfected hippocampal progenitor cell transplants after experimental traumatic brain injury // *J. Neurosurg.* – 2001. – V. 94. – P. 765-774.
512. Poltavtseva R.A., Marey M.V., Aleksandrova M.A. et al. Evaluation of progenitor cell cultures from human embryos for neurotransplantation // *Dev. Brain Res.* – 2002. – V. 132. – P. 149-154.
513. Poulos S.G., Richie W.D., Bailey R.K. et al. The potential of neural stem cell transplantation for the treatment of fetal alcohol spectrum disorder // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. – 2014. – V. 54. – P. 149-156.

514. Qiu Z., Farnsworth S.L., Mishra A., Hornsby P.J. Patient-specific induced pluripotent stem cells in neurological disease modeling: the importance of nonhuman primate models // *Stem Cells Cloning*. – 2013. – V. 6. – P. 19-29.
515. Quesenberry P., Colvin G., Abedi M. Perspective: Fundamental and clinical concepts on stem cell homing and engraftment: A journey to niches and beyond // *Exp. Hematol.* – 2005. – V. 33. – P. 9-19.
516. Rabinovich S.S., Seledtsov V.I., Poveschenko O.V. et al. Transplantation treatment of spinal cord injury patients // *Biomed. Pharmacother.* – 2003. – V. 57. – P. 428-433.
517. Raghupathi R. Cell death mechanisms following traumatic brain injury // *Brain Pathology*. – 2004. – V. 14, N 2. – P. 215-222.
518. Raisman G. A promising therapeutic approach to spinal cord repair // *J. R. Soc. Med.* – 2003. – V. 96, N 6. – P. 259-261.
519. Ralph G.S., Binley K., Wong L.F. et al. Gene therapy for neurodegenerative and ocular diseases using lentiviral vectors // *Clin. Sci. (Lond.)*. – 2006. – V. 110, N 1. – P. 37-46.
520. Ramer L.M., An E., Richter M.W. Peripheral olfactory ensheathing cells reduce scar and cavity formation and promote regeneration after spinal cord injury // *J. C. Neurol.* – 2004. – V. 473, N 1. – P. 1-15.
521. Ramon y Cajal S. Estudios sobre la degeneracion y regeneracion del sistema nervioso. Madrid, Moya. 1913-1914.
522. Reichardt L.F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B // Biol. Sci.* – 2006. – V. 361, N 1473. – P. 1545-1364.
523. Reier P.J. Cellular transplantation strategies for spinal cord injury and translational neurobiology // *NeuroRx*. – 2004. – V. 1, N 4. – P. 424-451.
524. Richter W.M., Fletcher P.A., Liu J. et al. Lamina propria and olfactory bulb ensheathing cells exhibit differential integration and migration and promote differential axon sprouting in the lesioned spinal cord // *J. Neurosci.* – 2005. – V. 25, N 46. – P. 10700-10711.
525. Rideout W.M., Hochedlinger K., Kyba M. et al. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy // *Cell*. – 2002. – V. 109. – P. 17-27.
526. Riess P., Zhang C., Saatman K.E. et al. Transplanted neural stem cells survive, differentiate, and improve neurological motor function after experimental traumatic brain injury // *Neurosurgery*. – 2002. – V. 51. – P. 1043-1051.
527. Rietze R.L., Valcanis H., Brooker G.F. et al. Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain // *Nature*. – 2001. – V. 412. – P. 736-739.
528. Rivera F.J., Aigner L. Adult mesenchymal stem cell therapy for myelin repair in Multiple Sclerosis // *Biol Res*. – 2012. – V. 45. – P. 257-268.
529. Roisen F.J., Klueber K.M., Lu C.L. et al. Human adult olfactory stem cells // *Brain Res.* – 2001. – V. 890. – P. 11-22.
530. Rosado-de-Castro P.H., Pimentel-Coelho P.M., [...], and Mendez-Otero R. The rise of cell therapy trials for stroke: review of published and registered studies // *Stem Cells* – 2013. – V. 22, N 15. – P. 2095-2111.

531. Rosenberg R.N. World Federation of Neurology position paper on human stem cell research // *J. Neurol. Sci.* – 2006. – V. 243, N 1-2. – P. 1-2.
532. Rosser A.E., Bachoud-Lévi A.C. Clinical trials of neural transplantation in Huntington's disease // *Prog Brain Res.* – 2012. – V. 200. – P. 345-371.
533. Rouhl R.P.W., van Ostenbrugge R.J., Damoiseaux J., Cohen T.J.-W., Lodder J. Endothelial progenitor cell research in stroke. A potential shift in pathophysiological and therapeutical concepts // *Stroke.* – 2008. – V. 39. – P. 2158-2165.
534. Ruff C.A., Faulkner S.D., Fehlings M.G. The potential for stem cell therapies to have an impact on cerebral palsy: opportunities and limitations // *Dev Med Child Neurol.* – 2013. – V. 55, N8. – P.689-697.
535. Rutz S., Scheffold A. Towards in vivo application of RNA interference – new toys, old problems // *Arthritis Res. Ther.* – 2004. – V. 6, N 2. – P. 78-85.
536. Saito K., Nawata M., Nakayamada S. et al. Successful treatment with anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) of life-threatening refractory systemic lupus erythematosus with renal and central nervous system involvement // *Lupus.* – 2003. – V. 12. – P. 798-800.
537. Sasaki M., Honmou O., Akiyama Y. et al. Transplantation of an acutely isolated bone marrow fraction repairs demyelinated adult rat spinal cord axons // *Glia.* – 2001. – V. 35. – P. 26-34.
538. Savitz S.I., Dinsmore J., Wu J. et al. Neurotransplantation of fetal porcine cells in patients with basal ganglia infarcts: a preliminary safety and feasibility study // *Cerebrovasc. Dis.* – 2005. – V. 20. – P. 101-107.
539. Schulze M., Belema-Bedada F., Technau A., Braun T. Mesenchymal stem cells are recruited to striated muscle by NFAT/IL-4-mediated cell fusion // *Genes Dev.* – 2005. – V. 19, N 15. – P. 1787-1798.
540. Schwartz P.H., Bryant P.J., Fuja T.J. et al. Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex // *J. Neurosci. Res.* – 2003. – V. 74. – P. 838-851.
541. Senior K. Olfactory ensheathing cells to be used in spinal-cord repair trial // *Lancet Neurol.* – 2002. – N 1. – P. 269.
542. Setoguchi T., Nakashima K., Takizawa T. et al. Treatment of spinal cord injury by transplantation of fetal neural precursor cells engineered to express BMP inhibitor // *Exp. Neurol.* – 2004. – V. 189, N 1. – P. 33-44.
543. Shi F. and Edge A.S.B. Prospects for replacement of auditory neurons by stem cells // *Hear Res.* – 2013. – V. 297. – P. 106-112.
544. Shin C.C., Fu L., Zhu L. et al. Derivation of neuralstem cells from mesenchymal stem cells: evidence for a bipotential stem cellpopulation // *Stem Cells Development.* – 2008. – V. 17, N 6. – P. 1109-1121.
545. Shin S., Sun Y., Liu Y. et al. Whole genome analysis of human neural stem cells derived from embryonic stem cells and stem and progenitor cells isolated from fetal tissue // *Stem Cells.* – 2007. – V. 25. – P. 1298-1306.
546. Shingo T., Gregg C., Enwere E. et al. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin // *Science.* – 2003. – V. 299. – P. 117-120.

547. Singh S.K., Clarke I.D., Terasaki M. et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors // *Cancer Res.* – 2003. – V. 63, N 18. – P. 5821-5828.
548. Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D. et al. Identification of human brain tumor initiating cells // *Nature.* – 2004. – V. 432, N 7015. – P. 396-401.
549. Singh, S. K. Hawkins C., Clarke I. et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumours // *Cancer Res.* – 2003. – V. 63. – P. 5821-5828.
550. Slavotinek A.M. Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays // *Hum. Genet.* – 2008. – V. 124. – P. 1-17.
551. Stallcup W.B., Beasley L. Bipotential glial precursor cells of the optic nerve express the NG2 proteoglycan // *J. Neurosci.* – 1987. – N 7. – P. 2737-2744.
552. Stein D.G., Hoffman S.W. Concepts of CNS plasticity in the context of brain damage and repair // *J. Head Trauma. Rehabil.* – 2003. – V. 18. – P. 317-341.
553. Suhonen J.O., Peterson D.A., Ray J., Gage F.H. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo // *Nature.* – 1996. – V. 383. – P. 624-627.
554. Sullivan K.M. Long term follow-up and quality of life after hematopoietic stem cell transplantation // *J. Rheumatol.* – 1997. – V. 48. – P. 46-52.
555. Sun T., Ma Q-H. Repairing neural injuries using human umbilical cord blood // *Mol Neurobiol.* – 2013. – V. 47, N 3. – P. 938-945.
556. Sun Y., Hu J., Zhou L., Pollard S.M., Smith A. Interplay between FGF2 and BMP controls the self-renewal, dormancy and differentiation of rat neural stem cells // *J. Cell Sci.* – 2011. – V. 124, Pt 11. – P. 1867-1877.
557. Sun Y.L., Zhou G.Y., Li K.N. et al., Suppression of glucosylceramide synthase by RNA interference reverses multidrug resistance in human breast cancer cells // *Neoplasma.* – 2006. – V. 53, N 1. – P. 1-8.
558. Sykova E., Homola A., Mazanec R. et al. Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury // *Cell Transpl.* – 2006. – V. 15, N 8-9. – P. 675-687.
559. Sykova E., Jendelova P. In vivo tracking of stem cells in brain and spinal cord injury // *Prog. Brain Res.* – 2007. – V. 161. – P. 367-383.
560. Sykova E., Jendelova P. Migration, fate and in vivo imaging of adult stem cells in the CNS // *Cell Death Differ.* – 2007. – V. 14, N 7. – P. 1336-1342.
561. Sykova E., Jendelova P., Glogarova K. et al. Bone marrow stromal cells - a promising tool for therapy of brain and spinal cord injury // *Exp. Neurol.* – 2004. – V. 187. – P. 220.
562. Taguchi A., Soma T., Tanaka H. et al. Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model // *J. Clin. Invest.* – 2004. – V. 114. – P. 330-338.
563. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult fibroblasts by defined factors // *Cell.* – 2007. – V. 131. – P. 861-972.
564. Takami T., Oudega M., Bates M.L. et al. Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord // *J. Neurosci.* – 2002. – V. 22. – P. 6670-6681.

565. Tashiro A., Makino H., Gage F.H. Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage // *J. Neurosci.* – 2007. – V. 27. – P. 3252–3259.
566. Taupin P., Gage F.H. Adult neurogenesis and neural stem cell of the central nervous system in mammals // *J. of Neurosci. Res.* – 2002. – V. 69. – P. 745-749.
567. Thompson L., Björklund A. Survival, differentiation, and connectivity of ventral mesencephalic dopamine neurons following transplantation // *Prog Brain Res.* – 2012. – V. 200. – P. 61-95.
568. Thomsen G.M., Gowing G., Svendsen S., Svendsen C.N. The past, present and future of stem cell clinical trials for ALS // *Experimental Neurology.* – 2014. – www.elsevier.com/locate/yexnr
569. Thored P., Arvidsson A., Cacci E. et al. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke // *Stem cells.* – 2006. – V. 24. – P. 739-747.
570. Thored P., Wood J., Arvidsson A., Cammenga J., Kokaia Z., Lindvall O. Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke // *Stroke.* – 2007. – V. 38, N 11. – P. 3032-3039.
571. Thorn S.R., Bhopale V.M. Stem cell mobilization by hyperbaric oxygen // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2006. – V. 290. – P. 1378-1386.
572. Tiansheng S., Jixin R., Wu J. et al. Transplantation of olfactory ensheathing cells for the treatment of spinal cord injury. First International Spinal Cord Injury Treatment and Trials Symposium. Abstracts and free papers. – Hong-Kong, 2005.
573. Toda H., Hamani C., Fawcett A.P. et al. The regulation of adult rodent hippocampal neurogenesis by deep brain stimulation // *J. Neurosurg.* – 2008. – V. 108. – P. 132-138.
574. Trojan S., Pokorny J. Theoretical aspects of neuroplasticity // *Physiol. Res.* – 1999. – V. 48, N 1. – P. 87-97.
575. Trounson A., Thakar R.G., Lomax G., Gibbons D. Clinical trials for stem cell therapies // *BMC Medicine.* – 2011. – N 9. – P. 52.
576. Tsai E.C., Tator C.H. Neuroprotection and regeneration strategies for spinal cord repair // *Curr. Pharm. Des.* – 2005. – V. 11, N 10. – P. 1211-1222.
577. Vacanti C.A. Tissue-engineered spinal cord // *Transplant. Proc.* – 2001. – V. 33. – P. 592-593.
578. Van den Berge S.A., van Strien M.E., Hol E.M. Resident adult neural stem cells in Parkinson's disease - the brain's own repair system? // *Eur J Pharmacol.* – 2013. – V. 719, N1-3. – P. 117-27.
579. Van Esch H., Backx L, Pijkels E., Fryns J.P. Congenital diaphragmatic hernia is part of the new 15q24 microdeletion syndrome // *Eur. J. Med. Genet.* – 2009. – V. 52. – P. 153-156.
580. Vendrame M., Cassidy J., Newcomb J. et al. Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume // *Stroke.* – 2004. – V. 35. – P. 2390.

581. Vercelli A., Mereuta O.M., Garbossa D. et al. Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis // *Neurobiol. Dis.* – 2008. – V. 31, N 3. – P. 395-405.
582. Vinogradova O.S. Perspectives and limitation of neurotransplantation // *Proc. Indian Nat. Sci. Acad. B.* – 1990. – V. 56, N 1. – P. 109-124.
583. Vissers L.E., Stankiewicz P. Microdeletion and microduplication syndromes // *Genomic Structural Variants: Methods and Protocols* / Ed. L. Feuk L. *Methods in Molecular Biology*. Springer Science-Business Media, LLC. – 2012. – V. 838. – P. 29-75.
584. Vorasubin B., Weedon J., Saljoogue F. et al. Selective differentiation of central nervous system-derived stem cells in response to cues from specific regions of the developing brain // *J. Neurosurg.* – 2007. – V. 107. – P. 145-154.
585. Wegner M., Stolt C. From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development // *Trends Neurosci.* – 2005. – V. 28. – P. 583-588.
586. Wei G., Schubiger G., Harder F. et al. Stem cell plasticity in Mammals // *Stem cells.* – 2000. – V. 18. – P. 409-419.
587. Weiss S., Dunne C., Hewson J. et al. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis // *J. Neurosci.* – 1996. – V. 16. – P. 7599-7609.
588. Wennersten A., Mejer X., Holmin S. et al. Proliferation, migration, and differentiation of human neural stem/progenitor cells after transplantation into a rat model of traumatic brain injury // *J. Neurosurg.* – 2004. – V. 100. – P. 88-96.
589. Westerlund U., Moe M.C., Varghese M. et al. Stem cells from the adult human brain develop into functional neurons in culture // *Exp. Cell Res.* – 2003. – V. 289. – P. 378-383.
590. Whitman M.C., Greer C.A. Adult neurogenesis and the olfactory system // *Prog. Neurobiol.* – 2009. – V. 89, N 2. – P. 162-175.
591. Wichterle H., Lieberam I., Porter J.A. et al. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons // *Cell.* – 2002. – V. 110. – P. 385-397.
592. Winkler C., Kirik D., Bjorklund A. Cell transplantation in Parkinson's disease: how can we make it work? // *Trends Neurosci.* – 2005. – V. 28. – P. 86.
593. Wislet-Gendebien S., Bruyere F., Hans G. et al. Nestin-positive mesenchymal stem cells favour the astroglial lineage in neural progenitors and stem cells by releasing active BMP4 // *BMC Neurosci.* – 2004. – V. 5, N 1. – P. 1-33.
594. Wojciechowski A.B., Englund U., Lundberg C. et al. Long-term survival and glial differentiation of the brain-derived precursor cell line RN33B after sub-retinal transplantation to adult normal rats // *Stem Cells.* – 2002. – V.20, N 2. – P. 163-173.
595. Wolf S.A., Steiner B., Wengner A. et al. Adaptive peripheral immune response increases proliferation of neural precursor cells in the adult hippocampus // *FASEB J.* – 2009. – V. 23. – P. 3121-3128.
596. Wu S., Suzuki Y., Ejiri Y. et al. Bone marrow stromal cells enhance differentiation of cocultured neurosphere cells and promote regeneration of injured spinal cord // *J. Neurosci Res.* – 2003. – V. 72. – P. 343-351.

597. Xiao J., Iman Z., Motooka Y., Low W.C. Transplantation of a novel cell line population of umbilical cord blood stem cells ameliorates neurological deficits associated with ischemic brain injury // *Stem Cells Dev.* – 2005. – V. 14, N 6. – P. 722-733.
598. Xiao-Cheng L.U., Yi T.A.O., Li-Xin L.I. Prospective use of skin-derived precursors in neural regeneration // *Chinese Medical Journal.* – 2012. – V. 125, N 24. – P. 4488-4496.
599. Xiong K., Luo D.W., Patrylo P.R. et al. Doublecortin-expressing cells are present in layer II across the adult guinea pig cerebral cortex: partial colocalization with mature interneuron markers // *Exp. Neurol.* – 2008. – V. 211. – P. 271-282.
600. Xiong Y., Mahmood A., Chopp M. Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury // *Curr. Opin. Investig. Drugs.* – 2010. – V. 11, N 3. – P. 298-308.
601. Xu Y., Tamamaki N., Noda T. et al. Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle // *Exp. Neurol.* – 2005. – V. 192. – P. 251-264.
602. Yarygin K.N., Kholodenko I.V., Tairova R.T. et al. Human placenta cells after intravenous transplantation into rats with experimental ischemic stroke undergo homing in brain neurogenic zones and enhance neurogenesis // *J. Tissue Eng. Reg. Med.* – 2012. – V. 6, Suppl. 1. – P. 282.
603. Yarygin V.N., Banin V.V., Yarygin K.N. Regeneration of the rat spinal cord after thoracic segmentectomy: restoration of the anatomical integrity of the spinal cord // *Neurosci. Behav. Physiol.* – 2006. – V. 36, N 5. – P. 483-490.
604. Yarygin V.N., Banin V.V., Yarygin K.N., Bryukhovetskii A.S. Regeneration of the rat spinal cord after thoracic segmentectomy: growth and restoration of nerve conductors // *Neurosci. Behav. Physiol.* – 2007. – V. 37, N 2. – P. 97-105.
605. Yeager A.M. Allogeneic hematopoietic cell transplantation in inborn metabolic diseases // *Ann. Hematol.* – 2002. – V. 81, Suppl. II. – P. 16-19.
606. Yip H.-K., Chang L.-T., Chang W.-N. et al. Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke // *Stroke.* – 2008. – V. 39. – P. 69-74.
607. Young F., Sloan A., Song B. Dental pulp stem cells and their potential roles in central nervous system regeneration and repair // *J Neurosci Res.* – 2013. – V. 91, N 11. – P. 1383-1393.
608. Young W. Bases for hope in spinal cord injury, <http://sci.rutgers.edu>.
609. Yuan S.H., Shaner M. Bioengineered stem cells in neural development and neurodegeneration research // *Ageing Res. Rev.* – 2013. – V. 12, N3. – P. 739-748.
610. Zhang L., Li P.P., Feng X. et al. Sex-related differences in neuronal cell survival and signaling in rats // *Neurosci. Lett.* – 2003. – V. 337, N 2. – P. 65-68.
611. Zhang R.L., LeTourneau Y., Gregg S.R. et al. Neuroblast division during migration toward the ischemic striatum: a study of dynamic migratory and proliferative characteristics of neuroblasts from the subventricular zone // *J. Neurosci.* – 2007. – V. 27. – P. 3157-3162.
612. Zhang R.L., Zhang Z.G., Chopp M. Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone // *Neuropharmacology.* – 2008. – V. 55, N 3. – P. 345-352.

613. Zhang R.L., Zhang Z.G., Lu M. et al. Reduction of the cell cycle length by decreasing G(1) phase and cell cycle reentry expand neuronal progenitor cells in the subventricular zone of adult rat after stroke // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2006. – V. 26. – P. 857-863.
614. Zhang R.L., Zhang Z.G., Zhang L. et al. Delayed treatment with sildenafil enhances neurogenesis and improves functional recovery in aged rats after focal cerebral ischemia // *J. Neurosci. Res.* – V. 2006. – V. 83. – P. 1213-1219.
615. Zhang X., Klueber K.M., Guo Z. et al. Adult human olfactory neural progenitors cultured in defined media // *Exp. Neural.* – 2004. – V. 186, N 2. – P. 112-123.
616. Zhang X.-M., Cai Y., Chu Y. et al., Doublecortin-expressing cells persist in the associative cerebral cortex and amygdala in aged nonhuman primates // *Frontiers Neuroanat.* – 2009. – V. 3. – P. 1-12.
617. Zhang X-B. Cellular reprogramming of human peripheral blood cells // *Genomics Proteomics Bioinformatics.* – 2013. – V. 11. – P. 264-274.
618. Zhang Z.G., Chopp M. Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic // *Lancet Neurol.* – 2009. – V. 8, N 5. – P. 491-500.
619. Zhao L.R., Duan W.M., Reyes M. et al. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats // *Exp. Neurol.* – 2002. – V. 174. – P. 11-20.
620. Zhao M., Momma S., Delfani K. et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – V. 100. – P. 925-7930.
621. Zhuravleva Z.N. The hippocampus and neurotransplantation. *Neurosci // Behav. Physiol.* – 2005. – V. 35, N 4. – P. 343-354.
622. Zigova T., Song S., Willing A.E. et al. Human umbilical cord blood cells express neural antigens after transplantation into the developing rat brain // *Cell Transplant.* – 2002. – V. 11, N 3. – P. 265-274.
623. Zlokovic B.V., Apuzzo M.L. Cellular and molecular neurosurgery: pathways from concept to reality-part I: target disorders and concept approaches to gene therapy of the central nervous system // *Neurosurgery.* – 1997. – V. 40, N 4. – P. 789-804.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СВЕДЕНИЯ О ТВОРЧЕСКОМ КОЛЛЕКТИВЕ	3
ПРЕДИСЛОВИЕ	8
ВВЕДЕНИЕ	11
 Глава 1. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ	15
1.1. Трансфекция клеток и генная инженерия.....	16
1.2. Гибридизация соматических клеток.....	16
1.3. Культивирование клеток.....	19
1.3.1. Культивирование стромальных клеток костного мозга.....	20
1.3.2. 3D-культивирование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.....	21
1.3.3. Культивирование гемопоэтических стволовых клеток.....	22
1.3.4. Предварительная иммунокоррекция и культивирование клеток костного мозга.....	24
1.4. Клонирование клеток и животных.....	25
 Глава 2. КЛИНИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДОВ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ	27
2.1. Краткая история.....	27
2.2. Цели и принципы использования клеточной терапии.....	33
2.3. Лечение стволовыми клетками.....	36
2.3.1. Аутологичные стволовые клетки.....	38
2.3.2. Стромальные клетки жировой ткани.....	39
2.3.3. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки.....	40
2.3.4. Стволовые клетки эмбрио-фето-пуповино-плацентарно-амниотического комплекса.....	46
2.3.5. Аллогенные гемопоэтические стволовые клетки пуповинной крови.....	49
2.3.6. Гемопоэтические стволовые клетки зрелой плаценты человека.....	58
2.3.7. Стволовые клетки амниона человека.....	64
2.4. Проблемы контроля качества продукции клеточных технологий.....	68
 Глава 3. БОЛЕЗНИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ	
3.1. Регенеративная биология центральной нервной системы и регенеративная неврология.....	69
3.2. Методы клеточной терапии в лечении болезней нервной системы.....	89
3.2.1. Индукция нейральной дифференцировки стромальных клеток жировой ткани.....	89
3.2.2. Оптимальные условия культивирования и дифференцировки стволовых и прогениторных клеток центральной нервной системы.....	93
3.2.3. Метод эндоскопического получения биоптата головного мозга и выделения из него нейральных стволовых клеток для аутотрансплантации.....	98
3.2.4. Применение клеток пуповинной крови.....	100

3.2.5. Трансплантация фетальных клеток.....	104
3.2.6. Особенности клеточной терапии в детской неврологии.....	112
3.3. Клеточная терапия при болезнях нервно-мышечного синапса и мышц.....	115
3.4. Клеточная терапия при нейродегенеративных болезнях.....	132
3.5. Клеточная терапия при черепно-мозговой травме.....	150
3.5.1. Клеточные технологии для нейрорегенерации.....	150
3.5.2. Влияние тяжелой политравмы на миграцию стволовых кроветворных клеток.....	155
3.5.3. Методы клеточной терапии.....	160
3.5.4. Трансплантация стромальных клеток костного мозга для пластики костей мозгового черепа.....	183
3.5.5. Клеточная терапия травматических ком.....	189
3.6. Клеточная терапия при травмах позвоночника и спинного мозга.....	197
3.6.1. Методы клеточной терапии.....	197
3.6.2. Морфологическая характеристика спинного мозга после торакальной сегментэктомии и трансплантации обкладочных нейроэпителиальных клеток.....	221
3.6.3. Динамика соматосенсорных вызванных потенциалов у пациентов с хроническим повреждением спинного мозга при трансплантации аутогенных гемопоэтических стволовых клеток.....	228
3.6.4. Международная экспертиза нейротрансплантации для лечения травмы спинного мозга.....	233
3.6.5. Отдаленные результаты аллогенной клеточной трансплантации в лечении последствий травмы спинного мозга.....	235
3.7. Клеточная терапия при острых нарушениях мозгового кровообращения.....	236
3.7.1. Субарахноидальная трансплантация фетальных клеток нервной ткани и кроветворной ткани из печени.....	236
3.7.2. Трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.....	238
3.7.3. Трансплантация негемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови.....	247
3.7.4. Аутогенная трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.....	247
3.7.5. Трансплантация стволовых клеток пуповинной крови.....	252
3.7.6. Применение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора.....	253
3.8. Клеточная терапия при эпизодических и пароксизмальных расстройствах.....	254
3.9. Астенический бульбарный паралич.....	261

Глава 4. КЛЕТОЧНЫЕ И ГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ИЗУЧЕНИИ ПАТОГЕНЕТИКИ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНЫХ РАССТРОЙСТВ..... 263

Глава 5. ПСИХИЧЕСКИЕ РАССТРОЙСТВА И РАССТРОЙСТВА ПОВЕДЕНИЯ..... 274

5.1. Трансплантация аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при медикаментозно-резистентных психических заболеваниях.....	274
5.2. Трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток для коррекции ориентировочно-исследовательского дефицита.....	276
5.3. Синдром хронической усталости.....	284
5.4. Аутизм.....	285

Глава 6. БОЛЕЗНИ ГЛАЗА И ЕГО ПРИДАТОЧНОГО АППАРАТА, БОЛЕЗНИ УША И СОСЦЕВИДНОГО ОТРОСТКА

6.1. Восстановление роговицы.....	286
6.2. Восстановление сетчатки.....	288
6.3. Восстановление зрительного нерва.....	298
6.4. Восстановление слуха.....	299
6.5. Восстановление барабанной перепонки.....	300

Глава 7. ТЕРМИНАЛЬНЫЕ СОСТОЯНИЯ.....

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ.....	306
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	309
ОГЛАВЛЕНИЕ.....	353

CONTENT

PREFACE	8
INTRODUCTION	11
Chapter 1. CELLULAR ENGINEERING	15
1.1. Cell transfection and gene engineering.....	16
1.2. Hybridization of somatic cells	16
1.3. Cultivation of cells	19
1.3.1. Cultivation of bone marrow stromal cells	20
1.3.2. 3D-cultivation of multipotent mesenchymal stromal cells	21
1.3.3. Cultivation of hematopoietic stem cells	22
1.3.4. Preliminary immunocorrection and cultivation of bone marrow stromal cells	24
1.4. Cloning of cells and animals	25
Chapter 2. CLINICO-BIOLOGICAL ASPECTS OF USE OF CELL THERAPY METHODS	27
2.1. Short history	27
2.2. The purposes and principles of use of cell therapy	33
2.3. Treatment by stem cells	36
2.3.1. Autologous stem cells of peripheral blood	38
2.3.2. Adipose tissue stromal cells	39
2.3.3. Multipotent mesenchymal stromal cells	40
2.3.4. Stem cells of embryo-, fet-, umbilical cord, amniotic complex	46
2.3.5. Allogenic hematopoietic umbilical cord blood stem cells	49
2.3.6. Hematopoietic stem cells of the term placenta in human	58
2.3.7. Stem cells of the human amnion	64
2.4. Problems of quality assurance of cell technologies.....	68
Chapter 3. DISEASES OF NERVOUS SYSTEM	69
3.1. Regenerative biology of the central nervous system and regenerative neurology	69
3.2. Methods of cell therapy in treatment of nervous system diseases.....	89
3.2.1. Induction of neural differentiations of adipose tissue stromal cells	89
3.2.2. Optimum conditions of cultivation and differentiations of the central nervous system stem and progenitor cells	93
3.2.3. Endoscopic method of brain biopsy for neural stem cells isolation for autotransplantation	98
3.2.4. Application of umbilical cord blood cells	100
3.2.5. Fetal cells transplantation	104
3.2.6. Features of cell therapy in children's neurology	112
3.3. Cell therapy at diseases of neuromuscular synapses and muscles.....	115
3.4. Cell therapy at neurodegenerative disease	132
3.5. Cell therapy at a craniocerebral trauma	150
3.5.1. Cell technologies for neuroregeneration	150
3.5.2. Influence of a heavy polytrauma on migration of stem hematopoietic cells	155
3.5.3. Methods of cell therapy	160
3.5.4. Transplantation of bone marrow stromal cells for plastics of a brain skull bones.....	183

3.5.5. Cell therapy for traumatic coma	189
3.6. Cell therapy at backbone and spinal cord traumas	197
3.6.1. Methods of cell therapy	197
3.6.2. Morphological characteristic of a spinal cord after thoracal segmentectomy and transplantations of accessory neuroepithelial cells	221
3.6.3. Dynamics of the somatosensory caused potentials at patients with chronic damage of a spinal cord at transplantation of autogenous hematopoietic stem cells	228
3.6.4. The international examination of neurotransplantation for treatment of a spinal cord trauma	233
3.6.5. The long-term results of allogenic cell transplantation in treatment of consequences of a spinal cord trauma	235
3.7. Cell therapy at acute cerebral circulation disorders	236
3.7.1. Subarachnoidal transplantation of a nervous tissue fetal cells and hematopoietic tissue from a liver	236
3.7.2. Transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells	238
3.7.3. Transplantation of non-hematopoietic umbilical cord blood stem cells.....	247
3.7.4. Autogenous transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells	247
3.7.5. Transplantation of umbilical cord blood stem cells	252
3.7.6. Application of the granulocytic colony-stimulating factor	253
3.8. Cell therapy at incidental and paroxysmal frustration	254
3.9. Asthenic bulbar paralysis	261
Chapter 4. CELL AND GENOME TECHNOLOGIES IN STUDYING OF PATHOGENESIS OF INTELLECTUAL DISABILITY	263
Chapter 5. MENTAL AND BEHAVIOUR IMPAIRMENTS	274
5.1. Transplantation of the autologous multipotent mesenchymal stromal cells at medicamentous resistant mental diseases	274
5.2. Transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells for correction of roughly-research deficiency	276
5.3. Syndrome of chronic weariness	284
5.4. Autism	285
Chapter 6. DISEASES OF THE EYE AND ITS APPENDAGES, DISEASES OF THE EAR AND THE MASTOID BONE.....	286
6.1. Cornea restoration	286
6.2. Retina restoration	288
6.3. Optic nerve restoration	298
6.4. Hearing restoration	299
6.5. Eardrum restoration	300
Chapter 7. TERMINAL CONDITIONS	303
ABBREVIATIONS.....	306
BIBLIOGRAPHIC LIST.....	309
CONTENT.....	353

Российская академия наук
Федеральное агентство научных организаций
Министерство здравоохранения Российской Федерации
Министерство сельского хозяйства Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт медицинской генетики»
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт фармакологии
и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга»

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования «Омский
государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина»
Бюджетное учреждение высшего образования Ханты-Мансийского
автономного округа – Югры «Ханты-Мансийская государственная
медицинская академия»

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
профессионального образования «Омская государственная
медицинская академия»

Государственное научное учреждение «Всероссийский научно-
исследовательский институт бруцеллёза и туберкулеза
животных» Россельхозакадемии

Государственное автономное учреждение здравоохранения
Свердловской области «Центр специализированных видов
медицинской помощи «Институт медицинских
клеточных технологий»

Ярыгин К.Н., Семченко В.В., Ерениев С.И., Ярыгин В.Н., Степанов С.С.,
Дыгай А.М., Петровский Ф.И., Лебедев И.Н. Регенеративная биология
и медицина. Книга II. Клеточные технологии в терапии болезней нервной
системы / Под ред. В.Н. Ярыгина, В.П. Пузырева, К.Н. Ярыгина и
В.В. Семченко. – Екатеринбург – Москва – Омск – Томск –
Ханты-Мансийск: Омская областная типография, 2015. – 360 с.

Издание осуществляется в рамках программы
«Наука и образование»
депутата Омского городского совета
кандидата юридических наук И.А. Антропенко

Научно-образовательный проект «Регенеративная биология,
гуманитарная и ветеринарная медицина. Современные биотехнологии и нано-
технологии» Института ветеринарной медицины
и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Омский государственный
аграрный университет имени П.А. Столыпина»

Информация об издании:
644122, г. Омск, ул. Октябрьская, 92,
Институт ветеринарной медицины и биотехнологии ОмГАУ,
курс цитологии, гистологии и эмбриологии,
ivm_omgau_gistology@mail.ru, 8(3812)23-74-71.

Компьютерная верстка
С.И. Ерениев, С.С. Степанов, И.Н. Лебедев, Н.И. Зайцева
Корректоры И.Н. Лебедев, В.В.Семченко
Ответственный за выпуск: В.В.Семченко
Авторы рисунка и монтаж фотографий на обложке:
А.Е. Макогонова, К.А. Гуляева

Сдано на верстку 30.08.2014 г. Подписано в печать 18.12.2014 г.
Формат 60х84/16. Гарнитура Times. Усл. печ. л. 20,93. Заказ 3326.
Тираж 500 экз. Отпечатано в ГП «Омская областная типография»:
644070, г. Омск, ул. Декабристов, 37.