

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

На правах рукописи

Фурса Григорий Андреевич

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ БИОИНЖЕНЕРНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА
ОСНОВЕ КЛЕТОК ОБОЯТЕЛЬНОЙ ВЫСТИЛКИ ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ТРАВМАХ СПИННОГО МОЗГА**

1.5.22. Клеточная биология

1.5.4. Биохимия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научные руководители

Чехонин Владимир Павлович,

Академик РАН, доктор
медицинских наук, профессор

Степанова Ольга Владиславовна,

Кандидат биологических наук

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1. Морфология и физиологическая роль спинного мозга	16
1.2. Травмы спинного мозга	21
1.2.1. Острая фаза травматического повреждения спинного мозга	22
1.2.2. Подострая фаза травматического повреждения спинного мозга.....	23
1.2.3. Хроническая фаза травматического повреждения спинного мозга.....	23
1.3. Методы диагностирования травмы спинного мозга.....	24
1.4. Консервативная терапия травмы спинного мозга	26
1.5. Инновационные методы терапии травматических повреждений спинного мозга	27
1.5.1. Использование клеточной терапии при лечении травм спинного мозга	28
1.5.2. Генная терапия при травме спинного мозга	36
1.5.3. Нейротрофические факторы.....	37
1.6. Биоинженерия в терапии травмы спинного мозга.....	40
1.6.1. Трехмерные гидрогели в терапии травмы спинного мозга	41
1.6.2. Полимеры, используемые при формировании гидрогелей.....	41
1.6.3. Самособирающиеся пептиды в терапии травмы спинного мозга.....	45
1.6.4. Использование трехмерная печати в терапии травмы спинного мозга.....	47
1.6.5. Материалы, используемые в печати	49
1.6.6. Технологии печати	50
1.6.7. Материалы с памятью формы.....	54
1.6.8. Сравнение гидрогелей и печатных конструкций в терапии травм спинного мозга	56
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	58
2.1. Материалы	58
2.1.1. Реактивы.....	58
2.1.2. Растворы	60
2.1.3. Объект исследования.....	61
2.2. Методы	62
2.2.1. Выделение обонятельной выстилки крысы	62
2.2.2. Получение первичной культуры клеток из обонятельной выстилки	63
2.2.3. Иммуноцитохимическая характеристика обкладочных клеток	64
2.2.4. Приготовление суспензии клеток.....	64

2.2.5. Оценка влияния гидрогелей на жизнеспособность клеток <i>in vitro</i>	65
2.2.6. Оценка влияния нейротрофического фактора мозга на жизнеспособность клеток в гидрогеле <i>in vitro</i>	66
2.2.7. Оценка функциональной активности BDNF	67
2.2.8. Моделирование контузионной травмы спинного мозга крысы	68
2.2.9. Тест локомоторной активности задних конечностей BBB (Basso, Beattie, Bresnahan)	70
2.2.10. Визуализация хронической травмы спинного мозга крысы с помощью метода MPT.....	73
2.2.11. Критерии исключения животных из групп.....	74
2.2.12. Приготовление биоинженерных препаратов из обкладочных клеток и гидрогеля.....	75
2.2.13. Приготовление биоинженерных препаратов из обкладочных клеток и пластин, полученных методом электроспиннинга	75
2.2.14. Маркирование обкладочных клеток мембранным красителем PKH26	76
2.2.15. Трансплантация биоинженерных препаратов при травме спинного мозга в острую фазу травмы	77
2.2.16. Трансплантация биоинженерных препаратов в кисту спинного мозга	78
2.2.17. Измерение морфометрических параметров кисты спинного мозга.....	79
2.2.18. Выведение животных из эксперимента	80
2.2.19. Подготовка гистологических препаратов спинного мозга.....	81
2.2.20. Иммуногистохимическое исследование спинного мозга	83
2.2.21. Проведение иммуноферментного анализа образцов биоинженерных конструкторов	84
2.2.22. Проведение ПЦР в реальном времени	84
2.2.23. Статистический анализ данных.....	86
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	87
3.1. Получение и иммуноцитохимическое исследование обкладочных клеток из обонятельной выстилки	87
3.2. Оценка функциональной активности рекомбинантного BDNF.....	90
3.3. Оценка выживаемости обкладочных клеток в биоинженерных конструкциях	91
3.4. Изучение динамики высвобождения нейротрофического фактора мозга из биоинженерных препаратов методом ИФА	94
3.5. Моделирование травмы спинного мозга	95
3.6. Оценка динамики восстановления двигательной активности задних конечностей при трансплантации биоинженерных препаратов на основе гидрогеля	96
А) Терапевтическая эффективность препарата на основе коллагена 1 типа с ОК.....	97
Б) Терапевтическая эффективность препарата на основе фибринового геля с ОК	99

В) Терапевтическая эффективность препарата на основе комбинированного гидрогеля	100
3.7. Оценка изменения морфометрических параметров кисты спинного мозга при трансплантации биоинженерных препаратов содержащие гидрогели и обкладочных клеток обонятельной выстилки крыс	104
А) Влияние препаратов на основе коллагена 1 типа на морфометрические параметры кисты спинного мозга	105
Б) Влияние препаратов на основе фибринового гидрогеля на морфометрические параметры кисты спинного мозга.....	106
В) Влияние препаратов из композитного гидрогеля на морфометрические параметры кисты спинного мозга	108
3.8. Изучение гистологических образцов тканей спинного мозга после трансплантации биоинженерных препаратов в кисты спинного мозга	113
3.9. Оценка динамики восстановления двигательной активности задних конечностей при трансплантации биоинженерных препаратов на основе пластин нановолокна ПВС.....	124
3.10. Изучение выживаемости клеток в составе биоинженерных препаратов на основе пластин нановолокна ПВС в зоне хронической травмы спинного мозга	128
3.11. Изучение влияния препарата на ремиелинизацию методом ПЦР.....	132
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ	137
ВЫВОДЫ	152
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	154
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	155

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Проблема терапевтического воздействия при травмах спинного мозга сохраняет высокую актуальность для современной медицины, а также нейробиологии. По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно диагностируется около 1 миллиона случаев [61, 157]. Часто травма является последствием дорожно-транспортных происшествий, падений с высоты, а также аварии на производстве [29]. Основными клиническими проявлениями последствий травмы спинного мозга являются параличи, а также нарушения чувствительности и функций внутренних органов ниже зоны повреждения [69, 89]. К развитию осложнений после травмы приводит гибель клеток в зоне повреждения и демиелинизация нейронов с последующим нарушением проводимости нервных импульсов. Существующие на сегодняшний день консервативные методы терапии малоэффективны ввиду того, что они не решают проблему нейрорегенерации [13, 122]. В этой связи первостепенной задачей становится разработка новых терапевтических стратегий при травматических повреждениях спинного мозга.

Одним из активно развивающихся направлений в терапии посттравматических повреждений спинного мозга является биоинженерия. Для лечения травм спинного мозга в экспериментальных работах и ряде клинических испытаний исследовались разные типы клеток в качестве клеточного препарата: эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, Шванновские клетки, нейральные стволовые/прогениторные клетки [3, 155, 231]. Особый интерес вызывают клетки из обонятельной выстилки носа. Получение этих клеток безопасно для пациента и позволяет создать аутологичный тканеспецифичный препарат для трансплантации в спинной мозг. Биопсия обонятельной выстилки проводится под местным наркозом и является безопасной для пациента. В ходе

доклинических испытаний была показана эффективность этих клеток в восстановлении моторной активности [8, 16, 200, 238, 261]. В ходе клинических испытаний была показана их безопасность у пациентов с травмой спинного мозга [46, 162, 251].

Однако трансплантация клеток напрямую в зону травмы может быть сопряжена с рядом трудностей. Так, было показано, что после извлечения инъекционной иглы под действием давления, которое создается в ткани спинного мозга из-за введения суспензии, может наблюдаться утечка клеток. Кроме того, при таком типе трансплантации значительное количество клеток может погибать в течение первых нескольких суток [166]. Решением данной проблемы может быть использование различных трехмерных конструкторов, которые могут быть дополнены клетками и введены через иглу. Использование трехмерных конструкторов для трансплантации клеток обеспечивает комплекс преимуществ: во-первых, они создают физический барьер, изолирующий трансплантированные клетки от агрессивного микроокружения поврежденной ткани, что значительно повышает их выживаемость; во-вторых, факторы роста, цитокины и внеклеточные везикулы способны накапливаться в таких конструкциях, выполняя роль их биоактивного наполнения. Благодаря этому появляется возможность дополнительно поддержать жизнеспособность клеток и управлять их миграцией, дифференцировкой и встраиванием в ткань-реципиент.

Основой таких конструкторов являются гидрогели, которые представляют собой мягкий материал из полимерных цепочек, образующий трёхмерную сеть и обладающий свойствами впитывать и удерживать большое количество воды или биологических жидкостей [105]. Данные качества позволяют создавать трехмерные конструкторы, способные одновременно быть гибкими, но при этом сохранять обособленную структуру. Было показано, что трансплантация клеток в составе геля значительно увеличивает выживаемость Шванновских клеток по сравнению с введением в солевом растворе и значительно уменьшает их утечку из зоны инъекции [166].

Помимо этого, существует альтернативный подход в использовании трехмерных конструкторов — применение твердых печатных каркасов. Такие скаффолды обладают большой механической прочностью, в то же время возможно детально контролировать свойства конструктора [40]. Они не подходят для использования при контузионной и компрессионной травме спинного мозга, однако есть исследования, в которых была показана эффективность применения печатных каркасов как накладок на зону повреждения [259]. В связи с этим большинство экспериментальных исследований проводится на модели повреждения с частичной гемисекцией тканей спинного мозга [20].

Перспективными для лечения травм спинного мозга могут быть биоинженерные препараты на основе обкладочных клеток обонятельной выстилки и трехмерных конструкторов. Однако подобные препараты на данный момент не были изучены в терапии повреждений спинного мозга, в частности, при хронической и острой фазе травма.

Степень разработанности темы

С конца XX столетия ведётся активное исследование того, насколько эффективна трансплантация клеток, полученных из обонятельной выстилки носа, в ткань спинного мозга. Данные, полученные в опытах *in vivo*, свидетельствуют о том, что обкладочные клетки приживаются в спинном мозге после трансплантации, мигрируют, уменьшают размер повреждённой области, способствуют ремиелинизации аксонов, а также восстановлению моторной функции [202]. В клинических испытаниях продемонстрированы безопасность и эффективность аутологичных ОК у пациентов с ТСМ [68, 162, 251].

Для повышения эффективности клеточной терапии активно применяются биоинженерные конструкции (гидрогели, нановолокнистые скаффолды), которые служат носителями для клеток, защищают их от агрессивного микроокружения и обеспечивают контролируемую доставку факторов роста [156, 233, 286]. В клинической практике применение скаффолдов направлено на восстановление костных дефектов, лечение остеомиелита, борьбу с

послеоперационными инфекциями и осложнениями. Так, была разработана линейка сосудистых скаффолдов, на основе биосорбируемого сополимера молочной кислоты и металлов. Было показано, что такие полимеры эффективнее металлических стентов восстанавливают эластичность сосудов [220, 241]. Кроме этого, трёхмерные печатные каркасы нашли широкое клиническое применение в терапии костных дефектов [83]. На сегодняшний день продолжаются исследования с целью применения новых разработанных скаффолдов при диабетических язвах, грыжах и дефектах периферических нервов [28, 264]. Также активно изучается возможность применения биоинженерных конструкций в тканевой инженерии центральной нервной системы (ЦНС) для восстановления после травматических повреждений головного и спинного мозга, а также при нейродегенеративных заболеваниях [7, 80, 176].

Несмотря на достигнутый прогресс, ряд вопросов остаётся нерешённым: практически отсутствуют систематические исследования комплексных биоинженерных препаратов на основе ОК, гидрогелей различного состава и BDNF при хронической TCM; недостаточно изучено применение конструкций из нановолокна ПВС с ОК в острой фазе травмы; нет данных о сравнительной эффективности гидрогелей разного состава как носителей ОК и о влиянии BDNF на терапевтический потенциал препаратов в зависимости от фазы травмы.

Цель исследования – Изучение эффективности биоинженерных препаратов на основе клеток обонятельной выстилки при экспериментальных травмах спинного мозга.

Задачи исследования:

1. Изучить выживаемость и пролиферацию обкладочных клеток в биоинженерных конструктах: в гидрогелях, полимерных пластинах *in vitro*.
2. Разработать методику трансплантации обкладочных клеток в коллагеновых гидрогелях, фибриновых гидрогелях и комбинированного гидрогеля на основе фибрина, гиалуроновой кислоты и желатина в посттравматические кисты спинного мозга.

3. Оценить эффективность биоинженерных препаратов из обкладочных клеток с нейротрофическим фактором мозга в коллагеновых гидрогелях, фибриновых гидрогелях и комбинированного гидрогеля на основе фибрина, гиалуроновой кислоты и желатина при трансплантации в экспериментальных кистах спинного мозга.
4. Разработать препарат на основе обкладочных клеток, полимерных пластин и BDNF, а также апробировать методику применения таких препаратов в острой фазе травмы спинного мозга.
5. Провести оценку эффективности применения комбинированных биоинженерных конструкций (обкладочные клетки, полимерная пластина, BDNF) при фазе острого повреждения спинного мозга.

Объект и предмет исследования

Объектом настоящего исследования являются клетки обонятельной выстилки крыс и полученные из них биоинженерные конструкции, комбинации гидрогелевых носителей с обкладочными клетками, используемые для трансплантации в кисту спинного мозга.

Предметом настоящего исследования является моделирование экспериментальной контузионной травмы спинного мозга на крысах; разработка биоинженерных препаратов на основе обкладочных клеток для терапии травмы спинного мозга; оценка эффективности трансплантации разработанных препаратов по динамике восстановления двигательной активности задних конечностей и изменению объёма кисты спинного мозга; исследование влияния мозгового нейротрофического фактора на терапевтическую эффективность созданных конструкторов.

Теоретической и методологической базой исследования являлись теоретические и методологические разработки российских и иностранных исследователей в области физиологии, гистологии и молекулярной биологии травматического повреждения спинного мозга, а также механизмов его восстановления. Кроме того, использованы методические работы по клеточным

технологиям выделения нейральных стволовых/прогениторных и обкладочных клеток из обонятельной области носовой слизистой, а также по моделированию травм спинного мозга.

Информационной основой работы являлись публикации из рецензируемых научных журналов, а также материалы и тезисы профильных научных конференций.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.22. «Клеточная биология» пунктам: 10 (...физиологической и репаративной регенерации тканей, а также, регуляции этих процессов...), 13 (Изучение молекулярных, иммунологических, цитохимических и физиологических аспектов жизненного цикла клеток при экспериментальных (в том числе повреждающих) воздействиях), 19 Клеточные технологии как основа для разработки терапевтических подходов для лечения различных патологий...) и 1.5.4. «Биохимия» пунктам 5 (Анализ и ... биологически активных веществ, выяснение их физиологического действия и возможностей применения полученных веществ в медицине и других отраслях народного хозяйства), 10 (...выяснения причин различных болезней и изыскания путей их эффективного лечения).

Научная новизна

Разработаны протоколы получения биоинженерных препаратов на основе клеток обонятельной выстилки крыс и гидрогелей. Уменьшение объёма посттравматических кист спинного мозга через 4 недели после трансплантации, а также улучшение динамики двигательной активности задних конечностей крыс на протяжении того же периода — таковы впервые полученные результаты применения указанных конструкторов при хронической фазе травматического повреждения спинного мозга.

Впервые были разработаны биоинженерные препараты на основе нановолокна из поливинилового спирта и клеток обонятельной выстилки крыс. Впервые было показано, что применение таких препаратов при острой фазе

травмы спинного мозга положительно влияет на восстановление моторной активности.

Впервые было изучено положительное влияние нейротрофического фактора мозга на эффективность полученных биоинженерных препаратов. Было показано незначительное улучшение моторной активности при терапии хронической формы травмы спинного мозга. При терапии острой фазы травмы спинного мозга было показано улучшение моторной активности на более раннем сроке с последующей демонстрацией наибольшего результата.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Для разработки новых средств лечения пациентов с травматическими поражениями спинного мозга, в том числе осложнёнными посттравматическими кистами, теоретическую базу составляют предложенные в работе протоколы получения биоинженерных препаратов. Эти протоколы охватывают клетки обонятельной выстилки, а также коллагеновые, фибриновые и комбинированные гидрогели на основе фибрина, гиалуроновой кислоты и желатина. При этом они допускают адаптацию к иным полимерам и клеткам, что открывает путь к созданию более результативных препаратов — например, гидрогелей, способных проводить нервные импульсы.

В отношении острой травмы спинного мозга аналогичную теоретическую базу закладывают протоколы получения биоинженерных препаратов из клеток обонятельной выстилки и нановолокна из поливинилового спирта. Развитие этой технологии в перспективе позволит сформировать линейку продуктов, нацеленных на различные аспекты повреждения спинного мозга, включая подавление воспаления и восстановление проводимости.

После трансплантации гидрогель-содержащих препаратов у экспериментальных животных отмечалась чётко выраженная положительная динамика в восстановлении локомоторной активности задних конечностей; при этом по результатам МРТ-исследования регистрировалось уменьшение объёма посттравматических кист. Эти экспериментальные данные подтверждают

результативность рассматриваемого подхода. Подобная совокупность наблюдений может рассматриваться как свидетельство запуска регенеративных процессов в спинном мозге после введения конструкта. Иными словами, трансплантация такого рода препаратов, по-видимому, не просто ограничивает дальнейшее повреждение тканей, но и способствует активизации собственных восстановительных механизмов нервной ткани. Соответственно, комбинированные препараты подобного типа представляют значительный интерес и могут стать предметом дальнейших доклинических и клинических испытаний.

Отдельно было установлено, что наложение конструктов из нановолокна на зону травмы в острую фазу повреждения спинного мозга даёт лучший результат по восстановлению моторной активности, чем отсутствие терапии или трансплантация клеток без геля. Вероятный механизм состоит в том, что трёхмерные конструкты экранируют клетки от цитотоксических факторов, возникающих в острой фазе травмы. Это поддерживает количество жизнеспособных клеток и обеспечивает их постепенную миграцию в зону повреждения, где они, по-видимому, и запускают регенеративные процессы.

Наконец, было продемонстрировано, что добавление BDNF способно повысить эффективность биоинженерных препаратов. Более того, введение активных агентов статистически значимо улучшает общую эффективность и может избирательно влиять на отдельные последствия травмы, например на нейровоспаление. В совокупности полученные результаты указывают на активацию нейрорегенерации после трансплантации биоинженерных препаратов на основе обкладочных клеток.

Методология и методы исследования

В работе использовался следующий набор методических подходов: культивирование клеточного материала (выделение клеток, их пассирование и наращивание, культивирование в трёхмерных биоконструкциях), гистологический анализ (получение срезов спинного мозга, их

иммуноцитохимическое окрашивание), создание экспериментальной модели посттравматических кист спинного мозга, тестирование двигательной функции животных по шкале BBB, визуализация структур спинного мозга методом МРТ, проведение иммуноферментного анализа и ПЦР в реальном времени, а также статистическая обработка результатов.

Положения, выносимые на защиту

1. Созданы биоинженерные конструкторы на основе клеточного материала обонятельной выстилки, интегрированного в гидрогелевые носители: коллаген I типа, фибрин, гиалуроновую кислоту и желатин, а также конструкции, в которых те же клетки размещены на нановолоконных пластинах из поливинилового спирта с добавлением нейротрофического фактора.
2. Введение полученных биоинженерных конструкторов в область экспериментальных посттравматических кист спинного мозга сопровождается положительной динамикой показателей опорно-двигательной функции задних конечностей животных на протяжении четырёхнедельного периода наблюдения.
3. При имплантации разработанных конструкций в полость посттравматических кист на стадии хронического повреждения спинного мозга зафиксировано статистически значимое сокращение их объёма к четвёртой неделе эксперимента. Показано, что трансплантированные клетки сохраняют жизнеспособность не менее 30 суток, способны к миграции за пределы зоны имплантации и стимулируют процессы ремиелинизации.
4. Применение конструкций на основе нановолоконных пластин из поливинилового спирта с плотной подложкой, заселённых обкладочными клетками, при их наложении на очаг повреждения на острой стадии травмы спинного мозга крыс обеспечивает статистически достоверное улучшение локомоторной активности задних конечностей начиная с третьих суток

после травмы и на протяжении всего 35-суточного периода наблюдения, в отличие от контрольных групп (без терапии, с трансплантацией изолированных клеток без конструкта и с применением пластин без подложки).

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных результатов обеспечена применением современных методов исследования, достаточным объёмом выборки в каждой экспериментальной группе, воспроизводимостью полученных данных, а также корректной статистической обработкой результатов и их сопоставлением с данными актуальной научной литературы.

Результаты проведенных исследований доложены на шести конференциях. V Национальный конгресс по регенеративной медицине (Москва, 23-25.11.2022), Биотехнология: состояние и перспективы развития (Москва, 2022), Биотехнология: состояние и перспективы развития (Москва, 2023), Международный конгресс CRISPR-2023 (Новосибирск, 11–13. 09. 2023), VI Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине (Санкт-Петербург, 13-15.11.2024), ХимБиоSeasons 2025 (Калининград, 10-18.04.2025).

Личный вклад автора заключается в самостоятельном планировании и реализации экспериментальной части работы на всех её этапах, проведении статистического анализа и содержательной интерпретации результатов, а также в написании научных статей по материалам исследования.

Публикации. Соискатель имеет 14 опубликованных работ по теме диссертации, из них 4 научные статьи, опубликованы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международной базе данных «Scopus», и 4 опубликованы в библиографической базе данных RSCI, а также 6 материалов конференций.

Внедрение результатов работы

Полученные в диссертации результаты используются в образовательном процессе кафедры медицинских нанобиотехнологий медико-биологического

факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (Пироговский Университет).

Структура и объем работы.

Диссертационная работа содержит: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, их обсуждение, заключение, выводы и список литературы, который включает работы на русском (8) и иностранном (293) языке. Диссертация изложена на 171 странице машинописного текста и содержит 20 таблиц и 43 рисунках.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Морфология и физиологическая роль спинного мозга

Спинной мозг (СМ) представляет собой отдел центральной нервной системы (ЦНС), реализующий несколько жизненно значимых функций. Прежде всего, это проводниковая функция: по нисходящим (эфферентным) путям сигналы передаются от головного мозга к скелетной мускулатуре и внутренним органам, обеспечивая двигательные акты и поддержание гомеостаза, тогда как по восходящим (афферентным) путям информация от кожных, мышечных и висцеральных рецепторов поступает в вышеразположенные отделы ЦНС. Кроме того, спинному мозгу свойственна рефлекторная функция — замыкание дуг безусловных рефлексов на собственном сегментарном уровне без обязательного вовлечения головного мозга. На уровне спинного мозга также локализованы центральные структуры вегетативной нервной системы, относящиеся как к симпатическому, так и к парасимпатическому её отделам.

СМ представляет собой длинный цилиндрический тяж длиной в 40–45 см, омываемый спинномозговой жидкостью, ликвором. Как и головной мозг, СМ защищён 3 оболочками: мягкой, паутинной и твёрдой (Рисунок 1). СМ человека связан с головным мозгом через большое затылочное отверстие черепа и пролегает в спинномозговом канале, образованном дугами позвонков. Спинномозговой канал защищает спинной мозг, корешки спинномозговых нервов и сосуды, изолируя их от внешних воздействий, в том числе, от травматических повреждений и сжатия.

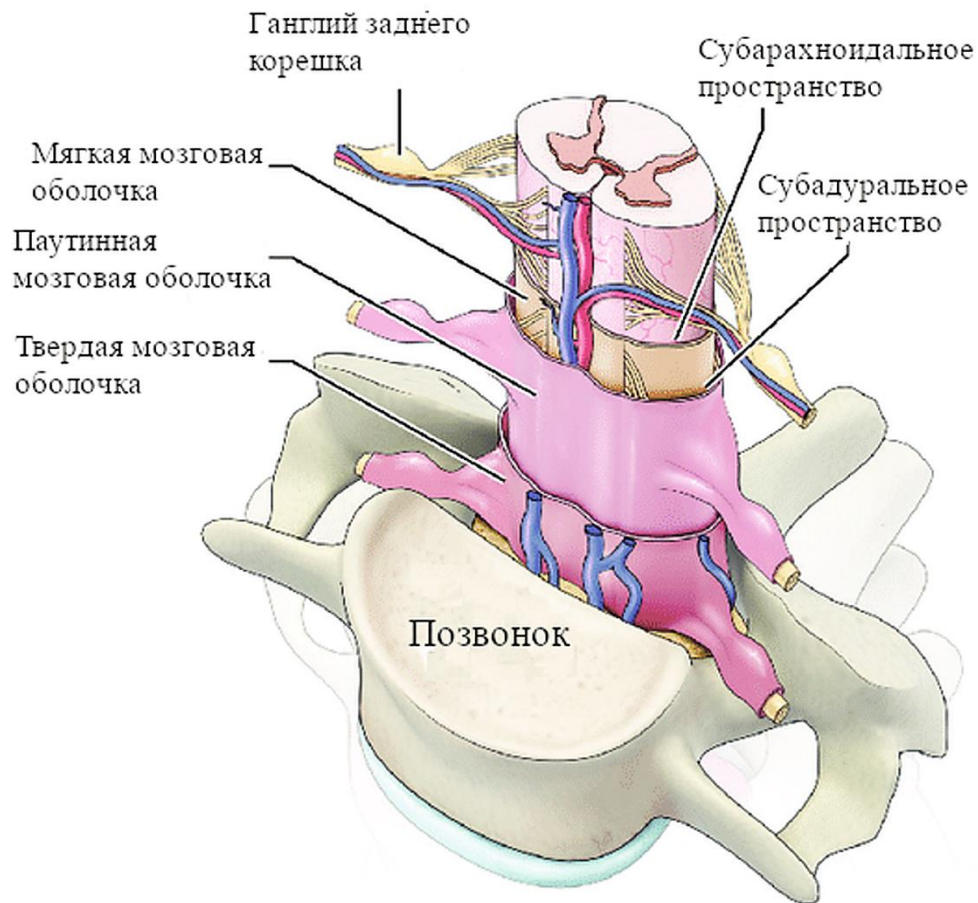


Рисунок 1 – Схема строения спинного мозга (адаптировано из [248])

СМ состоит из серого и белого вещества. Белое вещество расположено по периферии органа и представляет собой отростки нейронов. Также анатомически оно делится на дорсальные, дорсолатеральные, латеральные, вентральные и вентролатеральные канатики. Серое вещество состоит из тел нейронов и глии и локализовано ближе к центру. По анатомическому строению спинной мозг разделяют на несколько отделов: шейный, грудной, поясничный и крестцовый. От каждого позвонка отходят вентральные и дорсальные корешки, которые образуют спинномозговую нервную дугу (Рисунок 2). Каждый сегмент позвоночника имеет свою нервную дугу, которая, в свою очередь, отвечает за конкретные функции и органы (Таблица 2). [60, 271]. В основе рефлексорной функции лежит рефлексорная дуга. Сигнал от рецептора идет по чувствительному нейрону, который через вставочный нейрон передает сигнал на

мотонейрон, а тот, в свою очередь, несет его к эффекторному органу. Проводящая функция осуществляется восходящими и нисходящими путями в белом веществе спинного мозга.

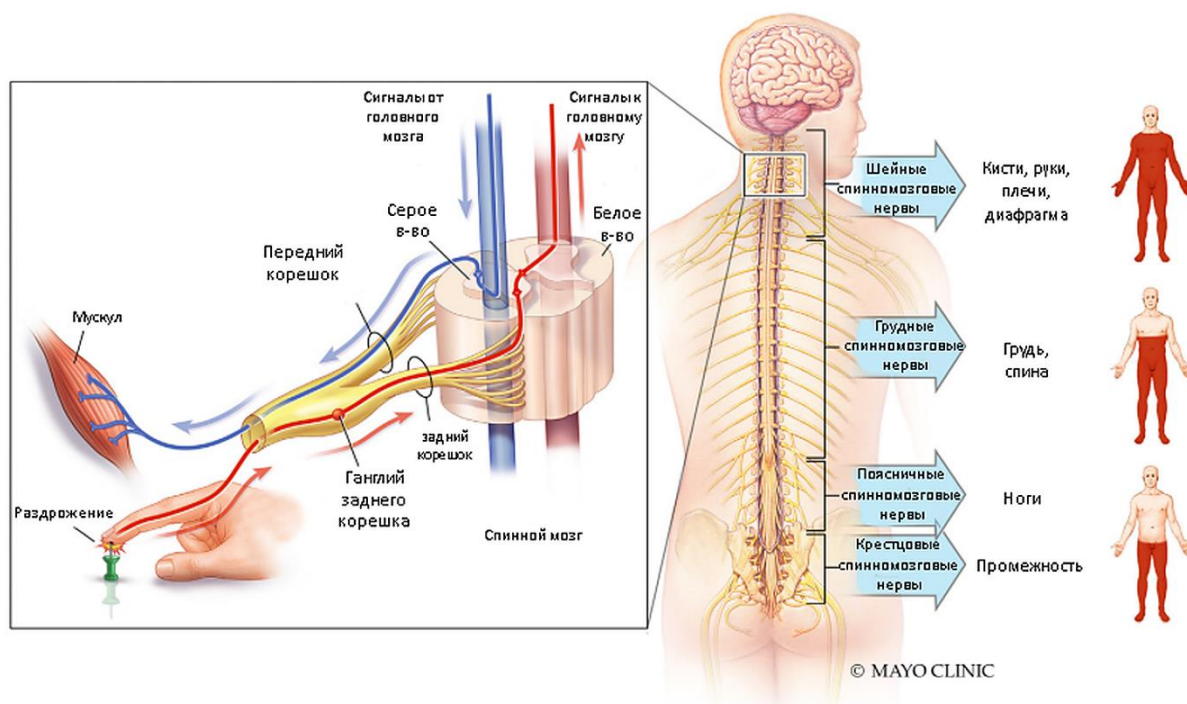


Рисунок 2 – Строение спинного мозга и распределение зон иннервации по сегментарным уровням (шейный, грудной, поясничный, крестцовый отделы), а также схема рефлекторной дуги на уровне сегмента спинного мозга (адаптировано из [19, 163])

Таблица 1 – Иннервация спинного мозга и органов (адаптировано из [19])

Сегмент	Иннервация поперечнополосатых мышц
C1-C6	Сгибание шеи
C1-T1	Разгибание шеи
C3, C4, C5	Поддержка диафрагмы
C5, C6	Движение плеч, подъем рук
C6	Повороты руками
C6, C7	Сгибание запястий
C7, C8	Мелкая моторика

Продолжение таблицы 1

Сегмент	Иннервация поперечнополосатых мышц
T1-T6	мышцы пояса
T7-L1	Мышцы пресса
L1-L4	Мышцы таза
L2, L3, L4	Сгибание ног
L4, L5, S1	Разгибание ног, сгибание голеностопа, сгибание пальцев
L5, S1, S2	Сгибание голеностопа и пальцев

Спинальный мозг образован различными типами нейронов и клеток глии. Выделяют 3 типа нейронов в зависимости от функций: сенсорные нейроны (передают сигналы от периферических сенсорных нейронов до ЦНС), мотонейроны (передача сигналов от ЦНС к органу) и вставочные нейроны (соединяют различные нейроны в спинном мозге). Глиальные клетки осуществляют поддержку нейронов [132]. Клетки нейроглии в свою очередь могут быть разделены на макроглию и микроглию. Макроглия включает в себя астроглию, олигодендроглию и эпендимную глию [1].

Астроциты в первую очередь отвечают за формирование внеклеточного матрикса ЦНС, а также участвуют в поддержке нейронов через транспортную и барьерную функцию, кроме этого они участвуют в фагоцитозе. Олигодендроциты создают и поддерживают миелиновые оболочки, формируя нервные волокна. Эпендимоциты, данный тип клеток выстилает полости желудочка, обеспечивая ток ликвора в полости мозга, а также образуют нейро-ликворный и гемато-ликворный барьеры. Отдельно выделяют клетки микроглии, которые являются потомками моноцитов и относятся к макрофагально-моноцитарной системе, отвечая за иммунные реакции в ЦНС [78, 120, 262].

Внутренняя, прилегающая к СМ, мягкая сосудистая оболочка состоит из рыхлой волокнистой соединительной ткани и сосудов, питающих мозг. Данный слой покрывает паутинная оболочка, состоящая из соединительной ткани и

фибробластов, покрытая с двух сторон клетками глии. Паутинная оболочка охватывает СМ, не заходя в пространство между его отделами. Самая внешняя, твердая оболочка, представляет собой два плотных соединительных слоя с коллагеновыми волокнами. Ее наружный слой пронизан сосудами и формирует каналы для спинномозговых нервов, а внутренний покрыт эндотелием и обращен к спинному мозгу, охватывая его. Между твердой и паутинной оболочкой находится субдуральное пространство. Между твердой оболочкой и спинномозговым каналом находится эпидуральное пространство с сосудами и соединительной тканью [184].

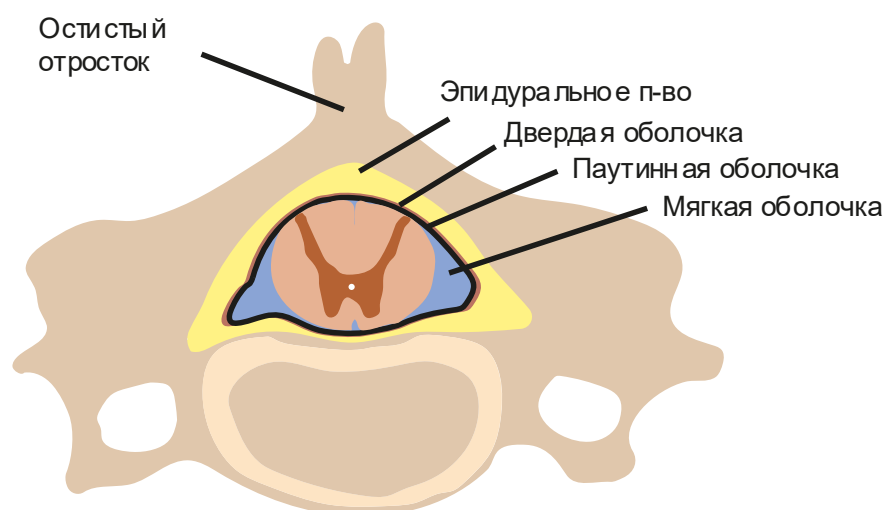


Рисунок 3 – Схематическое представление оболочек спинного мозга

В процессе эволюции параллельно с усложнением функций спинного мозга происходило усовершенствование строения этого органа ЦНС. Нахождение спинного мозга в спинномозговом канале, заполненном спинномозговой жидкостью, создает его защиту от внешних воздействий, в том числе, травм. Однако травмы в зависимости от локализации и степени повреждения спинного мозга могут приводить к осложнениям, в том числе, к параличам и хроническим болям.

1.2. Травмы спинного мозга

Поражения спинного мозга могут иметь как травматическую, так и нетравматическую этиологию и сопровождаются нарушением его структурной целостности и функциональной активности. К нетравматическим причинам относят инфекционные и воспалительные процессы, онкологические заболевания, а также токсическое воздействие; травматические причины охватывают все формы прямого механического повреждения спинного мозга (ушибы, удары, разрывы) [211].

Травма спинного мозга представляет собой повреждение, возникающее в результате различных внешних воздействий. По данным литературы, частота встречаемости данной патологии составляет в среднем 24 случая на 1 миллион населения. При этом основную долю (около 90%) причин травматизации спинного мозга составляют падения и дорожно-транспортные происшествия. [17, 52, 211]. В клинической практике выделяют контузионные и компрессионные травмы, а также разрыв спинного мозга [183].

Контузионная травма – патологическое состояние спинного мозга, вызванное ударом и приводящее к образованию гематомы в области поражения из-за кровоизлияний и нарушений кровотока. При наблюдении пациентов с данным типом травмы в шейном отделе спинного мозга диагностируется тетраплегия (паралич тела ниже шеи, включая верхние и нижние конечности), при аналогичной травме в грудном или поясничном отделе спинного мозга диагностируют параплегию (паралич обеих верхних или обеих нижних конечностей) и нарушения функций органов малого таза.

Компрессионная травма – патологическое состояние, обусловленное закрытым повреждением тканей спинного мозга вследствие продолжительного воздействия механической силы. Для пациентов с данным видом травмы характерно снижение болевой, температурной и тактильной чувствительности [223].

Разрыв спинного мозга — травматическое повреждение, характеризующееся полным либо частичным нарушением проводниковой связи внутри спинного мозга вследствие физического разрушения его тканевых структур [223]. Особую опасность данный тип травмы представляет ввиду того, что он приводит к полной утрате чувствительности и двигательной функции в областях тела, расположенных ниже уровня поражения.

Повреждения спинного мозга разделяют на первичные и вторичные [29, 89, 112]. Первичная травма связана с непосредственным повреждением органа. В месте травмы происходят кровоизлияние, ишемия и нарушение целостности ткани спинного мозга. Другим патологическим процессом после травмы является нейрогенный шок — разновидность шока, особенностью которого является нарушение проведения импульсов от симпатической нервной системы по спинному мозгу. В результате ничем не ограниченный тонус блуждающего нерва приводит к системной гипотензии, что усугубляет ишемию. Данные процессы способствуют гибели нейронов и клеток глии, что, в свою очередь, приводит к высвобождению кальция, активных форм кислорода, аларминов и токсичных соединений в ткань спинного мозга. Все это приводит к развитию вторичного повреждения нервной ткани спинного мозга [165].

При развитии вторичного повреждения выделяют три стадии по продолжительности и срокам развития патологических процессов: острая фаза, подострая фаза, хроническая фаза.

1.2.1. Острая фаза травматического повреждения спинного мозга

Острая фаза травмы спинного мозга — это патологический процесс, который протекает непосредственно с момента травмы в течение первых суток. Стадия характеризуется активацией воспалительных процессов, кровоизлиянием, увеличением проницаемости гематоэнцефалического барьера. Исходом является развитие ишемии и формирование отека в области травмы

с выраженной массовой гибелью клеток в зоне повреждения [17, 292]. На уровне организма наблюдается развитие сердечно-сосудистых патологий (шок, аритмии, колебания давления), нарушения дыхания, терморегуляции, мочеиспускания и функций кишечника, развитие тромбоэмболии, пролежней, спастичности, болей, а также негативных психологических реакций [95]. С течением времени острая фаза переходит в подострую.

1.2.2. Подострая фаза травматического повреждения спинного мозга

Подострая фаза травмы спинного мозга — это патологический процесс, который развивается со вторых суток после повреждения до 30-40 суток с момента травмы [122]. В рамках данной фазы происходит ряд событий: смена фенотипа макрофагов M1 на M2 [82]; развитие демиелинизации [101]; продолжение клеточной гибели и начало формирования глиального рубца. В клинической литературе подострый период рассматривается как время активной реабилитации, высокой пластичности и одновременного риска развития осложнений (тромбоэмболия, инфекции и др.) [76, 126]. В дальнейшем происходит переход травмы в хроническую фазу.

1.2.3. Хроническая фаза травматического повреждения спинного мозга

Хроническая травма спинного мозга — это патологическое состояние, которое обычно наступает через 40 суток с момента повреждения и может сохраняться на протяжении всей жизни в отсутствие лечения. К этой фазе относят множество различных процессов, которые включают продолжение деградации аксонов, завершение формирования глиально-фиброзного рубца [24], в ряде случаев (около 30% случаев) происходит формирование полостей с образованием кист [256]. Киста спинного мозга — это полость, заполненная

цереброспинальной жидкостью, стенки которой представляют собой плотное образование из астроцитов, фибробластов, эпендимных клеток и коллагеновых волокон [119, 229]. Данные образования в спинном мозге препятствуют регенерации и восстановлению функций, а также оказывают механическое давление на нервные ткани, что приводит к нарушению тока ликвора. Впоследствии развиваются вегетативная дистрофия, дистрофия мочевого пузыря, хронический болевой синдром, нарушение респираторной функции, остеопороз [222]. У пациентов с хронической травмой спинного мозга описан изменённый профиль Т-клеток и продукции цитокинов (IL-10, IL-9, IL-17, TNF- α , IFN- γ), особенно при давности повреждения более 15 лет [81]. Клиническая картина формирования кисты характеризуется нарушением моторных и сенсорных функций, острым болевым синдромом, а также повышенным риском тромбозов и дыхательных расстройств. При отсутствии терапии кисты имеют тенденцию к разрастанию, что приводит к прогрессирующему утяжелению клинической картины [217, 228].

1.3. Методы диагностирования травмы спинного мозга

При постановке диагноза после ТСМ основное внимание уделяется первичному осмотру. На данном этапе определяется степень поражения и нарушения работы органов. Критерием является установка места травмы и определение уровня чувствительности. По итогу проведенных исследований создают прогноз оптимальной стратегии терапии.

На сегодняшний день медицинским сообществом принята классификация Американской ассоциации спинальной травмы (American Spinal Injury Association / International Medical Society of Paraplegia, ASIA/IMSOP) (Таблица.2). Данная система позволяет оценить тяжесть патологии в баллах, основанных на оценке сенсорной и моторной функции пациента [55].

Таблица 2 – Система оценки моторной активности ASIA

Оценка	Краткое описание
A	Отсутствие моторной и сенсорной функции
B	Наличие слабой сенсорной функции
C	Слабовыраженная моторная функция, сохранение сенсорной функции
D	Средневыраженная моторная функция, нормальная сенсорная функция
E	Нормальная моторная и сенсорная функция

Наиболее информативным методом для диагностики травмы спинного мозга является магнитно-резонансная томография (МРТ) [58]. При развитии воспаления в результате травмы происходит нарушение гомогенности ткани, что на МРТ выявляется как область пониженной плотности. В случаях хронической травмы на МРТ-снимках можно распознать кисту спинного мозга, которая визуализируется как оформленная округлая полость, более светлая по сравнению с окружающей тканью область (Рисунок 4) [99].



Рисунок 4 – Киста спинного мозга через 4 недели после травмы на уровне 2 грудного позвонка. Стрелкой отмечена киста спинного мозга. Сагиттальная плоскость (адаптировано из [199])

Для более детального исследования патологических изменений, происходящих в спинном мозге при травме, разрабатываются и применяются различные биохимические тесты, оценивающие нейрохимические маркеры (Белок S100 β , NSE, GFAP и др) [93]. Также оцениваются маркеры остеопороза, включающие в себя такие методы, как оценка минерализации костей посредством двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии и компьютерная томография (КТ) для оценки структуры. [23, 25, 98].

Полная и своевременная диагностика травмы спинного мозга позволяет не только корректировать терапию для достижения большей эффективности, но и снижать риски дальнейшей инвалидизации больных.

1.4. Консервативная терапия травмы спинного мозга

Консервативная терапия пациентов с травмой спинного мозга включает широкий спектр медикаментозных, физиотерапевтических и реабилитационных подходов, направленных на минимизацию вторичного повреждения, поддержание жизненно важных функций и улучшение неврологического восстановления как в остром, так и в хроническом периодах [30, 173, 225]. В острой фазе основное внимание уделяется поддержанию перфузии спинного мозга (артериальное давление), предотвращению осложнений, а также использованию нейропротективных препаратов (кортикостероиды, рилузол, эритропоэтин и др.), хотя их эффективность остается предметом дискуссий [73, 174]. В хронической фазе основное внимание уделяется контролю боли (антиконвульсанты, антидепрессанты), лечению спастичности (баклофен, тизанидин), применению препаратов для улучшения проводимости (4-аминопиридин) и стимуляции регенерации (G-CSF) [64, 291]. Однако, данные подходы показали свою низкую эффективность, тем самым создавая запрос на комбинированные методы. В частности, сочетание медикаментозной терапии с

реабилитацией может приводить к лучшим функциональным результатам по сравнению с монотерапией [63, 86, 291].

Несмотря на все усилия, консервативное лечение пациентов с ТСМ не обеспечивает полного восстановления функций. Это связано с тем, что эти методы не способствуют регенерации нервной ткани. В связи с этим, необходима разработка новых методов терапии, которые будут оказывать нейропротективный эффект и запускать нейрорегенерацию.

1.5. Инновационные методы терапии травматических повреждений спинного мозга

Разработка более эффективных методов лечения травмы спинного мозга остаётся предметом активных исследований. Для этих целей используют различные экспериментальные модели ТСМ — как *in vitro*, так и *in vivo*. Среди наиболее часто применяемых — модели, воспроизводящие компрессию, контузию, разрыв и ишемию спинного мозга [140, 204, 224]. Наибольшее распространение в лабораторной практике получили модели на крысах, поскольку данный объект имеет ряд преимуществ. Так:

1. Крысы лучше переносят операционное вмешательство и быстрее выходят из наркоза по сравнению с другими лабораторными животными [84].
2. Их использование в экспериментальной работе экономически выгоднее по сравнению с другими млекопитающими.
3. Большая база медицинских и фармакологических исследований на этих лабораторных животных открывает широкие перспективы трансляции полученных результатов [96].

В последние годы широко применяются генно-модифицированные (трансгенные линии) крысы, которые могут служить моделью для изучения отдельно взятых процессов при различных патологиях путем направленного изменения молекулярного профиля [47, 250]. Для классического моделирования

травм спинного мозга (механические подходы) для создания физического повреждения используются различные породы и линии лабораторных крыс, в частности, линии Вистар (Wistar) [130].

Для мониторинга спинного мозга после моделирования травматических повреждений широкое распространение получили качественные тесты, имитирующие неврологические тесты, которые применяются для пациентов. К таким тестам относятся тест локомоторной активности задних конечностей BBB (Бассо, Битти и Бреснахан) [31] и catwalk. Такие методы, как МРТ и КТ применяются для визуализации спинного мозга экспериментальных животных и патологических изменений, развивающихся после травмы.

Несмотря на широкий спектр исследований и актуальность проблемы, не было получено эффективной стратегии терапии травм спинного мозга. Основными вопросами являются предотвращение гибели нейронов в области травмы и низкий регенеративный потенциал зрелых нейральных клеток. По этим причинам все больше исследователей обращает внимание на изучение эффективности различных подходов регенеративной медицины на экспериментальных травмах спинного мозга. Клеточная терапия, генная терапия, применение ростовых факторов (нейротрофинов) и трёхмерная биопечать — таковы наиболее перспективные направления поиска эффективных методов лечения травм спинного мозга. Все перечисленные подходы объединяются общим термином «биоинженерия».

1.5.1. Использование клеточной терапии при лечении травм спинного мозга

Под клеточной терапией понимают комплекс лечебных подходов, базирующихся на применении клеток эукариотического происхождения. В последние несколько лет данный метод терапии показывает многообещающие результаты. Существует широкий перечень клеточных культур, применяемых в

различных патологиях [272]. Так, модифицированные Т-клетки показали свою эффективность в терапии В-клеточных лейкозов [26, 74]. А прогениторные клетки рассматриваются как кандидаты для терапии нейродегенеративных заболеваний [254].

В зависимости от источника клеток или тканей для терапии выделяют следующие типы трансплантации:

1. Аллотрансплантация – пациенту пересаживают ткани или клетки от другого пациента. Самым частым случаем является пересадка органов, спинного мозга, переливание крови. Сопровождено с рисками отторжения трансплантата, вызванного ответом иммунной системы.
2. Аутоотрансплантация – пациенту пересаживают его собственные клетки. Часто встречается в пластической хирургии при пересадке кожной ткани. Является наиболее перспективной, поскольку в данном случае риск отторжения иммунной системой наименьший.
3. Ксенотрансплантация – пациенту пересаживают клетки от других видов. В случае человека в первую очередь рассматривают свиней. Так, были успешно трансплантированы неонатальные клетки сосудистого сплетения в терапии болезни Паркинсона [100, 159].

На сегодняшний день для терапии травм спинного мозга изучаются несколько типов клеток, находящихся на разных стадиях лабораторных и клинических испытаний (Таблица 3).

Таблица 3 – Обзорная таблица исследований по применению клеточных препаратов при терапии травм спинного мозга

Тип клеток	Трансплантат	Эффект	Тип исследований	Ссылка
Эмбриональные стволовые клетки	$2 \cdot 10^6$	Отмечена безопасность клеток	Клинические испытания	[171]
	$2 \cdot 10^7$ Множественная трансплантация	Улучшение оценки ASIA у пациентов	Клинические испытания	[227]
	$1 \cdot 10^6$	Показано улучшение оценки локомоторных тестов	Лабораторные исследования	[170]
Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки	$1 \cdot 10^6$	Показано выживание и улучшение оценки локомоторных тестов задних конечностей	Лабораторные исследования	[10]
	$1 \cdot 10^5$	Показано улучшение локомоторной активности	Лабораторные исследования	[129]

Тип клеток	Трансплантат	Эффект	Тип исследований	Ссылка
Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки	$2 \cdot 10^6$	Показано отсутствие эффектов при хронической травме	Лабораторные исследования	[49]
	$4 \cdot 10^5$	Показано отсутствие эффектов при хронической травме	Лабораторные исследования	[167]
Мезенхимальные стволовые клетки	$2.5 \cdot 10^4 - 1 \cdot 10^5$	Показано сокращение объема глиального рубца, без улучшения локомоторной активности	Лабораторные исследования	[169]
	$4 \cdot 10^7$	Показано улучшение локомоторной функции	Лабораторные исследования	[300]

Тип клеток	Трансплантат	Эффект	Тип исследований	Ссылка
Мезенхимальные стволовые клетки	$8 \cdot 10^6$	Показано улучшение оценки ASIA и уменьшение объёма кисты	Клинические испытания	[214]
	$1 \cdot 10^8$	Улучшение подвижности задних конечностей	Единичный клинический случай	[38]
	$7 \cdot 10^6$	Улучшение подвижности задних конечностей	Единичный клинический случай	[191]
	$3 \cdot 10^8$	Улучшение различных нейрофизиологическ их параметров по меньшей мере у 50% пациентов	Клинические испытания	[258]
Шванновские клетки	$3 \cdot 10^5$	Показано улучшение выживаемости и уменьшение демиелинизации в острой стадии травмы	Лабораторные исследования	[177]

Тип клеток	Трансплантат	Эффект	Тип исследований	Ссылка
Шванновские клетки	$2 \cdot 10^6$	Показано положительное влияние трансплантата на иммунный ответ на травму спинного мозга	Лабораторные исследования	[188]
	$29 \cdot 10^6$	Предположена высокая эффективность в сочетании с матриксами	Клинические испытания	[136]
Обкладочные клетки из обонятельной луковицы	$1 \cdot 10^6$	Показано проявление нейропротекции и ослабевание воспаления при введении через вену	Лабораторные исследования	[289]
	$4 \cdot 10^5$	Показано улучшение аксональной регенерации	Лабораторные исследования	[255]
	$1 \cdot 10^5$	Показан терапевтический эффект в лечении невропатической боли	Лабораторные исследования	[296]

Тип клеток	Трансплантат	Эффект	Тип исследований	Ссылка
Обкладочные клетки из обонятельной луковицы	$1 \cdot 10^6$	Показано улучшение восстановления локомоторной активности задних конечностей в острой травме	Лабораторные исследования	[87]
	$1 \cdot 10^5$	Показан анти-апоптотический эффект	Лабораторные исследования	[269]

Таким образом, существующие на сегодняшний день клеточные трансплантаты показывают свою эффективность, однако остается ряд важных проблем:

- Этическая проблема выбора источника клеток, особенно в случае с эмбриональными клетками.
- Высокий риск отторжения клеточного трансплантата в случаях ксенотрансплантатов и аллотрансплантатов.
- Существенные риски туморогенности и онкогенности от трансплантированных клеток (в первую очередь иПСК и ЭСК).

Решение перечисленных проблем возможно при использовании клеток, выделяемых из обонятельной выстилки. Данный источник клеточного материала представляется весьма перспективным для клеточной терапии, поскольку процедура его получения безопасна для пациента, что даёт возможность создавать препараты для лечения травм спинного мозга на основе аутологических клеток. Из этой ткани могут быть выделены несколько типов клеток, представляющих интерес для терапевтического применения: обкладочные клетки, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) обонятельной выстилки, а

также клетки, близкие по свойствам к нейральным стволовым/прогениторным клеткам (НСПК) — горизонтальные и глобулярные базальные клетки [2].

Обкладочные клетки (ОК) обонятельной выстилки — особая популяция глиальных клеток, в норме участвующая в выживании обонятельных нейронов, они обладают нейропротективными свойствами, способствуют регенерации и модулируют воспаление [143, 145]. Также немаловажным качеством данных клеток является их способность по аналогии со Шванновскими клетками участвовать в образовании миелина [70]. В норме ОК сопровождают обонятельные аксоны, которые сами по себе не миелинизируются, но после трансплантации в зоны с более крупными аксонами ОК способны переходить к миелинизирующему фенотипу, выраженному в формировании MPZ-положительного периферического миелина [203].

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) из обонятельной выстилки — имеют нейроэктомезенхимное происхождение, а также способны к дифференцировке в дофаминергические нейроны. Этот факт выделяет их по сравнению с другими популяциями МСК, однако они также способны к иммуномодуляции, секретируют нейротрофические и противовоспалительные факторы, а также микровезикулы [21].

НСПК, представленные популяциями горизонтальных базальных и глобулярных базальных клеток, обеспечивают непрерывный нейрогенез в обонятельном эпителии. Могут формировать нейросферы и дифференцироваться в нейроны. Активное изучение молекулярных регуляторов (p63, Notch, CNTF, HB-EGF и др.) открывает перспективы таргетной стимуляции собственных стволовых клеток и разработки аутологичных клеточных терапий [118, 218, 253].

Однако, несмотря на большие перспективы применения клеток из обонятельной выстилки, интерес в первую очередь направлен на ОК. Отмечается, что данные клетки могут быть более подходящими для трансплантации, чем НСПК из той же ткани [143, 290]. Их получение существенно проще, а культивирование дешевле. Также ОК обладают крайне

низким туморогенным потенциалом [179]. Также в ходе клинических испытаний показана их полная безопасность [46, 162, 251].

1.5.2. Генная терапия при травме спинного мозга

Одним из наиболее перспективных направлений в области лечения травм спинного мозга является генная терапия. Данный подход нацелен на преодоление ограничений классических методов лечения, так как может способствовать регенерации нервной ткани и восстановлению функций спинного мозга. Основные цели генотерапии при ТСМ включают стимуляцию роста аксонов, подавление ингибиторных факторов, модуляцию воспаления и создание благоприятной микросреды для восстановления нейрональных связей [85, 212]. Современные исследования охватывают широкий спектр стратегий: от использования вирусных и невирусных векторов для доставки генов, CRISPR/Cas9-редактирования, до генной модификации стволовых клеток и применения биоматериалов для локализованной доставки терапевтических агентов [53, 284].

В случае терапии острой фазы ТСМ основными задачами являются активация нейропротекторного эффекта, контроль воспаления, а также снижение вторичного воспаления. С этим справляются путем доставки плазмид, кодирующих IL-10, в зону травмы [245]. Также возможна трансплантация модифицированных мононуклеаров половинчатой крови, сверхэкспрессирующих GDNF и VEGF [65]. Широко изучается вопрос применения микроРНК в качестве терапевтического агента в зоне травмы [54]. При терапии хронической травмы спинного мозга основными задачами являются стимуляция регенерации аксонов, ремиелинизация, активация нейрональной пластичности. Для этого в зону травмы могут доставлять вирусы, способные к долгой экспрессии нейротрофических факторов, в частности, аденоассоциированные вирусы (AAV), способные доставлять BDNF, NT-3,

GDNF [158, 209]. Широко применяются генно-клеточные продукты, трансплантация которых может способствовать не только восполнению утраченных клеток, но и секреции различных факторов роста [284].

1.5.3. Нейротрофические факторы

Перспективным направлением терапии травм спинного мозга является применение таких сигнальных молекул, как нейротрофические факторы. Это крупная группа белков, включающая в себя 3 семейства: нейротрофины (NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5), семейство лигандов GDNF (GDNF, neurturin (NRTN), artemin (ARTN), persephin (PSPN)) и нейропоэтические цитокины (CNTF, LIF, OSM, IL-6, IL-11) [57]. Однако основной интерес в терапии сосредоточен на нейротрофинах. Данный тип белков характерен тем, что поддерживает выживание, рост и работу нейронов, а также пластичность связей между ними. Нарушения их уровня и сигнализации связаны с нейродегенеративными, психическими и нейроразвивающими расстройствами [27, 235]. Во взрослом организме нейротрофические факторы преимущественно локализованы в периферической нервной системе, в центральной нервной системе представлены ограниченно.

Выделяют несколько типов рецепторов для нейротрофинов:

1. P75NTR (Рецептор фактора роста нервов), низкоаффинный рецептор нейротрофинов. Играет важную роль в развитии нервной системы, контролируя развитие аксонов и формирование синаптических связей. Не имеет киназной активности, содержит «death-domain», и через адаптеры активирует NF-κB, JNK, p53, а также пути, связанные с выживанием или апоптозом [121, 172]. P75NTR формирует комплексы с TrkA/B/C, усиливая аффинность и селективность связывания «правильного» нейротрофина и повышая чувствительность к низким концентрациям нейротрофинов [51, 198]. Также данный рецептор может как усиливать Trk-сигнал

(про-выживание, PI3K–Akt), так и ограничивать активацию Trk «непредпочтительными» лигандами, тем самым повышая точность сигнализации [282]. В отсутствие активного рецептора семейства Trk, P75NTR часто запускает апоптотические программы [36].

2. Рецепторы семейства Trk (тирозинкиназных рецепторов). Данная группа схожих рецепторов включает в себя 3 представителя (TrkA, TrkB, TrkC). Автофосфорилируются и активируют Ras–MAPK, PI3K–Akt и PLCγ-зависимые пути, что ведёт к выживанию, росту аксонов/дендритов, синаптической пластичности [110, 110]. Ввиду важности данного семейства рецепторов был детально изучен молекулярный механизм. Так, были показаны роли отдельных путей: Ras–MAPK/ERK, способствует дифференцировке, росту нейритов, пластичности [92, 92]; PI3K–Akt, способствует выживанию через анти-апоптотические пути [121, 234]; PLCγ–PKC, участвует в синаптической пластичности и кальций-зависимом сигналинге [92, 109].

Для лечения травм спинного мозга были исследованы такие нейротрофические факторы, как нейротрофический фактор мозга (BDNF), нейротрофин-3 (NT-3), фактор роста нервов (NGF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) [2, 178]. Одним из наиболее изученных нейротрофических факторов является BDNF [268]. Нейротрофины доставляются экзогенно с помощью различных методов [192]. Для прямой доставки могут применяться осмотические помпы и локальные инъекции [97, 181]. Однако при таких способах введения существуют две основные проблемы: короткое время жизни нейротрофинов (период полураспада составляет всего несколько минут) и возникновение побочных эффектов в результате введения иглы для инъекции, в частности, хронической боли. Одной из попыток решения проблемы быстрого распада нейротрофинов является их доставка с помощью клеток-носителей. Так, МСК-сфероиды с BDNF-трансфекцией приводят к улучшению моторики и способствуют сохранению миелинизированных аксонов, по сравнению с

эффектами от применения рекомбинантного BDNF или сфероидов по отдельности [2, 257]. А котрансплантация NT-3-генномодифицированных шванновских клеток и TrkC-генномодифицированных МСК формируют экзогенные нейронные сети, интегрирующиеся в спинной мозг [2, 144, 276]. Также рассматривается прямая инъекция вирусных частиц для трансдукции в зоне травмы. В качестве вирусных векторов используются лентивирусы. Так было показано, что трансплантация кодирующего NT-3 и BDNF вируса способствовала длительной экспрессии, росту аксонов, ремиелинизации и оказывала моделирующий эффект на иммунную систему. Более безопасные подходы включают использование аденовирусов и AAV. Регенеративный и нейропротекторный эффект был продемонстрирован при использовании аденовекторов, кодирующих VEGF/GDNF и BDNF [102, 115], однако этот метод несёт риск развития воспаления. Безопасность повышается при переходе на AAV-векторы: их применение для доставки NT-3 и BDNF способствовало восстановлению моторных функций [190, 249]. Альтернативный метод продолжительной доставки нейротрофинов с фиксированной конвертацией – это трехмерные конструкции, наполненные белком. Так наночастицы для интратекального введения, нагруженные NT-3, после инъекции были обнаружены в спинном мозге как минимум 28 дней спустя [62].

Таким образом, доставка нейротрофинов в зону травмы – это важная задача для терапии травм спинного мозга. Однако использование прямой доставки малоэффективно, а использование вирусных частиц может способствовать развитию иммунологической реакции. Решением может выступать использование трехмерных конструкций с нейротрофинами, поскольку это не сопряжено с рисками быстрой деградации белков, а также не активирует иммунную систему.

1.6. Биоинженерия в терапии травмы спинного мозга

Биоинженерия — это междисциплинарная область, которая применяет инженерные принципы к биологии, медицине и живым системам, чтобы создавать технологии, процессы и устройства для здоровья, промышленности и окружающей среды [116]. В вопросе терапии ТСМ биоинженерия решает проблемы развития воспаления, ишемии, формирования глиального рубца и слабой регенерации ЦНС [33]. Ввиду этого перспективно применение мультимодальных биоинженерных конструкторов, поскольку они способствуют восстановлению микросреды и нейронных цепей с помощью биоматериалов, клеток и молекулярной доставки [108, 239].

В качестве биоматериалов в биоинженерии выделяют различные трехмерные пористые каркасы, в первую очередь гидрогели и печатные конструкторы. Основным различием является плотность полимеризованного полимера. Гидрогели — ключевой компонент конструкторов в биоинженерии, потому что они имитируют внеклеточный матрикс, однако из-за особенностей конструкции не обладают большой механической прочностью. Однако это в свою очередь позволяет их вводить через иглу. Другой тип скаффолдов, это печатные конструкторы, полученные методами биопечати. За счет возможности подбора условий и методов печати, а также модификации биочернил, можно получать крайне эффективные препараты. Однако, как правило, такие структуры обладают высокой механической прочностью, это хорошо для выживания клеток, но в то же время делает невозможным трансплантацию вглубь ткани.

Существующие различия в физических свойствах печатных конструкторов и гидрогелей привели к развитию нескольких параллельных концепций биоинженерных препаратов для терапии ТСМ. Их можно условно разделить на вводимые гидрогели и каркасы, накладываемые на повреждённую ткань ЦНС.

1.6.1. Трехмерные гидрогели в терапии травмы спинного мозга

Данный тип конструкторов характеризуется как полимерная сеть с водой как основной фазой. Они биосовместимы, биоразлагаемы и по мягкости и строению похожи на нервную ткань [39]. Благодаря текучести материал можно вводить прямо в зону травмы, после чего он принимает форму дефекта спинного мозга, в частности, может заполнять полость кисты спинного мозга [117]. Также, гидрогели имитируют внеклеточный матрикс, обеспечивая опору для клеток и направляя рост аксонов [72, 278].

Таким образом, использование гидрогелей позволяет решать ряд задач. В первую очередь, это механическая поддержка, в рамках которой гель заполняет полость травмы, объединяя концы, тем самым направляя рост аксонов [292]. Также гидрогель может служить носителем клеток [75]. Кроме того, гидрогели могут быть дополнительно модифицированы различными агентами для их локальной доставки, создавая медленный и контролируемый выход факторов роста, противовоспалительных препаратов [230]. Помимо этого, за счет заполнения полости травмы гидрогель снижает нейровоспаление, препятствует формированию глиального рубца [263].

1.6.2. Полимеры, используемые при формировании гидрогелей

Современные гидрогели подразделяются на натуральные (коллагеновые, фибриновые, гиалуроновые), синтетические (на основе полиэтиленгликоля, полипиррола) и композитные (с добавлением наночастиц или электропроводящих компонентов) (Таблица 4) [246, 273].

Таблица 4 – Сравнение различных вариантов гидрогелей

Параметр	Натуральные (коллаген, фибрин, гиалуроновая кислота)	Синтетические (PEG, PVA, полиуретан)	Композитные / с полипирролом
Биосовместимость	Высокая	Средняя (инертны)	Высокая (с оговорками)
Биодеградация	Да	Регулируемая	Да
Клеточная сигнализация	Есть (RGD, адгезия)	Нет (нужны добавки)	Частично
Контроль механики	Сложный	Точный	Средний

Гидрогели на основе натуральных полимеров считаются одними из самых безопасных материалов для регенерации спинного мозга после травмы. Они служат мягким 3D-каркасом, заполняют полость повреждения и одновременно могут доставлять клетки и лекарства [79].

Фибриновые гидрогели специфичны своей полимеризацией, так как после полимеризации формируют сгусток. Было показано, что гель может быть носителем стволовых клеток, факторов роста и лекарственных препаратов [11, 230]. В ряде работ было показано, что фибриновые гели могут выступать носителями НСПК крыс [243] и иПСК [148]. Во всех этих случаях стволовые клетки успешно регулировали иммунный ответ, улучшали проводимость и способствовали улучшению моторной активности задних конечностей. Фибриновые гидрогели могут быть дополнены экзосомами. Такой подход показал возможность регенерировать поврежденный СМ у крыс с травмой спинного мозга и уменьшать центральную нейропатическую боль, вызванную поражением спинного мозга [12].

Коллагеновые гидрогели специфичны тем, что при полимеризации представляют собой волокнистые/ориентированные гели, тем самым задавая жёсткость и химию матрикса, усиливая дифференцировку предшественников в олигодендроциты и улучшая моторную функцию у крыс с ТСМ [266]. Как и

прочие, коллагеновые гидрогели могут быть модифицированы для улучшения механических свойств или доставки факторов роста. Так, в рамках лабораторных тестов было показано, что коллагеновый гидрогель, насыщенный малыми сигнальными молекулами, способствует дифференцировке *in vitro* культуры НСК [5, 275]. Другой вариант применения геля – это использование его как сетки для наночастиц, заполненных bFGF и IL-10. Такой подход показал продолжительный нейропротекторный эффект [104]. Адипозные МСК, инкапсулированные в коллагеновый гель, в острой контузионной модели ТСМ улучшали моторную активность задних конечностей, а также уменьшали патологические изменения спинного мозга [11].

Другим популярным гелем на основе натуральных компонентов является гидрогель, содержащий гиалуроновую кислоту. Причина выбора данного вещества в том, что гиалуроновая кислота – основной полисахарид ЦНС. Часто в качестве дополнения к гиалуроновой кислоте используется желатин – производное коллагена с мотивами клеточной адгезии. Вместе они создают мягкие, биосовместимые конструкторы, которые заполняют полость повреждения, поддерживают нервные клетки и позволяют локально доставлять лекарства, факторы роста и стволовые клетки [151, 295]. Это позволило разработать широкий спектр гелей для терапии травмы спинного мозга. Было показано, что трансплантация геля способствует миграции эндогенных НСК, что улучшает дифференцировку нейронов и регенерацию аксонов [295]. В качестве клеточного компонента используют НСК, МСК и эндогенные НСК. В электроактивный гидрогель на основе гиалуроновой кислоты и желатина помещали НСК крыс вместе с донепезилом. Такой гель усиливал нейрональную дифференцировку, рост аксонов и снижал их дифференцировку в астроциты, что улучшало проводимость и двигательную функцию крыс с ТСМ [151].

В отдельную группу выделяют гидрогели на основе синтетических материалов. В отличие от натуральных, синтетические (PEG, PVA, полиуретан) - инертны, почти не дают сигналов для клеток. Часто нужно дополнительно

привносить белки и факторы роста для улучшения ангиогенеза и инфильтрации клеток [113]. Однако для таких гидрогелей можно точно настраивать такие параметры, как модуль упругости, скорость гелеобразования и стабильность [114, 139].

Гидрогели из полиэтиленгликоля (ПЭГ, PEG) используют для инъекционной доставки клеток и секрета, а также в качестве системы соединительных трубок без клеток. Так, было показано, что гранулированный гель на основе ПЭГ, предварительно собранный и наполненный НСК, поддерживает интеграцию клеток, не оказывает отрицательного влияния на иммунный ответ и успешно поддерживает дифференцировку трансплантата в сторону нейрональных или астроцитарных линий. Другим примером является гидрогель на основе фотосшитых трубок диаметром 20-60 мкм, такой конструкт способствовал направлению роста аксонов, а также уменьшению размера рубца [206].

Другой вариант гидрогелей основан на добавлении полипиррола (PPy). Данный полимер придает гелям электрическую проводимость, близкую к ткани спинного мозга, что позволяет усилить нейрорегенерацию [160]. Так на примере гидрогеля на основе сшитого желатин метакрилоила было показано, что добавление в гель пиррола и экзосом МСК способствует уменьшению раннего воспаления, усилению миграции резидентных НСК и содействует регенерации нейронов и миелин-ассоциированных аксонов и в результате – восстановлению локомоторных функций после гемисекции спинного мозга мышей [67].

Таким образом, в выборе материала для гидрогеля необходимо учитывать тот факт, что несмотря на то, что конструкты на основе синтетических материалов обладают максимальной пластичностью и могут быть модифицированы по желанию исследователя, они не обладают должной степенью функциональной активности. В то же время гидрогели на основе натуральных полимеров не обладают полной мерой пластичности в своем составе, создавая для исследователей трудности в подборе условий

полимеризации и введения. Другой немаловажной проблемой является возможный токсический эффект при использовании гидрогелей на основе синтетических полимеров, тогда как данная проблема практически полностью отсутствует в случае с натуральными полимерами. Следует внимательно оценивать то, какие полимеры будут использоваться в терапии с целью достижения наибольшего результата с минимальным риском его отторжения. Ввиду этого стоит отдавать предпочтение гидрогелям из естественных полимеров с различными добавками для улучшения отдельно взятых характеристик.

1.6.3. Самособирающиеся пептиды в терапии травмы спинного мозга

Другим совершенно отличительным полимером для создания гидрогелей являются короткие пептиды (от 2 до 20 аминокислот), обладающие уникальной способностью спонтанно организовываться в упорядоченные наноструктуры, способные запереть воду. Этим качеством они схожи с гидрогелями, однако обладают рядом отличительных черт. Такие гели биосовместимы, биodeградируемы и легко программируются под нужные задачи в доставке лекарств и регенерации тканей, а также могут быть настроены через модуль упругости через состав, заряд, условия pH [103, 219]. Водородные связи, гидрофобные и π - π -стэкинг, электростатические силы образуют фибриллы и нанофибры, которые дальше формируют 3D-сетку геля [205]. Запуск полимеризации регулируется через изменение pH, ионной силы, температуры, добавление солей и ферментативные реакции. Выделяют 2 типа ССП: β -листовые пептиды (в т.ч. ионно-комплементарные, как RADA16, EAK16) [137] и α -спиральные, коллаген-подобные и эластин-подобные пептиды [43]. Многие гели являются срезоразжижаемыми (shear-thinning) и самовосстанавливающимися, что удобно для инъекционной доставки клеток и лекарств без их повреждения [88].

Такие гели также нашли свое применение в терапии травмы спинного мозга. Особый интерес вызывает такой самосборный пептид, как RADA16 ([COCH₃]-RADARADARADA-CONH₂). Он используется как инъекционная гидрогель-матрица и носитель клеток и факторов. Его популярность связана с преимуществами его физико-химических свойств и уже имеющимися данными о клиническом использовании [180]. Такой гель мягкий, с упругостью, близкой к ткани спинного мозга, легко вводится как раствор и полимеризуется в зоне введения [247]. Так, например, гидрогель RADA16, модифицированный мотивом RGD, использовали для загрузки человеческих МСК из жировой ткани при ТСМ у крыс. Гель повышал выживаемость клеток, снижал воспаление, увеличивал сохранность аксонов и миелина и улучшал моторную функцию [138]. Такие гидрогели можно дополнять другими веществами. Так, инъекционный гель RADA16 с добавлением нейропептида вещества Р вводили без клеток в зону контузии спинного мозга. Гель подавлял развитие воспаления и образование рубца, усиливал ангиогенез, повышал плотность нейрофиламентов и улучшал моторную активность задних конечностей [106]. Также гели на основе RADA16 могут быть дополнены НСПК. Такая конструкция повышала выживаемость, миграцию и нейрональную дифференцировку клеток, уменьшала объём очага и улучшала неврологические функции по сравнению с клетками без геля [9].

Однако при всех преимуществах гелей на основе пептида RADA16 сохраняется ряд их недостатков. Так, ввиду мягкости они обладают низкой механической прочностью [277], инертностью, что требует добавок для эффективной терапии [161].

Таким образом, самособирающиеся пептиды обладают значительным терапевтическим потенциалом при повреждениях спинного мозга. Тем не менее это направление нуждается в дальнейшей проработке, конечная цель которой – создание конструкций, способных сочетать саморемонт с самодостаточным

терапевтическим действием, без потребности во введении дополнительных агентов.

1.6.4. Использование трехмерная печати в терапии травмы спинного мозга

Другим перспективным методом терапии является трёхмерный биопринтинг. Разработка тканеспецифичных скаффолдов, имитирующих естественную архитектуру исследуемой ткани - важнейшая задача современной медицины. Для создания подобных конструкций активно исследуется трехмерная биопечать. На трехмерных принтерах по технологии слой-за-слоем печатаются скаффолды, в которые также могут быть помещены клетки и нейротрофины [252]. Данную технологию уже на протяжении нескольких лет активно изучают и применяют при широком спектре патологий, в том числе, и при повреждениях спинного мозга [236].

Эффект трехмерных полимеров на восстановление нервной ткани активно изучают на экспериментальных моделях. Так, например, трансплантация напечатанного трехмерного скаффолда из биоразлагаемого полиуретана, содержащего зрелые нейральные стволовые клетки (НСК) мыши, положительно повлияла на восстановление центральной нервной системы эмбрионов данио-рерио. Трансплантация данного конструкта взрослым особям с травмой головного мозга увеличила выживаемость таких особей и оказала положительный эффект на восстановление двигательной активности [293]. Кроме того, были изучены напечатанные агарозные трубки в сочетании со стволовыми клетками костного мозга мыши при травме седалищного нерва крыс. Было показано, что применение такого трансплантата, более эффективно улучшало восстановление двигательной и сенсорной активности, чем введение коллагена или пересадка нервной ткани в область повреждения. Эти исследования показали, что твердый каркас увеличивает выживаемость клеток и положительно влияет на регенерацию поврежденных участков нервной ткани

[127]. Исследование, посвящённое изучению напечатанного методом 3D-печати скаффолда на основе полиэтиленгликоль-желатин метакрилата с внедрёнными в него крысиными нейральными прогениторными клетками (НПК), продемонстрировало, что имплантация подобного клеточно-инженерного конструкта обеспечивает наиболее выраженное восстановление двигательной активности задних конечностей у травмированных животных по сравнению с группами, которым осуществлялось введение изолированных клеток либо бесклеточного скаффолда [195]. С целью повышения эффективности трёхмерных матриц была предложена комбинация фосфида германия с гиалуроновой кислотой. Применение подобного конструкта позволило существенно улучшить восстановление двигательной функции задних конечностей у крыс в условиях экспериментальной модели травмы спинного мозга, а также способствовало усилению миграции НСК в область их введения в нервную ткань. [66].

Перспективным направлением является изучение 3D принтинга на основе ОК из обонятельной выстилки, поскольку, как было отмечено ранее, получение и применение данных клеток не несет в себе опасности для пациента. Были получены трехмерные нити из ОК и Матригеля. ОК выживали в процессе печати и сохраняли свой фенотип. Предполагается, что такая 3D конструкция может иметь терапевтический эффект при трансплантации в спинной мозг животных и способствовать росту аксонов вдоль скаффолда [111].

Также был рассмотрен напечатанный на 3D-принтере мультиканальный скаффолд на основе полипропиленфумарата и коллагена, содержащий нейротрофин NT-3. Имплантация данной конструкции в повреждённый спинной мозг крыс сопровождалась выраженным нейротрофическим эффектом, стимулирующим рост и регенерацию повреждённых аксонов. Пористая архитектура скаффолда способствовала миграции эндогенных НСК крыс и обеспечивала нейрональную регенерацию [208].

1.6.5. Материалы, используемые в печати

Немаловажным моментом является выбор материала для печати. Основная задача — создание биосовместимых, структурно и функционально подходящих матриц (скаффолдов), которые поддерживают рост нейронов, направляют аксональную регенерацию и обеспечивают доставку клеток или биомолекул. Такими материалами являются, в том числе, составы на основе коллагена в сочетании с хитозаном [244], фиброина шелка [42] или сульфата гепарина [41], а также синтетическо-природные гибриды [40]. Было показано, что при использовании вышеприведенных полимеров наблюдается уменьшение случаев формирования глиального рубца. Также отмечалось функциональное восстановление, выраженное в улучшении моторной активности задних конечностей. Однако отмечают недостаточную долгосрочную стабильность некоторых натуральных материалов *in vivo* (например, чистая гиалуроновая кислота быстро деградирует), а также необходимость оптимизации структуры пористости/каналов под конкретную анатомию повреждения [128].

Другим направлением является использование синтетических полимеров. Таких как полиэтиленгликоль (PEG), поли(молочная кислота) (PLA), поли(капролактон) (PCL), в отличие от природных полимеров они обладают важным свойством контролируемой деградации и повышенной механической стабильности [141, 281]. Эти свойства делают их идеальными для создания наночастиц, которые в свою очередь могут быть заполнены нейротрофинами [196, 267]. Также в эту группу можно включить электропроводящие материалы, такие как PEDOT:PSS, полипиррол (PPy), углеродные нанотрубки. Данные материалы специфичны за счет возможности проводить электричество, что улучшает передачу электрических сигналов между нейронами [75, 135, 221].

Также в последние годы активно исследуется такой материал, как поливиниловый спирт (ПВС/PVA). Работы по сочетанию PVA и 3D биопечати для дальнейшего применения в терапии травм спинного мозга пока

немногочисленны, но уже показывают нейропротекторные и регенеративные эффекты в моделях на грызунах. PVA активно изучается как смарт-полимер для 3D/4D-печати благодаря текучести, экструзии, биосовместимости и биodeградации [164]. Особые успехи были достигнуты при использовании данного полимера в составе нановолокон. Было показано, что трансплантация волокна PVA с добавлением тимола способствовала снижению нейропатической боли, повышению выживаемости нейронов [22].

Некоторые материалы лучше работают в форме плотных конструкций, а другие лучше показывают себя в форме нановолокна. Таким образом, большую роль играет не только выбор полимера, но также и метод печати.

1.6.6. Технологии печати

Основными вариантами получения трехмерных конструкций является биопринтинг на основе полимеров, однако за этим широким понятием стоит целый ряд вариантов со своими спецификами (Таблица 5, Рисунок 5).

Таблица 5 – Сравнение методов биопечати

Параметр	Экструзионная печать	Проекционная стереолитография (DLP/цифровая светодиодная печать)	Коаксиальная печать	Электроспиннинг (электропрядение)
Принцип метода	Выдавливание биочернил через сопло под давлением (пневматическое, поршневое или шнековое)	Послойное отверждение фотополимерной смолы под действием проецируемого УФ/видимого света	Два или более соосных сопла, создающих оболочку и ядро волокна/филамента	Формирование нановолокон из полимерного раствора под действием высокого электрического напряжения

Параметр	Экструзионная печать	Проекционная стереолитография (DLP/цифровая светодиодная печать)	Коаксиальная печать	Электроспиннинг (электропрядение)
Разрешение/точность	100–500 мкм	25–100 мкм	200–800 мкм	50 нм – 5 мкм
Типичные материалы	Альгинат, желатин, фибрин, PEG, Matrigel, RADA16	Фотополимеры (PEGDA, GelMA, HAMA) с фотоинициатором	Два полимера: ядро (PEG, коллаген) + оболочка (альгинат, желатин)	Поликапролактон (PCL), полилактид (PLA), коллаген, желатин, полиуретан
Совместимость с живыми клетками	Высокая (мягкие условия, низкое давление)	Средняя–низкая (УФ-излучение, свободные радикалы, токсичность фотоинициатора)	Высокая (клетки чаще в ядре, защищены)	Низкая (высокое напряжение, органические растворители, обезвоживание)
Направленность роста аксонов	Средняя (можно печатать ориентированные каналы)	Высокая (точная 3D-архитектура с каналами)	Высокая (аксоны могут расти вдоль волокон)	Очень высокая (нановолокна имитируют естественный ВКМ и направляют аксоны)
Применимость для ТСМ	Каркасы для заполнения полости, носители клеток	Сложные 3D-шаблоны с точной геометрией	Сосудоподобные структуры, градиентная доставка факторов	Направленные мембраны, накладки на зону травмы, трубчатые конструкты

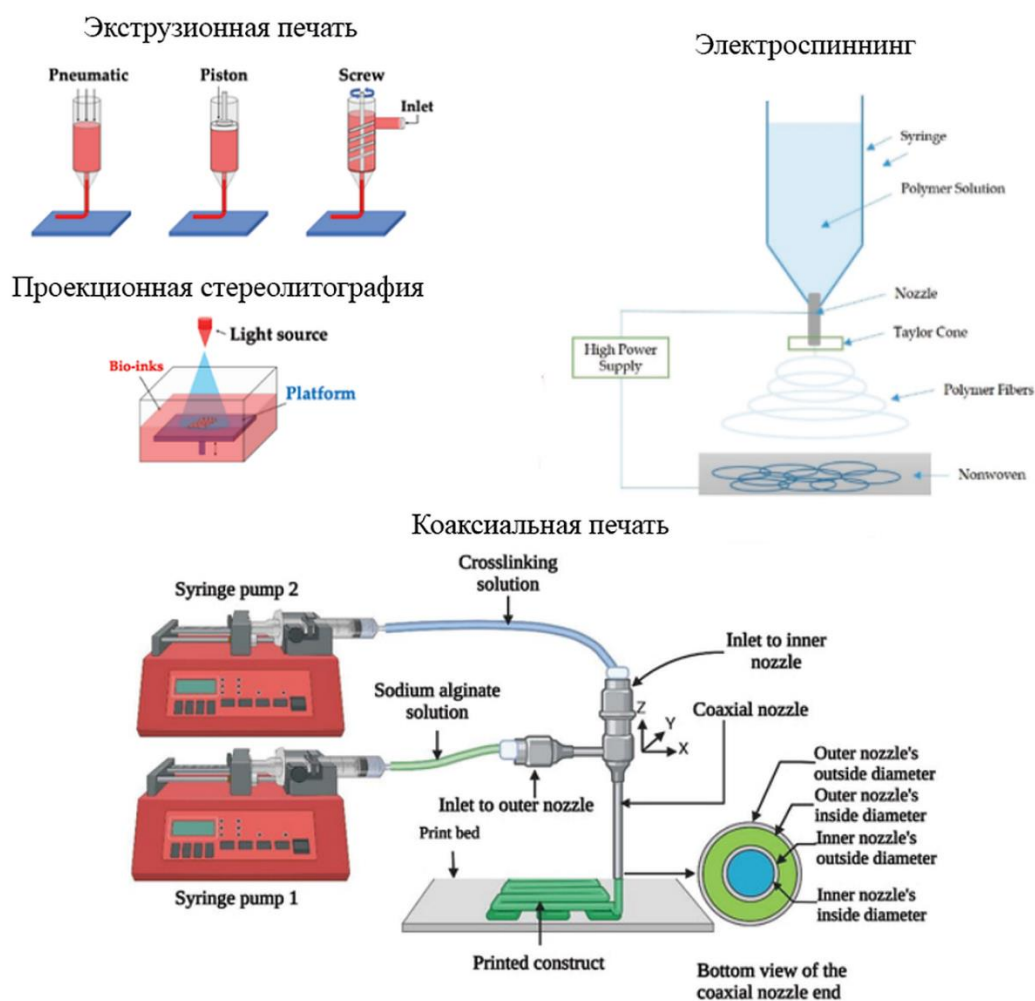


Рисунок 5 – Сравнение методов трехмерной печати (адаптировано из [197, 279, 283])

Самым простым вариантом является экструзионная печать. Данный метод основан на прямой пневматической или механической экструзии биочернил. Основное преимущество заключается в том, что полимер для печати может быть дополнен клетками и факторами роста. Основные работы в данном направлении посвящены чернилам на основе коллаген/хитозана с добавлением BDNF, а также альгинат/желатиновых клеточных конструкций [147, 154]. Было показано, что такие конструкты способствуют улучшению моторной активности задних конечностей, а также аксональному росту в моделях полного и частичного надреза спинного мозга.

Другая технология печати основана на мелкомасштабной непрерывной проекционной печати. В отличие от послойной экструзии, этот метод часто использует принципы светоотверждения (например, проекционную стереолитографию), что обеспечивает высокую скорость и разрешение (мелкомасштаб). Такие структуры могут обладать сложной формой. Было показано, что данные конструкты способны имитировать структуры внеклеточного каркаса спинного мозга. Было показано, что поврежденные аксоны хозяина регенерируют в 3D-биомиметические матрицы и образуют синапсы с НСК в каркасе, восстанавливая синаптическую передачу и значительно улучшая функциональные исходы [128].

Отдельного внимания заслуживает технология печати на основе коаксиальной печати. Данная технология, за счет строения сопла позволяет печатать конструкты из разных полимеров одновременно, достигая эффекта «трубка в трубке», способствуя отложенному по времени выходу агентов. Так был получен иерархический гидрогель с внешним антиоксидантным слоем и внутренним НСК-направляющим слоем. Такой подход позволил ингибировать первоначальный окислительный стресс в месте повреждения, защищая эндогенные НСК. В то же время как внутренний гидрогель с соответствующей механической поддержкой, структурой линейной топологии и биологически активными сигналами облегчает миграцию и нейрональную дифференцировку НСК на более поздней стадии лечения ТСМ, тем самым способствуя восстановлению двигательных функций у крыс [142].

Также отдельно рассматривают другой тип печати, схожий с экструзионным методом, но вместо каркаса получают нановолокна полимера. Такой метод называется электроспиннингом, поскольку полимер при попадании в заряженную камеру формирует тонкие нити. Электроспиннинг позволяет получать нановолоконные матрицы, близкие по размеру и структуре к внеклеточному матриксу нервной ткани [45, 94]. При травме спинного мозга такие волокна используют как направляющие «мостики» и локальные системы

доставки лекарств в доклинических моделях [56, 216]. Примечательно, что в рамках данного метода возможно получать нановолокна из почти любых полимеров, каждый из которых будет обладать теми или иными качествами. Так волокна на основе коллагена способствовали направленному росту аксонов, инфильтрации клеток [149, 150]. А волокна на основе PLLA показали себя отличным носителем клеток, была показана дифференцировка в нейроны, уменьшение количества астроцитов [56]. Также, работая с композитными биочернилами, можно получать волокна с разной скоростью выхода терапевтического агента, что приводит к увеличению моторной активности задних конечностей в модели контузионной травмы [193]. Кроме того, волокна на основе фибринового полимера, имитирующие белое вещество спинного мозга, были испытаны на приматах (*Macaca fascicularis*). Полученные нановолокна заполняли 1-см дефект гемисекции, способствуя высокоплотной, последовательной и выровненной регенерации нервных волокон, что способствовало ремиелинизации и васкуляризации и в итоге привело к значительному восстановлению двигательных функций [274].

Таким образом, выбирая принцип печати, мы также определяем возможности применения конструкта.

1.6.7. Материалы с памятью формы

Разработка более сложных и «умных» материалов позволит создавать передовые полимеры, обладающие рядом отличительных особенностей: изменяют форму, обладают способностью к самосборке, способны к автономной активации и способны улавливать широкий спектр сигналов [210]. Данный тип полимеров применяют в 4D печати. К настоящему времени данные технологии находят широкое применение в протезировании костей и кожи [32, 107, 134, 186]. Однако дальнейшее исследование возможностей 4D биопринтинга позволит

начать применение четырехмерных полимеров и в терапии травм спинного мозга.

На данный момент разработан матрикс, сочетающий в себе наработки 3D печати и преимущества передовых технологий. Было показано, что гибридный желатин метакрилатный-микрокапсульный гидрогель в сочетании с полилактидгликолидными капсулами с NT-3, способен секретировать ростовой фактор на определенном уровне в течение 20 дней. Это, в свою очередь, способствовало восстановлению спинного мозга после травмы, дифференцировке НСК, и улучшению двигательной активности задних конечностей у крыс с поврежденным спинным мозгом [186].

Параллельно с этим, на основе лазерной стереолитографии был разработан полимер на основе эпоксицированного акрилата соевого масла в сочетании с графеном и МСК человека [270]. В рамках данной работы клетки в 4D полимере помещали в среду для нейральной дифференцировки. По истечении двух недель МСК на полимере показывали значительно больший уровень экспрессии нейрогенных генов, по сравнению с этими же клетками, культивируемыми на обычном 3D полимере. Помимо этого, такой материал обладал способностью к обратимому изменению структуры и памятью формы [270]. Полученные результаты позволили в дальнейшем перейти с использования МСК на НСК *in vitro*. В более поздней работе тех же авторов особое внимание было уделено созданию микрочеек в полимере с функцией памяти [185]. Это было достигнуто путем комбинации лазерной стереолитографии и формы из полидиметилсилоксана и органического стекла для формирования лунок диаметром от 400 до 800 мкм. Данный подход позволил создать микроокружение вокруг клетки, способное менять свою форму, и достигнуть более благоприятных условий культивирования. НСК в полимере показали значительное увеличение экспрессии маркеров нейральной и глиальной дифференцировки, по сравнению с культурами, выращиваемыми на пластиковых и стеклянных поверхностях [185]. Другая исследовательская группа использовала технологию на основе

моделирования полимера методом плавления и показала эффект, схожий с описанным выше от культивирования НСК в сочетании с полимером из полиуретана, наночастиц и желатина. Полученный полимер также обладал эффектом памяти, был способен к поддержке своей формы и подходил для криоконсервации [44].

1.6.8. Сравнение гидрогелей и печатных конструкций в терапии травм спинного мозга

Обсуждая вопрос применения биоинженерных конструкций в терапии травмы спинного мозга, важно произвести сравнение конструкций на основе печатных каркасов и гидрогелей. Гидрогели имитируют внеклеточный матрикс, обеспечивают доставку клеток и факторов роста, а также создают благоприятную среду для регенерации нервной ткани [161, 230]. В свою очередь, трехмерные печатные конструкторы позволяют создавать сложные архитектуры с заданными механическими и биохимическими свойствами, что способствует направленному росту аксонов, интеграции трансплантированных клеток и восстановлению функций [128, 271]. Однако оба варианта конструкций обладают своими недостатками, которые напрямую вытекают из их физических свойств. Так, гидрогели без армирования могут быть слишком мягкими/нестабильными для крупных дефектов, возможна утечка из зоны имплантации [266]. В свою очередь, печать каркасов сопряжена со сложностями подготовки и стабилизации биочернил [153]. Так, печать конструкций на основе коллагена невозможна сразу с клетками, ввиду необходимости поддерживать низкий pH для предотвращения преждевременной полимеризации, что пагубно влияет на клетки [77, 240]. Помимо этого, в случае терапии травмы спинного мозга применение печатных каркасов возможно только в случае частичного или полного нарушения целостности органа (гемисекция/ транссекция) [42, 147], а также в виде накладки на зону травмы [259].

Таким образом, при разработке биоинженерных конструкторов для терапии травмы спинного мозга необходимо учитывать ограничения материала. Так, применение конструкций на основе мягких гидрогелей, которые можно вводить через иглу, предпочтительно в случаях ограниченных по объёму посттравматических кист спинного мозга. Такой подход решает проблему ограниченной плотности геля, в то же время позволяя заполнить объем поражения. При этом острая травма, которая характеризуется развитием повреждения на поверхности, нуждается в наложении печатных конструкций на зону травмы. Тем самым оказывая терапевтический эффект, препятствуя прямому контакту клеток с последствиями первичной травмы.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Реактивы

Реактивы культуральной работы

- DMEM: F12
- Фетальная бычья сыворотка
- L-glutamin (Gibco, США)
- Antibiotic-Antimycotic (Gibco, США)
- Трипсин
- Р-р Версена
- Диспаза-II (Gibco, США),
- Трипановый синий 0,5% (BioWest, Франция)
- Фосфатно-солевой буфер Дюльбекко (DPBS) без солей кальция и магния (Gibco, США).
- KCl (1M)
- ретиноевой кислоты (Sigma-Aldrich, R2625-1G)
- рекомбинантный белок BDNF (Активный) (Abcam, ab9794)

Реактивы для работы с животными

- Р-р Бриллиантовый зелёный
- Р-р хлоргексидина
- Спирт 70%
- Везотил 100 (Ветстем, ZVS-01-38383)
- Ксила 20 мг/мл (Интерхеми, 000271)
- Флекспрофен 25 мг/мл (ВИК, 0659)
- Рекавери гель (Medena AG, 736561)

Реактивы для ИГХ

- Раствор Triton X-100, 10% (Himedia, TCL135-100ML)
- фосфатно-солевой буфер
- Р-р бычьего сывороточного альбумина
- Р-р Фетальная бычья сыворотка
- Р-р формалина 10%
- Р-р формалина 4%
- Р-р ЭДТА 30%
- TUNEL assay kit (Servicebio, G1504-50T)
- Первые антитела:
 - Ms Beta III Tubulin (Abcam, ab78078)
 - Rb Myelin Protein Zero (Finetest, FNab05299)
 - Ms GFAP (Abcam, ab4648)
 - Rb Myelin Protein Basic (Thermo Fisher Scientific, PA5-78397)
 - Rb Nestin (Abcam, ab92391)
 - Rb P75 NTR (Finetest, FNab06091)
- Вторые антитела:
 - Dn anti Ms Alexa Fluor 488
 - Dn anti Ms Alexa Fluor 594

Реактивы для ИФА

- Набор ИФА для определения нейротрофического фактора мозга (BDNF) крысы, 96 тестов (Wuhan Fine Biotech, ER0008)

Реактивы для ПЦР

- RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104)
- Invitrogen™ Qubit™ RNA High Sensitivity (HS) Assay Kits (Thermo Scientific, Q32852)
- QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, 205311)
- QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen, 204052)

- Вода, не содержащая нуклеаз (не обработанная DEPC) (Thermo Fisher Scientific, AM9930)
- Праймеры:
 - S18
 - Прямой: 5' – GCAGACATCGACCTCACCAA – 3'
 - Обратный: 5' – АСТТСССГТССТТСАСГТСС – 3'
 - MPZ
 - Прямой: 5' – АСGAGCACATCAGGACAC – 3'
 - Обратный: 5' – САATGGGAGAАТААAGСААС – 3'

2.1.2. Растворы

Для культивирования клеток использовались следующие реактивы:

1. Среда DMEM/F-12 полная: DMEM/F-12 (Панэко, Россия), 10% фетальная бычья сыворотка (Hyclone, США), 1% L-glutamin (Gibco, США), 1% Antibiotic-Antimycotic (Gibco, США)
2. Среда дифференцировки 1: DMEM/F-12, 2.5% фетальная бычья сыворотка, 1% Antibiotic-Antimycotic; 1% L-glutamin; 10 мкМ ретиноевой кислоты (добавляется непосредственно перед применением)
3. Среда дифференцировки 2: DMEM/F-12, 1% фетальная бычья сыворотка, 1% Antibiotic-Antimycotic; 1% L-glutamin; 10 мкМ ретиноевой кислоты (добавляется непосредственно перед применением)
4. Среда дифференцировки 3 контроль: Нейробазальная среда, 2% B-27, 2% Antibiotic-Antimycotic, 1% L-glutamin, 2% KCl (1M), 10 мкМ ретиноевой кислоты (добавляется непосредственно перед применением)
5. Среда дифференцировки 3: Нейробазальная среда, 2% B-27, 2% Antibiotic-Antimycotic, 1% L-glutamin, 2% KCl (1M), 10 мкМ ретиноевой кислоты (добавляется непосредственно перед применением) + 50 нг/мл BDNF
6. Раствор коллагена 4 мг/мл

7. Раствор коллагена 1 мг/мл:
8. Раствор фибрина 1 мг/мл:
9. Раствор фибрина 4 мг/мл:
10. Раствор фибрина 10 мг/мл:
11. Раствор гиалуронового геля: Гиалуронат натрия 1 мг/мл : желатин 5 мг/мл = 5:2
12. Раствор комбинированного геля: Фибрин 30 мг/мл : Гиалуронат натрия 1 мг/мл : желатин 5 мг/мл = 1:5:2

2.1.3. Объект исследования

Экспериментальную часть работы выполняли на 300 половозрелых самках крыс линии Wistar со средней массой тела около 200 г; животные были получены из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Содержание животных велось на базе лицензированного экспериментально-биологического подразделения ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России — учреждения, отвечающего действующим нормативным требованиям к организациям подобного профиля [6].

Температурный режим в помещении содержания животных поддерживался на уровне 22°C; продолжительность светлого времени суток составляла 12 часов — с 7 утра до 7 вечера, при этом интенсивность освещения в этот период находилась в диапазоне 70–90 люкс. Ограничений в доступе к пище и питьевой воде животные не испытывали на всём протяжении эксперимента: рацион питания соответствовал сертифицированному стандарту (РООС ПР98 В01220, удостоверение о качестве от 10.07.08). Для обустройства подстилки применялась стружка мелкой фракции, изготовленная из древесины лиственных пород, не подвергавшейся химической обработке (ТУ 5313-001-1897639-92).

Работа с животными в рамках эксперимента строилась на принципах биоэтики. В частности, учитывались нормы, закреплённые Приказом Минздрава

России от 19.06.2003 № 267 («Правила лабораторной практики РФ»), а также положения второго издания «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (2005 год) и требования, изложенные в «Руководстве по содержанию и разведению лабораторных животных в питомниках и экспериментально-биологических клиниках (вивариях) и их использованию в научных, учебных и производственных целях» [4, 6].

Послеоперационное ведение животных предусматривало антибиотикотерапию и обезболивание в соответствии со стандартными протоколами ухода.

2.2. Методы

2.2.1. Выделение обонятельной выстилки крысы

Для проведения эксперимента крыс интраперитонеально наркотизировали водным раствором препарата Везетил-100 в дозировке 40 мг/кг массы тела в комбинации с ксилазином (5 мг/кг) в общем объеме инъекции 200 мкл. После достижения хирургической стадии наркоза животных подвергали декапитации. Волосяной покров в области головы предварительно обрабатывали 70% раствором этилового спирта для обеспечения асептических условий. Нижнюю челюсть последовательно удаляли с использованием больших прямых ножниц, после чего микроножницами выполняли рассечение кожных покровов над сводом черепа. Скелетирование черепа продолжали путем его сагиттального разреза хирургическими ножницами, направляя разрез сверху вниз вдоль центрального шва носовой кости. Дополнительно, для полного вскрытия черепной коробки, большими хирургическими ножницами производили разрез небной кости с нижней стороны, между центральными резцами, что позволяло

симметрично развести кости черепа в сагиттальной плоскости на две половины. На завершающем этапе при помощи анатомического пинцета осуществляли сбор обонятельной выстилки (обонятельного эпителия) вместе с прилегающими хрящевыми и костными структурами, которую помещали в стерильную пробирку, содержащую питательную среду DMEM/F12 в соотношении 1:1, для последующего культивирования и анализа.

2.2.2. Получение первичной культуры клеток из обонятельной выстилки

Выделение ОК из обонятельной выстилки крыс проводили по методике, разработанной в лаборатории ФГБУ «ФМИЦПН имени В.П. Сербского» Минздрава России (патент № RU2676142C2). После хирургического выделения обонятельной выстилки ткань последовательно отмывали от фрагментов хряща, костной ткани и форменных элементов крови в трёх сменах фосфатно-солевого буфера. Очищенный биоматериал подвергали ферментативной диссоциации в растворе диспазы-2 в концентрации 2 единицы активности на 1 мл в течение 15 минут при температуре 37 °С. По окончании инкубации ферментативную реакцию останавливали добавлением аликвоты полной культуральной среды, после чего механически отделяли собственную пластинку слизистой оболочки от обонятельного эпителия. Выделенную собственную пластинку рассекали на экспланты площадью не более 1 см², которые помещали в полную культуральную среду для последующей инкубации в течение 14 суток до миграции клеток на культуральный пластик; замену полной питательной среды проводили каждые 4 дня. По достижении гомогенного слоя клетки пассировали с использованием 0,1% раствора трипсина и пересеивали в начальной плотности 2×10^4 клеток на 1 см² культуральной поверхности. Пассирование осуществляли последовательно до 4-го пассажа, после чего клеточную культуру использовали для приготовления клеточных трансплантатов и проведения дальнейших экспериментальных исследований.

2.2.3. Иммуоцитохимическая характеристика обкладочных клеток

Экспрессию маркеров GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок) и p75NTR (низкоаффинный рецептор фактора роста нервов) оценивали методом иммуофлуоресцентного окрашивания клеточных культур, выращенных на покровных стёклах. На первом этапе клетки фиксировали 4%-ным раствором формальдегида (экспозиция 4 минуты, комнатная температура), после чего трижды отмывали в растворе DPBS, по 5 минут на каждое отмывание. Затем проводили пермеабиллизацию клеточных мембран раствором Triton X-100 в концентрации 0,1% в течение 5 минут, повторяя трёхкратную отмывку в PBS аналогичной продолжительности. Для предотвращения неспецифического связывания антител образцы обрабатывали 1%-ным раствором эмбриональной бычьей сыворотки на протяжении 90 минут при комнатной температуре, вновь выполняя трёхкратную отмывку в PBS по 5 минут.

Инкубацию с первичными моноклональными антителами проводили в течение ночи при температуре 4 °С. На следующие сутки, после трёхкратного отмывания в PBS (по 5 минут), препараты обрабатывали вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромами, инкубируя их 2 часа при комнатной температуре в защищённом от света месте. После заключительной трёхкратной отмывки в PBS покровные стёкла с клеточными культурами заключали в монтирующую среду с добавлением DAPI для визуализации клеточных ядер. Анализ полученных препаратов осуществляли методом флуоресцентной микроскопии.

2.2.4. Приготовление суспензии клеток

Клеточную культуру 4-ого пассажа по достижении монослоя отмывали от культуральной среды раствором Версена, 3 смены по 5 минут. После этого, к

культуре клеток добавляли раствор трипсин-ЭДТА с концентрацией 0,1%. Инкубировали с ферментом при 37 °С, 5% CO₂ в течение 5 минут. После отделения адгезивных клеток от культурального пластика клетки переносили в пробирку центрифужную объёмом 15 мл. Фермент инактивировали посредством добавления 1 мл полной культуральной среды. В дальнейшем из раствора клеток подготавливали пробы для подсчета клеток в камере Горяева с использованием трипанового синего для исключения мёртвых клеток. Раствор клеток центрифугировали с силой 200g в течение 7 минут. Супернатант удаляли. Клеточный осадок в дальнейшем использовали в работе.

2.2.5. Оценка влияния гидрогелей на жизнеспособность клеток *in vitro*

Тест с реззурином является общепринятым для исследования таких процессов, как жизнеспособность и пролиферативная активность клеток, через уровень ферментативной активности [189]. Особенно удобен данный тест в условиях трехмерных систем, где невозможно провести подсчет клеток стандартными методами [133, 260].

Клеточную культуру 4-го пассажа ресуспендировали в минимальном объеме полной культуральной среды и смешивали с растворами гидрогелей в многолуночной планшете с низкой адгезией для неадгезивных культур, доводя конечную концентрацию клеток до 1×10^4 клеток на 1 мкл гидрогеля. Полученные образцы помещали в CO₂-инкубатор при стандартных условиях культивирования (37 °С, 5% CO₂, влажная атмосфера). В процессе культивирования каждые 3 суток проводили частичную замену культуральной среды (50–70% объема) с сохранением целостности гидрогелевых конструкций.

Для оценки жизнеспособности и пролиферативной активности клеток в динамике на 1, 7, 14 и 28-е сутки инкубации выполняли реззуриновый тест строго в соответствии с протоколом производителя. В каждой временной точке клетки инкубировали с реагентом в течение 2 часов при 37 °С. Детекцию

флуоресценции осуществляли на многопараметрическом планшетном ридере CLARIOstar (BMG LABTECH) в режиме флуориметрии при длине волны возбуждения 545 нм и длине волны эмиссии 600 нм. Полученные значения флуоресценции, пропорциональные количеству метаболически активных клеток, использовали для построения графиков зависимости относительной флуоресцентной единицы (ОФЕ) от времени культивирования, отражающих динамику клеточной активности в исследованных гидрогелевых составах.

Полученные результаты в относительных единицах флуоресценции были пересчитаны в проценты жизнеспособных клеток относительно клеток без геля по формуле:

$$\text{жизнеспособные клетки, \%} = \frac{\text{отн. ед. флюор клетки в геле}}{\text{отн. ед. флюор клетки без геля}} * 100 \quad (1)$$

2.2.6. Оценка влияния нейротрофического фактора мозга на жизнеспособность клеток в гидрогеле *in vitro*

Клеточную культуру 4-го пассажа ресуспендировали в минимальном объёме полной культуральной среды и смешивали с растворами гидрогелей в многолуночном планшете с низкой адгезией для неадгезивных культур, доводя конечную концентрацию клеток до 1×10^4 клеток на 1 мкл гидрогеля. В экспериментальную группу дополнительно вносили нейротрофин BDNF в концентрации 500 нг на образец. Полученные гидрогелевые конструкции помещали в CO₂-инкубатор при стандартных условиях культивирования (37 °C, 5% CO₂, влажная атмосфера). В процессе культивирования каждые 3 суток проводили частичную замену культуральной среды (50–70% объёма) с сохранением целостности конструкций, при этом в экспериментальной группе замену осуществляли средой, дополненной свежим BDNF в той же концентрации (500 нг).

Для оценки жизнеспособности и пролиферативной активности клеток в динамике на 1, 7, 14 и 28-е сутки инкубации выполняли резазуриновый тест (Alamar Blue) строго в соответствии с протоколом производителя. В каждой временной точке клетки инкубировали с реагентом в течение 2 часов при 37 °C. Детекцию флуоресценции осуществляли на многопараметрическом планшетном ридере CLARIOstar (BMG LABTECH) в режиме флуориметрии при длине волны возбуждения 545 нм и длине волны эмиссии 600 нм.

Полученные значения флуоресценции, пропорциональные количеству метаболически активных клеток, нормализовали относительно контрольных образцов (гидрогелевые конструкции без добавления нейротрофина), после чего строили графики зависимости относительной ферментативной активности (в процентах или относительных единицах) от времени культивирования, что позволяло оценить влияние BDNF на метаболическую активность клеток в гидрогелевой матрице в динамике.

2.2.7. Оценка функциональной активности BDNF

Для оценки функциональной активности нейротрофина использовали общепринятый тест на культуре нейробластомы человека линии SH-SY5Y [226]. Известно, что в случае использования функционально активной формы BDNF клеточная культура дифференцируется [34].

Клетки нейробластомы человека линии SH-SY5Y высаживали в 6-луночные планшеты в плотности 1×10^5 клеток на лунку и культивировали в полной ростовой среде в стандартных условиях (37 °C, 5% CO₂, влажная атмосфера). На следующие сутки полную среду удаляли и заменяли средой дифференцировки 1 (первый этап дифференцировки). В дальнейшем замену питательной среды на свежую среду дифференцировки 1 проводили через каждые 48 часов культивирования.

На 7-е сутки клетки пассировали с использованием 0,1% раствора трипсина в течение 3 минут при комнатной температуре (20 °C), после чего ферментативную реакцию нейтрализовали добавлением полной культуральной среды, клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в среде дифференцировки 1 для продолжения культивирования. На следующие сутки среду дифференцировки 1 удаляли и заменяли средой дифференцировки 2 (второй этап), замену которой также осуществляли каждые 48 часов.

На 9-е сутки культивирования клетки обрабатывали трипсином 0,1% для пассирования (3 минуты при 20 °C) и переносили в новые 6-луночные планшеты, предварительно покрытые poly-D-лизином для улучшения адгезии, с последующим культивированием в среде дифференцировки 2. На следующие сутки среду дифференцировки 2 заменяли на среду дифференцировки 3 (третий этап) и продолжали культивирование с регулярной заменой среды каждые 48 часов до 19-х суток включительно.

По окончании протокола дифференцировки (19-е сутки) клетки фиксировали 4% раствором формальдегида, подогретым до 27 °C, в течение 5 минут. Фиксированные препараты подвергали визуальному анализу для оценки морфологических изменений клеточной культуры, включая формирование нейритов, изменение формы клеточного тела и образование нейроноподобных сетей, с использованием инвертированного фазово-контрастного микроскопа.

2.2.8. Моделирование контузионной травмы спинного мозга крысы

Модель контузионной травмы спинного мозга была разработана группой Allen и соавторами еще в 1911 году [18]. В дальнейшем модифицирована в отделе фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ «НМИЦ психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России [285]. Экспериментальным животным интраперитонеально вводили раствор анестетика Везотил-100 в дозировке 30 мг/кг массы тела в комбинации с ксилазином (5 мг/кг) в общем

объёме инъекции 200 мкл для достижения глубокой хирургической стадии наркоза. После индукции анестезии волосяной покров в области операционного поля удаляли с помощью электрического триммера. С соблюдением правил асептики производили срединный продольный разрез кожи и подкожных тканей вдоль позвоночника на уровне Th3–Th4 (3–4-й грудные позвонки). Билатеральную диссекцию и ретракцию паравертебральных мышц выполняли для обеспечения обзора остистых отростков и задних дуг позвонков. С использованием хирургических кусачек (костных щипцов) резекции подвергали ножки дуг Th3–Th4, после чего остистые отростки удаляли для формирования доступа к спинному мозгу, сохраняя при этом целостность твёрдой мозговой оболочки.

Контузионную травму спинного мозга наносили с помощью ударного устройства PSI-HI Impactor (Fairfax, VA, США) с параметрами удара, соответствующими силе 2 Ньютона. По окончании травматического воздействия операционную рану тщательно обрабатывали раствором хлоргексидина, затем ушивали послойно и на кожу наносили раствор бриллиантового зелёного для антисептической обработки. В послеоперационном периоде животным однократно вводили цефазолин в дозе 75 мг (0,3 мл раствора) и кетопрофен в дозе 0,5 мг (0,1 мл раствора) для профилактики инфекционных осложнений и купирования болевого синдрома, а также подкожно вводили 3 мл физиологического раствора для коррекции водно-электролитного баланса. Для предотвращения кератопатии на фоне анестезии на роговицу обоих глаз наносили мазь на основе декспантенола.

В течение первых 48 часов после операции животных содержали в условиях послеоперационного ухода с усиленным мониторингом, включая контроль поведения, болевого синдрома, питания и мочеиспускания; дополнительно в этот период вводили цефазолин в той же дозировке (75 мг, 0,3 мл раствора) для пролонгированной антибактериальной профилактики. Все

манипуляции с животными проводили в соответствии с принципами гуманного обращения, утверждёнными локальным этическим комитетом.

2.2.9. Тест локомоторной активности задних конечностей BBB (Basso, Beattie, Bresnahan)

Данную модификацию теста открытого поля использовали для оценки восстановления моторной функции задних конечностей. Оценка выставляется в соответствии с 21-балльной шкалой (Таблица 6) [31]. Принимали во внимание раннюю стадию (BBB оценка от 0 до 7), промежуточную (8–13) и позднюю фазу (14–21) восстановления. Балл выставляется на основе усредненных независимых оценок 3 исследователей.

Оценка проводится в открытом поле размером не менее 80×80×30 см с непроскальзывающим покрытием. Крысу помещают в центр поля и наблюдают в течение 4–5 минут. Оценку проводили 3 независимых исследователя. Исследованные группы были произвольно перемешаны для предотвращения предвзятости оценки.

В работе рассматривались два варианта терапевтического воздействия при травме спинного мозга. Первый предполагал лечение в острый период повреждения, второй — терапию хронической стадии травмы на фоне уже сформированной кисты спинного мозга.

При проведении терапии острой травмы спинного мозга животные проходили тестирование локомоторной активности начиная с 2 суток после операции.

При проведении терапии хронической травмы были отобраны крысы на ранней и промежуточной стадиях восстановления. Именно на этих стадиях оценка восстановления является наиболее объективной. Динамику восстановления двигательной активности оценивали посредством еженедельных

тестов в течение 5 недель. Начальной точкой являются сутки до трансплантации препарата (0 неделя).

Таблица 6 – Шкала оценки BBB (Basso, Beattie, Bresnahan) [3, 31]

Балл оценки	Характеристика
0	Отсутствие видимых движений задних конечностей
1	Слабые движения в одном или двух суставах, обычно тазобедренном и/или коленном
2	Экстенсивные движения в одном суставе или экстенсивные движения в одном суставе и слабые движения в другом суставе
3	Экстенсивные движения в двух суставах
4	Слабые движения во всех трех суставах задних конечностей
5	Слабые движения в двух суставах и экстенсивные движения в третьем суставе
6	Экстенсивные движения в двух суставах и слабые движения в третьем суставе
7	Экстенсивные движения во всех трех суставах задних конечностей
8	Размашистые движения задних конечностей без поддержания веса тела или плантарная постановка стопы без поддержания веса тела
9	Плантарная постановка стопы с поддержанием веса тела только в покое или единичные, частые или постоянные дорсальные шаги с поддержанием веса тела; отсутствие плантарных шагов
10	Единичные плантарные шаги с поддержанием веса тела, отсутствие координации передних и задних конечностей
11	Частые или постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, отсутствие координации передних и задних конечностей
12	Частые или постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, единичные шаги с координацией передних и задних конечностей
13	Частые или постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, частые шаги с координацией передних и задних конечностей

Балл оценки	Характеристика
14	Постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, постоянная координация передних и задних конечностей; при движении стопа преимущественно находится в состоянии наружной и внутренней ротации, как момент начала контакта с поверхностью, так и в момент начала переноса конечности или частые плантарные шаги с поддержанием веса тела, постоянная координация передних и задних конечностей, единичные дорсальные шаги
15	Постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, постоянная координация, отсутствие клиренса пальцев при выносе конечности вперед, преимущественное положение стопа в момент начала контакта параллельно телу
16	Постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, при ходьбе постоянная координация передних и задних конечностей, клиренса пальцев при выносе конечности вперед наблюдается часто, преимущественное положение стопы в момент начала контакта параллельно телу, в момент начала переноса конечности - ротация
17	Постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, при ходьбе постоянная координация передних и задних конечностей, клиренса пальцев при выносе конечности вперед наблюдается часто, преимущественное положение стопы в момент начала контакта параллельно телу, как в момент начала контакта, так и в момент начала переноса конечности
18	Постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, при ходьбе постоянная координация передних и задних конечностей, клиренса пальцев при выносе конечности вперед наблюдается постоянно, преимущественное положение стопы в момент начала контакта параллельно телу, в момент начала переноса конечности - ротация
19	Постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, при ходьбе постоянная координация передних и задних конечностей, клиренса пальцев при выносе конечности вперед наблюдается постоянно, преимущественное положение стопы в момент начала контакта параллельно телу, как в момент начала контакта, так и в момент начала переноса конечности, хвост опущен иногда или всегда

Балл оценки	Характеристика
20	Постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, при ходьбе постоянная координация передних и задних конечностей, клиренса пальцев при выносе конечности вперед наблюдается постоянно, преимущественное положение стопы в момент начала контакта параллельно телу, как в момент начала контакта, так и в момент начала переноса конечности, хвост всегда поднят, нестабильность туловища при ходьбе
21	Постоянные плантарные шаги с поддержанием веса тела, при ходьбе постоянная координация передних и задних конечностей, клиренса пальцев при выносе конечности вперед наблюдается постоянно, преимущественное положение стопы в момент начала контакта параллельно телу, как в момент начала контакта, так и в момент начала переноса конечности, хвост всегда поднят, при ходьбе туловище стабильно

2.2.10. Визуализация хронической травмы спинного мозга крысы с помощью метода МРТ

Для визуализации и морфометрической оценки последствий контузионной травмы спинного мозга в хроническом периоде экспериментальное исследование проводили с использованием томографа ClinScan 7T 70/30 (Bruker BioSpin, Германия) в режиме T2 на базе отдела медицинских нанобиотехнологий ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. Первое сканирование выполняли через 4 недели после хирургического вмешательства, повторное — через 8 недель после травмы (в том числе для оценки эффектов трансплантации).

Перед проведением МРТ животных подвергали ингаляционной анестезии с использованием изофлурана в концентрации 2–3% в смеси с кислородом при потоке газа 1–2 л/мин в течение 5 минут для достижения стабильного наркозного сна. Наркотизированное животное фиксировали в МРТ-совместимом стереотаксическом держателе с непрерывной подачей анестетика через лицевую

маску для поддержания анестезии на протяжении всего сканирования. Томографическое исследование области травмы проводили в двух ортогональных плоскостях (сагиттальной и корональной/аксиальной) с получением 12 срезов в каждой плоскости при толщине шага 5 мм.

Полученные изображения использовали для идентификации локализации посттравматической кисты спинного мозга относительно тел позвонков (сегментарная привязка), а также для количественной оценки морфометрических параметров — площади поперечного сечения кистозной полости, длины и объёма повреждённого участка спинного мозга. Повторное МРТ-исследование, проведённое через 8 недель после травмы, позволяло оценить динамику изменения указанных морфометрических показателей и регресс или прогресс кистозных изменений в зоне поражения. Все измерения выполняли с использованием встроенного программного обеспечения томографа с последующей статистической обработкой полученных данных.

2.2.11. Критерии исключения животных из групп

В рамках данной работы, для достижения наиболее значимых результатов, были приняты критерии для исключения животных из исследования.

Критерии исключения на этапе работы с животными включали в себя: непредвиденные осложнения после операции, в том числе инфекции; не сформированная киста на МРТ исследовании, непредвиденные реакции на наркоз, наличие эктопаразитов; произвольное восстановление моторной активности свыше 12 баллов при исследовании хронической фазы травмы; выраженные нарушения вестибулярного аппарата.

Критерии исключения на этапе работы с образцами тканей включали в себя: артефакты фиксации, технический брак гистологии, недостаточный объём РНК.

2.2.12. Приготовление биоинженерных препаратов из обкладочных клеток и гидрогеля

Для приготовления биоинженерных препаратов использовали культуру ОК 4-го пассажа. На основе полученного осадка готовили трансплантационные пробы из расчёта 750 000 ОК на один трансплантат. Клеточную массу ресуспендировали в 10 мкл гидрогеля, приготовленного согласно стандартному протоколу производителя. Для экспериментальных групп, предусматривающих нейротрофическую поддержку, в раствор гидрогеля дополнительно вносили BDNF в концентрации 500 нг на 10 мкл гидрогеля, что соответствовало 500 нг на один трансплантат. Полученную смесь тщательно гомогенизировали и непосредственно перед трансплантацией инкубировали в течение времени, необходимого для гелеобразования (согласно протоколу гидрогеля), после чего трансплантат был готов к имплантации в зону спинномозговой травмы. Все манипуляции проводили в стерильных условиях с использованием ламинарного бокса.

2.2.13. Приготовление биоинженерных препаратов из обкладочных клеток и пластин, полученных методом электроспиннинга

Для приготовления биоинженерных препаратов использовали культуру ОК 4-го пассажа. На основе полученного осадка готовили клеточную суспензию из расчёта 750 000 ОК на 20 мкл бессывороточной культуральной среды. Готовые пластинки из нановолокна ПВС, полученного методом электроспиннинга, а также эти пластины на подложке были предоставлены институтом биомедицинской инженерии, НИТУ МИСИС. Для экспериментальных групп в среду дополнительно вносили BDNF в концентрации 1 мкг на 20 мкл суспензии. Полученную клеточную суспензию переносили на чашку Петри и инкубировали

в течение 1 часа при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ для обеспечения адгезии и стабилизации клеток. По окончании инкубации объём среды доводили до 100 мкл путём добавления дополнительного количества пустой культуральной среды, после чего трансплантат был готов к использованию для имплантации в зону спинномозговой травмы. Все манипуляции проводили в стерильных условиях с использованием ламинарного бокса.

2.2.14. Маркирование обкладочных клеток мембранным красителем РКН26

Клеточные трансплантаты готовили на основе культуры ОК четвёртого пассажа. Флуоресцентное мечение клеточной популяции проводили следующим образом: осадок клеток ресуспендировали в 500 мкл буферного раствора С, предназначенного для маркировки. Рабочий раствор флуоресцентного красителя РКН26 готовили из расчёта 4 мкл концентрата (что соответствовало конечной концентрации 4×10^{-6} М) на каждые 5×10^6 клеток, разведённых в 500 мкл раствора С. Смешивание клеточной суспензии с красителем осуществляли путём быстрого интенсивного пипетирования, после чего инкубировали смесь при комнатной температуре в течение 1 минуты. Реакцию мечения останавливали добавлением 1 мл эмбриональной бычьей сыворотки. Далее клетки подвергали повторному центрифугированию (200 g, 10 минут), супернатант удаляли, осадок дважды промывали, ресуспендируя в полной ростовой среде с последующим центрифугированием в тех же условиях и удалением надосадочной жидкости.

После завершения отмывки жизнеспособность клеток оценивали в камере Горяева с добавлением 0,5% раствора трипанового синего для исключения мёртвых клеток. Клетки вновь осаждали центрифугированием при 200 g, супернатант удаляли, и на основе полученного осадка готовили трансплантационные пробы. Для гидрогелевых конструкций клетки

ресуспендировали в 10 мкл гидрогеля, приготовленного согласно стандартному протоколу производителя, из расчёта 750 000 меченых клеток на один трансплантат. В случае применения биоинженерных конструкций на основе пластин электроспиннингового ПВС (скаффолдов) меченые клетки в объёме 20 мкл наносили на поверхность пластин в соответствии с протоколом изготовления, после чего конструкты инкубировали для обеспечения адгезии клеток перед имплантацией в зону спинномозговой травмы. Все манипуляции проводили в стерильных условиях с использованием ламинарного бокса.

2.2.15. Трансплантация биоинженерных препаратов при травме спинного мозга в острую фазу травмы

Непосредственно после нанесения контузионного удара (силой 2 Ньютона) в зону повреждения спинного мозга имплантировали заранее подготовленные пластины электроспиннингового ПВС (скаффолды), ориентируя их таким образом, чтобы поверхность с нанесёнными мечеными клетками была обращена непосредственно к поражённой нервной ткани. Для дополнительной механической фиксации и стабилизации имплантата поверх трёхмерного конструкта укладывали фрагмент гиалуроновой губки, обеспечивающий плотное прилегание скаффолда к тканям и препятствующий его смещению. После имплантации зону травмы тщательно обрабатывали раствором хлоргексидина для антисептической обработки.

Для надёжной фиксации имплантата и закрытия операционного дефекта мышцу, выпрямляющую позвоночник (*m. erector spinae*), ушивали поверх конструкта, после чего послойно зашивали кожу и наносили на поверхность раны раствор бриллиантового зелёного. В послеоперационном периоде животным однократно вводили цефазолин в дозе 75 мг (0,3 мл раствора) и кетопрофен в дозе 0,5 мг (0,1 мл раствора) для профилактики инфекционных осложнений и купирования болевого синдрома, а также подкожно вводили 3 мл

физиологического раствора для коррекции водно-электролитного баланса. Для предотвращения кератопатии на фоне анестезии на роговицу обоих глаз наносили мазь на основе декспантенола.

В течение первых 48 часов после операции животных содержали в условиях усиленного послеоперационного ухода с регулярным мониторингом поведенческих реакций, болевого синдрома и общего состояния; дополнительно в этот период вводили цефазолин в той же дозировке (75 мг, 0,3 мл раствора) для пролонгированной антибактериальной профилактики. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с принципами гуманного обращения, утверждёнными локальным этическим комитетом.

2.2.16. Трансплантация биоинженерных препаратов в кисту спинного мозга

Для проведения интрамедуллярной инъекции биоинженерного препарата животных интраперитонеально наркотизировали водным раствором Везотила-100 в дозировке 79 мг/кг массы тела в комбинации с ксилазином (208 мкл/кг) в общем объёме инъекции 150 мкл. После достижения хирургической стадии наркоза производили разрез мягких тканей в области 3–4-го грудных позвонков (Th3–Th4) для обеспечения прямого доступа к спинному мозгу. На основе морфометрических данных, полученных при предварительном МРТ-исследовании, определяли точные координаты посттравматической кисты для последующего направленного введения препарата.

Забор биоинженерного препарата (клеточно-гидрогелевого конструкта или суспензии) осуществляли с использованием автоматического инжектора Fazel R-100EC (США) и микрошприца Hamilton (США) с катетером, оснащённым иглой на дистальном конце. Инъекцию выполняли непосредственно в полость посттравматической кисты под углом 45° к дорсальной поверхности спинного мозга со скоростью инфузии 6 мкл/мин с целью минимизации травматизации

окружающей нервной ткани и обеспечения равномерного распределения препарата в кистозной полости. При введении

В процессе введения коллагеновых гидрогелей катетер непрерывно охлаждался, для предотвращения преждевременной полимеризации. При введении фибриновых гидрогелей вводили сначала раствор фибриногена, затем происходило введение раствора тромбина с общей концентрацией фермента 1 единица. При введении комбинированного гидрогеля также вводили раствор гидрогеля, затем происходило введение раствора тромбина с общей концентрацией фермента 1 единица.

По завершении инъекции иглу медленно извлекали, место разреза обрабатывали раствором хлоргексидина, рану послойно ушивали, а на поверхность кожи наносили раствор бриллиантового зелёного для антисептической обработки. В послеоперационном периоде животных помещали в условия тепловой поддержки и осуществляли мониторинг состояния до полного выхода из наркоза [3].

2.2.17. Измерение морфометрических параметров кисты спинного мозга

Через 4 недели после нанесения травмы спинного мозга и спустя 4 недели после трансплантации клеток проводили оценку размеров кист методом МРТ. Обработку МРТ-изображений выполняли на фронтальных и сагиттальных срезах спинного мозга крыс с шагом сканирования 0,5 мм с использованием программного обеспечения Vidar Dicom Viewer [3]. На каждом срезе очерчивали области, соответствующие зоне хронического повреждения, после чего программа автоматически рассчитывала площадь поражённого участка. Объём кисты рассчитывали на основании данных двух проекций по следующей формуле:

$$V = \frac{(X + Y) * Z}{2} \quad (2)$$

Где:

V – объём кисты по 2 проекциям

X – сумма площадей сагиттальной проекции

Y – сумма площадей аксиальной проекции

Z – шаг сканирования

После этого проводили сравнение объёмов кист, полученных спустя 4 недели и 8 недель после травмы по формуле:

Уменьшение объема кисты

$$= \left(1 - \frac{\text{объем кисты спустя 8 недель после травмы}}{\text{объем кисты спустя 4 недели после травмы}} \right) * 100 \quad (3)$$

2.2.18. Выведение животных из эксперимента

По окончании экспериментального периода животных выводили из эксперимента в соответствии с протоколом, утверждённым на заседании локального этического комитета. Для этого крыс интраперитонеально наркотизировали водным раствором Везетил-100 в дозировке 30 мг/кг массы тела в комбинации с ксилазином (5 мг/кг) в общем объёме 150 мкл, после чего производили декапитацию. Для выделения спинного мозга большими прямыми ножницами выполняли продольный разрез кожи параллельно позвоночному столбу. На уровне 12-го грудного позвонка (Th12) проводили поперечный разрез, рассекая спинной мозг полностью. Затем в спинномозговой канал вводили изогнутые по оси ножницы для последовательного перекусывания остистых отростков позвонков, продвигаясь краниально до уровня 1-го грудного позвонка (Th1), что обеспечивало полное открытие позвоночного канала и визуализацию спинного мозга. После этого специальными костными кусачками перекусывали спинномозговые корешки, и выделенный спинной мозг извлекали целиком.

В зависимости от запланированных методов анализа образцы тканей фиксировали и сохраняли в следующих условиях:

- Для иммуногистохимического исследования (ИГХ) — сегмент спинного мозга, включающий зону травмы и прилежащую неповреждённую нервную ткань, помещали в 10% раствор формалина на 24 часа для фиксации, после чего переносили в 70% раствор этилового спирта для длительного хранения.
- Для иммуноферментного анализа (ИФА) — образцы, включающие не менее половины спинного мозга с зоной травмы, немедленно замораживали при температуре -80°C для последующей подготовки тканевого гомогената.
- Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) — образцы, содержащие исключительно зону травмы, помещали в стабилизирующий раствор RNeasy на 24 часа при 4°C , после чего раствор удаляли, а образцы переносили для длительного хранения при температуре -20°C .
- Для иммуногистохимического исследования пластин, полученных методом электроспиннинга (скаффолдов) с прилегающими тканями — препараты, включающие сегмент спинного мозга вместе с соответствующими позвонками (на уровне проведённой операции и наложения биоинженерного препарата), фиксировали в 10% формалине в течение 24 часов, после чего переносили в 70% спирт для дальнейшей обработки и изготовления гистологических срезов.

Все манипуляции по забору и фиксации тканей проводили в максимально короткие сроки для минимизации аутолитических изменений.

2.2.19. Подготовка гистологических препаратов спинного мозга

Для образцов с гидрогелевыми препаратами. После проведения фиксации в формалине сегменты спинного мозга, включающие область травматического повреждения и имплантированную гидрогелевую конструкцию, помещали в 30%-ный раствор сахарозы для осуществления криопротекции и выдерживали

при температуре 4 °C в течение 48 часов вплоть до полного погружения образца в раствор. После этого ткани заливали криозаливочной средой Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek) и подвергали быстрой заморозке при –80 °C. Полученные замороженные блоки закрепляли посредством той же среды O.C.T. на металлических держателях микротомы криостатического. Изготовление криосрезов толщиной 7 мкм осуществляли с последующим их монтированием на предметные стёкла с силановым покрытием, обеспечивающим улучшенную адгезию тканевого материала; хранение препаратов до проведения иммуногистохимического исследования проводили при температуре –80 °C.

Для образцов с пластинами из электроспиннингового ПВС подготовка материала включала забор тканей спинномозгового канала совместно с прилегающей мышечной тканью. Ввиду наличия костных структур в составе исследуемого препарата, после стандартной фиксации образцы подвергались процедуре декальцинации с использованием 30%-ного раствора ЭДТА при 4 °C на протяжении не менее 14 суток — до достижения полной деминерализации тканей. В дальнейшем образцы заливали средой Tissue-Tek O.C.T. с последующей заморозкой при температуре –80 °C. Замороженные блоки закрепляли на держателях криостата аналогичным способом с применением O.C.T., после чего изготавливали криосрезы толщиной 14 мкм — увеличение толщины среза по сравнению с предыдущей группой образцов было обусловлено необходимостью сохранения структурной целостности имплантированных конструкций и костных фрагментов. Полученные срезы монтировали на предметные стёкла с силановым покрытием и хранили при –80 °C для последующего проведения иммуноцитохимического анализа. На всех этапах криозаморозки и приготовления срезов строго соблюдался температурный режим с целью предотвращения формирования артефактов, связанных с кристаллизацией тканей.

2.2.20. Иммуногистохимическое исследование спинного мозга

Криосрезы спинного мозга, предварительно смонтированные на силанизированных предметных стёклах и хранившиеся при -80°C , доставали из хранилища и оставляли до полного оттаивания и достижения комнатной температуры — это было необходимо для последующей флуоресцентной микроскопии. Далее клеточные мембраны пермеабилizировали, обрабатывая срезы 0,1%-ным раствором Triton X-100 в течение 10 минут при комнатной температуре, с последующей трёхкратной отмывкой в PBS (по 5 минут каждая). Неспецифическое связывание антител блокировали путём обработки срезов бычьей эмбриональной сывороткой на протяжении 90 минут при комнатной температуре, после чего вновь проводили трёхкратную отмывку в PBS по 5 минут.

Затем срезы инкубировали во влажной камере с первичными моноклональными антителами (разведение согласно протоколу производителя) в течение ночи при 4°C . На следующий день, после трёхкратного отмывания в PBS по 5 минут, к срезам добавляли вторичные антитела, меченные соответствующими флуорохромами, и выдерживали 2 часа при комнатной температуре в темноте. По окончании инкубации выполняли завершающую трёхкратную отмывку в PBS (по 5 минут).

По окончании отмывки стёкла со срезами аккуратно переносили на чистые предметные стёкла и заключали в монтирующую среду с DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) для контрастирования клеточных ядер. Препараты покрывали покровными стёклами, высушивали при комнатной температуре в тёмном месте, после чего хранили при $+4^{\circ}\text{C}$ вплоть до проведения флуоресцентной микроскопии. На протяжении всех этапов инкубации и отмывки тщательно контролировали температурные условия и уровень освещённости для предотвращения фотовыцветания флуорохромов.

2.2.21. Проведение иммуноферментного анализа образцов биоинженерных конструкций

Была проведена оценка выхода BDNF из биоинженерного конструкта. Для этого тестовую конструкцию, включающую в себя 10 мкл гидрогелей и 50 нг нейротрофина, помещали в 96-луночный планшет (100 мкл среды DMEM/F12 с 10% FBS). Супернатант собирали через 0, 1, 3, 7, 14, 21, 42 суток после начала эксперимента. Для этого откручивали дебрис при 1000g (центрифуга Ependorf minispin), переносили в новые пробирки объемом 1.5 мл, замораживали и хранили супернатант при -80 °C для будущего ИФА. Эксперимент был проведен в двух независимых повторах и в двух технических повторностях. Сам иммуноферментный анализ проводили в соответствии с инструкциями производителей наборов.

2.2.22. Проведение ПЦР в реальном времени

Выделение РНК. Образцы ткани спинного мозга (зона травмы) помещали в лизирующий раствор в объеме 350 мкл с добавлением 5 мкл β -меркаптоэтанола. Гомогенизацию ткани проводили перетиранием ткани с последующей инкубацией в течение 10 минут при 65 °C. Полученный лизат переносили на адсорбирующую колонку и центрифугировали при 13 150 g в течение 2 минут. Колонку удаляли, а фильтрат переносили в чистые пробирки объемом 2 мл. Далее пробирки помещали в автоматическую станцию для выделения нуклеиновых кислот, где программировали получение 30 мкл элюата РНК. Концентрацию выделенной РНК оценивали с помощью флуориметра (Qubit или аналогичный) с использованием РНК-специфичного красителя. Нормировку концентраций образцов проводили относительно образца с минимальной концентрацией,

разведение выполняли водой, свободной от РНКаз (DEPC-обработанной или коммерческой водой для молекулярной биологии).

Обратная транскрипция. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием коммерческого набора (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. На первом этапе для элиминации геномной ДНК готовили смесь, содержащую 2 мкл буфера для удаления геномной ДНК (qDNA Wipeout Buffer, 7×), 1–12 мкл препарата РНК и воду без РНК в объёме, доводящем суммарный объём смеси до 14 мкл. Инкубацию проводили при 42 °С в течение 3 минут, после чего пробирки немедленно помещали на лёд для остановки реакции. Затем готовили мастер-микс для обратной транскрипции, состоящий из 1 мкл обратной транскриптазы, 4 мкл RT-буфера (5×) и 1 мкл смеси праймеров (RT Primer Mix). К полученному мастер-миксу добавляли 14 мкл подготовленного раствора РНК (после удаления геномной ДНК) и инкубировали при 42 °С в течение 20 минут. Реакцию останавливали нагреванием до 95 °С в течение 3 минут. Полученную кДНК хранили при –20 °С до проведения ПЦР.

Количественная ПЦР в реальном времени (qPCR). Реакционную смесь для амплификации готовили по рекомендациям производителя. Амплификацию и детекцию проводили на роторном амплификаторе (Rotor-Gene Q) со следующими параметрами температурного профиля: начальная денатурация при 95 °С в течение 300 секунд (1 цикл), денатурация при 95 °С в течение 15 секунд и элонгация при 60 °С в течение 30 секунд (45 циклов), с регистрацией сигнала на каждом цикле. Финальную элонгацию проводили при 72 °С в течение 360 секунд (1 цикл). Для оценки специфичности амплификации выполняли анализ кривых плавления (от 65 до 95 °С с шагом 0,5 °С). Относительный уровень экспрессии целевых генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ с использованием эндогенного референсного гена (например, GAPDH или β -актин) для нормировки.

Все реакции проводили в повторах, с использованием пяти биологических реплик. Уровень экспрессии каждого гена в каждом образце был стандартизован относительно экспрессии генов «домашнего хозяйства» по формуле:

$$\text{Относительная экспрессия гена X} = \frac{\text{Экспрессия}(x)}{\text{Экспрессия}(\beta)} = E(x)^{(Ct(\beta) - Ct(x))} \quad (4)$$

Где:

X – исследуемый ген

В – ген «домашнего хозяйства»

Ct - Пороговое число циклов

E – Эффективность ПЦР

2.2.23. Статистический анализ данных

Полученные данные обрабатывали в программе Prism 10 (GraphPad Software). Для исключения выпадающих значений использовали ROUT метод. Для оценки нормальности распределения выборок использовали тест Шапиро-Вилка. Далее подсчитывали среднее значение и стандартное отклонение. Оценку значимости различий между исследуемыми группами по уменьшению объёма кист проводили с помощью метода дисперсионного анализа с поправкой Брауна-Фишера и теста Данна. Оценку значимых различий между исследуемыми группами при изменении ВВВ проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа, апостериорный тест Тьюки. Если данные не проходили тест на нормальность, использовали критерий Краскела – Уоллиса, апостериорный тест Данна. Данные представлены в виде среднее + стандартное отклонение. Критерий значимости был равен 0.05.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Получение и иммуноцитохимическое исследование обкладочных клеток из обонятельной выстилки

На первом этапе данного исследования нами были получены ОК из обонятельной выстилки крысы в соответствии с разработанным протоколом [261].

По результатам оценки культуры на 14 сутки было показано, что клетки активно мигрируют из экспланта на пластик и пролиферируют (Рисунок 6, 7).

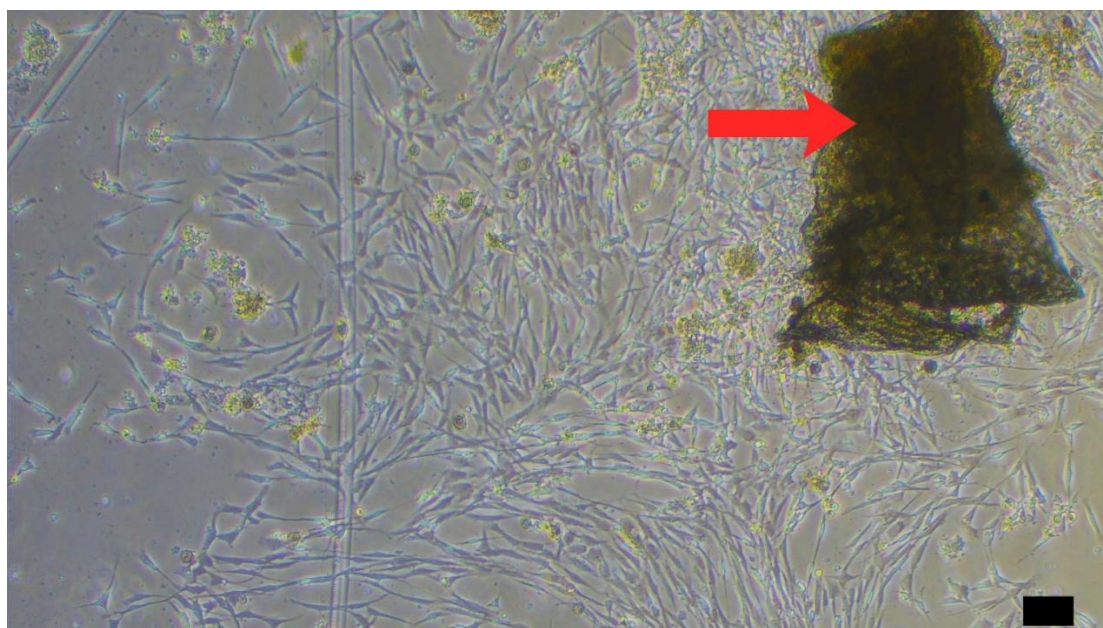


Рисунок 6 – Клеточная культура собственной пластинки. 14 сутки культивирования. Размерный отрезок 100 мкм. Красная стрелка указывает на фрагмент собственной пластинки

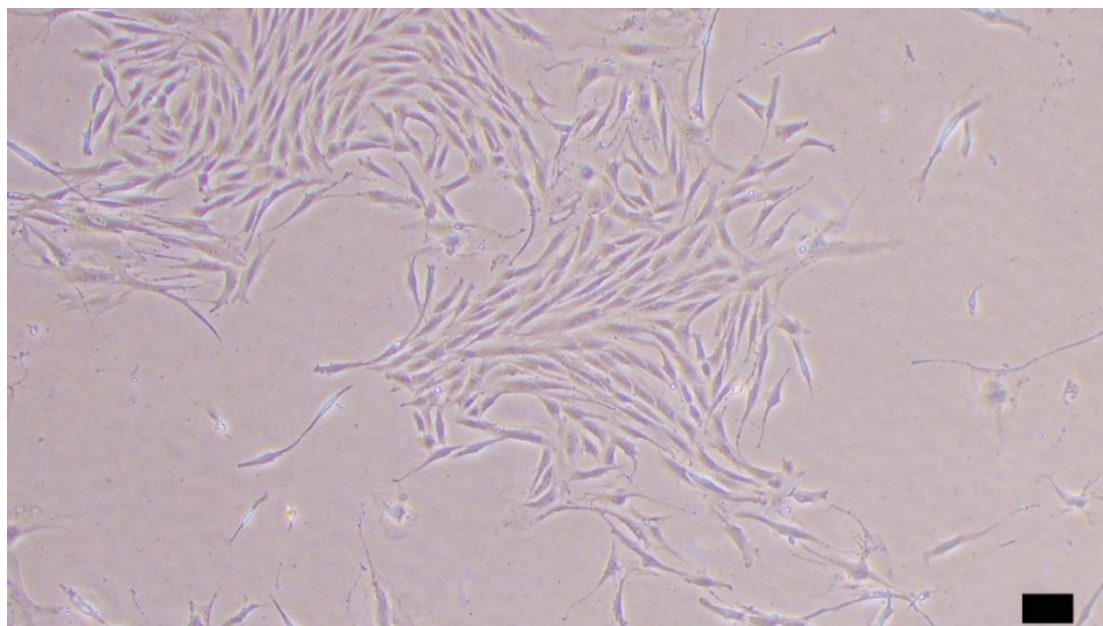


Рисунок 7 – Клеточная культура собственной пластинки. 14 сутки культивирования. Размерный отрезок 100 мкм

На 28 сутки клетки полностью занимали площадь культивирования, формируя монослой (Рисунок 8).

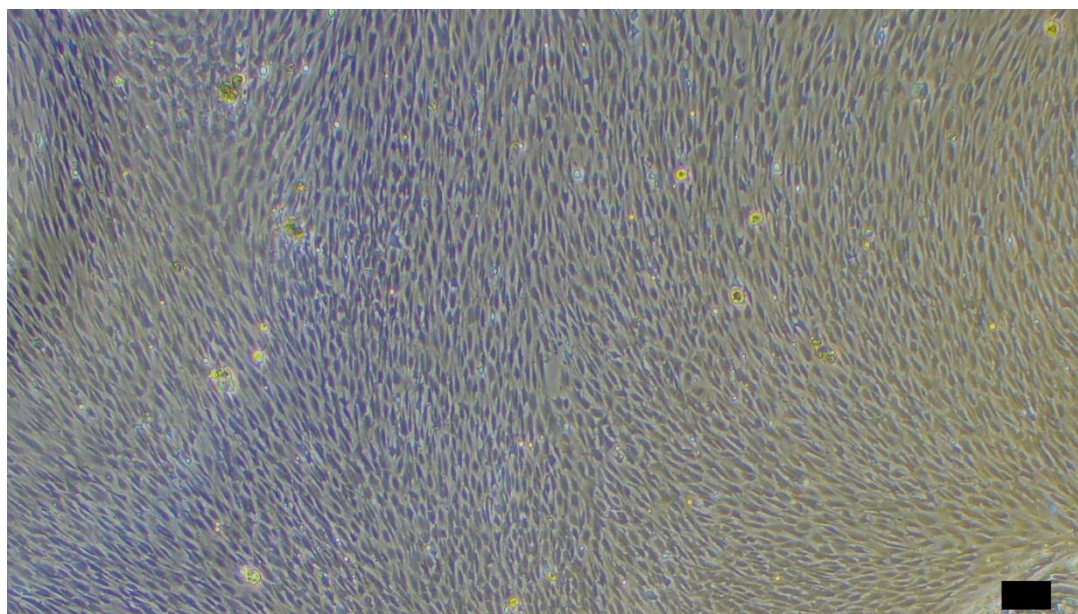


Рисунок 8 – Клеточная культура собственной пластинки. 21 сутки культивирования. Размерный отрезок 100 мкм

Установлено, что полученные культуры клеток крысы были представлены преимущественно глиальными веретеновидными астроцито-подобными клетками, а также более крупными клетками, по своим характеристикам напоминающими Шванновские. Полученные результаты соответствуют имеющимся в литературе сведениям о морфологии ОК [50, 232].

ОК крысы в полученных культурах были выявлены по коэкспрессии общепринятых маркеров ОК p75NTR и GFAP (Рисунок 9) [146, 237].

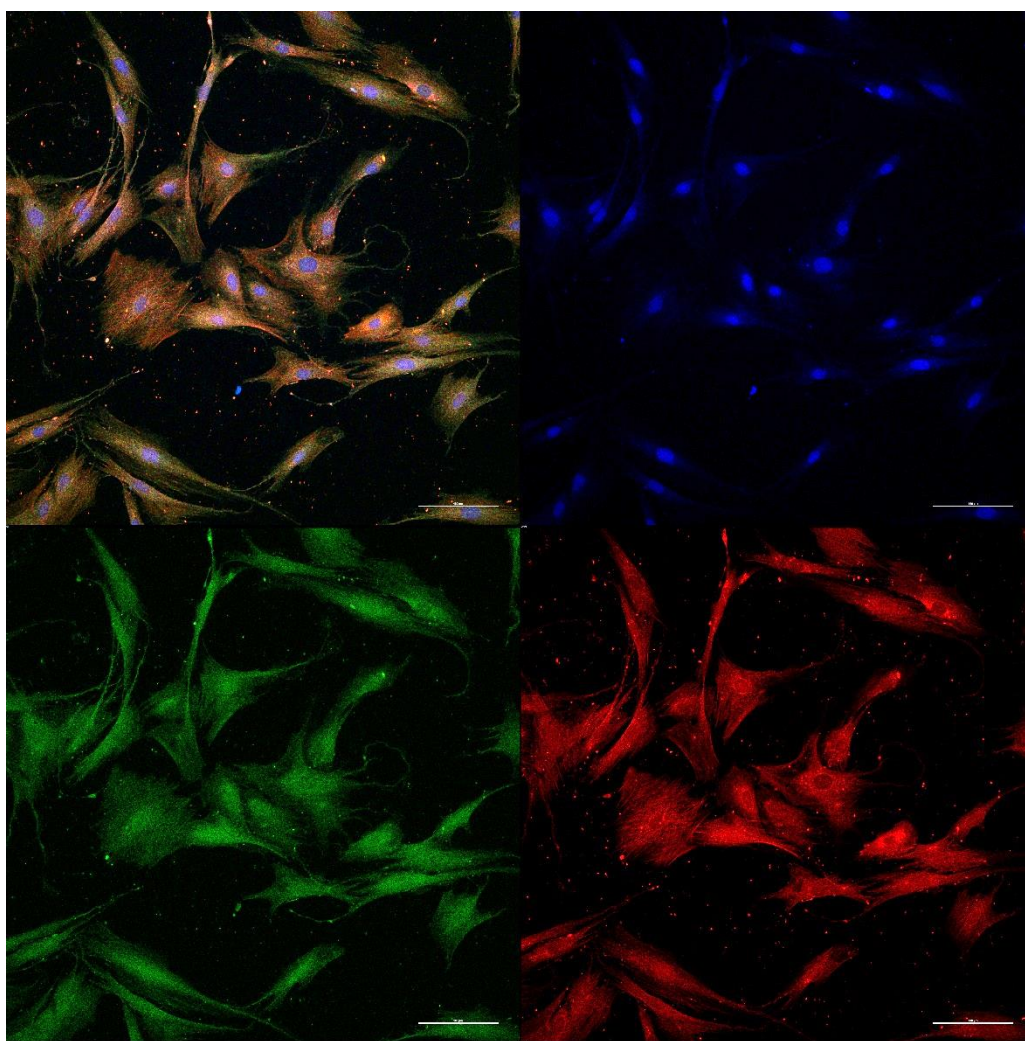


Рисунок 9 – Культура ОК крысы 4 пассаж. Метод окрашивания иммуногистохимия. Синий канал – DAPI, зеленый канал – GFAP, красный канал – p75. Размерный отрезок 100 мкм

Полученные результаты позволяют нам делать вывод о том, что полученные клетки являются ОК обонятельной выстилки. В соответствии с ранее полученными результатами в работе использовались клетки 3 и 4 пассажа [237], поскольку отмечается наибольший уровень клеток с коэкспрессией 2-х маркеров.

3.2. Оценка функциональной активности рекомбинантного BDNF

В ходе подготовки эксперимента по оценке влияния добавления BDNF на эффективность биоинженерного препарата были проведены исследования по оценке функциональной активности нейротрофина *in vitro*.

В эксперименте на BDNF-зависимой культуре SH-SY5Y была показана дифференцировка клеток, что выражалось в формировании характерных структур нейральных сетей. В то же время данные структуры не наблюдались в среде дифференцировки без BDNF (Рисунок 10).

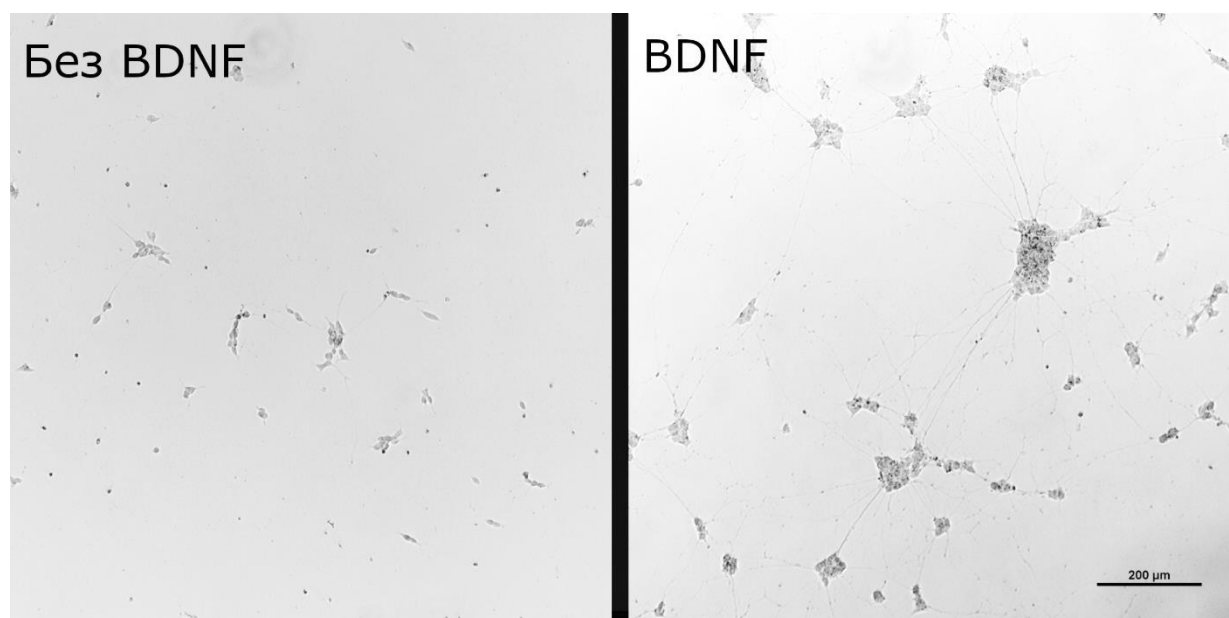


Рисунок 10 – Культура SH-SY5Y, 21 сутки дифференцировки. Сравнение сред дифференцировки с добавлением BDNF и без нейротрофина

Данное наблюдение позволяет нам сделать вывод о том, что используемый нами нейротрофин является функционально активным и может использоваться в дальнейших экспериментах.

3.3. Оценка выживаемости обкладочных клеток в биоинженерных конструкциях

В работе была изучена токсичность гидрогелей для клеток в условиях суспензионной культуры. Также было изучено выживание ОК в пластинах из нановолокон ПВС.

Было показано, что в гидрогелях на основе коллагена 1 типа происходит непрерывное уменьшение ферментативной активности по отношению к клеткам без гидрогеля. Переход на конструкты на основе фибрина показал более плавное уменьшение ферментативной активности. Увеличение концентрации фибриногена до 10 мг/мл привело к незначительному увеличению количества жизнеспособных клеток. Добавление в конструкт гиалуроновой кислоты с желатином также показало увеличение ферментативной активности.

При анализе данных можно выделить 3 группы, первая группа включает в себя гидрогели из коллагена, вторая группа включает в себя фибриновый гель низкой плотности, третья группа состоит из гелей с использованием фибрина не менее 10 мг/мл (Таблица 7, Рисунок11).

Таблица 7 – Оценка жизнеспособности клеток в биоинженерных конструкциях. Детекция по реакции с резазурином, возбуждением при 570 нм. Данные представлены в виде среднего процента от контрольной группы (клетки без конструкта) $\pm$ стандартное отклонение

Вид конструкта (состав)	Процент от контрольной группы, клетки без конструкта							
	1 сутки		7 сутки		14 сутки		28 сутки	
	Срз	СО	Срз	СО	Срз	СО	Срз	СО
Коллаген 1 типа 1 мг/мл + $1 \cdot 10^6$ ОК крысы	97,5	3,5	62,5	3,5	27,5	3,5	12,5	3,5
Коллаген 1 типа 4 мг/мл + $1 \cdot 10^6$ ОК крысы	98	1,4	67,5	3,5	37,5	3,5	22,5	3,5
Фибрин 1 мг/мл + $1 \cdot 10^6$ ОК крысы	95,5	0,7	75,5	13,4	72,5	3,5	62,5	3,6
Фибрин 10 мг/мл + $1 \cdot 10^6$ ОК крысы	96,5	3,5	93,25	2,1	112,5	3,6	117,5	3,6
Фибрин 10 мг/мл + ГК 1 мг/мл + желатин 5 мг/мл + $1 \cdot 10^6$ ОК крысы	100,5	0,7	87,5	3,5	111,5	0,7	135	0,7

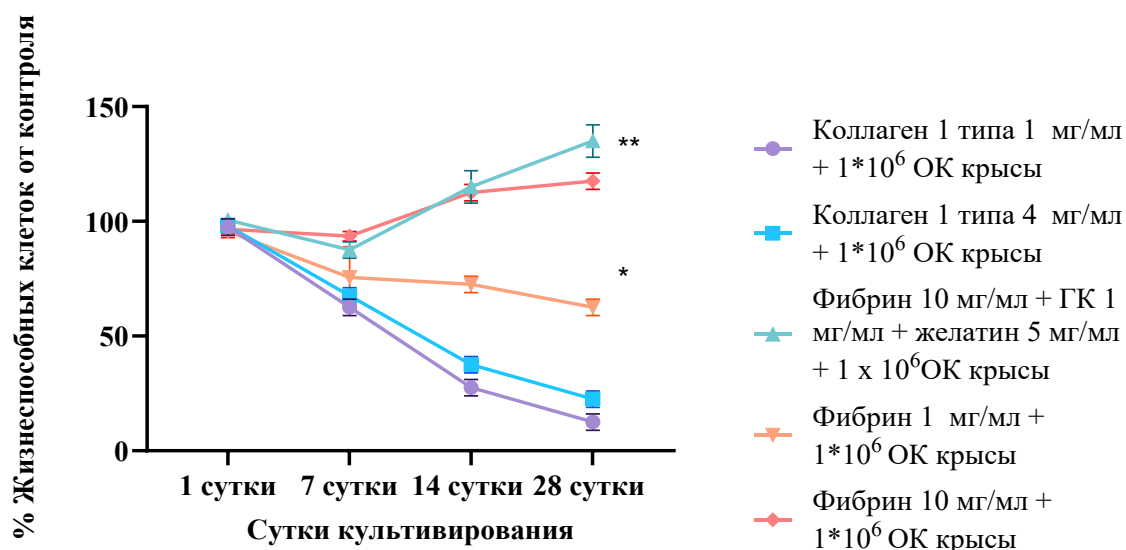


Рисунок 11 – Сравнение выживаемости клеток в биоинженерных препаратах. Данные представлены в виде среднего процента от контрольной группы (клетки без конструкта) $\pm$ стандартное отклонение. Статистическую значимость различий оценивали методом двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,005$)

Было показано, что в пластинах из нановолокна ПВС клетки выживают по меньшей мере в течение 3 суток. На иммортализованных линиях было показано, что нановолокно не токсично и не обладает цитотоксичным свойством. Было отражено, что за период наблюдения ОК статистически незначимо снизили ферментативную активность (Таблица 8, Рисунок 12).

Таблица 8 – Оценка жизнеспособности клеток в биоинженерных конструкциях. Детекция по реакции с резазурином, возбуждением при 570 нм. Данные представлены в виде среднего процента от контрольной группы (клетки без конструкта) $\pm$ стандартное отклонение (СО)

Вид конструкта (состав)	Процент от контрольной группы, клетки без конструкта			
	1 сутки		3 сутки	
	Срз	СО	Срз	СО
пластинка электроспинингованного ПВС + подложка + $1 \cdot 10^6$ ОК крысы	102	3,5	85	7,1
пластинка электроспинингованного ПВС + подложка + $1 \cdot 10^6$ NIH/3T3	81	1,4	103	0,7
пластинка электроспинингованного ПВС + подложка + $1 \cdot 10^6$ EA. hy926	93	2,8	96	5,6

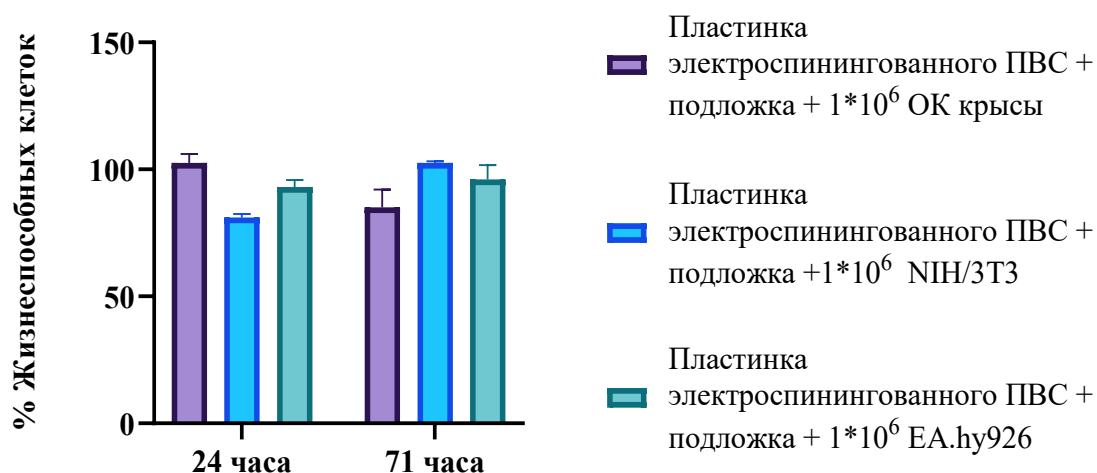


Рисунок 12 – Сравнение выживаемости клеток в биоинженерных препаратах. Данные представлены в виде среднего процента от контрольной группы (клетки без конструкта) $\pm$ стандартное отклонение

3.4. Изучение динамики высвобождения нейротрофического фактора мозга из биоинженерных препаратов методом ИФА

В ходе проведенного исследования был оценен уровень высвобождения нейротрофического фактора из биоинженерных конструкций. Было показано, что нейротрофин способен выходить из конструкций на основе гидрогелей, а также конструктов на основе пластин нановолокна ПВС. Средний темп высвобождения нейротрофина из композитного гидрогеля составил 16 пг/сутки, для фибринового гидрогеля 12 пг/мл, для пластины из нановолокна ПВС 21 пг/сутки (Рисунок 13).

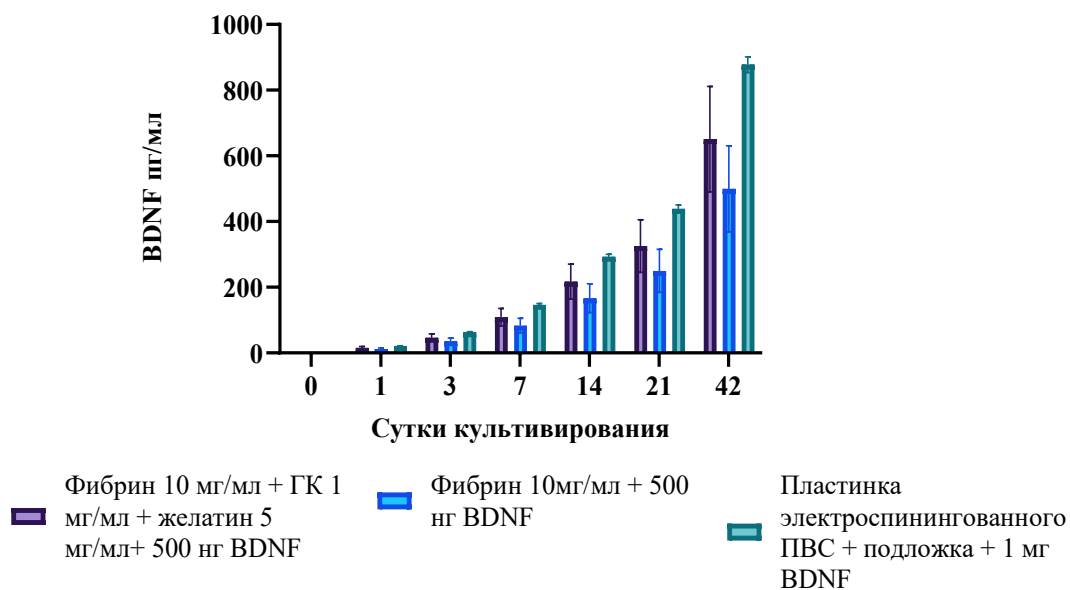


Рисунок 13 – Высвобождение нейротрофина из биоинженерных препаратов на основе гидрогелей и пластин нановолокна ПВС методом иммуноферментного анализа. На графике указаны средние значения $\pm$ среднее квадратическое отклонение

Таким образом, исследуемые биоинженерные препараты способны к стабильному высвобождению внесенных нейротрофинов.

3.5. Моделирование травмы спинного мозга

Для моделирования контузионной ТСМ было прооперировано 450 животных. Из них 60 было отобрано для исследования терапии острой фазы травмы, с использованием пластин из нановолокна ПВС. Остальные животные были использованы в экспериментах по терапии кисты спинного мозга. У 124 животных наблюдалось формирование полноценных кист (Рисунок 14).

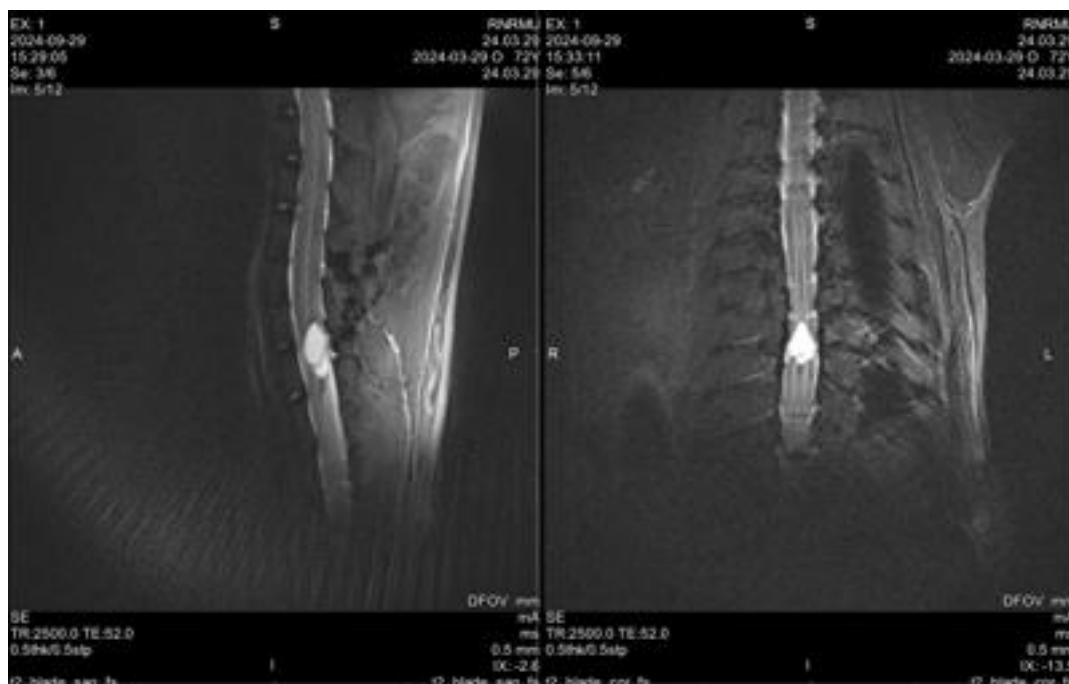


Рисунок 14 – Визуализация хронической травмы спинного мозга методом МРТ, режим T2. Слева сагиттальная проекция, справа коронарная проекция. Крыса Wistar 4 недели с момента контузионной травмы

У остальных животных на протяжении аналогичного временного периода признаков выраженного кистообразования не выявлялось. Данные особи с хроническим повреждением спинного мозга, не сопровождавшимся формированием кист, подлежали исключению из дальнейшего эксперимента по критериям исключения животных.

3.6. Оценка динамики восстановления двигательной активности задних конечностей при трансплантации биоинженерных препаратов на основе гидрогеля

В данной работе впервые были изучены терапевтические эффекты после трансплантации биоинженерных препаратов, состоящих из гидрогелей и ОК крыс в посттравматические кисты [71, 72]. Была оценена эффективность препаратов на основе 750 тысяч ОК крысы в гидрогелях: коллагена 1 типа (4

мг/мл, 1 мг/мл), фибрина (1 мг/мл, 10 мг/мл), гиалуроновой кислоты с добавлением желатина (ГК 1 мг/мл и желатин 5 мг/мл), а также комбинированного геля на основе фибрина, гиалуроновой кислоты и желатина (фибрин 10 мг/мл + ГК 1 мг/мл + желатин 5 мг/мл в пропорции 1:2:5).

А) Терапевтическая эффективность препарата на основе коллагена 1 типа с ОК

Трансплантация ОК крысы в гидрогеле из коллагена 1 типа с концентрацией 4 мг/мл приводит к положительной динамике восстановления двигательной активности задних конечностей крыс (ΔBBB) по сравнению с контрольной группой DMEM: F12. На 4-й неделе препарат на основе коллагена 4 мг/мл продемонстрировал наиболее статистически значимое различие с группой контроля ($p < 0,0005$). Аналогичный гидрогель с клетками показал менее выраженный эффект, сопоставимый с клетками без геля ($p < 0,05$). Что касается препарата на основе коллагена 1 мг/мл, статистически значимых различий с контролем выявлено не было, кроме того, обнаружено значимое различие против коллагена 4 мг/мл (Таблица 9, Рисунок 15).

Таблица 9 – Восстановление двигательной функции задних конечностей крыс после трансплантации биоинженерных препаратов на основе коллагенового гидрогеля и ОК крыс в кисты спинного мозга, отражённое через изменение показателя Δ BVV. Приведены средние значения $\pm$ стандартное отклонение. Данные представлены в виде Δ BVV относительно исходного уровня (0-я неделя). СО — стандартное отклонение

Недели	Коллаген 1 мг/мл (n=7)		Коллаген 1 мг/мл + $1 \cdot 10^6$ ОК крысы (n=7)		Коллаген 4 мг/мл (n=9)		Коллаген 4 мг/мл + $1 \cdot 10^6$ ОК крысы (n=7)		0,75 $\cdot 10^6$ ОК крысы (n=10)		DMEM:F12 (n=10)	
	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,63	0,48	0,30	0,45	0,44	0,95	-0,42	1,16	0,38	0,79	-0,30	0,59
2	0,00	0,71	0,70	0,76	0,72	1,25	-0,33	0,82	1,06	1,27	0,05	0,93
3	0,25	0,50	0,70	0,97	1,00	1,03	0,42	0,66	1,50	1,51	-0,30	0,75
4	0,13	0,63	0,10	0,65	1,72	0,51	0,92	0,66	1,44	1,24	-0,40	0,88

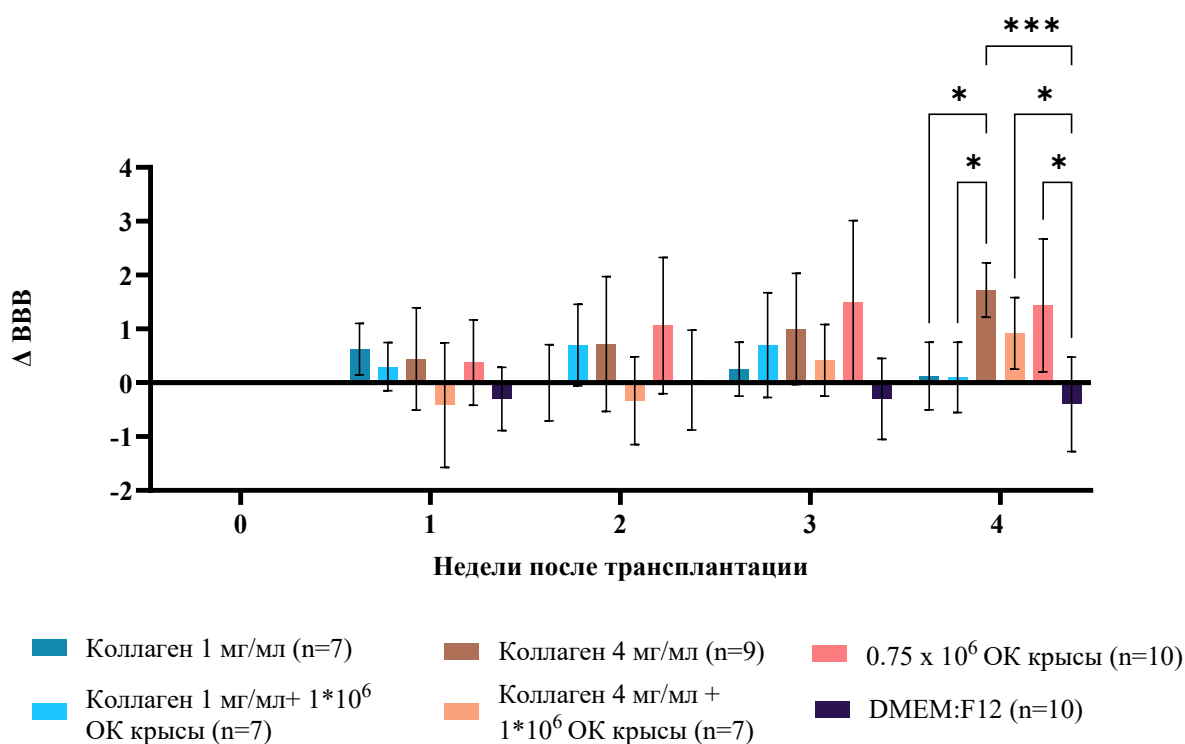


Рисунок 15 – Изменение показателей шкалы BBB (Δ BVV) у крыс после трансплантации биоинженерных препаратов с ОК крыс и коллагеновым гидрогелем в кисты спинного мозга. Приведены средние значения $\pm$ стандартное отклонение. Статистическую значимость различий оценивали методом двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки. * ($p < 0,05$), *** ($p < 0,0005$)

Б) Терапевтическая эффективность препарата на основе фибринового геля с ОК

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что трансплантация ОК крыс, инкапсулированных в фибриновый гидрогель, обеспечивает более выраженное восстановление двигательной функции задних конечностей животных (по шкале Бассо — Битти — Бреснахан) в сравнении с контрольной группой, которой вводили среду DMEM:F12. Применение препарата на основе фибринового гидрогеля концентрацией 10 мг/мл сопровождалось статистически достоверным отличием от контрольной группы ($p < 0,0001$). В то же время ни введение бесклеточного гидрогеля, ни использование фибринового геля более низкой концентрации не сопровождалось статистически значимыми различиями относительно контроля (Таблица 10, Рисунок 16).

Таблица 10 – Динамика восстановления локомоторной функции задних конечностей крыс по показателю $\Delta B V V$ после введения в кисты спинного мозга биоинженерных препаратов, включающих фибриновый гидрогель и ОК крыс. Данные представлены как средние значения $\pm$ среднееквадратическое отклонение. Данные представлены в виде $\Delta B V V$ по отношению к 0 неделе. СО-среднееквадратическое отклонение

Недели	Фибрин 4 мг/мл (n=9)		Фибрин 4 мг/мл + 1* 10 ⁶ ОК крысы (n=8)		Фибрин 10 мг/мл + 1*1 0 ⁶ ОК крысы (n=7)		Фибрин 10 мг/ мл (n=7)		0,75*10 ⁶ ОК к рысы (n=10)		DMEM:F12 (n=10)	
	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,06	0,63	-0,31	1,22	0,64	0,90	0,17	0,68	0,38	0,79	-0,30	0,59
2	0,56	1,13	0,06	0,98	1,21	0,91	0,58	1,66	1,06	1,27	0,05	0,93
3	0,06	0,92	0,19	1,16	1,00	0,91	0,42	0,80	1,50	1,51	-0,30	0,75
4	1,00	1,15	0,69	0,92	1,93	0,45	0,67	1,17	1,44	1,24	-0,40	0,88

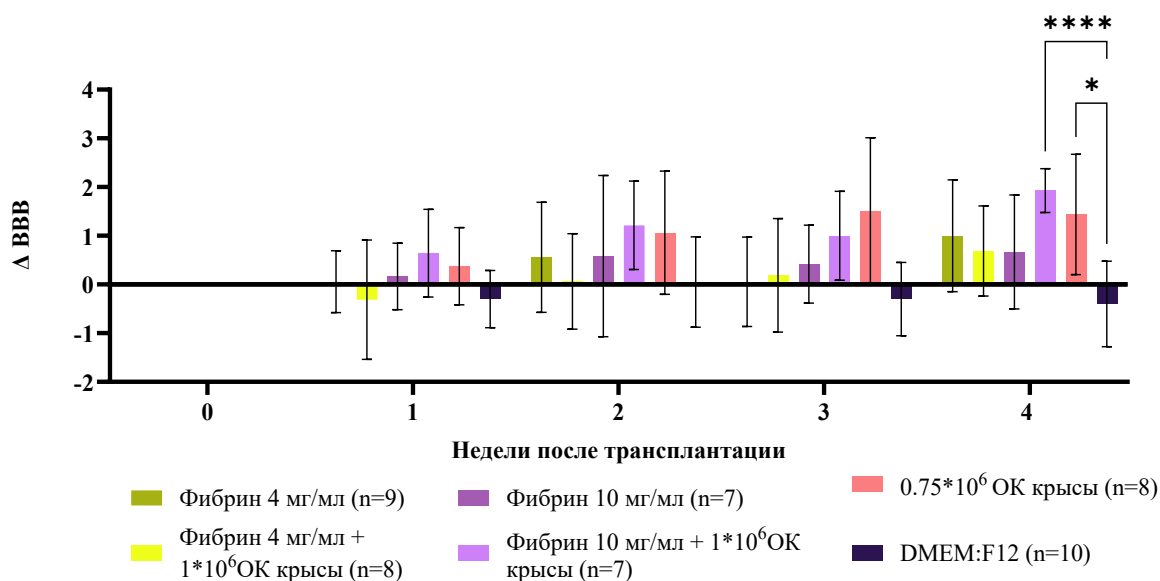


Рисунок 16 – Изменение показателей шкалы BBB (ΔBBB) у крыс после трансплантации биоинженерных препаратов с ОК крыс и фибриновым гидрогелем в кисты спинного мозга. Приведены средние значения $\pm$ стандартное отклонение. Статистическую значимость различий оценивали методом двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием.

* ($p < 0,05$), **** ($p < 0,0001$)

В) Терапевтическая эффективность препарата на основе комбинированного гидрогеля

В рамках настоящей работы созданы биоинженерные конструкции на основе комбинированного гидрогеля, состоящего из фибрина, гиалуроновой кислоты и желатина. Установлено, что имплантация ОК крыс в составе указанных гидрогелевых композиций способствует более эффективному восстановлению моторной функции задних конечностей (по показателю ΔBBB) в сравнении с контрольной группой, получавшей DMEM: F12. Начиная с 3-й недели наблюдения фиксировались статистически достоверные различия между группами с композитным гидрогелем и контролем. К 4-й неделе различия между контролем и группой, получавшей бесклеточный гидрогель, перестали носить статистически значимый характер, тогда как в группах с клеточным компонентом достоверные отличия сохранялись. Группы, получавшие комбинированный

гидрогель, а также клетки без носителя, продемонстрировали отличия от контроля на уровне $p < 0,05$. Наиболее выраженный терапевтический эффект — как по величине среднего значения ΔBVB (2,3 балла), так и по степени статистической достоверности ($p < 0,00001$) — был отмечен в группе, получавшей композитный гидрогель с клетками (Таблица 11, Рисунок 17).

Таблица 11 – Динамика восстановления локомоторной функции задних конечностей крыс по показателю ΔBVB после введения в кисты спинного мозга биоинженерных препаратов, включающих комбинированный гидрогель и ОК крыс. Данные представлены как средние значения $\pm$ среднеквадратическое отклонение. Данные представлены в виде ΔBVB по отношению к 0 неделе. СО – среднеквадратическое отклонение

Недели	Фибрин 10 мг/мл + ГК 1 мг/мл + желатин 5 мг/мл (n=7)		Фибрин 10 мг/мл + ГК 1 мг/мл + желатин 5 мг/мл + $1 \cdot 10^6$ ОК крысы (n=7)		ГК 1 мг/мл + желатин 5 мг/мл (n=7)		ГК 1 мг/мл + желатин 5 мг/мл + $1 \cdot 10^6$ ОК крысы (n=7)		0,75 $\cdot 10^6$ ОК крысы (n=10)		DMEM:F12 (n=10)	
	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,38	0,48	0,29	1,11	-0,14	1,03	-0,40	0,89	0,38	0,79	-0,30	0,59
2	0,38	1,03	1,14	1,03	0,71	1,25	0,20	0,45	1,06	1,27	0,05	0,93
3	2,00	0,41	1,57	1,24	0,79	1,15	0,80	1,30	1,50	1,51	-0,30	0,75
4	1,50	1,08	2,29	0,70	0,71	0,95	1,40	0,89	1,44	1,24	-0,40	0,88

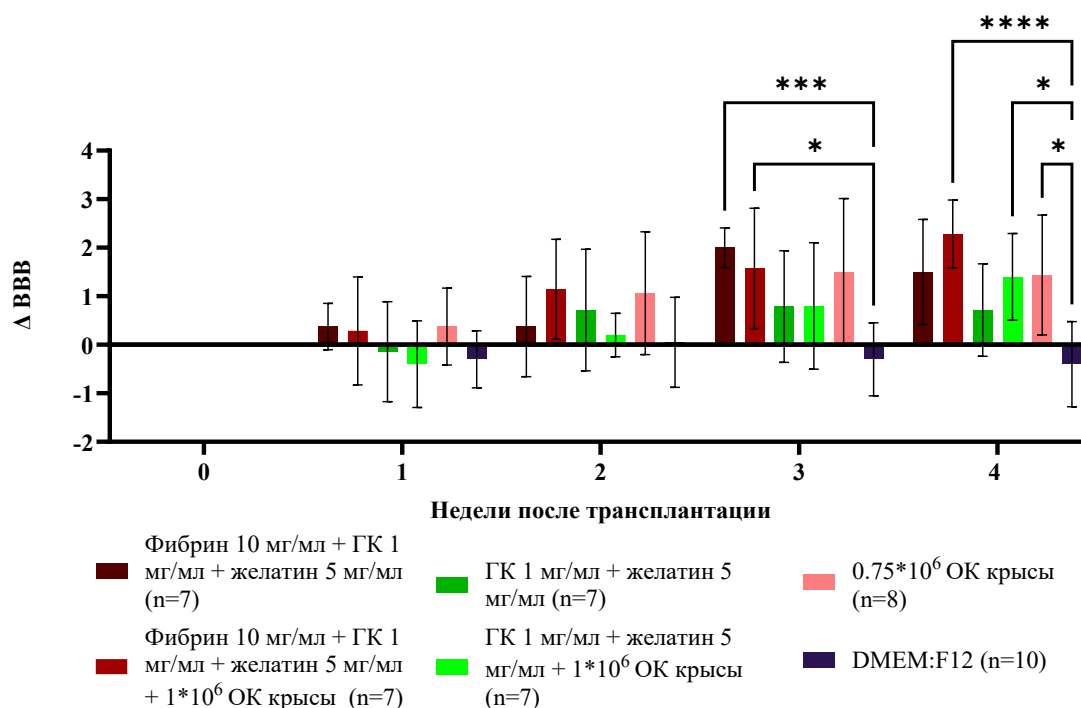


Рисунок 17 – Изменение показателей шкалы BBB (Δ BBB) у крыс после трансплантации биоинженерных препаратов с ОК крыс и комбинированным гидрогелем в кисты спинного мозга. Приведены средние значения $\pm$ стандартное отклонение. Статистическую значимость различий оценивали методом двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием * ($p < 0,05$), *** ($p < 0,0005$), **** ($p < 0,0001$)

На основе полученных данных в дальнейшие исследования с нейротрофинами были выбраны следующие гидрогели: фибриновый гидрогель 10 мг/мл, а также комбинированный гидрогель. К данным конструктам было добавлено по 500 нг BDNF.

При использовании конструкта на основе фибринового гидрогеля с добавлением 500 нг BDNF было продемонстрировано, что уже на 3-й неделе группа с препаратом превосходит контрольную группу по динамике восстановления моторной активности. На 4-й неделе разрыв с контрольной группой был увеличен и достиг существенного статистического различия по сравнению с группой контроля ($p < 0,005$).

В случае использования композитного геля также наблюдалось значимое увеличение динамики восстановления моторной активности уже на 3-й неделе наблюдения по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). На 4-й неделе продолжился рост динамики восстановления моторной активности, достигнув однозначных различий против группы контроля ($p < 0,0001$). Добавление нейротрофина в композитный гель никак не отразилось на его эффективности (Таблица 12, Рисунок 18).

Таблица 12 – Динамика восстановления локомоторной функции задних конечностей крыс по показателю ΔBVB после введения в кисты спинного мозга биоинженерных препаратов, включающих гидрогель, BDNF и ОК крыс. Данные представлены как средние значения $\pm$ среднеквадратическое отклонение. Данные представлены в виде ΔBVB по отношению к 0 неделе. СО — среднеквадратическое отклонение

Недели	Фибрин 10 мг/мл (n=7)		ГК 1 мг/мл + желатин 5 мг/мл + $1 \cdot 10^6$ ОК крысы (n=7)		Фибрин 10 мг/мл + $1 \cdot 10^6$ ОК крысы + 500 нг BDNF (n=10)		Фибрин 10 мг/мл + ГК 1 мг/мл + желатин 5 мг/мл + $1 \cdot 10^6$ ОК крысы + 500 нг BDNF (n=10)		0,75 $\cdot 10^6$ ОК крысы (n=10)		DMEM:F12 (n=10)	
	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,17	0,68	-0,40	0,89	0,15	1,00	0,23	0,96	0,38	0,79	-0,30	0,59
2	0,58	1,66	0,20	0,45	0,50	0,88	0,82	1,01	1,06	1,27	0,05	0,93
3	0,42	0,80	0,80	1,30	1,25	0,92	1,14	0,92	1,50	1,51	-0,30	0,75
4	0,67	1,17	1,40	0,89	2,30	1,06	2,36	0,60	1,44	1,24	-0,40	0,88

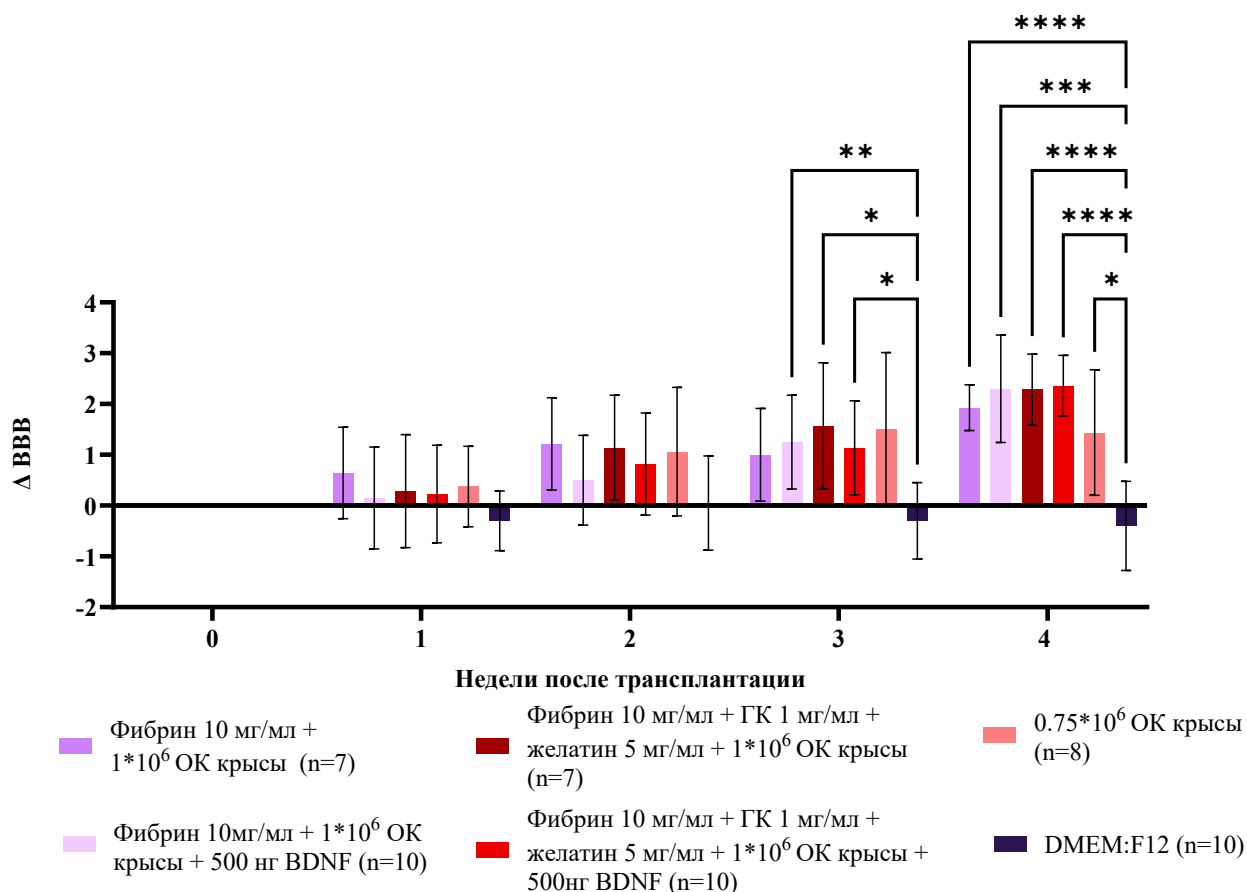


Рисунок 18 – Изменение показателей шкалы BBB (Δ BBB) у крыс после трансплантации биоинженерных препаратов с ОК крыс, гидрогелями и BDNF в кисты спинного мозга. Приведены средние значения $\pm$ стандартное отклонение.

Статистическую значимость различий оценивали методом двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием. *($p < 0,05$), **($p < 0,005$), ***($p < 0,0005$), ****($p < 0,0001$)

3.7. Оценка изменения морфометрических параметров кисты спинного мозга при трансплантации биоинженерных препаратов содержащие гидрогели и обкладочных клеток обонятельной выстилки крыс

В настоящем исследовании продемонстрирована динамика изменения размеров посттравматических кист спинного мозга крыс на фоне трансплантации биоинженерных препаратов.

А) Влияние препаратов на основе коллагена 1 типа на морфометрические параметры кисты спинного мозга

Анализ МРТ-изображений спинного мозга крыс, выполненный до и после трансплантации, показал, что группы, получавшие клетки в составе коллагенового геля, характеризовались способностью к уменьшению объёма кисты относительно контрольной группы DMEM: F12. Кроме того, все препараты, включающие клеточный компонент, обеспечивали статистически значимое снижение объёма кистозной полости. В группах, получавших бесклеточный гидрогель, статистически значимых различий выявлено не было (Таблица 13, Рисунок 19).

Таблица 13 – Динамика морфометрических характеристик кистозных полостей спустя 4 недели после трансплантации биоинженерных конструкций на основе коллагенового гидрогеля. Показатель представлен как процентное отношение объёма кисты после трансплантации к её исходному объёму (до трансплантации). СО — среднеквадратическое отклонение

	% уменьшения кисты	СО
DMEM: F12 (n=10)	-20,53	25,85
0,75*10 ⁶ ОК крысы (n=10)	42,41	9,48
Коллаген 1 мг/мл (n=7)	25,06	28,30
Коллаген 4 мг/мл (n=7)	16,75	18,25
Коллаген 1 мг/мл + 1*10 ⁶ ОК крысы (n=7)	35,97	25,91
Коллаген 4 мг/мл + 1*10 ⁶ ОК крысы (n=9)	28,40	21,21

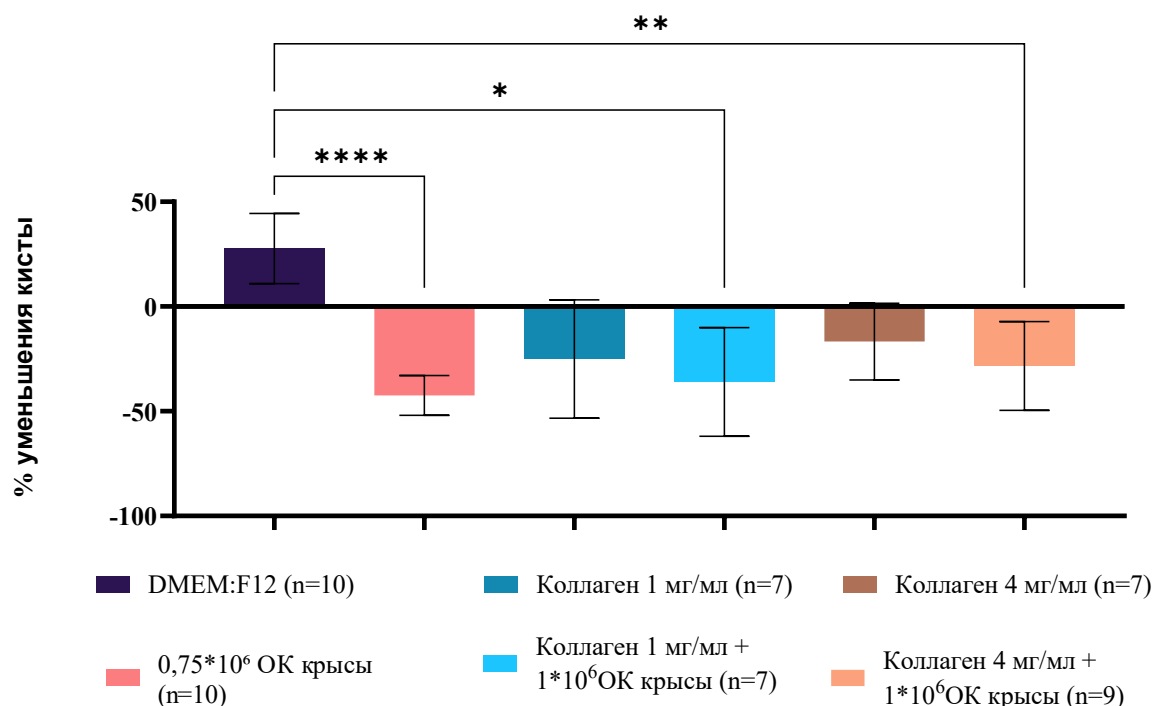


Рисунок 19 – Динамика морфометрических параметров кистозных полостей через 4 недели после трансплантации биоинженерных конструкций на основе коллагенового гидрогеля, представленная в виде процентного соотношения объёма кисты после пересадки к её объёму до вмешательства. Данные приведены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Статистическую значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием Данна. *($p < 0,05$), ***($p < 0,0005$)

Б) Влияние препаратов на основе фибринового гидрогеля на морфометрические параметры кисты спинного мозга

При анализе МРТ-изображений спинного мозга крыс до и после трансплантации было показано, что группы с клеточным компонентом способны уменьшать размеры кисты СМ. Статистический анализ показал, что гидрогель с фибрином 4 мг/мл ($p < 0,05$), гель с фибрином 10 мг/мл ($p < 0,005$), а также клетки без геля ($p < 0,0005$) способствуют значимому уменьшению объема кисты по сравнению с группой контроля. Увеличение концентрации фибрина показало

более значимое различие по сравнению с группой контроля, с увеличением среднего процента на 35% (Таблица 14, Рисунок 20).

Таблица 14 – Динамика морфометрических характеристик кистозных полостей спустя 4 недели после трансплантации биоинженерных конструкций на основе фибринового гидрогеля. Показатель представлен как процентное отношение объёма кисты после трансплантации к её исходному объёму (до трансплантации). СО — среднее квадратическое отклонение

	% уменьшения кисты	СО
DMEM: F12 (n=10)	-20,53	25,85
0,75*10 ⁶ ОК крысы (n=10)	42,41	9,48
Фибрин 4 мг/мл (n=9)	-1,45	28,39
Фибрин 4 мг/мл + 1*10 ⁶ ОК крысы (n=8)	23,28	17,03
Фибрин 10 мг/мл (n=7)	-37,43	67,71
Фибрин 10 мг/мл + 1*10 ⁶ ОК крысы (n=7)	35,73	18,18

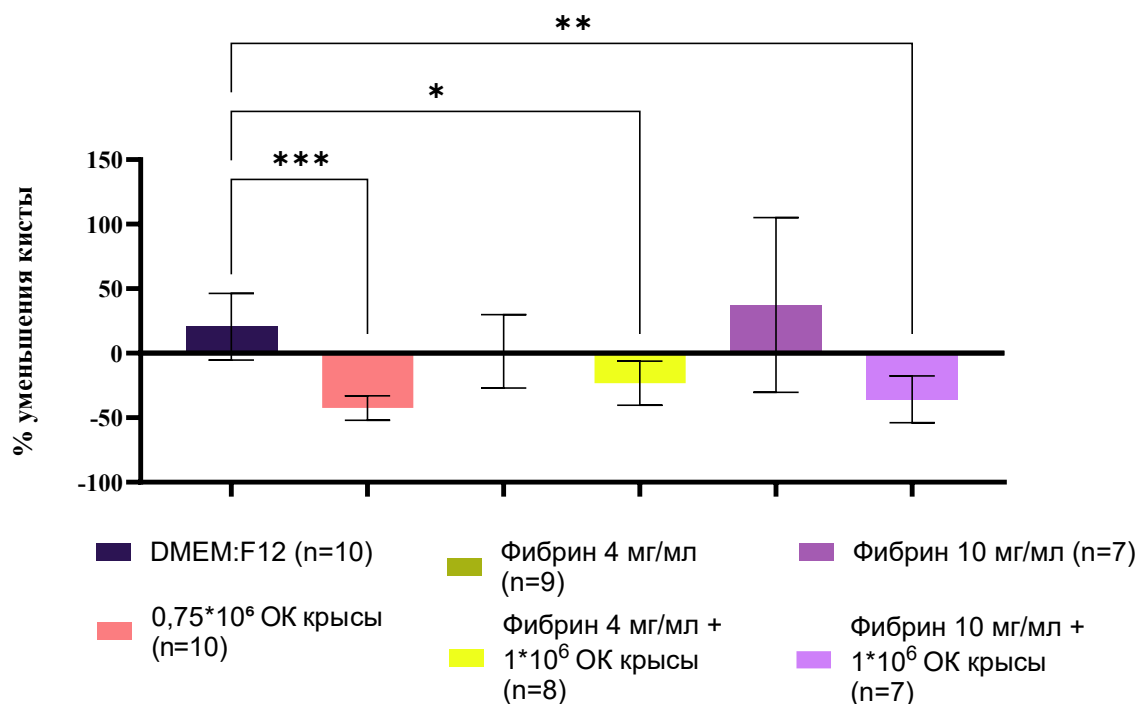


Рисунок 20 – Динамика морфометрических параметров кистозных полостей через 4 недели после трансплантации биоинженерных конструкций на основе фибринового гидрогеля, представленная в виде процентного соотношения объема кисты после пересадки к её объёму до вмешательства. Данные приведены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Статистическую значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием Данна. *($p < 0,05$), **($p < 0,005$), ***($p < 0,0005$)

В) Влияние препаратов из композитного гидрогеля на морфометрические параметры кисты спинного мозга

В данной работе было показано, что использование препаратов из композитного гидрогеля с добавлением клеток положительно сказывается на уменьшении объема кисты спинного мозга. Комбинированный гель и гиалуроновый гель демонстрировали сопоставимые значимые различия по сравнению с группой контроля ($p < 0,005$). Добавление в гиалуроновый гель фибриногена позволило увеличить средний процент уменьшения кисты на 18% (Таблица 15, Рисунок 21).

Таблица 15 – Динамика морфометрических характеристик кистозных полостей спустя 4 недели после трансплантации биоинженерных конструкций на основе композитного гидрогеля. Показатель представлен как процентное отношение объёма кисты после трансплантации к её исходному объёму (до трансплантации). СО — среднеквадратическое отклонение

	% уменьшения кисты	СО
DMEM: F12 (n=10)	-20,53	25,85
0,75*10 ⁶ ОК крысы (n=10)	42,41	9,48
Фибрин 10 мг/мл + ГК 1 мг/мл + желатин 5 мг/мл (n=7)	3,16	28,08
Фибрин 10 мг/мл + ГК 1 мг/мл + желатин 5 мг/мл + 1*10 ⁶ ОК крысы (n=7)	52,06	23,09
ГК 1 мг/мл + желатин 5 мг/мл (n=7)	13,60	8,02
ГК 1 мг/мл + желатин 5 мг/мл + 1*10 ⁶ ОК крысы (n=7)	42,80	18,62

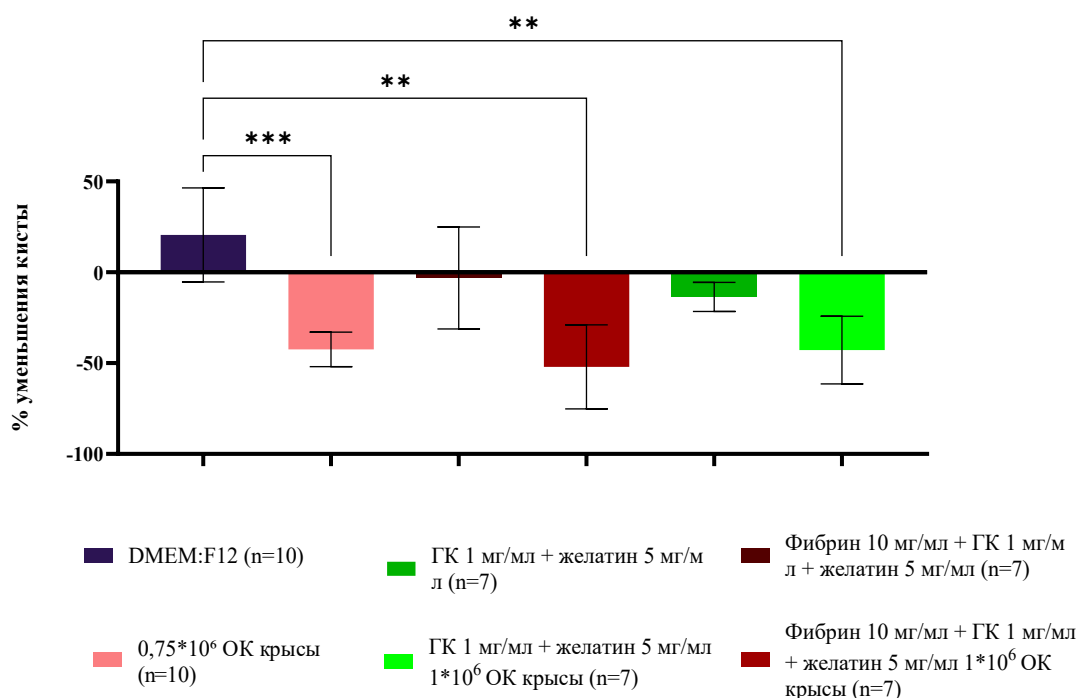


Рисунок 21 – Динамика морфометрических параметров кистозных полостей через 4 недели после трансплантации биоинженерных конструкций на основе композитного гидрогеля, представленная в виде процентного соотношения объёма кисты после пересадки к её объёму до вмешательства. Данные приведены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Статистическую значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием Данна. $** (p < 0,005)$, $*** (p < 0,0005)$

Анализ МРТ-изображений спинного мозга крыс до и после трансплантации препаратов показал, что все исследованные группы способствуют уменьшению кисты СМ. При этом наибольшее сокращение объёма кисты достигнуто при использовании конструкторов на основе композитного гидрогеля. Так, конструктор из композитного геля и ОК уменьшил средний объём на 52%, а добавление нейротрофина позволило достичь уменьшения до 59%. Статистический тест продемонстрировал значимые различия между фибриновым гидрогелем с BDNF ($p < 0,005$), композитным гелем с BDNF ($p < 0,0005$) и группой сравнения DMEM: F12. В ходе эксперимента также было изучено влияние BDNF на эффективность биоинженерных препаратов на основе

гидрогелей в отношении изменения кисты спинного мозга (Таблица 16, Рисунок 22).

Таблица 16 – Динамика морфометрических характеристик кистозных полостей спустя 4 недели после трансплантации биоинженерных конструкций на основе гидрогелей с добавлением BDNF. Показатель представлен как процентное отношение объёма кисты после трансплантации к её исходному объёму (до трансплантации). СО — среднеквадратическое отклонение

	% уменьшения кисты	СО
DMEM: F12 (n=10)	-20,53	25,85
0,75*10 ⁶ ОК крысы (n=10)	42,41	9,48
Фибрин 10 мг/мл + 1*10 ⁶ ОК крысы (n=7)	35,73	18,18
Фибрин 10 мг/мл + 1*10 ⁶ ОК крысы + 500 нг BDNF (n=7)	39,62	17,32
Фибрин 10 мг/мл + ГК 1 мг/мл + желатин 5 мг/мл + 1*10 ⁶ ОК крысы (n=7)	52,06	23,09
Фибрин 10 мг/мл + ГК 1 мг/мл + желатин 5 мг/мл + 1*10 ⁶ ОК крысы + 500 нг BDNF (n=7)	58,66	15,24

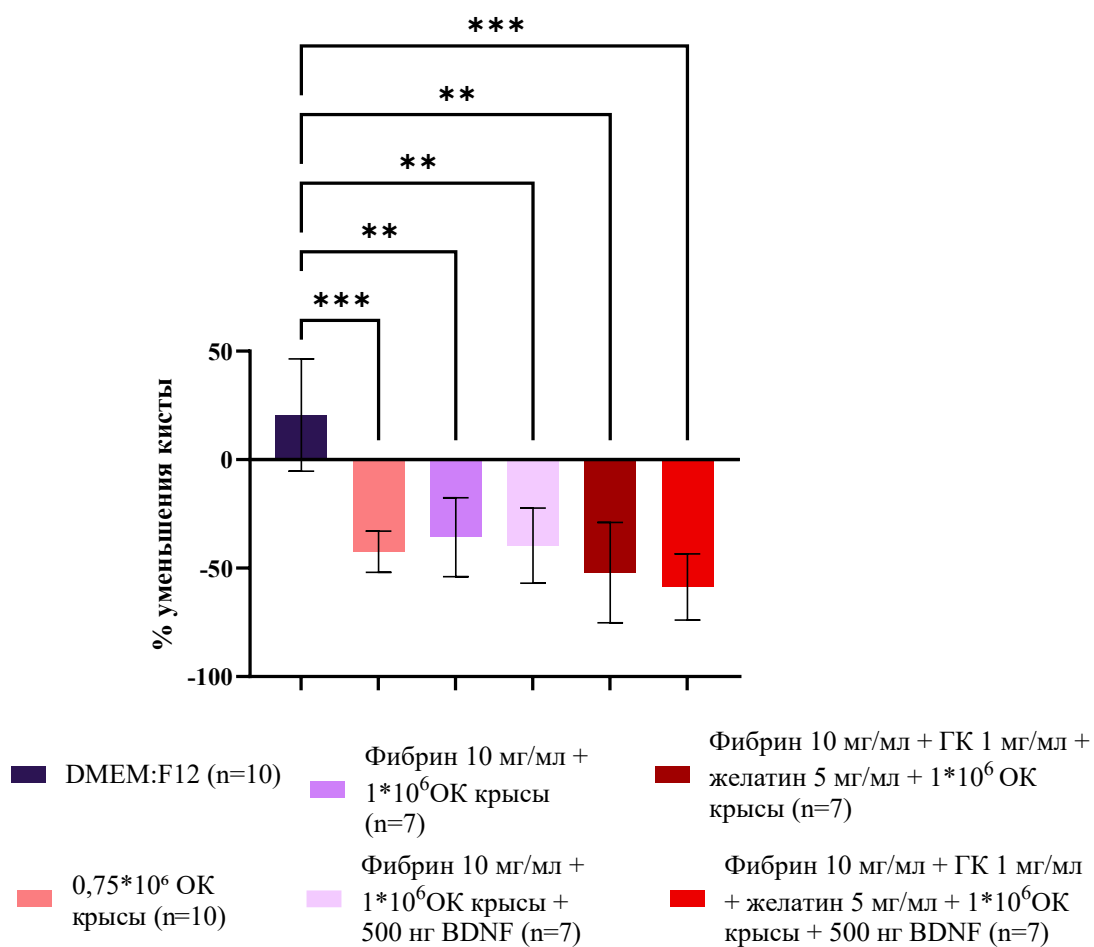


Рисунок 22 – Динамика морфометрических параметров кистозных полостей через 4 недели после трансплантации биоинженерных конструкций на основе гидрогелей с добавлением BDNF, представленная в виде процентного соотношения объёма кисты после пересадки к её объёму до вмешательства.

Данные приведены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Статистическую значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием Данна. **($p < 0,005$), ***($p < 0,0005$)

3.8. Изучение гистологических образцов тканей спинного мозга после трансплантации биоинженерных препаратов в кисты спинного мозга

В рамках данного исследования впервые была показана способность ОК мигрировать из гидрогеля в ткани спинного мозга, а также была оценена ремиелинизация.

Было показано, что меченые РКН26 клетки способны мигрировать в ткани из зоны введения. Данные меченые ОК выявляются на 4 неделе после трансплантации. Помимо этого, было показано образование нового периферического миелина (MPZ) (Рисунок 23–32).

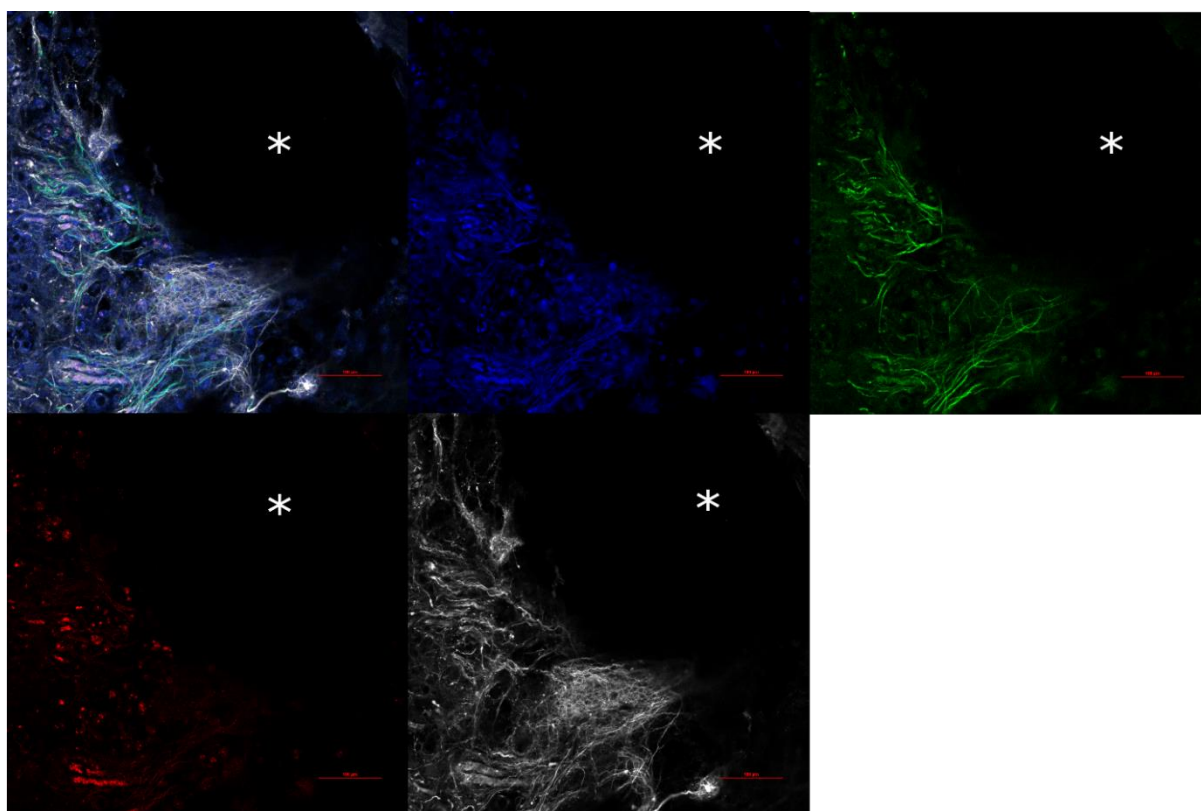


Рисунок 23 – Иммуногистохимическое окрашивание среза СМ после трансплантации коллагена 1 мг/мл + $1 \cdot 10^6$ ОК. MPZ - зелёный, 3- β -tubulin - белый, DAPI - синий, РКН26 - красный; * указывает на просвет кисты спинного мозга. Размерный отрезок 100 мкм

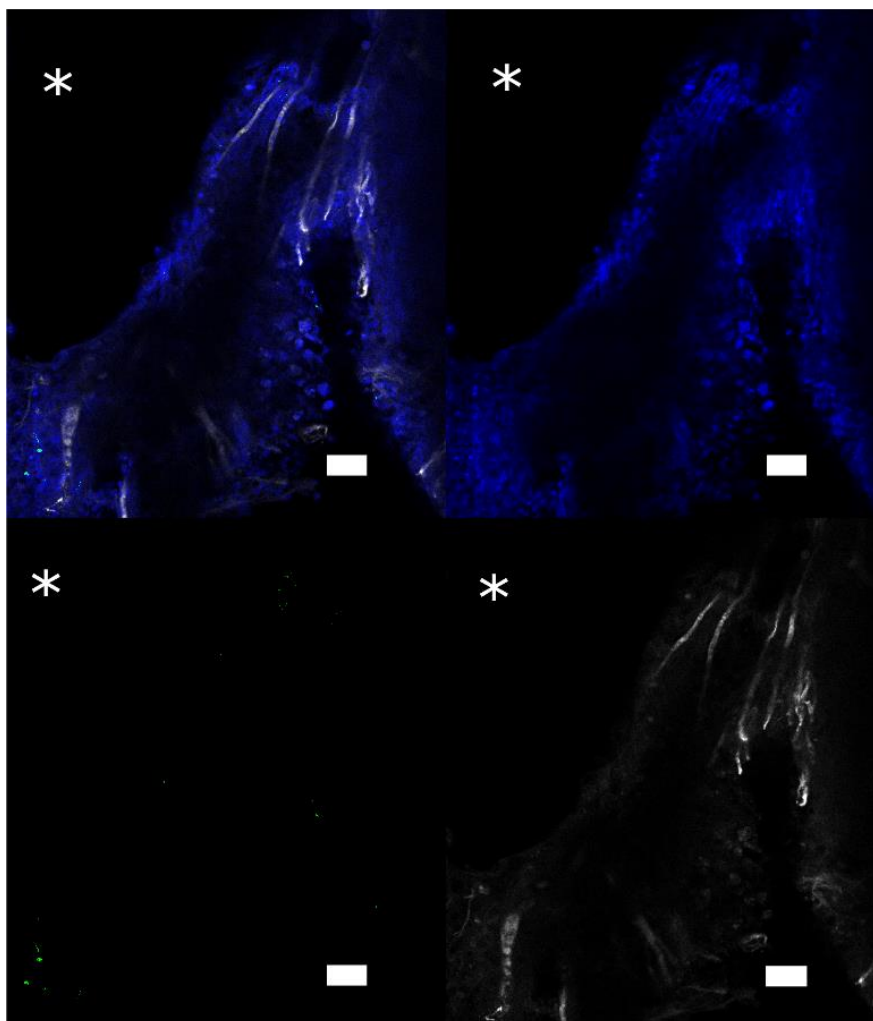


Рисунок 24 – Иммуногистохимическое окрашивание среза СМ после трансплантации коллагена 1 мг/мл. MPZ - зелёный, 3-β-tubulin - белый, DAPI - синий; * указывает на просвет кисты спинного мозга. Размерный отрезок 50 МКМ

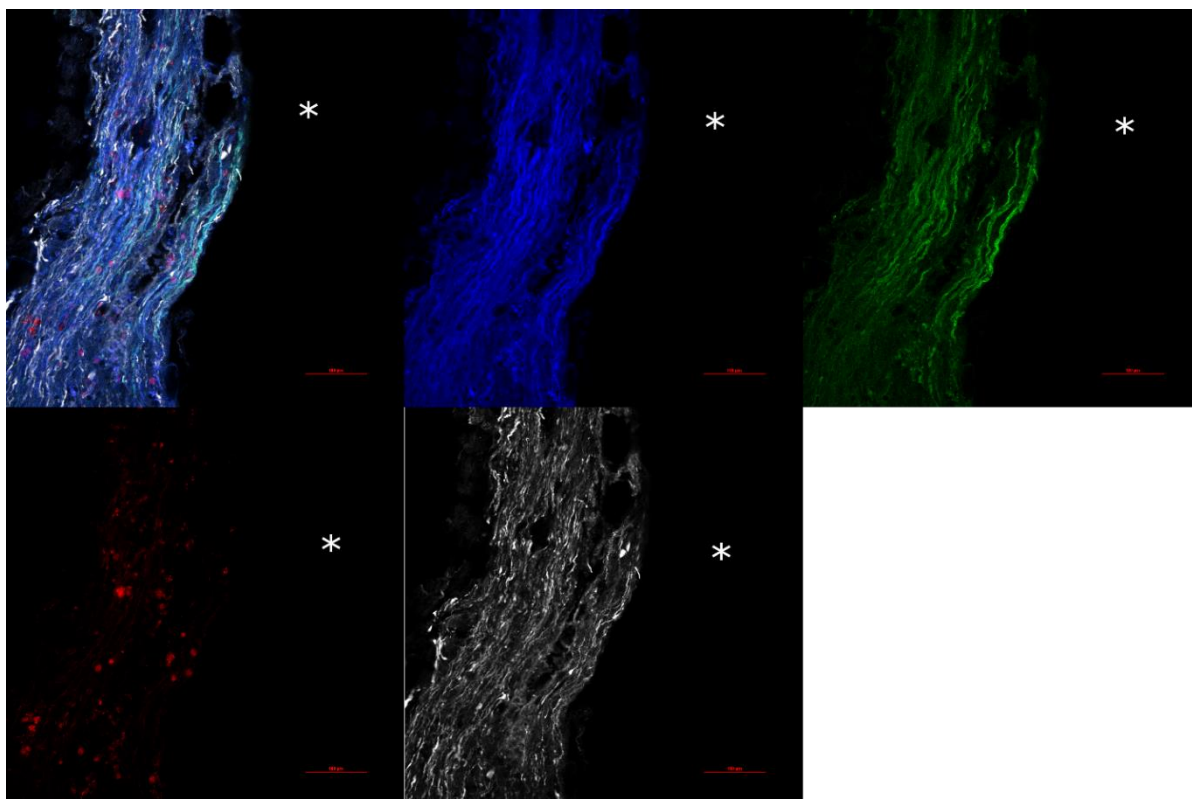


Рисунок 25 – Иммуногистохимическое окрашивание среза СМ после трансплантации коллагена 4 мг/мл + 1×10^6 ОК. MPZ - зелёный, 3- β -tubulin - белый, DAPI - синий, PKH26 - красный; * указывает на просвет кисты спинного мозга. Размерный отрезок 100 мкм

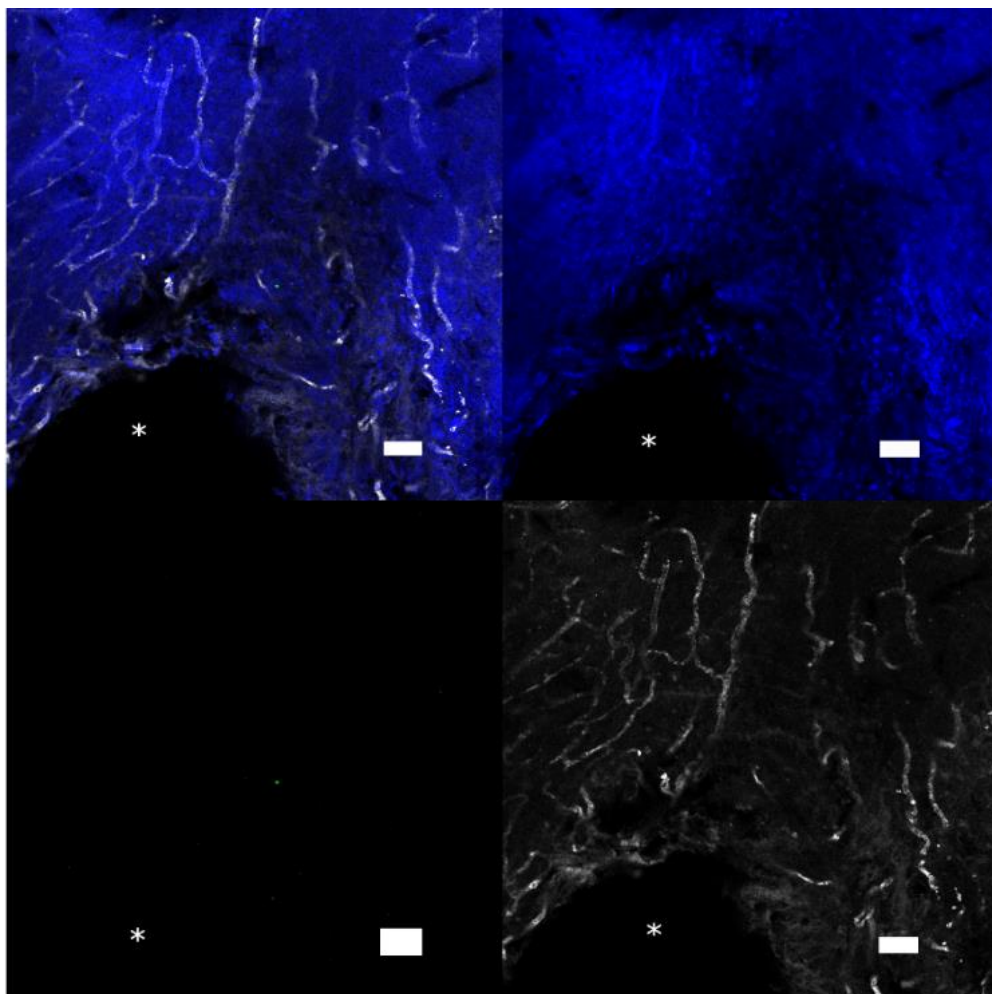


Рисунок 26 – Иммуногистохимическое окрашивание среза СМ после трансплантации коллагена 4 мг/мл. MPZ - зелёный, 3- β -tubulin - белый, DAPI - синий; * указывает на просвет кисты спинного мозга. Размерный отрезок 50 мкм

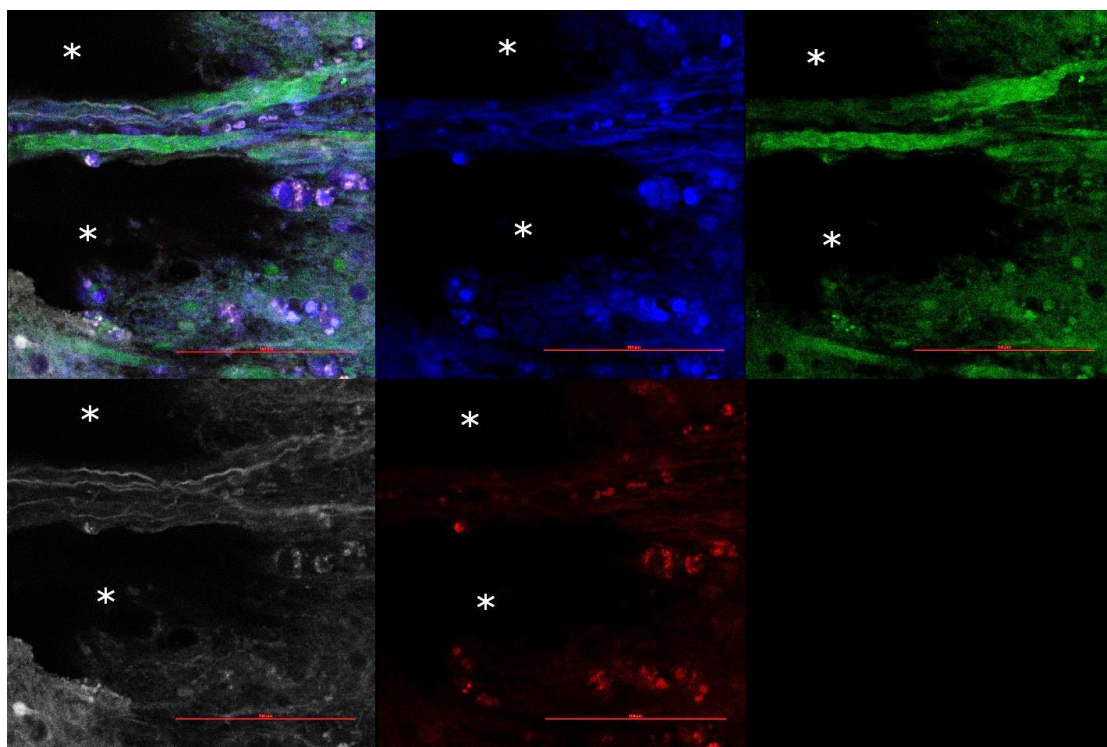


Рисунок 27 – Иммуногистохимическое окрашивание среза СМ после трансплантации фибринового гидрогеля 4 мг/мл с мечеными РКН26 ОК. MPZ - зелёный, 3-β-tubulin - белый, DAPI - синий, РКН26 - красный; * указывает на просвет кисты спинного мозга. Размерный отрезок 100 мкм

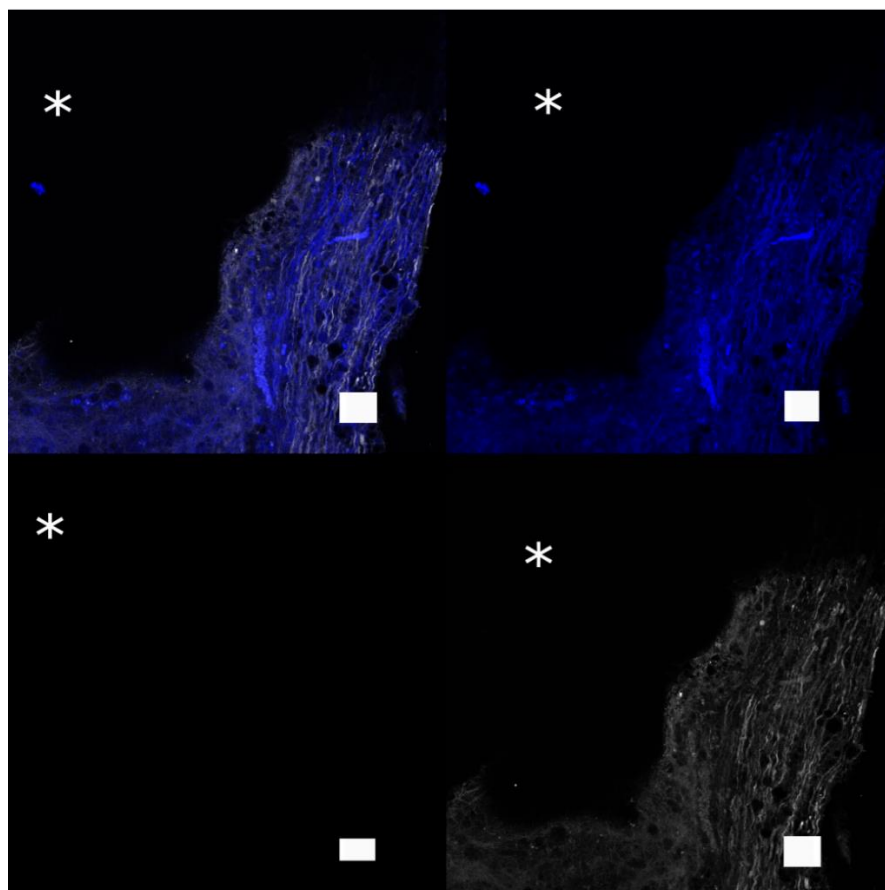


Рисунок 28 – Иммуногистохимическое окрашивание среза СМ после трансплантации фибринового гидрогеля 4 мг/мл. MPZ - зелёный, 3-β-tubulin - белый, DAPI - синий; * указывает на просвет кисты спинного мозга. Размерный отрезок 50 мкм

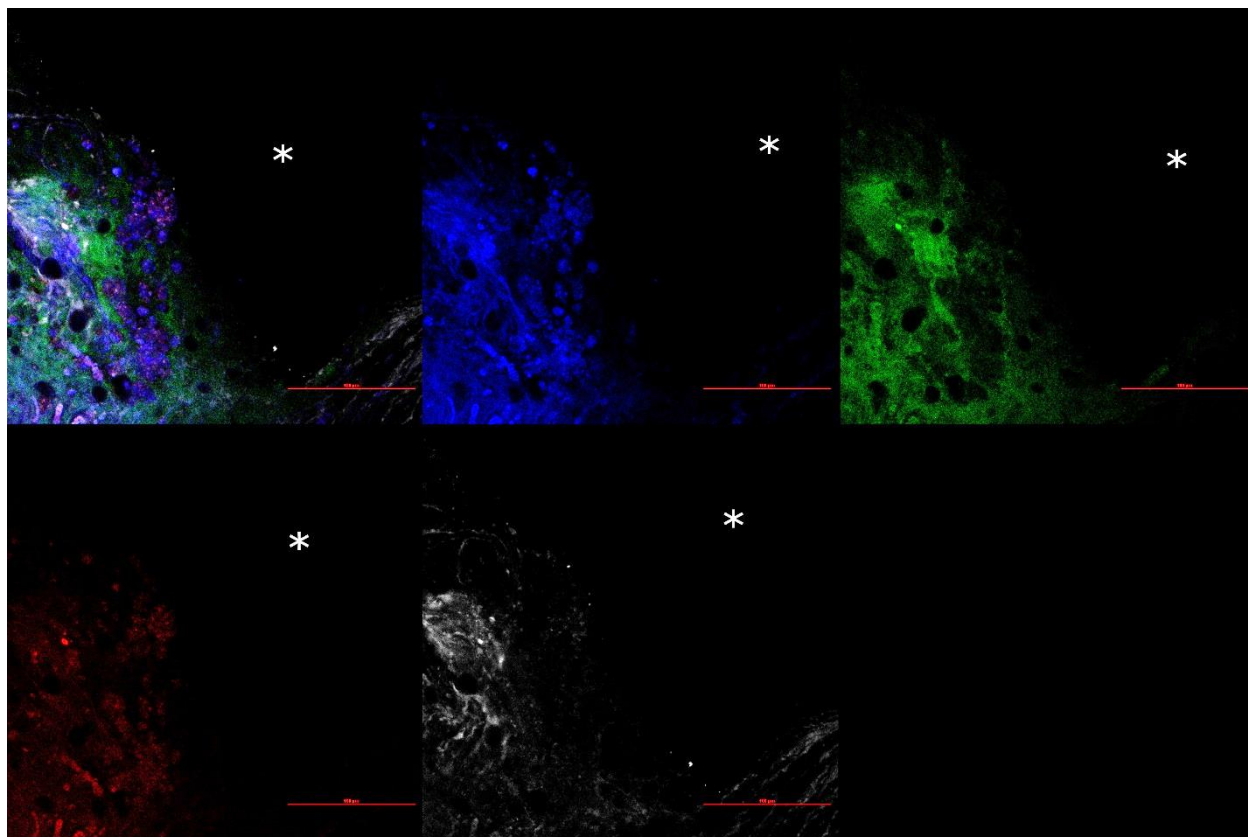


Рисунок 29 – Иммуногистохимическое окрашивание среза СМ после трансплантации фибринового гидрогеля 10 мг/мл с мечеными РКН26 ОК. MPZ - зелёный, 3-β-tubulin - белый, DAPI - синий, РКН26 - красный; * указывает на просвет кисты спинного мозга. Размерный отрезок 100 мкм

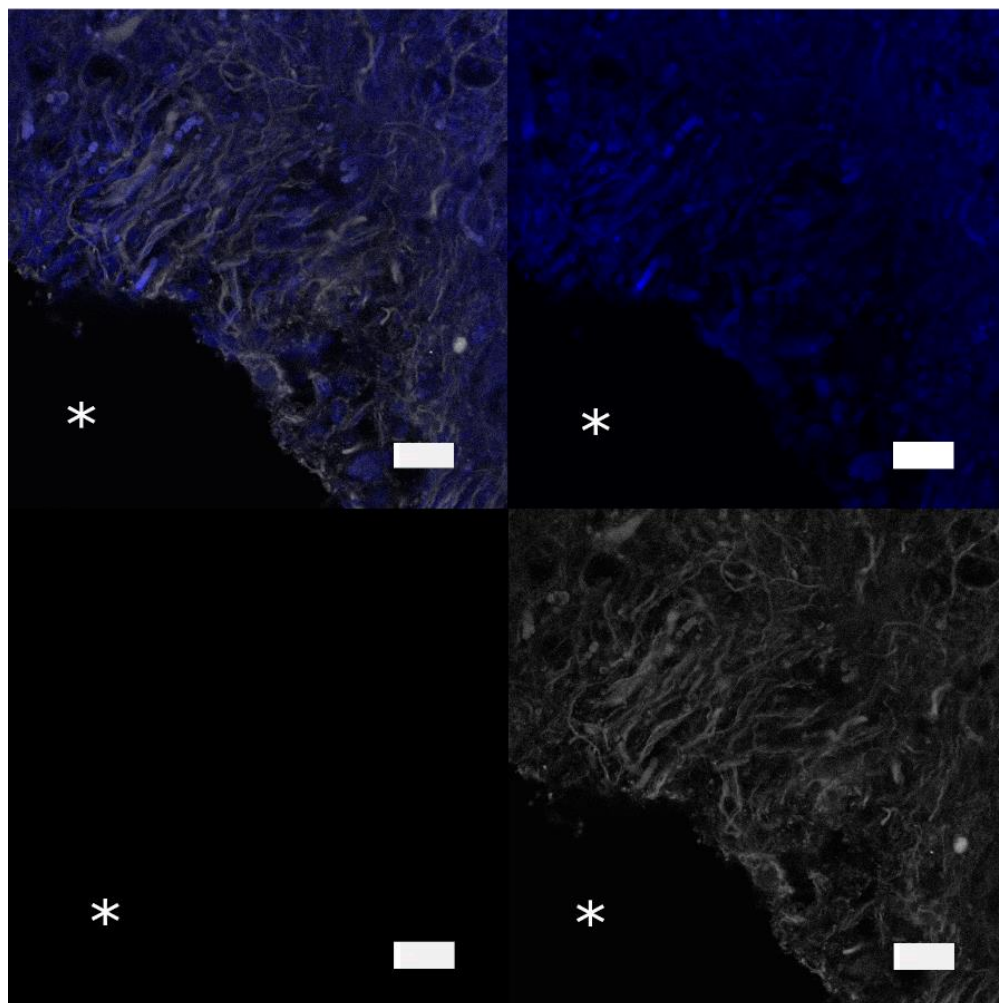


Рисунок 30 – Иммуногистохимическое окрашивание среза СМ после трансплантации фибринового гидрогеля 10 мг. MPZ - зелёный, 3-β-tubulin - белый, DAPI - синий; * указывает на просвет кисты спинного мозга. Размерный отрезок 50 мкм

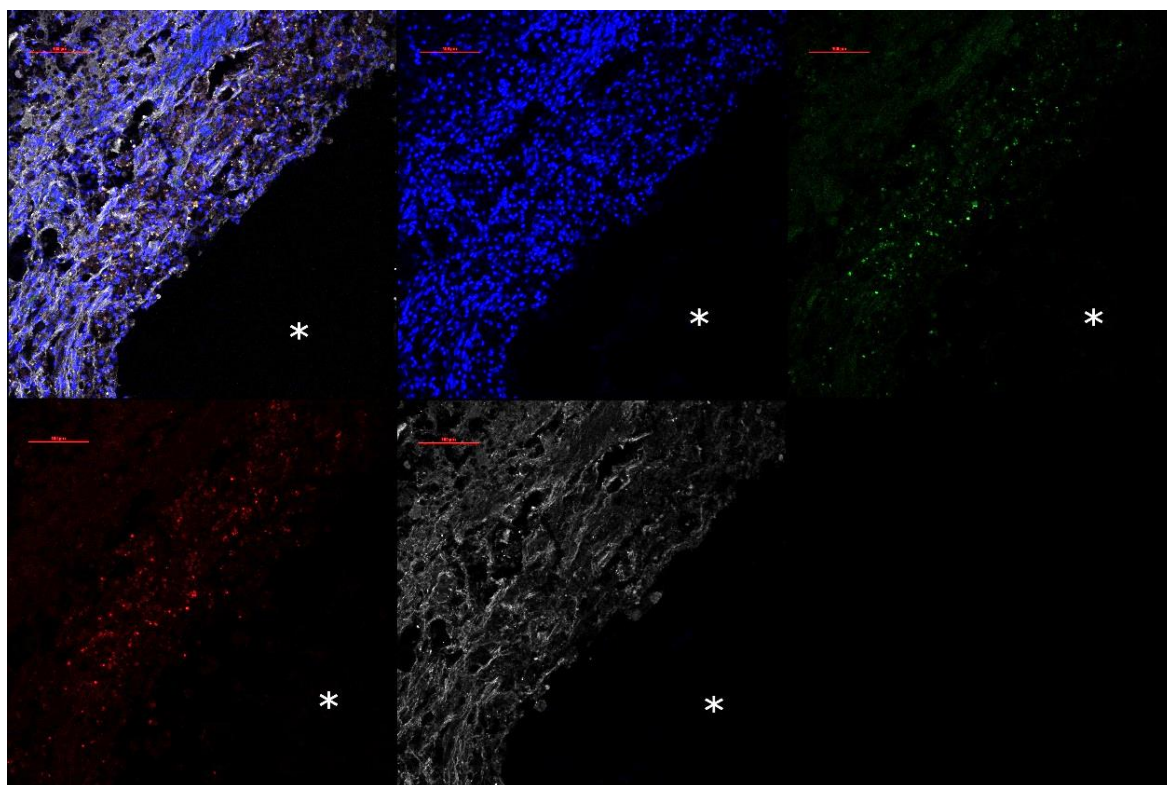


Рисунок 31 – Иммуногистохимическое окрашивание среза СМ после трансплантации препарата фибрин 10 мг/мл + ГК 1 мг/мл + желатин 5 мг/мл + $1 \cdot 10^6$ ОК крысы меченные РКН26. MPZ - зелёный, 3-β-tubulin - белый, DAPI - синий, РКН26 - красный; * указывает на просвет кисты спинного мозга.

Размерный отрезок 100 мкм

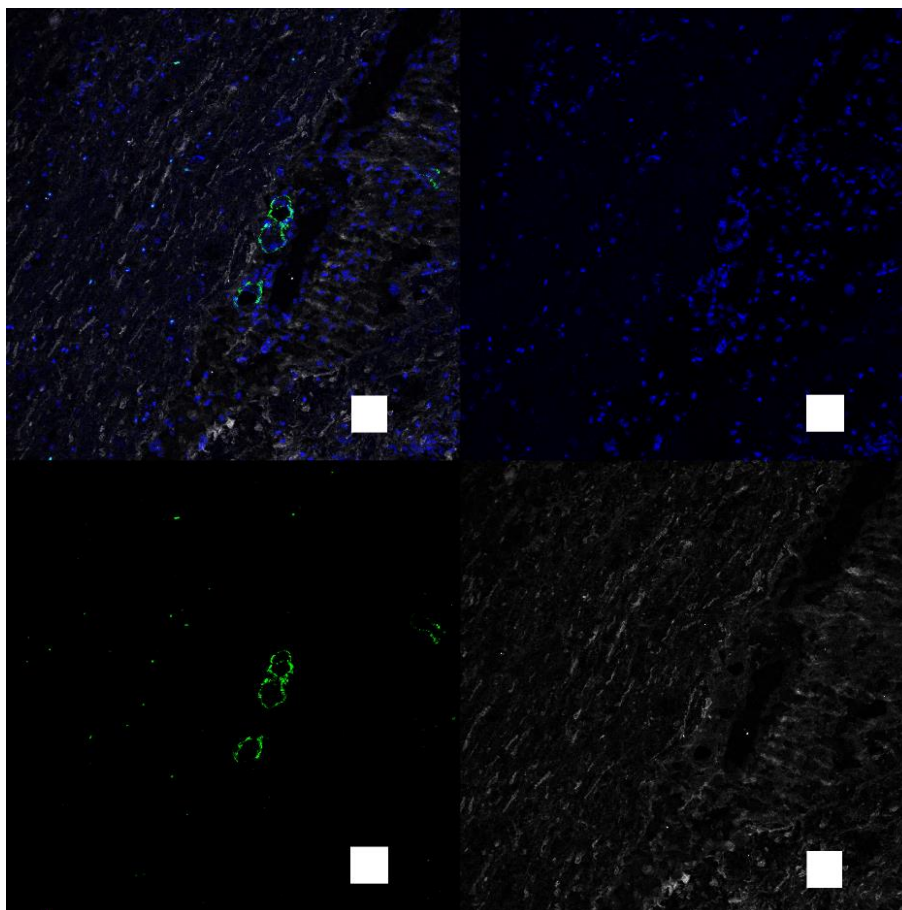


Рисунок 32 – Иммуногистохимическое окрашивание среза СМ после трансплантации препарата фибрин 10 мг/мл + ГК 1 мг/мл + желатин 5 мг/мл. MPZ - зелёный, 3-β-tubulin - белый, DAPI - синий, PKH26 - красный; Размерный отрезок 50 мкм

Было показано, что меченые мембранным красителем PKH26 клетки выявляются в образцах, это говорит о том, что клетки способны мигрировать в окружающие ткани из зоны введения. Также обнаруживается MPZ, примечательно, что наблюдается распределение клеток в зонах с новым миелином. Также в ряде образцов обнаруживается белок микротрубочек бета-III тубулин, характерный для нервных клеток. В ряде случаев данный белок обнаруживается рядом со скоплением клеток.

Также выживаемость клеток оценивалась методом TUNEL-теста: клетки с двухцепочечными разрывами ДНК с образованием свободных 3'-ОН концов, после маркирования дают свечение в красном канале (Рисунок 33).

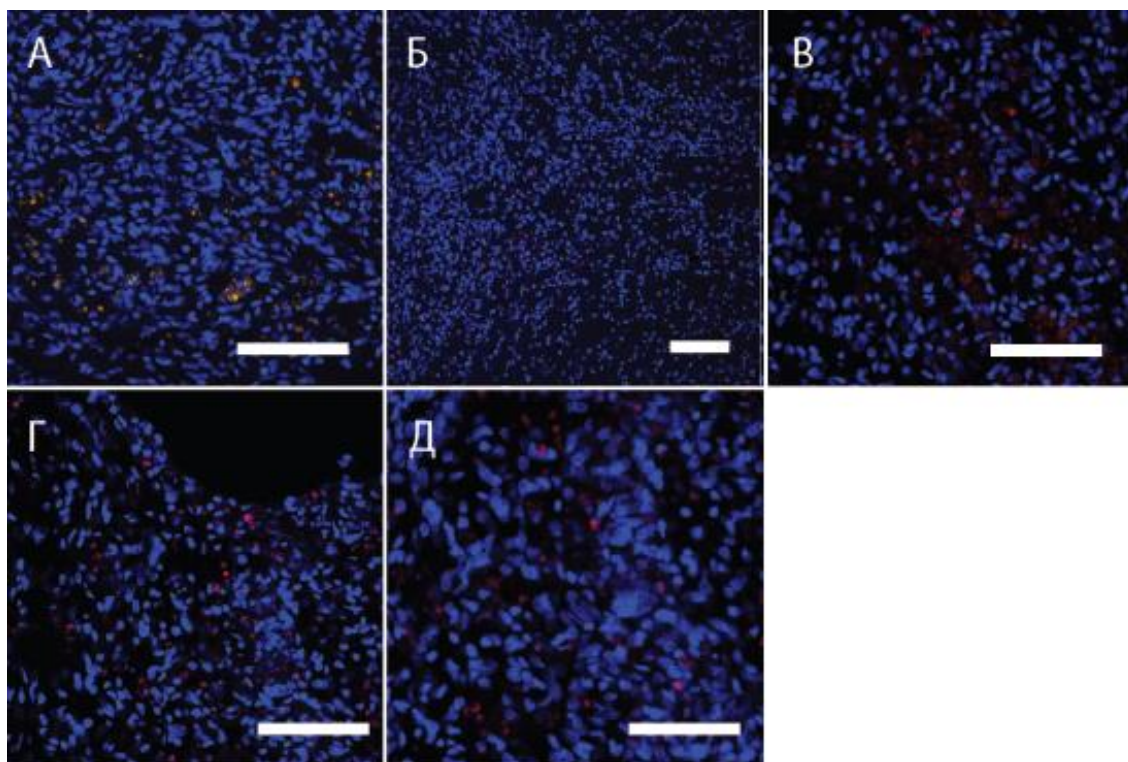


Рисунок 33 – Иммуногистохимическое окрашивание среза СМ после трансплантации гидрогелей. TUNEL assay. Синий - окрашивание ядер DAPI, Зеленый- окрашивание двухнитевые разрывы в клетке, красный – меченные PKH26 ОК крысы. А - коллаген 1 мг/мл Б - коллаген 4 мг/мл В - фибриновый гидрогель 4 мг/мл Г - фибриновый гидрогель 10 мг/мл Д – комбинированный гидрогель. Размерный отрезок 100 мкм

Анализ гистологических срезов показал, что максимальная частота случаев колокализации меток красного и зеленого цвета характерна для образцов, содержащих коллагеновый гидрогель с концентрацией 1 мг/мл. В образцах с иными гидрогелями подобные наблюдения носят единичный характер.

3.9. Оценка динамики восстановления двигательной активности задних конечностей при трансплантации биоинженерных препаратов на основе пластин нановолокна ПВС

При оценке динамики восстановления моторной активности задних конечностей было показано, что используемые биоинженерные препараты на основе пластин нановолокна ПВС не оказывают токсического эффекта на организм, что выражено в сохранении моторной активности в группе без травмы (контроль токсичности). Также было продемонстрировано, что наибольший балл моторной активности продемонстрировал препарат на основе пластины из нановолокна с ОК и печатной подложкой. Данный препарат не только статистически значимо отличается по баллу моторной активности от группы клеток, трансплантированных в зону острой травмы, но и от группы без терапии ($p < 0,005$). Также препарат на основе нановолокна с ОК и подложкой превосходит в моторной активности группу, в которой нановолокно применялось без плотной подложки ($p < 0,005$) (Таблица 17, Рисунок 34).

Таблица 17 – Динамика восстановления моторной функции задних конечностей крыс в течение 35 суток после трансплантации биоинженерного конструкта на основе нановолоконных пластин из ПВС при острой травме спинного мозга. Статистика: двухфакторный дисперсионный анализ с критерием Тьюки. Данные приведены в виде значений ВВВ. СО – стандартное отклонение.

Сутки	Пластина электроспиннигованного ПВС + подложка ПВС (n=7)		Контроль токсичности (n=7)		Пластина электроспиннигованного ПВС (n=7)		Пластина электроспиннигованного ПВС + подложка + 7*10 ⁵ ОК		Пластина электроспиннигованного ПВС 7*10 ⁵ ОК крысы (n=6)		Контроль травмы (n=7)	
	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО
0	21,00	0,00	21,00	0,00	21,00	0,00	21,00	0,00	21,00	0,00	21,00	0,00
1	0,00	0,00	21,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	21,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	21,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	1,07	0,00	0,00
6	2,50	1,50	21,00	0,00	3,07	2,75	4,57	3,21	2,25	1,49	2,43	1,13
9	6,86	2,12	21,00	0,00	5,57	2,99	6,71	3,59	3,88	2,23	5,14	1,86
13	7,71	3,82	21,00	0,00	7,86	1,95	8,14	4,49	5,63	3,07	7,71	2,14
20	10,00	1,15	21,00	0,00	8,64	2,06	9,86	3,57	8,19	1,53	9,79	1,63
27	10,07	0,93	21,00	0,00	9,29	1,41	10,86	2,54	8,25	0,46	10,29	1,50
35	10,64	1,03	21,00	0,00	9,57	1,72	12,86	0,94	9,31	1,03	10,21	1,29

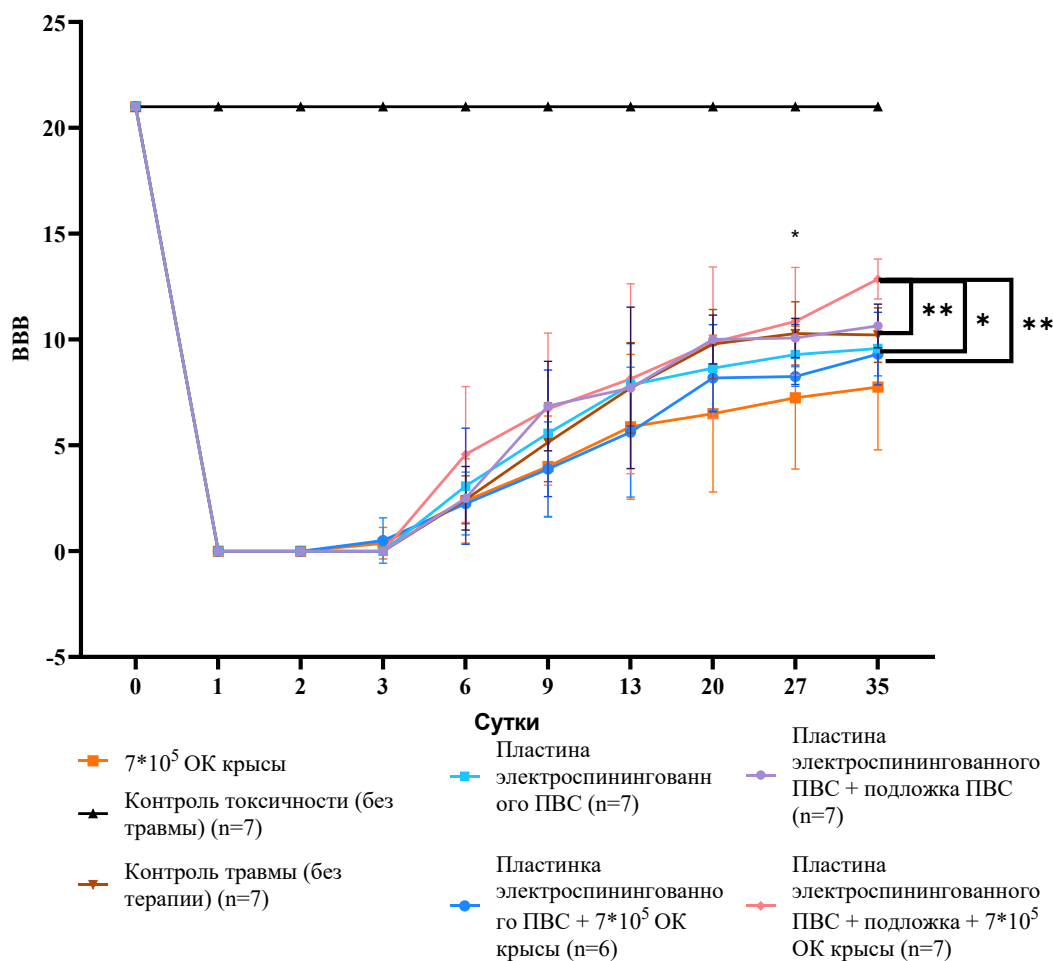


Рисунок 34 – Динамика восстановления двигательной функции задних конечностей крыс после трансплантации биоинженерных препаратов, включающих нановолоконные пластины ПВС и ОК крысы, в зону острого повреждения спинного мозга, представленная в баллах шкалы BBB. На графике приведены средние значения $\pm$ стандартное отклонение. Значимость различий определяли методом двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки. *($p < 0,05$), **($p < 0,005$)

Для дальнейшего изучения эффектов нейротрофина, исходя из полученных ранее данных, был выбран конструкт на основе пластин нановолокна ПВС с плотной подложкой с добавлением 500 нг BDNF. Установлено, что включение нейротрофина в состав препарата положительно сказывается на восстановлении двигательной активности задних конечностей животных.

Установлено, что по показателям моторной активности конструктор, содержащий клетки в сочетании с BDNF, не отличается от конструкторов без нейротрофина и клеточного компонента. Кроме того, продемонстрировано, что группа, получавшая клетки в составе нановолокна, превосходит по баллам моторной активности как группу с прямой трансплантацией клеток в зону острой травмы ($p < 0,005$), так и группу с прямым введением клеток совместно с нейротрофином ($p < 0,0001$). Примечательно также, что положительный эффект в группах с клетками и нейротрофином в составе нановолокна проявляется уже на 3-и сутки после травмы — в отличие от группы, где клетки трансплантировали напрямую ($p < 0,005$) (Таблица 18, Рисунок 35).

Таблица 17 – Динамика восстановления двигательной функции задних конечностей крыс на протяжении 35 суток после трансплантации биоинженерного конструктора на основе нановолоконных пластин ПВС с добавлением BDNF в острой фазе травмы спинного мозга, отражённая через изменение баллов моторной активности по шкале BBB. Сравнение с контрольной группой выполнено с применением двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Тьюки. Данные приведены в виде значений BBB. СО – стандартное отклонение

Сутки	Пластина электроспинингованного ПВС + подложка ПВС (n=7)		7*10 ⁵ ОК крысы (n=9)		7*10 ⁵ ОК крысы + 500 нг BDNF (n=9)		Пластина электроспинингованного ПВС + подложка + 1 мкг BDNF (n=5)		Пластина электроспинингованного ПВС + подложка + 7*10 ⁵ ОК крысы (n=7)		Спининг + подложка + 7*10 ⁵ ОК крысы + 1 мкг BDNF (n=10)	
	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО
0	21,00	0,00	21,00	0,00	21,00	0,00	21,00	0,00	21,00	0,00	21,00	0,00
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,82	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,38	0,74	1,33	1,97	0,00	0,00	0,00	0,00	1,60	1,43
6	2,50	1,50	2,38	2,00	3,00	3,10	4,60	2,79	4,57	3,21	5,10	1,73
9	6,86	2,12	4,00	2,39	4,83	2,79	6,60	2,97	6,71	3,59	10,00	3,12
13	7,71	3,82	5,88	3,42	6,17	2,79	10,30	2,22	8,14	4,49	11,40	1,79
20	10,00	1,15	6,50	3,70	8,17	1,94	10,20	2,02	9,86	3,57	12,30	1,89
27	10,07	0,93	7,25	3,37	8,17	1,60	10,80	2,28	10,86	2,54	13,10	1,79
35	10,64	1,03	7,75	2,96	8,50	0,84	12,20	1,79	12,86	0,94	13,70	1,49

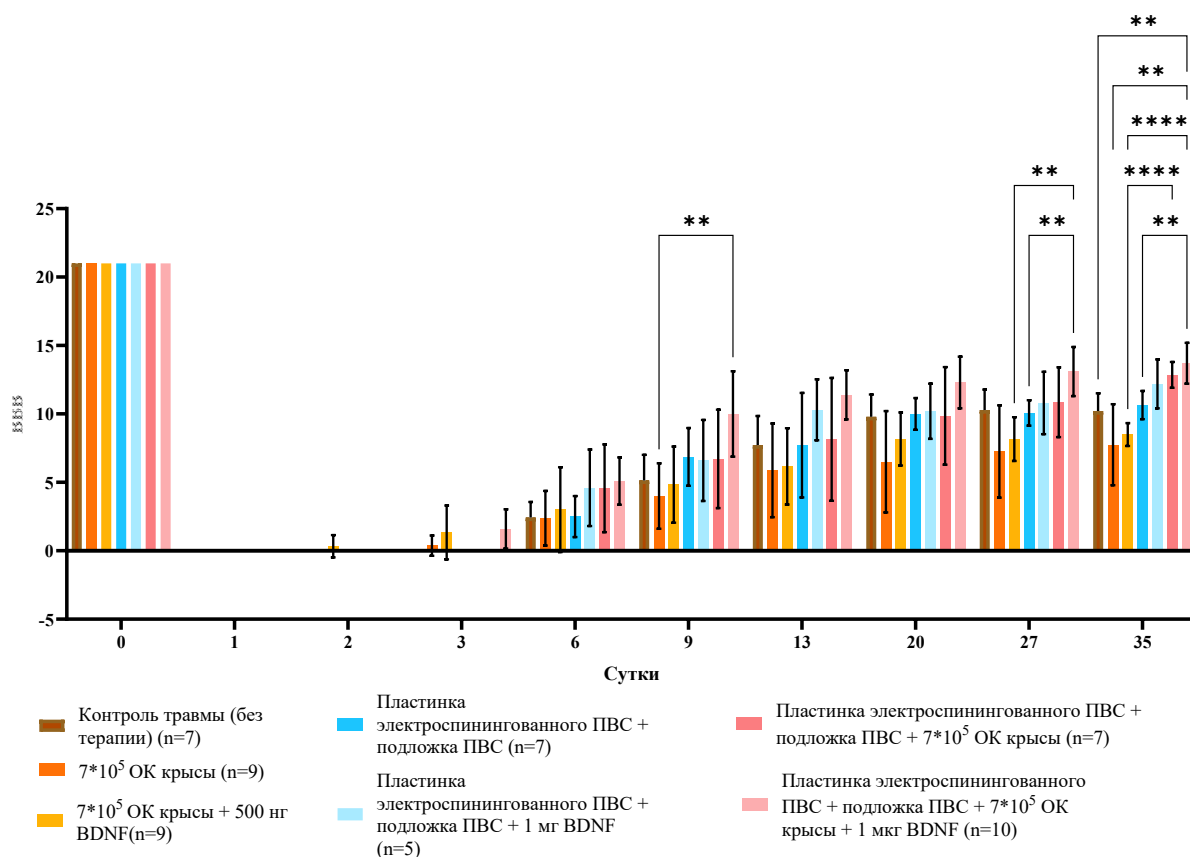


Рисунок 35 – График отражает динамику восстановления двигательной функции задних конечностей крыс после трансплантации биоинженерных препаратов на основе нановолоконных пластин ПВС, ОК крысы и нейротрофина при травме спинного мозга, оценённую в баллах шкалы BBB. Указаны средние значения $\pm$ стандартное отклонение. Для оценки статистической значимости различий использовали двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным критерием Тьюки. ** ($p < 0,005$), *** ($p < 0,0005$), **** ($p < 0,0001$)

Таким образом, добавление нейротрофина статистически незначимо улучшает динамику восстановления моторной активности задних конечностей.

3.10. Изучение выживаемости клеток в составе биоинженерных препаратов на основе пластин нановолокна ПВС в зоне хронической травмы спинного мозга

В ходе данного исследования была изучена способность клеток выживать после трансплантации в составе пластины. Меченые РКН26 клетки мигрировали в направлении зоны травмы (Рисунок 36–37).

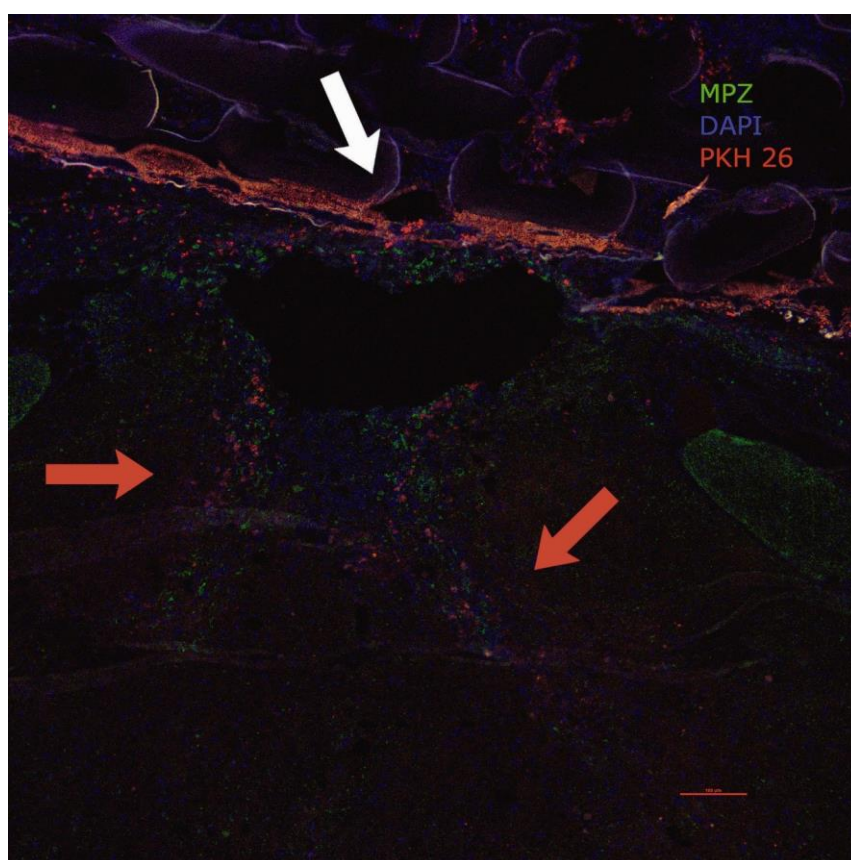


Рисунок 36 – Иммуногистохимический анализ образца спинного мозга через 5 недель после трансплантации. Синий цвет – DAPI, зелёным – MPZ, красным – РКН26-меченые ОК. Белой стрелкой обозначена пластина нановолокна ПВС, красной стрелкой – миграция меченых ОК. Масштабная линейка – 100 мкм

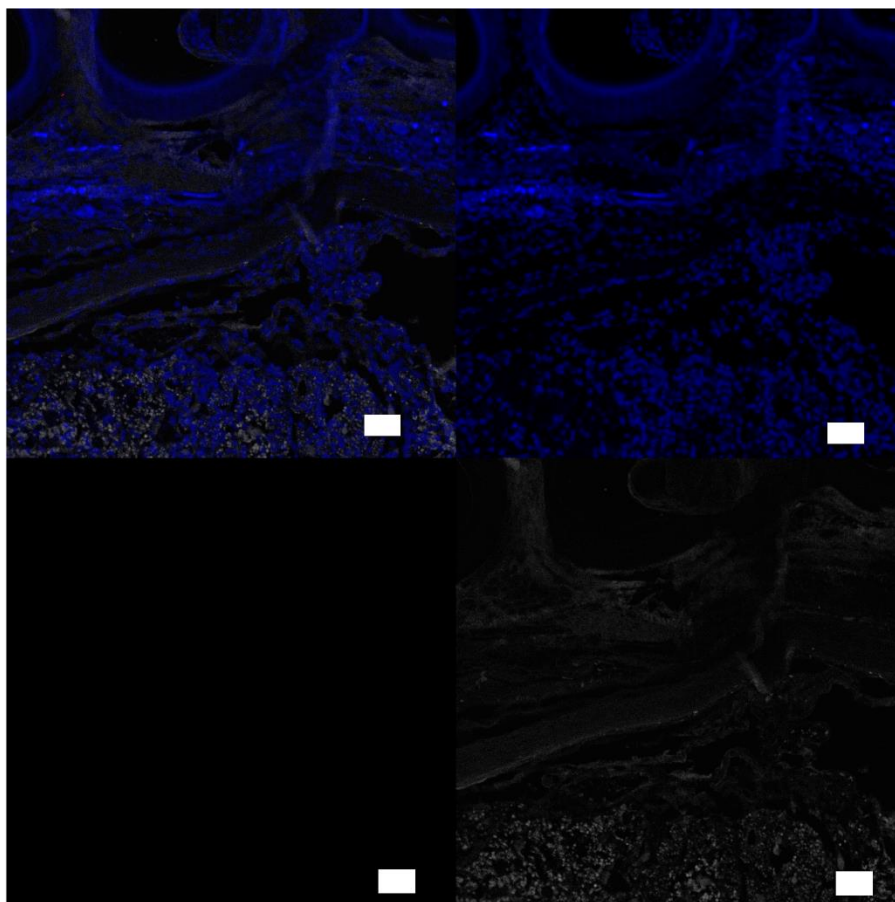


Рисунок 37 – Иммуногистохимический анализ образца спинного мозга через 5 недель после трансплантации. Синий цвет – DAPI, белый цвет – β -III-тубулин, зеленый цвет – MPZ. Масштабная линейка — 50 мкм

Методом TUNEL исследования было изучено выживание клеток, трансплантированных в пластине из нановолокна (Рисунок 38). Это позволяет сделать суждение о том, что ОК выживают за счет изоляции от зоны травмы в пластине.

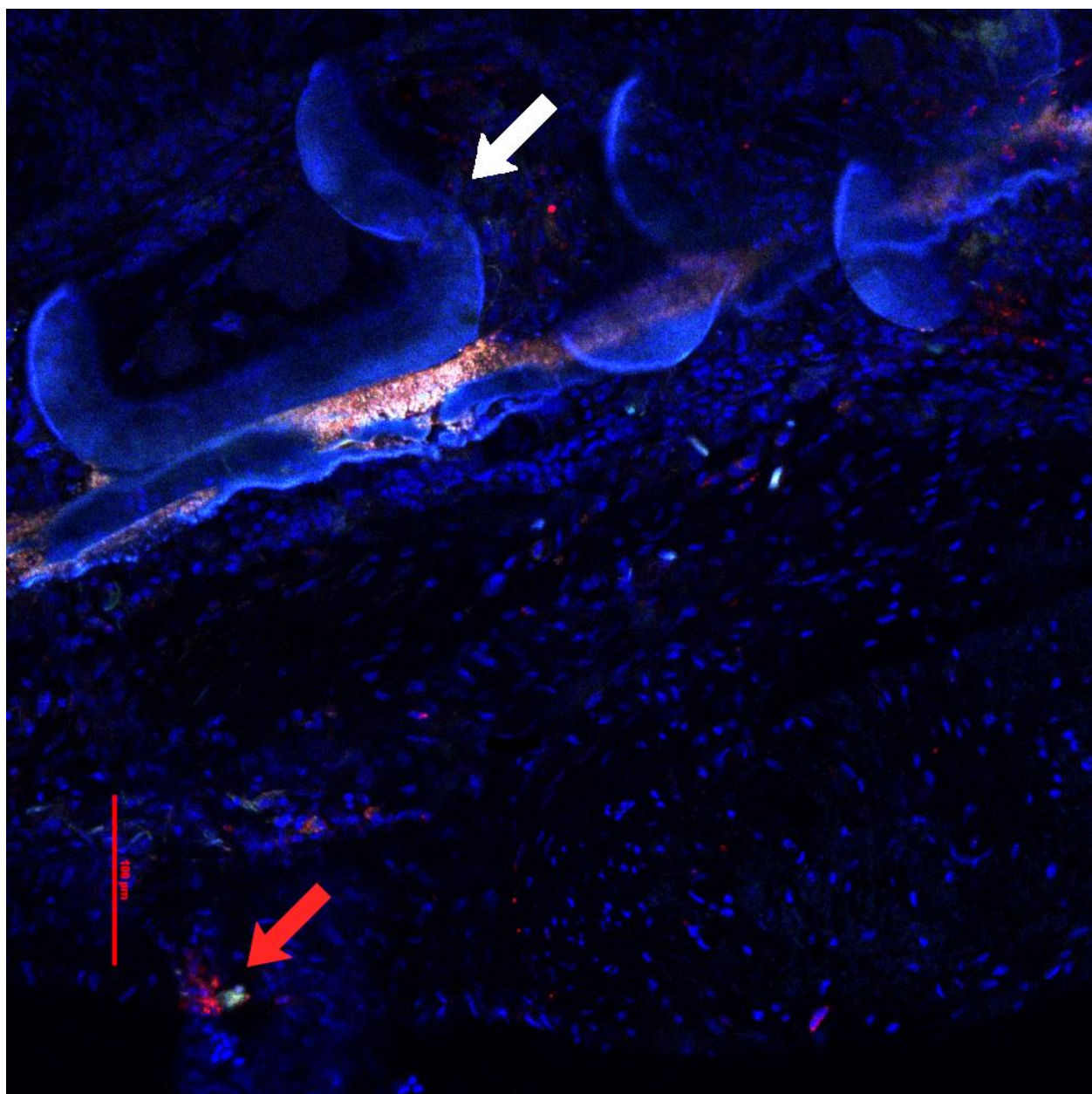


Рисунок 38 – Иммуногистохимическое окрашивание среза СМ после трансплантации пластин из нановолокна ПВС. TUNEL assay. Синий - окрашивание ядер DAPI, Зеленый- окрашивание двухнитевые разрывы ДНК в клетке, красный – меченные PKH26 ОК крысы. Белая стрелка – фрагменты твердой подложки, красная стрелка – крупная группа мигрировавших в ткань клеток. Размерный отрезок 100 мкм

Также было проведено TUNEL исследование с группой, которой проводили трансплантацию клеток напрямую в зону травмы спинного мозга. В результате окрашивания была обнаружена колокализация сигналов от

окрашенных двухнитевых разрывов ДНК и меченных РКН26 мембран. Это позволяет сделать суждение о том, что ОК не выживают в зоне травмы при прямой трансплантации в зону острой травмы (Рисунок 39).

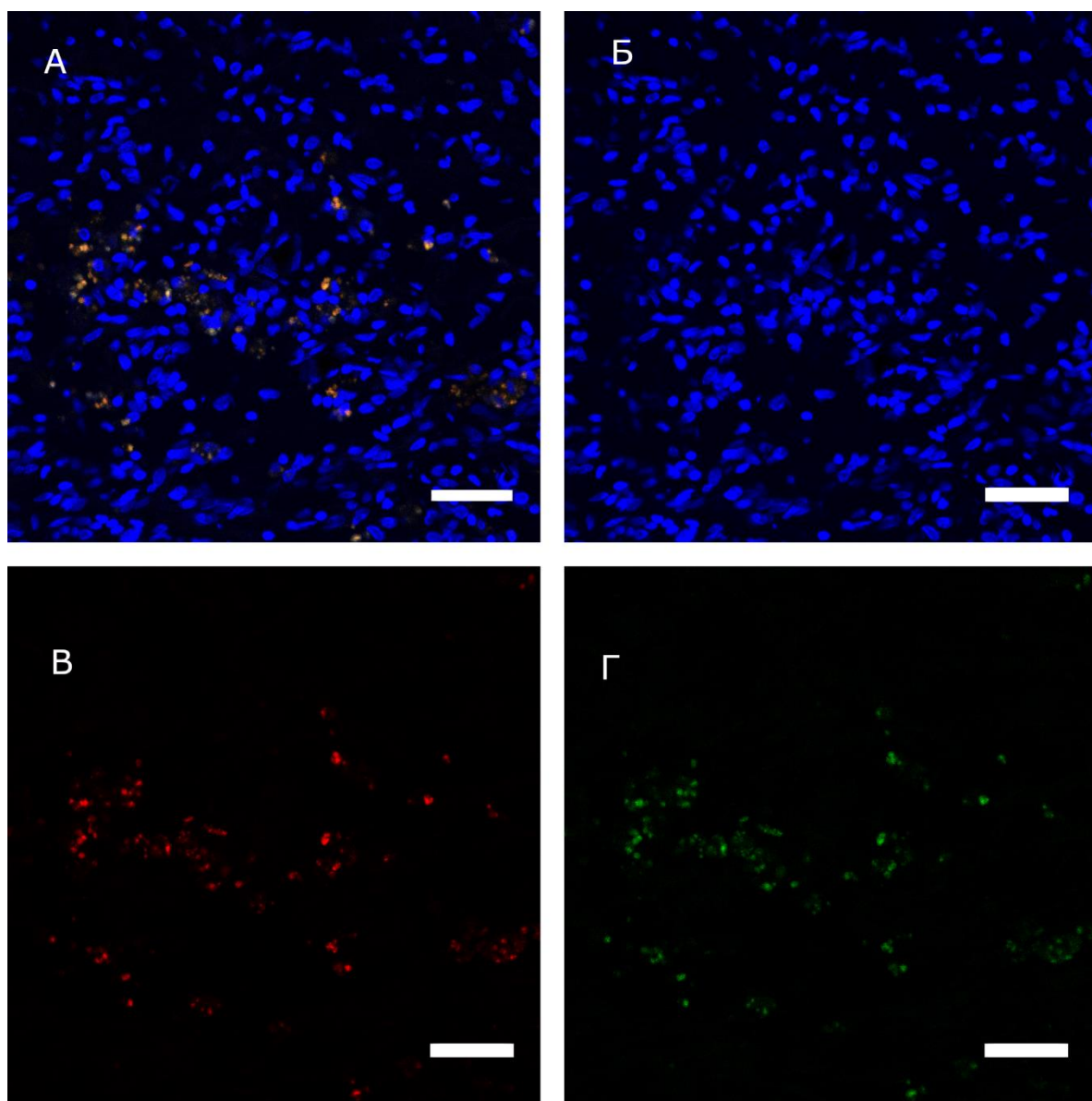


Рисунок 39 – Иммуногистохимическое окрашивание среза СМ после трансплантации ОК в зону острой травмы. TUNEL assay. Б - окрашивание ядер DAPI, В – меченные РКН26 ОК крысы, Г- окрашивание двухнитевые разрывы ДНК в клетке. Размерный отрезок 100 мкм

Таким образом, клетки, трансплантированные в пластине, выживают в острой фазе травмы, и способны мигрировать и выживать спустя 30 суток.

3.11. Изучение влияния препарата на ремиелинизацию методом ПЦР

В рамках исследования было изучено влияние биоинженерных конструкций на ремиелинизацию аксонов в зоне хронической травмы спинного мозга посредством оценки уровня экспрессии основной белка нулевого миелина (MPZ).

Было показано, что все исследованные группы с биоинженерными конструктами статистически значимо превосходят контрольную группу по уровню экспрессии гена *MPZ*, ассоциированного с новообразованным миелином. А именно комбинированный гель ($p < 0,005$), комбинированный гель с клетками ($p < 0,0005$) и фибриновый гидрогель ($p < 0,0005$). Также группы с композитным гелем и фибриновым гидрогелем значимо превосходят группу с клетками без геля ($p < 0,05$) (Таблица 19, Рисунок 40).

Таблица 18 – Результаты ПЦР в реальном времени. CO - среднееквадратическое отклонение. Ген «домашнего хозяйства» - S18

Группа	Отношение экспрессии к гену «домашнего хозяйства». Среднее	CO	Размер группы
Интактные животные	0,0023	0,0006	5
7,5*10 ⁵ ОК крысы	0,0015	0,0006	5
DMEM:F12	0,0014	0,0009	5
Фибрин 10 мг/мл + ГК 1 мг/мл + желатин 5 мг/мл	0,0033	0,0010	5

Продолжение таблицы 19

Группа	Отношение экспрессии к гену «домашнего хозяйства». Среднее	СО	Размер группы
Фибрин 10 мг/мл + ГК 1 мг/мл + желатин 5 мг/мл + 1*10 ⁶ ОК крысы	0,0035	0,0013	5
Фибрин 10мг/мл + 1*10 ⁶ ОК крысы	0,0037	0,0006	5
Фибрин 10мг/мл	0,0026	0,0011	5

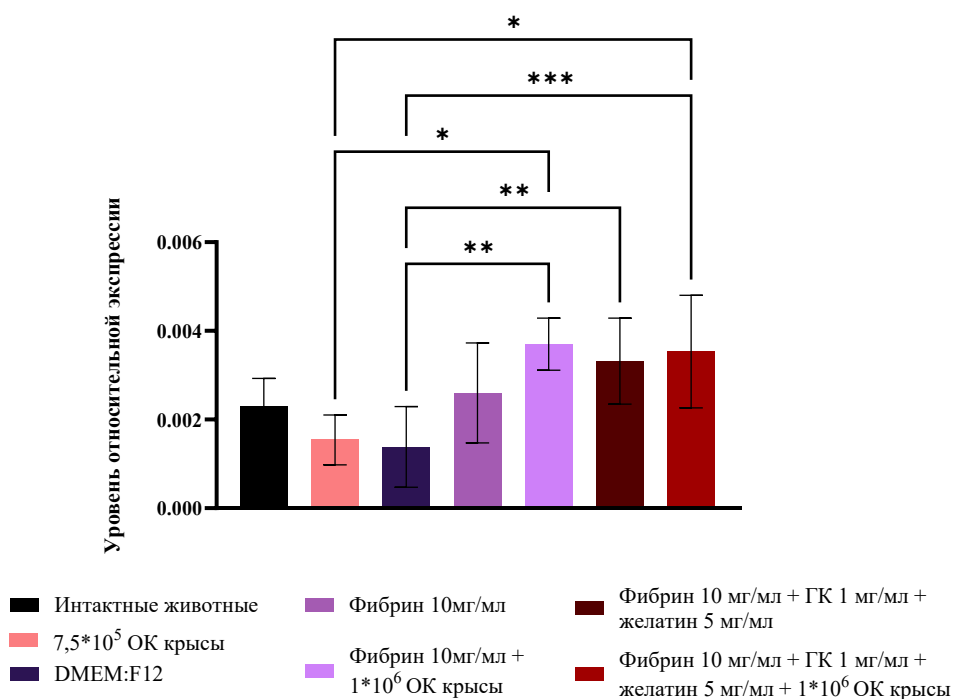


Рисунок 40 – Изменение уровня относительной экспрессии гена MRZ. ПЦР в
рольном времени. На графике указаны средние значения $\pm$
среднеквадратическое отклонение. значимость различий оценивали с
использованием однофакторного дисперсного анализа, апостериорный тест
Холма — Сидака. *(p < 0,05), **(p < 0,005), ***(p < 0,0005). Размер выборки всех
групп 5

Также в рамках данного исследования было изучено влияние на ремиелинизацию после хронической травмы спинного мозга добавления BDNF.

Так, было показано, что группы с биоинженерной конструкцией с добавлением нейротрофина статистически значимо превосходят контрольную группу по уровню экспрессии гена, ассоциированного с новообразованным миелином. А именно комбинированный гель против группы контроля ($p < 0,0001$) и фибриновый гель против группы контроля ($p < 0,0001$). Также исследованные конструкторы превосходят в ремиелинизации группу с клетками без гидрогеля ($p < 0,005$) (Таблица 20, Рисунок 41).

Таблица 19 – Результаты ПЦР в реальном времени. СО - среднееквадратическое отклонение. Ген «домашнего хозяйства» - S18

Группа	Отношение экспрессии к гену «домашнего хозяйства». Среднее	СО	Размер группы
Интактные животные	0,0023	0,0006	5
7,5*10 ⁵ ОК крысы	0,0015	0,0006	5
DMEM:F12	0,0014	0,0009	5
Фибрин 10 мг/мл + ГК 1 мг/мл + желатин 5 мг/мл + 1*10 ⁶ ОК крысы	0,0035	0,0013	5
Фибрин 10мг/мл + 1*10 ⁶ ОК крысы	0,0037	0,0006	5

Группа	Отношение экспрессии к гену «домашнего хозяйства». Среднее	СО	Размер группы
Фибрин 10 мг/мл + ГК 1 мг/мл + желатин 5 мг/мл + $1 \cdot 10^6$ ОК крысы + 500 нг BDNF	0,0038	0,0010	5
Фибрин 10мг/мл + $1 \cdot 10^6$ ОК крысы + 500 нг BDNF	0,0043	0,0006	5

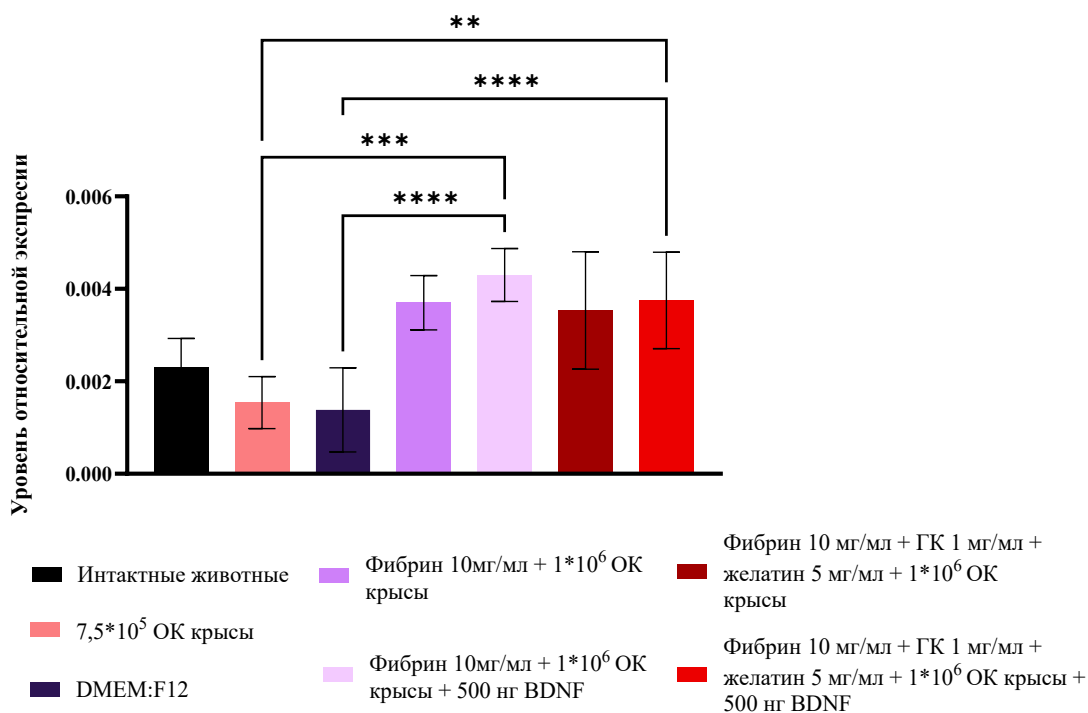


Рисунок 41 – Изменение уровня относительной экспрессии гена MPZ. ПЦР в реальном времени. На графике указаны средние значения $\pm$ среднеквадратическое отклонение. значимость различий оценивали с использованием однофакторного дисперсного анализа, апостериорный тест Холма — Сидака. **($p < 0,005$), ***($p < 0,0005$), ****($p < 0,0001$). Размер выборки всех групп 5

Таким образом, использование гидрогеля существенно и значимо увеличивает уровень экспрессии гена (*MPZ*) по сравнению с группами контроля и клеток без конструкторов. Однако добавление в состав гидрогеля BDNF не показало статистически значимых улучшений по сравнению с препаратом без нейротрофина.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ данных литературы показал, что существующие на сегодняшний день методы терапии травм спинного мозга остаются малоэффективными. Перспективным методом лечения является применение биоинженерных препаратов на основе гидрогелей и трехмерной печати. За прошедшие годы биоинженерный подход позволил разработать эффективную терапию при таких патологиях, как раневые поражения кожи и костные дефекты [91]. Однако, эти решения не были использованы для терапии ТСМ, в частности, такие препараты не изучены при посттравматических кистах спинного мозга и острой фазе повреждения после травмы спинного мозга.

Перспективно создание биоинженерных препаратов, состоящих из конструкта с клетками и нейротрофином [3, 152, 288, 298]. Эти подходы существенно увеличивают терапевтическую эффективность клеточного трансплантата [32, 161, 230, 279]. Немаловажно отдавать предпочтение скаффолдам на основе материалов, которые не только безопасны, но и допустимы к применению в клинической практике. Однако то, какой тип клеток и тип материалов для разработки таких конструктов выбрать, является актуальным вопросом.

В данной работе был применен один из распространенных материалов для формирования гидрогелей коллаген 1 типа. Данный полимер легко получать, он биосовместим и обладает предсказуемой полимеризацией. Нами было показано, что несмотря на широкое применение данного гидрогеля, он мало подходит для терапии в составе биоинженерного препарата на основе ОК. Отмечается их низкая жизнеспособность и пролиферация. Ранее проведенные исследования на собаках показали, что трансплантация инкапсулированных аутологичных трансдуцированных клеток обонятельной выстилки в коллагеновой капсуле показала свою безопасность. Однако неоднородность клеточного компонента и небольшой размер группы не позволили исследователям сделать однозначные

выводы об эффективности [194]. В данной работе мы решили, что помимо широко распространённого коллагенового гидрогеля, для сборки биоинженерных продуктов нами также будет использоваться фибриновый гидрогель и комбинированный гель из фибрина, гиалуроновой кислоты и желатина.

В качестве клеточного компонента целесообразно применять аутологичные клетки, характеризующиеся доступностью получения и безопасностью использования. Не менее важным критерием является способность таких клеток содействовать восстановлению функций нервной системы. К числу подобных клеток относятся ОК, выделяемые из обонятельной выстилки носа: их эффективность подтверждена в экспериментальных моделях, а безопасность применения в ряде клинических исследований [46, 162, 251]. Установлено, что данные клетки не только способствуют восстановлению моторной функции, но и принимают участие в процессах ремиелинизации и ремоделирования внеклеточного матрикса. В связи с этим при разработке новых биоинженерных препаратов для терапии ТСМ в качестве клеточного компонента был выбран именно этот тип клеток. Одной из ключевых проблем регенеративной медицины ЦНС остаётся низкая выживаемость клеток в зоне трансплантации, особенно в условиях выраженной цитотоксичности, характерной, в частности, для острой фазы после травмы спинного мозга.

В целях разработки наиболее эффективного биомедицинского препарата полученные конструкторы были исследованы *in vitro* в тестах с резазурином для оценки жизнеспособности и пролиферативной активности клеток. При оценке клеток в коллагеновом гидрогеле с концентрациями 1 мг/мл и 4 мг/мл было показано постепенное снижение ферментативной активности на протяжении всего времени наблюдения, что трактуется как гибель клеток [260]. В препаратах с добавлением фибринового гидрогеля с концентрацией 4 мг/мл было показано, что ОК не теряют активности. При увеличении концентрации до 10 мг/мл отмечается увеличение ферментативной активности, это, напротив, можно

трактовать как увеличение численности клеток. В комбинированном гидрогеле также демонстрируется постепенный рост числа клеток на всем времени наблюдения.

Таким образом, в терапии кисты спинного мозга наиболее перспективно применение биоинженерного препарата с добавлением фибринового гидрогеля с концентрацией 10 мг/мл и комбинированного гидрогеля.

Причиной гибели клеток в коллагеновом гидрогеле может выступать несколько факторов. В первую очередь ОК из обонятельной выстилки может не подходить гидрогель из коллагена 1 типа, поскольку помимо коллагена 1 типа в собственной пластинке присутствует также коллаген 3 и 4 типа [14]. Вопрос выживания ОК обонятельной выстилки в коллагеновых гидрогелях является мало изученным. Помимо этого, в литературе отмечается, что кислая среда, необходимая для ингибирования полимеризации коллагена, может пагубно влиять на клетки [240].

Полученные на фибриновом гидрогеле данные косвенно согласуются с результатами, ранее опубликованными Brinkmann et al. В указанной работе авторами продемонстрировано, что включение в фибриновый гидрогель дополнительных связывающих белков, повышающих его плотность, оказывает положительное влияние на выживаемость клеток. Вместе с тем это сопровождается повышением вязкости геля, что затрудняет трансплантацию конструкции с клеточным компонентом [37]. Полимеризация данного белка, в отличие от коллагена, запускается за счет фермента тромбина и ионов кальция. Эти параметры не оказывают влияния на трансплантированные клетки, а сам полимер представляет собой однородную структуру. Также немаловажную роль играет возможность ОК перестраивать внеклеточный матрикс, что предотвращает избыточную плотность геля, что часто выделяется как основной негативный аспект фибринового геля [123, 124].

Наиболее высокий результат был получен при использовании комбинированного геля. В таких гидрогелях клетки выживают не из-за одного

компонента, а потому что фибрин дает адгезивную матрицу, гиалуроновая кислота удерживает воду и замедляет сжатие/распад, а желатин добавляет сайты связывания для прикрепления клеток [201, 294]. Наши результаты подтверждают и ранее опубликованные данные, согласно которым клетки МСК в гидрогеле на основе гиалуроновой кислоты и желатина более успешно выживают при культивировании по сравнению с аналогичной двухмерной культурой [187]. Положительный эффект был обусловлен более выраженной экспрессией генов, отвечающих за пролиферацию и выживание клеток. Применение гидрогелей с гиалуроновой кислотой, являющейся основным компонентом внеклеточного матрикса ЦНС, уменьшало проявления воспалительных процессов и препятствовало образованию фиброзных рубцов, улучшало восстановление проводимости, а также способствовало ангиогенезу после повреждения спинного мозга [131]. Гиалуроновую кислоту часто комбинируют с другими компонентами для создания комплексных гидрогелей, однако гидрогель из гиалуроновой кислоты, желатина и фибрина с клетками обонятельной выстилки при травмах спинного мозга еще не был изучен.

Также в рамках данного исследования мы впервые исследовали, как добавление в состав гидрогелей 500 нг BDNF влияет на ранее показанные результаты. Для характеристики этих препаратов мы методом ИФА подтверждали, что такие конструкторы способны к стабильному высвобождению внесенного нейротрофина. При этом высвобождаемый BDNF был функционально активен, что было показано в тестах с BDNF-зависимой культурой.

В тестах *in vivo* было показано, что после трансплантации препарата, содержащего только ОК, наблюдалось восстановление двигательной активности, что подтверждает существующие данные [238].

В целях улучшения полученного результата в терапии травмы спинного мозга нами были разработаны биоинженерные препараты на основе ОК и гидрогелей, в частности коллагенового, фибринового и комбинированного.

Было показано, что биоинженерный препарат с добавлением коллаген I в концентрации 4 мг/мл при одиночном введении и в комбинации с ОК способствовал восстановлению двигательных функций крыс. При оценке МРТ снимков было показано, что уменьшение объема кисты после трансплантации препарата с ОК без гидрогеля подтверждает терапевтический эффект клеток [261]. Коллаген I в концентрации 4 мг/мл также уменьшал объем кисты. Последующая оценка гистологических образцов показала, что ОК мигрируют в нервную ткань и формируют периферический миелин после трансплантации ОК с коллагеном I, что подтверждает имеющиеся данные о миграции ОК в окружающую поврежденную нервную ткань [261].

С уменьшением концентрации коллагена до 1 мг/мл не наблюдалось улучшения моторной активности, также не наблюдалось и уменьшения объема кист. Более того, при оценке гистологических образцов методом TUNEL было показано, что в образцах с коллагеном 1 мг/мл наблюдается наибольшее количество клеток с двухнитевыми разрывами, что может свидетельствовать о гибели клеток. Комбинация ОК и коллагена I не показала увеличения терапевтической эффективности ОК, что также может объясняться несовместимостью ОК и гидрогеля в роли их носителя.

Несмотря на низкую способность коллагенового гидрогеля поддерживать жизнеспособность ОК наблюдается и терапевтическая эффективность. Возможно, это вызвано тем, что коллаген I типа обеспечивает более полное заполнение областей кисты, создавая механическую поддержку клеток [48]. На гистологических образцах отмечалось формирование нового миелина периферической нервной системы. На формирование периферического миелина влияет в первую очередь клеточный компонент, так как ОК могут сами образовывать миелин и ремиелинизировать аксоны в месте повреждения [70]. А также возможно привлекают резидентные шванновские клетки или их предшественники, которые способны к хемотаксису с помощью цитокинов или факторов роста [175]. Данная экспериментальная работа, отражающая влияние

введения препарата с добавлением коллагена I на двигательную активность крыс посредством теста BBB и влияние на размеры кисты, проведена впервые, и причины различий в эффективности гидрогелей разной плотности не ясны.

Таким образом, гидрогель на основе коллагена 1 типа не является оптимальным носителем при изученных концентрациях для поддержания пролиферации и повышения биологической активности обкладочных клеток.

По результатам *in vivo* тестирования локомоторной функции установлено, что трансплантация ОК в составе фибринового гидрогеля концентрацией 10 мг/мл сопровождается статистически значимым улучшением показателей моторной активности относительно контрольной группы DMEM: F12. Остальные группы с гидрогелевыми препаратами достоверных отличий от контроля не продемонстрировали. При анализе морфометрических параметров кисты выявлено, что все композиции фибринового гидрогеля с ОК обеспечивают снижение объёма кистозной полости по сравнению с контролем, тогда как в остальных группах наблюдаемое улучшение не достигало статистической значимости. Показано, что включение нейротрофина в состав фибринового гидрогеля концентрацией 10 мг/мл обеспечивало восстановление двигательной функции уже к третьей неделе наблюдения, тогда как к четвёртой неделе прирост показателей локомоторных тестов был минимальным. По данным МРТ, значимого увеличения степени уменьшения объёма кисты также не зафиксировано. Гистологический анализ показал, что ОК, меченые PKN26, способны к миграции из фибринового гидрогеля в ткань спинного мозга, содействуя формированию нового периферического миелина, при этом выраженных качественных различий между гелями разной концентрации фибриногена не выявлено. Методом TUNEL зарегистрированы лишь единичные положительно окрашенные клетки, что свидетельствует об отсутствии массовой гибели трансплантированных клеток в зоне травмы на протяжении месяца наблюдения.

Полученные данные позволяют заключить, что само по себе введение клеток в структуру гидрогеля не приводит к росту их функциональной активности. Пониженную эффективность препарата с концентрацией фибриногена 4 мг/мл можно объяснить ограниченной пролиферативной активностью ОК в этом геле — данное предположение подтверждено экспериментами *in vitro*. Поскольку влияние фибрина на размер кисты рассматривается впервые, механизм данного явления на сегодняшний день остаётся невыясненным. Не исключено, что фибрин удерживает свою исходную форму в области кисты, и именно поэтому при МРТ-визуализации создаётся впечатление отсутствия динамики её объёма. Уменьшение размеров кист при использовании ОК-содержащих препаратов, вероятно, обусловлено способностью этих клеток продуцировать матриксные металлопротеиназы [59], перестраивающие компоненты внеклеточного матрикса, в том числе структуру фибринового гидрогеля.

Исходя из этого, можно заключить, что фибриновый гидрогель может служить платформой-носителем для ОК при их трансплантации в область кисты спинного мозга. Данные по восстановлению локомоторной функции указывают на возможную связь между увеличением плотности геля и более активной динамикой моторного восстановления. Введение BDNF в состав гидрогеля обусловило более раннее наступление положительной динамики моторных функций. В целом, совокупность полученных результатов указывает на большую перспективность фибриновых гидрогелей в сравнении с коллагеновыми.

В *in vivo* тестах локомоторной активности было показано, что трансплантация комбинированного гидрогеля приводит к увеличению динамики восстановления уже на третью неделю наблюдения. Однако тенденция увеличения баллов BBB на четвертой неделе сохранилась только в группах с ОК. Животные, которым трансплантировали комбинированный гель с ОК, продемонстрировали наиболее высокую динамику восстановления моторной активности среди исследованных биоинженерных препаратов в хронической

фазе ТСМ. При исследовании снимков МРТ было показано, что комбинированный гидрогель с ОК способствует уменьшению объёма кисты. Примечательно, что в группе без ОК уменьшения кисты не наблюдалось, что также подтверждает существенный вклад клеток в ремоделирование фибринового компонента. Также это утверждение подтвердилось в группе, в которой трансплантировали гидрогель на основе гиалуроновой кислоты и желатина. Несмотря на отсутствие клеток, данный гидрогель также способствовал уменьшению объёма кисты. Схожие результаты были получены и при добавлении BDNF в комбинированный гидрогель. В исследованных группах не было выявлено существенного увеличения эффективности ОК и гидрогеля в целом при добавлении в состав нейротрофина. Также на гистологических образцах было показано, что трансплантированные в гидрогеле клетки способны мигрировать в окружающую ткань спинного мозга. После миграции ОК образовывали MPZ. А TUNEL-исследование выявило только единичные клетки с разрывами ДНК.

Вероятно, комплексный гидрогель, состоящий из фибрина, гиалуроната и желатина, создает благоприятные условия для клеток при нейрорегенерации после травмы спинного мозга. Фибриновый компонент представляет собой плотный полимер и служит каркасом для миграции клеток [243, 280]. Гиалуронат модулирует воспалительный ответ, подавляя нейровоспаление через переключение макрофагов в M2 фенотип, и способствуя формированию микросреды, которая активирует внутриклеточные каскады выживания и пролиферации [168]. Желатин, в свою очередь, содержит в своем составе аргинилглициласпарагиновую кислоту (RGD-последовательность), способную связываться с белками интегринами на поверхности клеток, что способствует адгезии клеток [207]. Сочетание выбранных нами компонентов комплексного гидрогеля усиливает нейрорегенерацию.

Полученные результаты демонстрируют, что из исследованных биоинженерных препаратов на основе ОК и гидрогелей наиболее

перспективными являются фибриновый гидрогель с концентрацией 10 мг/мл и комбинированный гидрогель.

Также данные биоинженерные препараты были детально исследованы на предмет ремиелинизации методом ПЦР в реальном времени, по уровню относительной экспрессии гена MPZ, ассоциированного с новообразованным миелином (MPZ). Было показано, что комбинированный гидрогель превосходит группу контроля DMEM: F12 в ремиелинизации. Данный высокий уровень экспрессии гена в отсутствие ОК, вероятно, обусловлен ранее описанными процессами и качествами гидрогеля, приводящими к миграции Шванновских клеток. Также было показано, что включение ОК в комбинированный гидрогель и фибриновый гидрогель с концентрацией 10 мг/мл приводит к тому, что эти группы превосходят клетки без конструкта. Это наблюдение говорит нам о том, что гидрогели способствуют увеличению функциональной активности ОК, которая дополняется показанной ремиелинизацией препаратов без клеток.

Полученные данные по ремиелинизации и результаты изменения морфометрических параметров кисты позволяют выделить закономерность, в рамках которой препараты с добавлением фибринового и комбинированного гидрогеля также показывают наибольшую динамику восстановления моторной активности задних конечностей, что говорит нам о возможных физиологических обоснованиях полученных терапевтических эффектов.

Таким образом, из разработанных нами биоинженерных препаратов на основе ОК и гидрогелей наибольшую терапевтическую эффективность показали конструкты с использованием фибринового гидрогеля с концентрацией 10 мг/мл, а также комбинированный гидрогель. Добавление же в состав препаратов активного BDNF привело к сдержанному росту терапевтической эффективности, выраженной в первую очередь в более выраженной экспрессии гена, связанного с образованием миелина.

Другой актуальной проблемой современной медицины является терапия острой фазы повреждения после ТСМ. В данном процессе происходит целый

каскад реакций вторичного повреждения, которые делают малоэффективным прямое введение клеток в зону травмы, ввиду их гибели [299]. Решением данной проблемы является изолирование клеток в трёхмерной конструкции, в которой клетки смогут пережить наиболее цитотоксичные процессы в зоне травмы, а в дальнейшем мигрировать в ткань [125].

Наибольший интерес вызывают конструкции на основе нановолокна, полученного методом электроспиннинга. Такие конструкты обладают рядом полезных качеств: большой удельной поверхностью, высокой пористостью, при этом состав полимера легко изменять, а сами волокна просто и дешево получать [15, 242]. Наибольший интерес в данном случае вызывает ПВС, поскольку он крайне стабилен, из него легко получать нановолокно, а также данный материал уже применяется в клинической практике как офтальмологический, перевязочный, эмболизационный и имплантационный материал [297].

Однако не были изучены возможности применения ОК вместе с нановолокнами ПВС в терапии острой фазы повреждения после ТСМ. С учетом поставленной задачи было решено организовать волокна в плотную пластину.

Было показано в тестах *in vitro*, что иммортализованные клетки и ОК способны выживать в таких конструктах. Клетки не только находились на поверхности пластины, но и мигрировали вглубь.

В тестах локомоторной активности было показано, что такие пластины не обладают токсичным эффектом на нервную ткань. Также в ходе тестов было обнаружено, что применение нановолокна без твердой подложки негативно сказывается на эффективности терапии, что обусловлено смещением наклейки от спинного мозга в течение месяца и выражено в более медленной динамике восстановления моторной активности. Также пластина с подложкой превосходит в эффективности прямое введение клеток в зону острой ТСМ.

При оценке гистологических образцов было обнаружено, что клетки из таких биоинженерных препаратов на основе пластин нановолокна ПВС с подложкой способны мигрировать в ткани спинного мозга, распределяясь по

серому веществу. Также отмечается, что клетки после миграции формируют периферический миелин, что выражено в отложении MPZ. Методом TUNEL-исследования было отражено, что клетки выживали в таких конструктах и в ткани после миграции.

Таким образом, наибольшую эффективность в терапии при острой фазе TCM показал биоинженерный препарат на основе ОК и пластин из нановолокна ПВС с твердой подложкой из ПВС. Такой конструкт сочетает в себе механическую прочность и функциональную часть нановолокна.

Как отмечалось ранее, состав полимера может быть легко модифицирован, в рамках данного исследования было оценено, как добавление в состав пластин BDNF влияет на терапевтическую эффективность конструкта. Методом ИФА нами было показано, что нановолокна способны к стабильному высвобождению внесенного нейротрофина.

В тестах локомоторной активности отмечается, что конструкты с нейротрофином демонстрируют существенное увеличение моторной активности уже на 9 сутки наблюдения, в дальнейшем эта группа демонстрирует наибольший балл по сравнению с другими группами. В то же время добавление нейротрофина в клетки при прямом введении не привело к росту моторной активности. Это свидетельствует о важности изолирования клеток в первые часы после травмы, поскольку клетки теряют свою эффективность, вероятно, вызванную в первую очередь апоптозом клеток.

Таким образом, добавление BDNF в нановолокно ПВС оказывает существенное улучшение моторной активности, выраженное не только в более высоком балле, но и в более раннем проявлении положительного эффекта. Схожие результаты были получены на компрессионных моделях. Трехмерные скаффолды связаны с улучшением функции: Тимол-нагруженные волокна ПВС/хитозана уменьшали сенсорные и локомоторные нарушения у крыс [22], Также, подобные волокна, но нагруженные МСК пуповинной крови улучшали моторику у собак [213].

Обобщая вышесказанное, можно сформировать теоретическую основу действия полученных препаратов (Рисунок 42).

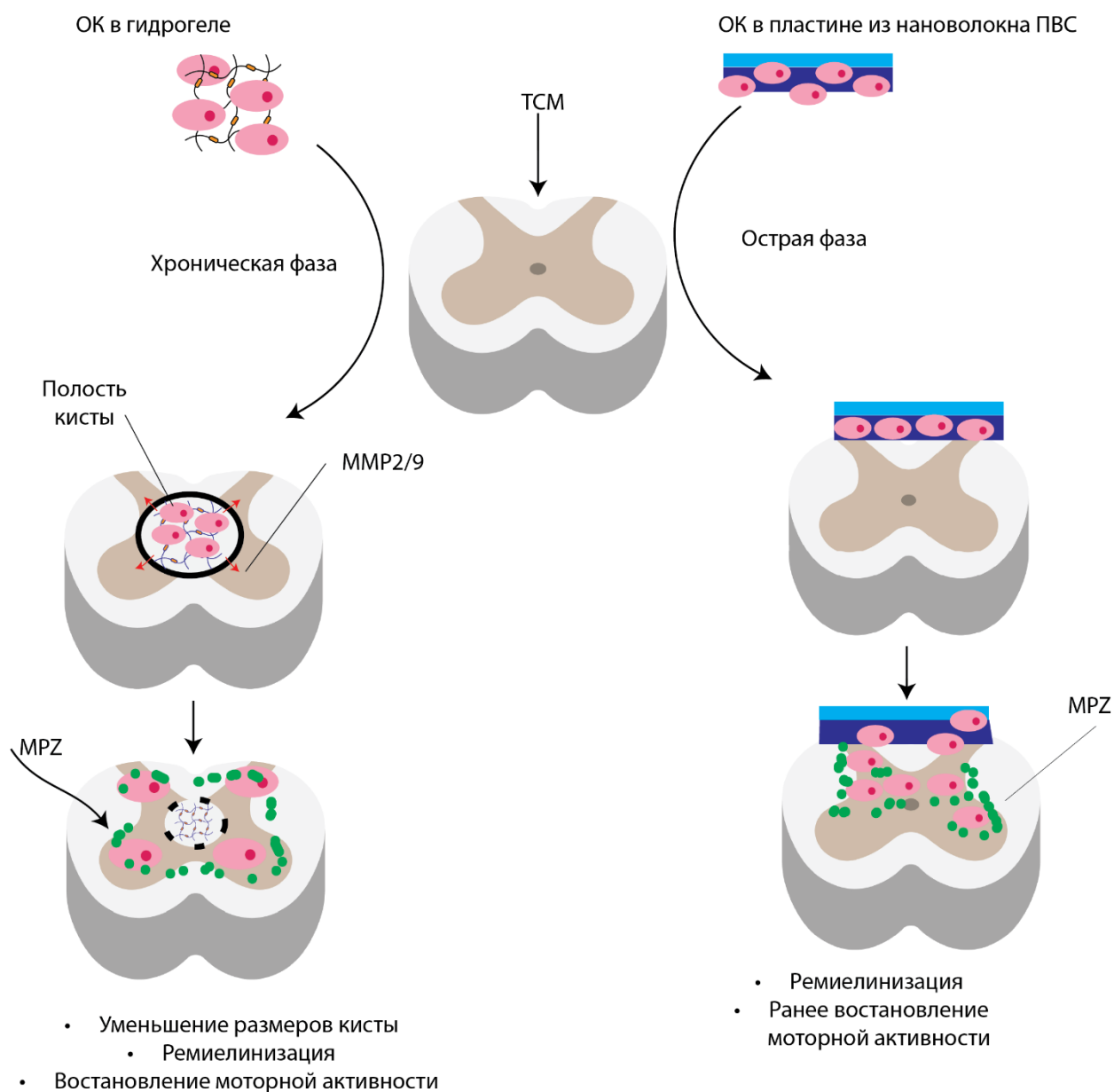


Рисунок 42 – Механизмы действия биоинженерных препаратов на разных фазах повреждения спинного мозга

Так, говоря о действии препарата на основе гидрогелей особое внимание необходимо уделять таким процессам, как ремиелинизация, миграция клеток и уменьшение размера кисты. Ключевой вклад в уменьшение размера кисты по-видимому обусловлен в первую очередь способностью обкладочных клеток секретировать матриксные металлопротеиназы 2 и 9 (ММР 2/9) [90]. Данные

цинк-зависимые эндопептидазы способны деградировать практически все компоненты внеклеточного матрикса [35], в том числе и стенки кисты [287]. В дальнейшем с повышением проницаемости капсулы кисты ОК начинают мигрировать в ткани спинного мозга. При этом они взаимодействуют с астроцитами хозяина, формируя переходную зону на границе повреждения и формируя характерные «мосты», для направления регенерирующих аксонов через зону травмы [182]. В процессе контакта с аксонами ОК также активно экспрессируют белок периферического миелина (MPZ), что способствует интеграции клеток в процессы ремиелинизации. Отмечается, что в течение 3 недель наблюдается реконструкция узлов Ранвье, с конечной организацией ионных каналов Nav1.6 и Kv1.2, однако точные внутриклеточные каскады в этом процессе остаются малоизученными [215]. Эти процессы в конечном счете приводят к восстановлению проводящей функции спинного мозга.

В то же время, в случае использования препаратов на основе полимерных пластин из нановолокна ПВС основной эффект заключается в способности таких конструкций депонировать клетки. Это позволяет защитить клетки в период острой фазы травмы. В дальнейшем клетки способны мигрировать в ткани, без риска цитотоксичности. В процессе миграции клетки не только уходят вглубь серого вещества, но и также формируют новый миелин по пути следования, что также свидетельствует о взаимодействии ОК и аксонов спинного мозга. Их активное взаимодействие и интеграция в серое вещество выражена в восстановлении проводящей функции спинного мозга.

Также, немаловажным является вопрос влияния BDNF на ОК и зону травмы (Рисунок 43).

Известно, что обкладочные клетки не только обладают тирозинкиназным рецептором B, специфичным для BDNF, но и сами могут производить BDNF [265]. При контакте с BDNF, ОК в первую очередь усиливают миграцию, нейропротекторный эффект, а также пролиферацию. Это частично объясняет

увеличение экспрессии *MPZ* при хронической травме спинного мозга, что объясняет наблюдаемый терапевтический эффект.

В то же время в зоне травмы спинного мозга BDNF способствует уменьшению вторичного повреждения, уменьшает воспаление и тем самым усиливает регенерацию. Наиболее выражены эти эффекты в терапии острой травмы, что наблюдается в использовании пластин из нановолокна ПВС. Добавление в препарат BDNF способствовало более раннему восстановлению моторной функции.

Таким образом, на разных этапах травмы BDNF запускает разные процессы. Так при хронической фазе он больше влияет на трансплантированные клетки, усиливая миграцию и ремиелинизацию. При острой травме BDNF больше влияет на системные процессы в зоне травмы, позволяя клеткам запускать процессы регенерации на более раннем сроке.

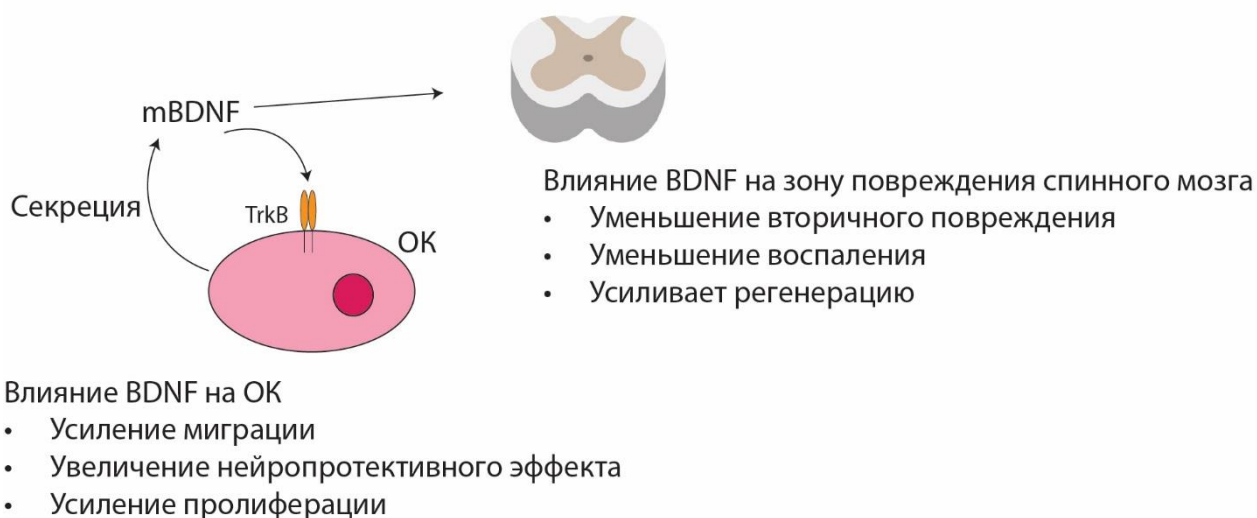


Рисунок 43 – Визуализация действия mBDNF на обкладочные клетки и зону повреждения спинного мозга

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя вышесказанное, по результатам проведенного исследования можно сделать вывод о том, что в терапии хронической фазы ТСМ со сформированной кистой наибольшую эффективность показал комбинированный гидрогель с ОК. На сопоставимом уровне работает фибриновый гидрогель с концентрацией 10 мг/мл и ОК. Добавление в состав гидрогелей BDNF не способствовало существенному увеличению эффективности. В терапии острой фазы ТСМ наибольшую эффективность показал препарат на основе ОК и пластины из нановолокна ПВС с твёрдой подложкой ПВС. В отличие от хронической формы добавление нейротрофина не только увеличило эффективность трансплантата, но и привело к более быстрому восстановлению моторной функции. Вероятно, немаловажным аспектом усиления эффективности препарата за счет добавления нейротрофина является фаза ТСМ, так BDNF усилил положительный эффект в первые 9 суток после травмы (подострая фаза травмы), но практически никак не повлиял на травмах старше 30 суток (хроническая фаза травмы). Перспективой дальнейших исследований является оценка эффективности комбинированных трансплантатов в сочетании с другими клетками обонятельной выстилки и генной терапией.

ВЫВОДЫ

1. Выявлен эффект снижения выживаемости и пролиферации обкладочных клеток в коллагеновых гидрогелях с концентрацией 1 мг/мл и 4 мг/мл на протяжении 30 суток. В фибриновом гидрогеле с концентрацией 4 мг/мл изменений выживаемости и пролиферации обкладочных клеток не выявлено. В фибриновых гелях с концентрацией 10 мг/мл и комбинированном геле обкладочные клетки увеличивали выживаемость и пролиферацию на всем протяжении наблюдения. При культивировании обкладочных клеток в полимерных пластинах достоверных изменений их выживаемости и пролиферации не обнаружено.
2. Комбинация методов самосборки волокон коллагена и ферментативной полимеризации фибриногена позволила разработать методику трансплантации препарата обкладочных клеток в гидрогелевом матриксе в посттравматические кисты спинного мозга. Выявлено, что коллагеновые гидрогели наиболее эффективно трансплантировать при непрерывном охлаждении. Фибрин-содержащие гидрогели эффективны при трансплантации в виде трехкомпонентной системы с отдельным последовательным нанесением фибрина, среды и тромбина.
3. Впервые установлено, что трансплантация биоинженерных препаратов на основе обкладочных клеток в гидрогеле обеспечивает восстановление двигательной активности задних конечностей на сопоставимо с клетками без носителя уровне. Показано, что клетки, входящие в состав биоинженерного препарата, участвуют в ремиелинизации зоны повреждения спинного мозга за счёт формирования и интеграции нового миелина в зоне травмы. Доказано, что ключевой вклад в уменьшении объёма кисты вносит клеточный компонент биоинженерного препарата. Показано, что включение в состав препарата BDNF достоверно способствовало увеличению ремиелинизации в области травмы.

4. Комбинация методов электроспиннинга и трехмерной печати позволила разработать уникальный биоинженерный препарат на основе обкладочных клеток, пластин из нановолокна поливинилового спирта, печатной подложки и BDNF. Применение коллагеновых губок и сшивания фасций позволило разработать наиболее эффективную методику плотной фиксации препарата на спинном мозге в острой фазе травмы.
5. Применение биоинженерных препаратов на основе обкладочных клеток, пластин из нановолокна поливинилового спирта и печатной подложки способствует восстановлению моторной активности и ремиелинизации при острой фазе травмы спинного мозга. Продемонстрирована способность обкладочных клеток активно мигрировать в ткани спинного мозга с последующей интеграцией. Добавление BDNF в клеточный препарат привело к достоверному усилению терапевтической эффективности, что проявлялось ускоренным восстановлением двигательной активности

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

MPT – магнитно-резонансная томография

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

НСПК – нейральные стволовые/прогениторные клетки

ОК – обкладочные клетки

TSM – травма спинного мозга

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

ASIA – American Spinal Injury Association – Американская ассоциация спинальной травмы

BDNF – Brain-Derived Neurotrophic Factor – нейротрофический фактор мозга

GDNF – Glial cell line-derived neurotrophic factor – глиальный клеточный нейротрофический фактор

GFAP – Glial Fibrillary Acidic Protein – кислый глиальный фибриллярный белок

IL – InterLeukin – интерлейкин

P75NTR – Low-affinity nerve growth factor receptor – рецептор фактора роста нервов

TUNEL – Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling – маркировка концов разрывов ДНК dUTP с помощью терминальной дезоксиинуклеотидилтрансферазы

VEGF – Vascular endothelial growth factor – фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Быков, В. Л. Цитология и общая гистология: функциональная морфология клеток и тканей человека : учебник для студентов мед. ин-тов / В. Л. Быков. – Санкт-Петербург: СОТИС, 2001. – 519 с.
2. Клеточная терапия при травмах спинного мозга / А. Д. Воронова [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2016. – Т. 71, № 6. – С. 420–426.
3. Воронова, А. Д. Обкладочные и нейральные стволовые/прогениторные клетки обонятельной слизистой оболочки млекопитающих в экспериментальной терапии посттравматических повреждений спинного мозга : дис. ... канд. биол. наук: 03.03.04 / Воронова Анастасия Денисовна – Москва, 2020. – 141 с.
4. Обухова, Т. Учет лабораторных животных в медицинских учреждениях / Т. Обухова // Учреждения здравоохранения: бухгалтерский учет и налогообложение. – 2014. – № 9. – Доступ из справ.-правовой системы «ГАРАНТ».
5. Влияние аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генетическим материалом, на ремоделирование нейроглии в головном мозге мини-свиней с ишемическим инсультом / В. П. Петрова [и др.] // Гены и клетки. – 2022. – Т. 17, № 3. – С. 178.
6. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях / под ред. Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачева. – Москва : Межакадемическое издательство «ВПК», 2003. – 138 с
7. Смирнов, В. А. Применение моноклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека на лабораторной модели контузионной травмы спинного мозга тяжелой степени : дис. ... канд. мед. наук: 14.01.18 / Смирнов Владимир Александрович. – Москва, 2019. – 137 с.
8. Трансдуцированные Клетки Обонятельной Выстилки, Экспрессирующие Фактор Роста Нервов, Для Терапии Экспериментальных Кист Спинного Мозга / О. В. Степанова [и др.] // Клеточные Технологии В Биологии И Медицине. – 2024. – № 2. – С. 109–115.
9. Improvement of Rat Spinal Cord Injury Following Lentiviral Vector-Transduced Neural Stem/Progenitor Cells Derived from Human Epileptic Brain Tissue Transplantation with a Self-assembling Peptide Scaffold / S. Abdolahi [et al.] // Molecular Neurobiology. – 2021. – Т. 58, № 6. – С. 2481–2493.
10. Treatment of a Mouse Model of Spinal Cord Injury by Transplantation of Human Treatment of a Mouse Model of Spinal Cord Injury by Transplantation of Human iPS Cell-derived Long-term Self-renewing Neuroepithelial-like Stem Cells / M. Abematsu [et al.] // Stem cells. – 2018. – Т. 30. – С. 1163–1173.
11. Comparison of the Regenerative Effect of Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cell Encapsulated into Two Hydrogel Scaffolds on Spinal Cord Injury / Z. Afsartala [et al.] // Archives of Neuroscience. – 2022. – Т. 9, № 1.
12. The Effect of Collagen and Fibrin Hydrogels Encapsulated with Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes for Treatment of Spinal Cord Injury in a Rat Model / Z. Afsartala [et al.] // Iranian Journal of Biotechnology. – 2023. – Т. 21, № 3. – С. 1–13.
13. Ahuja, C. S. Recent advances in managing a spinal cord injury secondary to trauma / C. S. Ahuja, A. R. Martin, M. G. Fehlings // F1000Research. – 2016. – Vol. 5. – P. 1017.
14. Akiko Sanai, Hiroshi Nagata, Akiyos Extensive Interstitial Collagen Deposition on the Basement Membrane Zone in Allergic Nasal Mucosa // Acta Oto-Laryngologica. – 1999. – Vol. 119, № 4. – P. 473–478.
15. Al-Abduljabbar, A. Electrospun Polymer Nanofibers: Processing, Properties, and Applications / A. Al-Abduljabbar, I. Farooq // Polymers. – 2022. – Vol. 15, № 1. – P. 65.

16. Olfactory and respiratory lamina propria transplantation after spinal cord transection in rats : Effects on functional recovery and axonal regeneration / L. Aline [et al.] // *Brain Research*. – 2011. – T. 1426. – C. 54–72.
17. Alizadeh, A. Traumatic spinal cord injury: An overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms / A. Alizadeh, S. M. Dyck, S. Karimi-Abdolrezaee // *Frontiers in Neurology*. – 2019. – Vol. 10, № March. – P. 1–25.
18. Allen, A. R. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column: a preliminary report / A. R. Allen // *Journal of the American Medical Association*. – 1911. – Vol. LVII, № 11. – P. 878–880.
19. Spinal Cord Injury Detection and Monitoring Using Spectral Coherence / H. Al-Nashash [et al.] // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. – 2009. – Vol. 56, № 8. – P. 1971–1979.
20. Use of 3D-printed polylactic acid/bioceramic composite scaffolds for bone tissue engineering in preclinical in vivo studies: A systematic review / I. Alonso-Fernández [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2023. – T. 168. – C. 1–21.
21. Effects of Olfactory Mucosa Stem/Stromal Cell and Olfactory Ensheathing Cells Secretome on Peripheral Nerve Regeneration / R. D. Alvites [et al.] // *Biomolecules*. – 2022. – T. 12, № 6. – C. 818.
22. Evaluating the anti-neuropathic effects of the thymol-loaded nanofibrous scaffold in a rat model of spinal cord injury / R. Amirian [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2025. – T. 16.
23. Opportunistic Osteoporosis Assessment and Fracture Risk Determination Using Cancellous Density Measurement in Hounsfield Units of Native Lumbar Computed Tomography Images—A Comparative Study with Conventional Bone Density Evaluation / J. R. Andresen [et al.] // *Journal of Clinical Medicine*. – 2025. – T. 14, № 4. – C. 1226.
24. Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms / A. Anjum [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – T. 21, № 20. – C. 7533.
25. Anupama, S. Updates on the Role of DXA in the Evaluation and Monitoring of Osteoporosis / S. Anupama, S. Y. Lim, M. B. Bolster // *Current Rheumatology Reports*. – 2025. – Vol. 27, № 1. – P. 38.
26. Current updates on generations, approvals, and clinical trials of CAR T-cell therapy / Dejenie T. Asmamaw [et al.] // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2022. – T. 18, № 6. – C. 2114254.
27. Azman, K. F. Recent Advances on the Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Neurodegenerative Diseases / K. F. Azman, R. Zakaria // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23, № 12. – P. 6827.
28. New Paradigm in Diabetic Foot Ulcer Grafting Techniques Using 3D-Bioprinted Autologous Minimally Manipulated Homologous Adipose Tissue (3D-AMHAT) with Fibrin Gel Acting as a Biodegradable Scaffold / M. Y. Bajuri [et al.] // *Gels*. – 2023. – T. 9, № 1. – C. 66.
29. Epidemiology of traumatic spinal cord injury: a large population-based study / Amidei C. Barbiellini [et al.] // *Spinal Cord*. – 2022. – T. 60, № 9. – C. 812–819.
30. Management of traumatic spinal cord injury: A current concepts review of contemporary and future treatment / M. Baroudi [et al.] // *Injury*. – 2024. – T. 55, № 6. – C. 111472.
31. Basso, D. M. A Sensitive and Reliable Locomotor Rating Scale for Open Field Testing in Rats / D. M. Basso, M. S. Beattie, J. C. Bresnahan // *Journal of Neurotrauma*. – 1995. – Vol. 12, № 1. – P. 1–21.
32. 3D bioprinting applications in neural tissue engineering for spinal cord injury repair / T. Bedir [et al.] // *Materials Science and Engineering: C*. – 2020. – T. 110. – C. 110741.
33. Bhatt, M. Advancements in Spinal Cord Injury Treatment: Integrating Drug Delivery, Biophysical Stimulation, Cell-Based Therapies, and Tissue Engineering Approaches / M. Bhatt, B. Das // *ACS Applied Bio Materials*. – 2025. – Vol. 8, № 8. – P. 6526–6540.

34. Bilginer Kartal R., Arslan Yildiz A. Exploring Neuronal Differentiation Profiles in SH-SY5Y Cells through Magnetic Levitation Analysis // *ACS Omega*. – 2024. – Vol. 9, № 13. – P. 14955–14962.
35. Role of matrix metalloprotease-2 and MMP-9 in experimental lung fibrosis in mice / T. Bormann [et al.] // *Respiratory Research*. – 2022. – T. 23, № 1. – C. 180.
36. Bothwell, M. Recent advances in understanding neurotrophin signaling / M. Bothwell // *F1000Research*. – 2016. – Vol. 5. – P. 1885.
37. Assessment of Fibrin-Based Hydrogels Containing a Fibrin-Binding Peptide to Tune Mechanical Properties and Cell Responses / J. Brinkmann [et al.] // *Macromolecular Materials and Engineering*. – 2023. – T. 308, № 7. – C. 2200678.
38. CELLTOP Clinical Trial: First Report From a Phase 1 Trial of Autologous Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Paralysis Due to Traumatic Spinal Cord Injury / M. Bydon [et al.] // *Mayo Clinic Proceedings*. – 2020. – T. 95, № 2. – C. 406–414.
39. Hydrogel scaffolds in the treatment of spinal cord injury: a review / M. Cai [et al.] // *Frontiers in Neuroscience*. – 2023. – T. 17. – C. 1211066.
40. 3D-Bioprinted Scaffolds with Precise Factor Delivery for Spinal Cord Injury Repair / X. Cao [et al.] // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2025. – T. 17, № 30. – C. 42586–42601.
41. Collagen/heparin sulfate scaffolds fabricated by a 3D bioprinter improved mechanical properties and neurological function after spinal cord injury in rats / C. Chen [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2017. – T. 105, № 5. – C. 1324–1332.
42. 3D printed collagen/silk fibroin scaffolds carrying the secretome of human umbilical mesenchymal stem cells ameliorated neurological dysfunction after spinal cord injury in rats / C. Chen [et al.] // *Regenerative Biomaterials*. – 2022. – T. 9.
43. Chen, J. Self-assemble peptide biomaterials and their biomedical applications / J. Chen, X. Zou // *Bioactive Materials*. – 2019. – Vol. 4. – P. 120–131.
44. Functional Multichannel Poly(Propylene Fumarate)-Collagen Scaffold with Collagen-Binding Neurotrophic Factor 3 Promotes Neural Regeneration After Transected Spinal Cord Injury / X. Chen [et al.] // *Advanced Healthcare Materials*. – 2018. – T. 7, № 14. – C. 1800315.
45. Cheng, Y. Polymeric Fibers as Scaffolds for Spinal Cord Injury: A Systematic Review / Y. Cheng, Y. Zhang, H. Wu // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2022. – Vol. 9. – P. 807533.
46. Ten years of clinical observation of olfactory ensheathing cell transplantation in patients with spinal cord injury / Z. Cheng [et al.] // *Journal of Neurorestoratology*. – 2021. – T. 9, № 2. – C. 106–116.
47. Advances in Genome Editing and Application to the Generation of Genetically Modified Rat Models / V. Chenouard [et al.] // *Frontiers in Genetics*. – 2021. – T. 12. – C. 615491.
48. Cholas, R. H. The reparative response to cross-linked collagen-based scaffolds in a rat spinal cord gap model / R. H. Cholas, H.-P. Hsu, M. Spector // *Biomaterials*. – 2012. – Vol. 33, № 7. – P. 2050–2059.
49. Generation of Neural Progenitor Cells From Canine Induced Pluripotent Stem Cells and Preliminary Safety Test in Dogs With Spontaneous Spinal Cord Injuries / L. Chow [et al.] // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2020. – T. 7.
50. Chuah, M. I. Olfactory Schwann cells are derived from precursor cells in the olfactory epithelium / M. I. Chuah, C. Au // *Journal of Neuroscience Research*. – 1991. – Vol. 29, № 2. – P. 172–180.
51. Conroy, J. N. High-affinity TrkA and p75 neurotrophin receptor complexes: A twisted affair / J. N. Conroy, E. J. Coulson // *Journal of Biological Chemistry*. – 2022. – Vol. 298, № 3.
52. Characteristics of adults with incident traumatic spinal cord injury in Ontario, Canada / C. M. Couris [et al.] // *Spinal Cord*. – 2010. – T. 48, № 1. – C. 39–44.

53. Precision Recovery After Spinal Cord Injury: Integrating CRISPR Technologies, AI-Driven Therapeutics, Single-Cell Omics, and System Neuroregeneration / R.-A. Covache-Busuioc [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2025. – T. 26, № 14. – C. 6966.
54. The potential of gene therapies for spinal cord injury repair: a systematic review and meta-analysis of pre-clinical studies / C. Cunningham [et al.] // *Neural Regeneration Research*. – 2023. – T. 18, № 2. – C. 299.
55. Curt, A. Ambulatory capacity in spinal cord injury: Significance of somatosensory evoked potentials and ASIA protocol in predicting outcome / A. Curt, V. Dietz // *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. – 1997. – Vol. 78, № 1. – P. 39–43.
56. Biomimetic Electrospun PLLA/PPSB Nanofibrous Scaffold Combined with Human Neural Stem Cells for Spinal Cord Injury Repair / Y. Dai [et al.] // *ACS Applied Nano Materials*. – 2023. – T. 6, № 7. – C. 5980–5993.
57. Deister, C. Optimizing neurotrophic factor combinations for neurite outgrowth / C. Deister, C. E. Schmidt // *Journal of Neural Engineering*. – 2006. – Vol. 3, № 2. – P. 172–179.
58. Demaerel, P. Magnetic resonance imaging of spinal cord trauma: A pictorial essay / P. Demaerel // *Neuroradiology*. – 2006. – Vol. 48, № 4. – P. 223–232.
59. Neurotrophic and immunomodulatory effects of olfactory ensheathing cells as a strategy for neuroprotection and regeneration / S. Denaro [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – T. 13. – C. 1098212.
60. Diaz, E. Spinal Cord Anatomy and Clinical Syndromes / E. Diaz, H. Morales // *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*. – 2016. – Vol. 37, № 5. – P. 360–371.
61. Spinal Cord Injury: The Global Incidence, Prevalence, and Disability From the Global Burden of Disease Study 2019 / W. Ding [et al.] // *Spine*. – 2022. – T. 47, № 21. – C. 1532–1540.
62. Donaghue, I. E. Sustained delivery of bioactive neurotrophin-3 to the injured spinal cord / I. E. Donaghue, C. H. Tator, M. S. Shoichet // *Biomaterials Science*. – 2014. – Vol. 3, № 1. – P. 65–72.
63. Doncel-Pérez, E. From single to combinatorial therapies in spinal cord injuries for structural and functional restoration / E. Doncel-Pérez, G. Guízar-Sahagún, I. Grijalva-Otero // *Neural Regeneration Research*. – 2025. – Vol. 20, № 3. – P. 660–670.
64. Pharmacological and non-pharmacological therapeutic interventions for the treatment of spinal cord injury-induced pain / O. C. Eller [et al.] // *Frontiers in Pain Research*. – 2022. – T. 3. – C. 991736.
65. Combination of epidural electrical stimulation with ex vivo triple gene therapy for spinal cord injury: a proof of principle study / F. Fadeev [et al.] // *Neural Regeneration Research*. – 2021. – T. 16, № 3. – C. 550.
66. Gene delivery to adult neural stem cells / A. Falk [et al.] // *Experimental Cell Research*. – 2002. – T. 279, № 1.
67. Exosomes-Loaded Electroconductive Hydrogel Synergistically Promotes Tissue Repair after Spinal Cord Injury via Immunoregulation and Enhancement of Myelinated Axon Growth / L. Fan [et al.] // *Advanced Science*. – 2022. – T. 9, № 13. – C. 2105586.
68. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury / F. Féron [et al.] // *Brain*. – 2005. – T. 128. – C. 2951–2960.
69. Finnerup, N. B. Neuropathic pain and spasticity: intricate consequences of spinal cord injury / N. B. Finnerup // *Spinal Cord*. – 2017. – Vol. 55, № 12. – P. 1046–1050.
70. Franklin, R. J. M. Remyelination by transplanted olfactory ensheathing cells / R. J. M. Franklin // *The Anatomical Record Part B: The New Anatomist*. – 2003. – Vol. 271B, № 1. – P. 71–76.
71. Study of transplantation of preparations based on fibrin hydrogel and olfactory ensheathing cells for experimental therapy of spinal cord injuries / G. A. Fursa [et al.] // *Cell Technologies in Biology and Medicine*. – 2025. – № 4. – C. 233–239.

72. Application of Olfactory Ensheathing Cells in Collagen Hydrogels for Therapy of Experimental Spinal Cord Cysts / G. A. Fursa [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2025. – T. 178, № 4. – C. 560–566.
73. Established and Emerging Therapies in Acute Spinal Cord Injury / R. Gadot [et al.] // *Neurospine*. – 2022. – T. 19, № 2. – C. 283–296.
74. Barriers to Chimeric Antigen Receptor T-Cell (CAR-T) Therapies in Clinical Practice / A. Gajra [et al.] // *Pharmaceutical Medicine*. – 2022. – T. 36, № 3. – C. 163–171.
75. 3D bioprinted conductive spinal cord biomimetic scaffolds for promoting neuronal differentiation of neural stem cells and repairing of spinal cord injury / C. Gao [et al.] // *Chemical Engineering Journal*. – 2023. – T. 451. – C. 138788.
76. Untargeted blood serum proteomics identifies novel proteins related to neurological recovery after human spinal cord injury / D. Garcia-Ovejero [et al.] // *Journal of Translational Medicine*. – 2024. – T. 22, № 1. – C. 666.
77. Characterization and assessment of new fibrillar collagen inks and bioinks for 3D printing and bioprinting / F. Garcia-Villen [et al.] // *International Journal of Bioprinting*. – 2023. – T. 9, № 3. – C. 712.
78. Gaudet, A. D. Glial Cells Shape Pathology and Repair After Spinal Cord Injury / A. D. Gaudet, L. K. Fonken // *Neurotherapeutics*. – 2018. – Vol. 15, № 3. – P. 554–577.
79. Design of hydrogel-based scaffolds for the treatment of spinal cord injuries / N. Ghane [et al.] // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2020. – T. 8, № 47. – C. 10712–10738.
80. Biomaterials and Cell Therapy Combination in Central Nervous System Treatments / Z. Giorgi [et al.] // *ACS Applied Bio Materials*. – 2024. – T. 7, № 1. – C. 80–98.
81. Patients with Chronic Spinal Cord Injury and a Long Period of Evolution Exhibit an Altered Cytokine Production by CD4 and CD8 T Cell Populations / S. H. Girón [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – T. 24, № 8. – C. 7048.
82. Changes in transcriptome profiling during the acute/subacute phases of contusional spinal cord injury in rats / L. Gong [et al.] // *Annals of Translational Medicine*. – 2020. – T. 8, № 24. – C. 1682–1682.
83. Efficacy and safety of the low-temperature-derived 3D printed biodegradable Mg-containing composite porous scaffold for bone defect repair: A prospective and multi-center randomized controlled trial / M. Gong [et al.] // *Biomaterials*. – 2026. – T. 327. – C. 123751.
84. Gordon, T. The use of the rat as a model for studying peripheral nerve regeneration and sprouting after complete and partial nerve injuries / T. Gordon, G. H. Borschel // *Experimental Neurology*. – 2017. – Vol. 287. – P. 331–347.
85. Astrocyte-selective AAV gene therapy through the endogenous GFAP promoter results in robust transduction in the rat spinal cord following injury / J. M. Griffin [et al.] // *Gene Therapy*. – 2019. – T. 26, № 5. – C. 198–210.
86. Griffin, J. M. Therapeutic repair for spinal cord injury: combinatory approaches to address a multifaceted problem / J. M. Griffin, F. Bradke // *EMBO Molecular Medicine*. – 2020. – Vol. 12, № 3. – P. e11505.
87. Feasibility of diffusion tensor imaging for assessing functional recovery in rats with olfactory ensheathing cell transplantation after contusive spinal cord injury (Sci) / M. Gu [et al.] // *Medical Science Monitor*. – 2017. – T. 23. – C. 2961–2971.
88. Self-Assembling Peptide-Based Hydrogels for Wound Tissue Repair / T. Guan [et al.] // *Advanced Science*. – 2022. – T. 9, № 10. – C. 2104165.
89. Pathophysiology, Classification and Comorbidities after Traumatic Spinal Cord Injury / J. Guest [et al.] // *Journal of Personalized Medicine*. – 2022. – T. 12, № 7. – C. 1126.
90. Trafficking and secretion of matrix metalloproteinase-2 in olfactory ensheathing glial cells: A role in cell migration? / Y. Gueye [et al.] // *Glia*. – 2011. – T. 59, № 5. – C. 750–770.
91. Guo, J. L. Bioprinted Hydrogels for Fibrosis and Wound Healing: Treatment and Modeling / J. L. Guo, M. T. Longaker // *Gels*. – 2022. – Vol. 9, № 1. – P. 19.

92. TrkB Receptor Signalling: Implications in Neurodegenerative, Psychiatric and Proliferative Disorders / V. Gupta [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2013. – T. 14, № 5. – C. 10122–10142.
93. Thalamic activity and biochemical changes in individuals with neuropathic pain after spinal cord injury / S. M. Gustin [et al.] // *Pain*. – 2014. – T. 155, № 5. – C. 1027–1036.
94. Effects of Electrospun Nanofibers on Motor Function Recovery After Spinal Cord Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis / Moghaddam N. Haeri [et al.] // *World Neurosurgery*. – 2024. – T. 181. – C. 96–106.
95. Hagen, E. M. Acute complications of spinal cord injuries / E. M. Hagen // *World Journal of Orthopedics*. – 2015. – Vol. 6, № 1. – P. 17.
96. Hartung, T. The (misleading) role of animal models in drug development / T. Hartung // *Frontiers in Drug Discovery*. – 2024. – Vol. 4. – P. 1355044.
97. Neurotrophic factors for spinal cord repair: Which, where, how and when to apply, and for what period of time? / A. R. Harvey [et al.] // *Brain Research*. – 2015. – T. 1619. – C. 36–71.
98. Effects of Curcumin on Bone Loss and Biochemical Markers of Bone Turnover in Patients with Spinal Cord Injury / M. Hatefi [et al.] // *World Neurosurgery*. – 2018. – T. 114. – C. e785–e791.
99. MRT bei myelonverletzungen / H. Hawighorst [et al.] // *Radiologe*. – 2001. – T. 41, № 12. – C. 1033–1037.
100. International Xenotransplantation Association (IXA) Position Paper on the History, Current Status, and Regulation of Xenotransplantation / W. J. Hawthorne [et al.] // *Xenotransplantation*. – 2025. – T. 32, № 2. – C. e70002.
101. The PI3K/AKT signalling pathway in inflammation, cell death and glial scar formation after traumatic spinal cord injury: Mechanisms and therapeutic opportunities / X. He [et al.] // *Cell Proliferation*. – 2022. – T. 55, № 9. – C. e13275.
102. Hendriks, W. T. J. Viral vector-mediated gene transfer of neurotrophins to promote regeneration of the injured spinal cord / W. T. J. Hendriks [et al.]. – Elsevier, 2004. – P. 451–476.
103. Heremans, J. The versatility of peptide hydrogels: From self-assembly to drug delivery applications / J. Heremans, S. Ballet, C. Martin // *Journal of Peptide Science*. – 2025. – Vol. 31, № 2. – P. e3662.
104. Hjazi, A. Bioactive and degradable collagen-based hydrogel encapsulated with microspheres containing basic fibroblast growth factor (bFGF) and interleukin (IL)-10 promotes recovery following traumatic spinal cord injury in rats / A. Hjazi // *Histochemistry and Cell Biology*. – 2025. – Vol. 163, № 1. – P. 65.
105. Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine / T.-C. Ho [et al.] // *Molecules*. – 2022. – T. 27, № 9. – C. 2902.
106. Self-assembling peptide gels promote angiogenesis and functional recovery after spinal cord injury in rats / J. Y. Hong [et al.] // *Journal of Tissue Engineering*. – 2022. – T. 13. – C. 20417314221086491.
107. Hsieh, F.-Y. 3D bioprinting of neural stem cell-laden thermoresponsive biodegradable polyurethane hydrogel and potential in central nervous system repair / F.-Y. Hsieh, H.-H. Lin, S. Hsu // *Biomaterials*. – 2015. – Vol. 71. – P. 48–57.
108. Spinal cord injury: molecular mechanisms and therapeutic interventions / X. Hu [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2023. – T. 8, № 1. – C. 245.
109. Huang, E. J. Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function / E. J. Huang, L. F. Reichardt // *Annual Review of Neuroscience*. – 2001. – Vol. 24, № 1. – P. 677–736.
110. Huang, E. J. Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction / E. J. Huang, L. F. Reichardt // *Annual Review of Biochemistry*. – 2003. – Vol. 72, № 1. – P. 609–642.

111. Glial cell line-derived neurotrophic factor-overexpressing human neural stem/progenitor cells enhance therapeutic efficiency in rat with traumatic spinal cord injury / K. Hwang [et al.] // *Experimental Neurobiology*. – 2019. – T. 28, № 6.
112. Hyun, J. K. Clinical and Experimental Advances in Regeneration of Spinal Cord Injury / J. K. Hyun, H.-W. Kim, V. Mudera // *Journal of Tissue Engineering*. – 2010. – Vol. 1, № 1. – P. 650857.
113. Impact of PEG sensitization on the efficacy of PEG hydrogel-mediated tissue engineering / A. H. Isaac [et al.] // *Nature Communications*. – 2024. – T. 15, № 1. – C. 3283.
114. MOFs—Combining Fully Synthetic Injectable Hydrogel Scaffolds Exhibiting Higher Skeletal Muscle Regenerative Efficiency than Matrigel / S. S. Islam [et al.] // *Gels*. – 2025. – T. 11, № 7. – C. 514.
115. Spinal Cord Molecular and Cellular Changes Induced by Adenoviral Vector- and Cell-Mediated Triple Gene Therapy after Severe Contusion / A. A. Izmailov [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2017. – T. 8. – C. 813.
116. Sustaining the healthcare systems through the conceptual of biomedical engineering: A study with recent and future potentials / M. Javaid [et al.] // *Biomedical Technology*. – 2023. – T. 1. – C. 39–47.
117. Application of Injectable Hydrogels as Delivery Systems in Spinal Cord Injury / R. Ji [et al.] // *Gels*. – 2023. – T. 9, № 11. – C. 907.
118. Differential efficacy of olfactory neurospheres from deviated nasal septum and chronic rhinosinusitis patients in regenerating olfactory epithelium / R.-S. Jiang [et al.] // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2025. – T. 16, № 1. – C. 166.
119. Prognostic Factors of Hearing Outcome in Untreated Vestibular Schwannomas: Implication of Subdivision of Their Growth by Volumetric Analysis / J. D. Joo [et al.] // *World Neurosurgery*. – 2017. – T. 106. – C. 768–774.
120. Jung, Y. J. Phagocytic roles of glial cells in healthy and diseased brains / Y. J. Jung, W. S. Chung // *Biomolecules and Therapeutics*. – 2018. – Vol. 26, № 4. – P. 350–357.
121. Kaplan, D. R. Neurotrophin signal transduction in the nervous system / D. R. Kaplan, F. D. Miller // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2000. – Vol. 10, № 3. – P. 381–391.
122. Clinical Trials Targeting Secondary Damage after Traumatic Spinal Cord Injury / Z. Z. Khaing [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – T. 24, № 4. – C. 3824.
123. Effect of fibrin on the expression of adhesion molecules (ICAM-1, ITGAV, and ITGB3) in unrestricted somatic stem cells / S. Khaseb [et al.] // *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*. – 2025. – T. 47, № 2. – C. 103827.
124. Fibrin Glue Improves the Therapeutic Effect of MSCs by Sustaining Survival and Paracrine Function / I. Kim [et al.] // *Tissue Engineering Part A*. – 2013. – T. 19, № 21–22. – C. 2373–2381.
125. Transplantation of Mesenchymal Stem Cells for Acute Spinal Cord Injury in Rats: Comparative Study between Intralesional Injection and Scaffold Based Transplantation / Y.-C. Kim [et al.] // *Journal of Korean Medical Science*. – 2016. – T. 31, № 9. – C. 1373.
126. Kirshblum, S. Challenges and strategies for spinal cord injury research recruitment in rehabilitation hospitals: a single center perspective / S. Kirshblum, B. Snider, E. Engel-Haber // *Spinal Cord*. – 2025. – Vol. 63, № 7. – P. 385–391.
127. Adenovirus vector-mediated ex vivo gene transfer of brain-derived neurotrophic factor to bone marrow stromal cells promotes axonal regeneration after transplantation in completely transected adult rat spinal cord / M. Koda [et al.] // *European Spine Journal*. – 2007. – T. 16, № 12.
128. Biomimetic 3D-printed scaffolds for spinal cord injury repair / J. Koffler [et al.] // *Nature Medicine*. – 2019. – T. 25, № 2. – C. 263–269.

129. hiPSC-derived NSCs effectively promote the functional recovery of acute spinal cord injury in mice / D. Kong [et al.] // *Stem Cell Research and Therapy*. – 2021. – T. 12, № 1.
130. Krubaa, P. Albino Wistar Rats: Advantages and Limitations in Biomedical Research / P. Krubaa, P. S. Yogitha // *SBV Journal of Basic, Clinical and Applied Health Science*. – 2024. – Vol. 7, № 2. – P. 61–65.
131. Hyaluronic acid scaffold has a neuroprotective effect in hemisection spinal cord injury / S. V. Kushchayev [et al.] // *Journal of Neurosurgery: Spine*. – 2016. – T. 25, № 1. – C. 114–124.
132. Kuypers, H. G. J. M. The Descending Pathways to the Spinal Cord, their Anatomy and Function / H. G. J. Kuypers // *Progress in Brain Research*. – 1964. – Vol. 11, № C. – P. 178–202.
133. Revisiting the Resazurin-Based Sensing of Cellular Viability: Widening the Application Horizon / D. Lavogina [et al.] // *Biosensors*. – 2022. – T. 12, № 4. – C. 196.
134. Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine / C. S. Lee [et al.] // *Genes & Diseases*. – 2017. – T. 4, № 2. – C. 43–63.
135. 3D printing nano conductive multi-walled carbon nanotube scaffolds for nerve regeneration / S.-J. Lee [et al.] // *Journal of Neural Engineering*. – 2018. – T. 15, № 1. – C. 016018.
136. The use of autologous schwann cells to supplement sciatic nerve repair with a large gap: First in human experience / A. D. Levi [et al.] // *Cell Transplantation*. – 2016. – T. 25, № 7. – C. 1395–1403.
137. Recent advances of self-assembling peptide-based hydrogels for biomedical applications / J. Li [et al.] // *Soft Matter*. – 2019. – T. 15, № 8. – C. 1704–1715.
138. Human Adipose-Derived Stem Cells Combined with Nano-Hydrogel Promote Functional Recovery after Spinal Cord Injury in Rats / J. Li [et al.] // *Biology*. – 2022. – T. 11, № 5. – C. 781.
139. Li, J. Tissue Regeneration with Gelatine/Polysaccharide Derived Hydrogel Scaffolds: From Formulation to In Vivo Efficacy / J. Li, K. He, Q. Xu // *Gels*. – 2023. – Vol. 9, № 9. – P. 744.
140. Construction of rat spinal cord injury model based on Allen's animal model / S. Li [et al.] // *Saudi Journal of Biological Sciences*. – 2019. – T. 26, № 8. – C. 2122–2126.
141. Advances in 3D bioprinting of functional biomaterials for neural tissue engineering / S. Li [et al.] // *Tissue and Cell*. – 2025. – T. 96. – C. 103024.
142. Coaxial 3D printing of hierarchical structured hydrogel scaffolds for on-demand repair of spinal cord injury / Y. Li [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2023. – T. 168. – C. 400–415.
143. The role of olfactory ensheathing cells in the repair of nerve injury / J. Liao [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2024. – T. 966. – C. 176346.
144. Cell Transplantation and Neuroengineering Approach for Spinal Cord Injury Treatment: A Summary of Current Laboratory Findings and Review of Literature / X.-Y. Lin [et al.] // *Cell Transplantation*. – 2016. – T. 25, № 8. – C. 1425–1438.
145. Lindsay, S. L. Olfactory mucosa for transplant-mediated repair: A complex tissue for a complex injury? / S. L. Lindsay, J. S. Riddell, S. C. Barnett // *Glia*. – 2010. – Vol. 58, № 2. – P. 125–134.
146. The mitosis and immunocytochemistry of olfactory ensheathing cells from nasal olfactory mucosa / J. Liu [et al.] // *Chinese Journal of Traumatology = Zhonghua Chuang Shang Za Zhi*. – 2005. – T. 8, № 5. – C. 306–310.
147. Three-dimensional bioprinting sodium alginate/gelatin scaffold combined with neural stem cells and oligodendrocytes markedly promoting nerve regeneration after spinal cord injury / S. Liu [et al.] // *Regenerative Biomaterials*. – 2022. – T. 9.

148. Transplantation of fibrin-thrombin encapsulated human induced neural stem cells promotes functional recovery of spinal cord injury rats through modulation of the microenvironment / S. Liu [et al.] // *Neural Regeneration Research*. – 2024. – T. 19, № 2. – C. 440–446.
149. Sustained release of neurotrophin-3 and chondroitinase ABC from electrospun collagen nanofiber scaffold for spinal cord injury repair / T. Liu [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2012. – T. 100A, № 1. – C. 236–242.
150. Nanofibrous Collagen Nerve Conduits for Spinal Cord Repair / T. Liu [et al.] // *Tissue Engineering Part A*. – 2012. – T. 18, № 9–10. – C. 1057–1066.
151. An injectable, self-healing, electroconductive hydrogel loaded with neural stem cells and donepezil for enhancing local therapy effect of spinal cord injury / T. Liu [et al.] // *Journal of Biological Engineering*. – 2023. – T. 17, № 1. – C. 48.
152. Neuroactive network tissue based on dual-factor neuroregenerative bioactive coating scaffolds and neural stem cells for spinal cord injury repair / T. Liu [et al.] // *Materials Today Bio*. – 2025. – T. 34. – C. 102172.
153. 3D bioprinted neural tissue constructs for spinal cord injury repair / X. Liu [et al.] // *Biomaterials*. – 2021. – T. 272. – C. 120771.
154. Integrated printed BDNF/collagen/chitosan scaffolds with low temperature extrusion 3D printer accelerated neural regeneration after spinal cord injury / X.-Y. Liu [et al.] // *Regenerative Biomaterials*. – 2021. – T. 8, № 6. – C. rbab047.
155. Huang, L. Stem cell therapy for spinal cord injury / L. Huang, C. Fu, F. Xiong [et al.] // *Cell Transplantation*. – 2018. – Vol. 24, № 8. – P. 1088.
156. Harnessing the potential of hydrogels for advanced therapeutic applications: current achievements and future directions / P. Lu [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2024. – T. 9, № 1. – C. 166.
157. Global incidence and characteristics of spinal cord injury since 2000–2021: a systematic review and meta-analysis / Y. Lu [et al.] // *BMC Medicine*. – 2024. – T. 22, № 1. – C. 285.
158. Intramuscular injection of AAV-GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transport / Y.-Y. Lu [et al.] // *Neuroscience Research*. – 2003. – T. 45, № 1. – C. 33–40.
159. Study on Xenotransplantation of Capsulated Porcine Choroid Plexus Cells in Rhesus PD Model: 2011 / X. Luo [et al.] // *Transplantation Journal*. – 2012. – T. 94, № 10S. – C. 67.
160. An injectable, self-healing, electroconductive extracellular matrix-based hydrogel for enhancing tissue repair after traumatic spinal cord injury / Y. Luo [et al.] // *Bioactive Materials*. – 2022. – T. 7. – C. 98–111.
161. Hydrogels in Spinal Cord Injury Repair: A Review / Z. Lv [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2022. – T. 10. – C. 931800.
162. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial / A. Mackay-Sim [et al.] // *Brain*. – 2008. – T. 131, № 9. – C. 2376–2386.
163. Madigan, N. N. Spinal cord injury / N. N. Madigan, A. J. Windebank // *Principles of Tissue Engineering*. – 2020. – P. 1047–1091.
164. Mallakpour, S. A new trend of using poly(vinyl alcohol) in 3D and 4D printing technologies: Process and applications / S. Mallakpour, F. Tabesh, C. M. Hussain // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2022. – Vol. 301. – P. 102605.
165. Marino, R. J. International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury / R. J. Marino [et al.] // *The Journal of Spinal Cord Medicine*. – 2016. – Vol. 269, № November.
166. Designer, injectable gels to prevent transplanted Schwann cell loss during spinal cord injury therapy / L. M. Marquardt [et al.] // *Science Advances*. – 2020. – T. 6, № 14. – C. eaaz1039.

167. Modeling chronic cervical spinal cord injury in aged rats for cell therapy studies / M. Martín-López [et al.] // *Journal of Clinical Neuroscience*. – 2021. – T. 94. – C. 76–85.
168. Hyaluronic acid-based hydrogels modulate neuroinflammation and extracellular matrix remodelling in multiple sclerosis: insights from a primary cortical cell model / S. Martín-Saldaña [et al.] // *Materials Horizons*. – 2025. – T. 12, № 11. – C. 3841–3854.
169. Effects of Bone-Marrow-Derived MSC Transplantation on Functional Recovery in a Rat Model of Spinal Cord Injury: Comparisons of Transplant Locations and Cell Concentrations / J. J. Matyas [et al.] // *Cell Transplantation*. – 2017. – T. 26, № 8. – C. 1472–1482.
170. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord / John W. McDonald [et al.] // *Nature Medicine*. – 1999. – T. 5. – C. 1410–1412.
171. Ten-year safety of pluripotent stem cell transplantation in acute thoracic spinal cord injury / S. L. McKenna [et al.] // *Journal of Neurosurgery: Spine*. – 2022. – C. 1–10.
172. Meeker, R. Dynamic Nature of the p75 Neurotrophin Receptor in Response to Injury and Disease / R. Meeker, K. Williams // *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. – 2014. – Vol. 9, № 5. – P. 615–628.
173. Pharmacological management of secondary chronic spinal cord injury: a systematic review / F. Migliorini [et al.] // *British Medical Bulletin*. – 2024. – T. 151, № 1. – C. 49–68.
174. Therapeutic strategies that modulate the acute phase of secondary spinal cord injury scarring and inflammation and improve injury outcomes / F. Migliorini [et al.] // *Expert Review of Neurotherapeutics*. – 2025. – T. 25, № 4. – C. 477–490.
175. Min, Q. Migrating Schwann cells direct axon regeneration within the peripheral nerve bridge / Q. Min, D. B. Parkinson, X. P. Dun // *GLIA*. – 2021. – Vol. 69, № 2. – P. 235–254.
176. Conductive Nanocomposite Hydrogels for Neural Tissue Engineering: A Systematic Scoping Review of Recent Trends / M. Moghaddasi [et al.] // *Advanced Science*. – 2025. – T. 12, № 38. – C. e16085.
177. Schwann cell transplantation exerts neuroprotective roles in rat model of spinal cord injury by combating inflammasome activation and improving motor recovery and remyelination / M. Mousavi [et al.] // *Metabolic Brain Disease*. – 2019. – T. 34, № 4. – C. 1117–1130.
178. Sustained delivery of neurotrophic factors to treat spinal cord injury / A. Muheremu [et al.] // *Translational Neuroscience*. – 2021. – T. 12, № 1. – C. 494–511.
179. Why are olfactory ensheathing cell tumors so rare? / M. Murtaza [et al.] // *Cancer Cell International*. – 2019. – T. 19, № 1. – C. 260.
180. Harnessing the Potential of Self-Assembled Peptide Hydrogels for Neural Regeneration and Tissue Engineering / H. Najafi [et al.] // *Macromolecular Bioscience*. – 2024. – T. 24, № 6. – C. 2300534.
181. Namiki, J. Effect of Brain-Derived Neurotrophic Factor, Nerve Growth Factor, and Neurotrophin-3 on Functional Recovery and Regeneration After Spinal Cord Injury in Adult Rats / J. Namiki, A. Kojima, C. H. Tator // *Journal of Neurotrauma*. – 2000. – Vol. 17, № 12. – P. 1219–1231.
182. Oieni, F. St John J. Olfactory Ensheathing Cells for Spinal Cord Injury: The Cellular Superpowers for Nerve Repair / F. Oieni, R. Reshamwala // *Neuroglia*. – 2022. – Vol. 3, № 4. – P. 139–143.
183. Olby, N. Current concepts in the management of acute spinal cord injury / N. Olby // *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. – 1999. – Vol. 13, № 5. – P. 399–407.
184. Osseward, P. J. Cell type and circuit modules in the spinal cord / P. J. Osseward, S. L. Pfaff // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2019. – Vol. 56. – P. 175–184.

185. Single-cell printing to form three-dimensional lines of olfactory ensheathing cells / C. M. Othon [et al.] // *Biomedical Materials*. – 2008. – T. 3, № 3. – C. 034101.
186. Biofabrication and testing of a fully cellular nerve graft / C. M. Owens [et al.] // *Biofabrication*. – 2013. – T. 5, № 4. – C. 045007.
187. 3D culture of alginate-hyaluronic acid hydrogel supports the stemness of human mesenchymal stem cells / A. Pangjantuk [et al.] // *Scientific Reports*. – 2024. – T. 14, № 1. – C. 4436.
188. Schwann cell transplantation subdues the pro-inflammatory innate immune cell response after spinal cord injury / D. D. Pearse [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – T. 19, № 9. – C. 1–19.
189. Petiti, J. Standard Operating Procedure to Optimize Resazurin-Based Viability Assays / J. Petiti, L. Revel, C. Divieto // *Biosensors*. – 2024. – Vol. 14, № 4. – P. 156.
190. AAV Vector Mediated Delivery of NG2 Function Neutralizing Antibody and Neurotrophin NT-3 Improves Synaptic Transmission, Locomotion, and Urinary Tract Function after Spinal Cord Contusion Injury in Adult Rats / H. A. Petrosyan [et al.] // *The Journal of Neuroscience*. – 2023. – T. 43, № 9. – C. 1492–1508.
191. Motoric recovery after transplantation of bone marrow derived mesenchymal stem cells in chronic spinal cord injury: A case report / P. Phedy [et al.] // *American Journal of Case Reports*. – 2019. – T. 20. – C. 1299–1304.
192. Plunet, W. Promoting axonal regeneration in the central nervous system by enhancing the cell body response to axotomy / W. Plunet, B. K. Kwon, W. Tetzlaff // *Journal of Neuroscience Research*. – 2002. – Vol. 68, № 1. – P. 1–6.
193. Prabhakar, O. Bioengineering of chitosan/citric acid/curcumin nanofiber scaffolds for treatment of spinal cord injury / O. Prabhakar, N. Pavani // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2025. – Vol. 321. – P. 146143.
194. Delivery of chondroitinase by canine mucosal olfactory ensheathing cells alongside rehabilitation enhances recovery after spinal cord injury / J. Prager [et al.] // *Experimental Neurology*. – 2021. – T. 340.
195. Thrombospondin-1 modified bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) promote neurite outgrowth and functional recovery in rats with spinal cord injury / Y. Pu [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – T. 8, № 56.
196. Qasim, M. Advancements and frontiers in nano-based 3D and 4D scaffolds for bone and cartilage tissue engineering / M. Qasim, D. S. Chae, N. Y. Lee // *International Journal of Nanomedicine*. – 2019. – Vol. 14. – P. 4333–4351.
197. Effects of Coaxial Nozzle's Inner Nozzle Diameter on Filament Strength and Gelation in Extrusion-Based 3D Printing with In Situ Ionic Crosslinking / T. T. Rahman [et al.] // *Biomimetics*. – 2024. – T. 9, № 10. – C. 589.
198. Reichardt, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways / L. F. Reichardt // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2006. – Vol. 361, № 1473. – P. 1545–1564.
199. Reinders, J. W. C. Intramedullary enterogenous cyst presenting with spastic paraparesis during two consecutive pregnancies: A case report / J. W. C. Reinders, P. Wesseling, P. H. E. Hilken // *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. – 2001. – Vol. 71, № 4. – P. 528–530.
200. Designing a Clinical Trial with Olfactory Ensheathing Cell Transplantation-Based Therapy for Spinal Cord Injury: A Position Paper / R. Reshamwala [et al.] // *Biomedicines*. – 2022. – T. 10, № 12. – C. 3153.
201. Injectable Hyaluronic Acid-co-Gelatin Cryogels for Tissue-Engineering Applications / M. Rezaeeyazdi [et al.] // *Materials*. – 2018. – T. 11, № 8. – C. 1374.
202. Richter, M. W. Lamina Propria and Olfactory Bulb Ensheathing Cells Exhibit Differential Integration and Migration and Promote Differential Axon Sprouting in the

- Lesioned Spinal Cord / M. W. Richter [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2005. – Vol. 25, № 46. – P. 10700–10711.
203. Richter, M. Culturing Olfactory Ensheathing Cells from the Mouse Olfactory Epithelium / M. Richter, K. Westendorf, A. J. Roskams // *Methods in Molecular Biology* / ed. L. P. Weiner. – Totowa, NJ : Humana Press, 2008. – P. 95–102.
 204. Development of a chronic compression spinal cord injury model in neonatal and adult rats / R. Ridlen [et al.] // *Animal Models and Experimental Medicine*. – 2024. – T. 7, № 5. – C. 758–768.
 205. Peptide Self-Assembly into Hydrogels for Biomedical Applications Related to Hydroxyapatite / M. Rivas [et al.] // *Gels*. – 2019. – T. 5, № 1. – C. 14.
 206. Building-Block Size Mediates Microporous Annealed Particle Hydrogel Tube Microenvironment Following Spinal Cord Injury / B. C. Ross [et al.] // *Advanced Healthcare Materials*. – 2024. – T. 13, № 25. – C. 2302498.
 207. Bioactive Hydrogels for Spinal Cord Injury Repair: Emphasis on Gelatin and Its Derivatives / A. D. Rotaru-Zavaleanu [et al.] // *Gels*. – 2025. – T. 11, № 7. – C. 497.
 208. Ex vivo adenoviral vector-mediated neurotrophin gene transfer to olfactory ensheathing glia: Effects on rubrospinal tract regeneration, lesion size, and functional recovery after implantation in the injured rat spinal cord / M. J. Ruitenberg [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2003. – T. 23, № 18.
 209. Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer of brain-derived neurotrophic factor reverses atrophy of rubrospinal neurons following both acute and chronic spinal cord injury / M. J. Ruitenberg [et al.] // *Neurobiology of Disease*. – 2004.
 210. Ruitenberg, M. J. NT-3 expression from engineered olfactory ensheathing glia promotes spinal sparing and regeneration / M. J. Ruitenberg // *Brain*. – 2005. – Vol. 128, № 4. – P. 839–853.
 211. Spinal cord injury / C. Sadowsky [et al.] // *Disability and Rehabilitation*. – 2002. – T. 24, № 13. – C. 680–687.
 212. Human-induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cell ex vivo gene therapy with synaptic organizer CPTX for spinal cord injury / Y. Saijo [et al.] // *Stem Cell Reports*. – 2024. – T. 19, № 3. – C. 383–398.
 213. Neuronal regeneration with novel polyvinyl alcohol/chitosan scaffold and stem cells in canine spinal cord injury model: from development to animal studies / Y. M. Sakti [et al.] // *Asian Spine Journal*. – 2026.
 214. Jeon, S. R. Treatment of spinal cord injury with bone marrow-derived, cultured autologous mesenchymal stem cells / S. R. Jeon [et al.] // *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2010. – Vol. 7, № 3. – P. 316–322.
 215. Molecular Reconstruction of Nodes of Ranvier after Remyelination by Transplanted Olfactory Ensheathing Cells in the Demyelinated Spinal Cord / M. Sasaki [et al.] // *The Journal of Neuroscience*. – 2006. – T. 26, № 6. – C. 1803–1812.
 216. Electrospun Fibers for Spinal Cord Injury Research and Regeneration / N. J. Schaub [et al.] // *Journal of Neurotrauma*. – 2016. – T. 33, № 15. – C. 1405–1415.
 217. Schurch, B. Post-traumatic syringomyelia (cystic myelopathy): A prospective study of 449 patients with spinal cord injury / B. Schurch, W. Wichmann, A. B. Rossier // *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. – 1996. – Vol. 60, № 1. – P. 61–67.
 218. Stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: Taking poietic license / J. E. Schwob [et al.] // *Journal of Comparative Neurology*. – 2017. – T. 525, № 4. – C. 1034–1054.
 219. Multifunctional Self-Assembled Peptide Hydrogels for Biomedical Applications / M. Sedighi [et al.] // *Polymers*. – 2023. – T. 15, № 5. – C. 1160.
 220. Vascular response following implantation of the third-generation drug-eluting resorbable coronary magnesium scaffold: an intravascular imaging analysis of the BIOMAG-

- I first-in-human study / M. Seguchi [et al.] // *EuroIntervention*. – 2024. – T. 20, № 18. – C. e1173–e1183.
221. Electroconductive PEDOT nanoparticle integrated scaffolds for spinal cord tissue repair / A. Serafin [et al.] // *Biomaterials Research*. – 2022. – T. 26, № 1. – C. 63.
 222. Sezer, N. Chronic complications of spinal cord injury / N. Sezer, S. Akkuş, F. G. Uğurlu // *World Journal of Orthopaedics*. – 2015. – Vol. 6, № 1. – P. 24–33.
 223. Intraoperative Monitoring of Spinal Cord Perfusion using Ultrasound in an Ovine Model / E. Shaaya [et al.] // 2021 43rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC). – Mexico : IEEE, 2021. – P. 3813–3816.
 224. Animal models of spinal cord injury: a systematic review / M. Sharif-Alhoseini [et al.] // *Spinal Cord*. – 2017. – T. 55, № 8. – C. 714–721.
 225. Pharmacologic Therapy for Spinal Cord Injury / B. A. Sherrod [et al.] // *Clinical Spine Surgery*. – 2024. – T. 37, № 9. – C. 433–439.
 226. Shipley, M. M. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line / M. M. Shipley, C. A. Mangold, M. L. Szpara // *Journal of Visualized Experiments*. – 2016. – № 108. – P. 9–11.
 227. Shroff, G. Human embryonic stem cells in the treatment of patients with spinal cord injury / G. Shroff, R. Gupta // *Annals of Neurosciences*. – 2015. – Vol. 22, № 4. – P. 208–216.
 228. Siddall, P. J. Pain following spinal cord injury / P. J. Siddall, J. D. Loeser // *Spinal Cord*. – 2001. – Vol. 39, № 2. – P. 63–73.
 229. Silberstein, M. Cystic cord lesions and neurological deterioration in spinal cord injury: Operative considerations based on magnetic resonance imaging / M. Silberstein, O. Hennessy // *Paraplegia*. – 1992. – Vol. 30, № 9. – P. 661–668.
 230. Silva, D. Hydrogels as delivery systems for spinal cord injury regeneration / D. Silva, R. A. Sousa, A. J. Salgado // *Materials Today Bio*. – 2021. – Vol. 9. – P. 100093.
 231. Stem Cells Therapy for Spinal Cord Injury: An Overview of Clinical Trials / S. Silvestro [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – T. 21, № 2. – C. 659.
 232. In vitro Maintenance of Olfactory Mucosa: with Enriched Olfactory Ensheathing Cells / N. Singh [et al.] // *Journal of Stem Cell Research & Therapy*. – 2013. – T. 03, № 01.
 233. Hydrogel Scaffolds to Deliver Cell Therapies for Wound Healing / D. Sivaraj [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2021. – T. 9.
 234. Skaper, S. The Biology of Neurotrophins, Signalling Pathways, and Functional Peptide Mimetics of Neurotrophins and their Receptors / S. Skaper // *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*. – 2008. – Vol. 7, № 1. – P. 46–62.
 235. Skaper, S. D. Neurotrophic Factors: An Overview / S. D. Skaper ; ed. S. D. Skaper. – New York, NY : Springer, 2018. – P. 1–17.
 236. Clinical evaluation of the remineralizing potential of biomimetic scaffolds on enamel white spot lesions: A 12-month randomized controlled trial / E. M. Soliman [et al.] // *Journal of Dentistry*. – 2026. – T. 166. – C. 106303.
 237. Recombinant Adenoviruses for Delivery of Therapeutics Following Spinal Cord Injury / A. O. Sosnovtseva [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2022. – T. 12. – C. 777628.
 238. Isolation of Rat Olfactory Ensheathing Cells and Their Use in the Therapy of Posttraumatic Cysts of the Spinal Cord / O. V. Stepanova [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2018. – T. 165, № 1. – C. 132–135.
 239. Neurotrophin-3 enhances the effectiveness of cell therapy in chronic spinal cord injuries / O. V. Stepanova [et al.] // *Cell Technologies in Biology and Medicine*. – 2022. – T. 1. – C. 3–8.
 240. Prospects for the use of olfactory mucosa cells in bioprinting for the treatment of spinal cord injuries / O. V. Stepanova [et al.] // *World Journal of Clinical Cases*. – 2023. – T. 11, № 2. – C. 322–331.

241. pH Modification of High-Concentrated Collagen Bioinks as a Factor Affecting Cell Viability, Mechanical Properties, and Printability / J. Stepanovska [et al.] // *Gels*. – 2021. – T. 7, № 4. – C. 252.
242. 5-Year Outcomes After Bioresorbable Coronary Scaffolds Implanted With Improved Technique / G. W. Stone [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2023. – T. 82, № 3. – C. 183–195.
243. Electrospinning and electrospun polysaccharide-based nanofiber membranes: A review / W. Su [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2024. – T. 263. – C. 130335.
244. Optimizing fibrin hydrogel toward effective neural progenitor cell delivery in spinal cord injury / T. Sudhadevi [et al.] // *Biomedical Materials*. – 2022. – T. 17, № 1. – C. 014102.
245. 3D printing collagen/chitosan scaffold ameliorated axon regeneration and neurological recovery after spinal cord injury / Y. Sun [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. – 2019.
246. Genetically engineered electrospinning contributes to spinal cord injury repair by regulating the immune microenvironment / Y. Sun [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2024. – T. 12. – C. 1415527.
247. Recent advance in bioactive hydrogels for repairing spinal cord injury: material design, biofunctional regulation, and applications / Z. Sun [et al.] // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2023. – T. 21, № 1. – C. 238.
248. Bioactive Peptide Hydrogel Scaffold with High Fluidity, Thermosensitivity, and Neurotropism in 3D Spatial Structure for Promoted Repair of Spinal Cord Injury / Z. Sun [et al.] // *Small*. – 2025. – T. 21, № 2. – C. 2406990.
249. Swanson, P. Portals of Viral Entry into the Central Nervous System / P. Swanson, D. McGavern // *The Blood-Brain Barrier in Health and Disease, Volume Two*. – 2015. – № October. – P. 23–47.
250. Peripherally delivered Adeno-associated viral vectors for spinal cord injury repair / J. D. Sydney-Smith [et al.] // *Experimental Neurology*. – 2022. – T. 348. – C. 113945.
251. Szpirer, C. Rat models of human diseases and related phenotypes: a systematic inventory of the causative genes / C. Szpirer // *Journal of Biomedical Science*. – 2020. – Vol. 27, № 1. – P. 84.
252. Transplantation of autologous olfactory ensheathing cells in complete human spinal cord injury / P. Tabakow [et al.] // *Cell Transplantation*. – 2013. – T. 22. – C. 1591–1612.
253. 3D and 4D printing of polymers for tissue engineering applications / D. G. Tamay [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2019. – T. 7, № JUL.
254. Isolation of putative stem cells present in human adult olfactory mucosa / T. Tanos [et al.] // *PLOS ONE*. – 2017. – T. 12, № 7. – C. e0181151.
255. Temple, S. Advancing cell therapy for neurodegenerative diseases / S. Temple // *Cell Stem Cell*. – 2023. – Vol. 30, № 5. – P. 512–529.
256. Evidence of axon connectivity across a spinal cord transection in rats treated with epidural stimulation and motor training combined with olfactory ensheathing cell transplantation / M. A. Thornton [et al.] // *Experimental Neurology*. – 2018. – T. 309. – C. 119–133.
257. Tran, A. P. The Biology of Regeneration Failure and Success After Spinal Cord Injury / A. P. Tran, P. M. Warren, J. Silver // *Physiological Reviews*. – 2018. – Vol. 98, № 2. – P. 881–917.
258. Treatment of spinal cord injury by an advanced cell transplantation technology using brain-derived neurotrophic factor-transfected mesenchymal stem cell spheroids / S. Uchida [et al.] // *Biomaterials*. – 2016. – T. 109. – C. 1–11.

259. Intrathecal administration of autologous mesenchymal stromal cells for spinal cord injury: Safety and efficacy of the 100/3 guideline / J. Vaquero [et al.] // *Cytherapy*. – 2018. – T. 20, № 6. – C. 806–819.
260. Biocompatible adipose extracellular matrix and reduced graphene oxide nanocomposite for tissue engineering applications / K. Verstappen [et al.] // *Materials Today Bio*. – 2024. – T. 26. – C. 101059.
261. Vieira-da-Silva, B. B. Resazurin Reduction-Based Assays Revisited: Guidelines for Accurate Reporting of Relative Differences on Metabolic Status / B. Vieira-da-Silva, M. A. R. Castanho // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28, № 5. – P. 2283.
262. Survival and Migration of Rat Olfactory Ensheathing Cells after Transplantation into Posttraumatic Cysts in the Spinal Cord / A. D. Voronova [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2018. – T. 166, № 1. – C. 118–123.
263. Wall, B. Y. P. D., Werman R. THE PHYSIOLOGY AND ANATOMY OF LONG RANGING AFFERENT FIBRES WITHIN THE SPINAL CORD / B. Y. P. Wall // *Glass*. – 1976. – P. 321–334.
264. Functional hydrogels as therapeutic tools for spinal cord injury: New perspectives on immunopharmacological interventions / C. M. Walsh [et al.] // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2022. – T. 234. – C. 108043.
265. Mechanisms underlying the cell-matrixed nerve grafts repairing peripheral nerve defects / S. Wang [et al.] // *Bioactive Materials*. – 2024. – T. 31. – C. 563–577.
266. Brain-derived Neurotrophic Factor Promotes the Migration of Olfactory Ensheathing Cells Through TRPC Channels: BDNF Promotes OEC Migration Through TRPCs / Y. Wang [et al.] // *Glia*. – 2016. – T. 64, № 12. – C. 2154–2165.
267. Multimodal therapy strategies based on hydrogels for the repair of spinal cord injury / Y. Wang [et al.] // *Military Medical Research*. – 2022. – T. 9, № 1. – C. 16.
268. Sustained intraspinal delivery of neurotrophic factor encapsulated in biodegradable nanoparticles following contusive spinal cord injury / Y. C. Wang [et al.] // *Biomaterials*. – 2008. – T. 29, № 34. – C. 4546–4553.
269. Weishaupt, N. BDNF: The career of a multifaceted neurotrophin in spinal cord injury / N. Weishaupt, A. Blesch, K. Fouad // *Experimental Neurology*. – 2012. – Vol. 238, № 2. – P. 254–264.
270. Wang, X. Transplantation of olfactory ensheathing cells promotes the therapeutic effect of neural stem cells on spinal cord injury by inhibiting necroptosis / X. Wang [et al.] // *Aging*. – 2021. – Vol. 13, № 6. – P. 9056–9070.
271. Two-Dimensional-Germanium Phosphide-Reinforced Conductive and Biodegradable Hydrogel Scaffolds Enhance Spinal Cord Injury Repair / C. Xu [et al.] // *Advanced Functional Materials*. – 2021. – T. 31, № 41. – C. 2104440.
272. Anisotropic scaffolds for peripheral nerve and spinal cord regeneration / W. Xue [et al.] // *Bioactive Materials*. – 2021. – T. 6, № 11. – C. 4141–4160.
273. Yamanaka, S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges / S. Yamanaka // *Cell Stem Cell*. – 2020. – Vol. 27, № 4. – P. 523–531.
274. A conductive supramolecular hydrogel creates ideal endogenous niches to promote spinal cord injury repair / B. Yang [et al.] // *Bioactive Materials*. – 2022. – T. 15. – C. 103–119.
275. Preclinical evaluation of aligned fibrin nanofibre hydrogels in a non-human primate model of spinal cord injury: A pilot study / J. Yang [et al.] // *Biomaterials Translational*. – 2025. – T. 6, № 3. – C. 334–344.
276. Small molecules combined with collagen hydrogel direct neurogenesis and migration of neural stem cells after spinal cord injury / Y. Yang [et al.] // *Biomaterials*. – 2021. – T. 269. – C. 120479.

277. Electroacupuncture facilitates the integration of a grafted TrkC -modified mesenchymal stem cell-derived neural network into transected spinal cord in rats via increasing neurotrophin-3 / Y. Yang [et al.] // *CNS Neuroscience & Therapeutics*. – 2021. – T. 27, № 7. – C. 776–791.
278. Self-Assembling Peptide RADA16: A Promising Scaffold for Tissue Engineering and Regenerative Medicine / X. Yao [et al.] // *Nanomedicine*. – 2023. – T. 18, № 19. – C. 1305–1326.
279. Hydrogel and Nanomedicine-Based Multimodal Therapeutic Strategies for Spinal Cord Injury / P. Yin [et al.] // *Small Methods*. – 2024. – T. 8, № 1. – C. 2301173.
280. Current Advances in 3D Bioprinting Technology and Its Applications for Tissue Engineering / J. Yu [et al.] // *Polymers*. – 2020. – T. 12, № 12. – C. 2958.
281. Application of fibrin-based hydrogels for nerve protection and regeneration after spinal cord injury / Z. Yu [et al.] // *Journal of Biological Engineering*. – 2020. – T. 14, № 1. – C. 22.
282. Functional Bioink and 3D Bioprinting Tissue Scaffold Applications for Spinal Cord Injury / S. Yücer [et al.] // *Annals of Biomedical Engineering*. – 2026. – T. 54, № 2. – C. 353–380.
283. The p75 Neurotrophin Receptor Facilitates TrkB Signaling and Function in Rat Hippocampal Neurons / J. P. Zanin [et al.] // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2019. – T. 13.
284. Zaszczynska, A. A Comprehensive Review of Electrospun Fibers, 3D-Printed Scaffolds, and Hydrogels for Cancer Therapies / A. Zaszczynska, B. Niemczyk-Soczynska, P. Sajkiewicz // *Polymers*. – 2022. – Vol. 14, № 23. – P. 5278.
285. Novel innovations in cell and gene therapies for spinal cord injury / M.-M. Zavvarian [et al.] // *F1000Research*. – 2020. – T. 9. – C. 279.
286. Precise delivery into chronic spinal cord injury syringomyelic cysts with magnetic nanoparticles MRI visualization / C. Zhang [et al.] // *Medical Science Monitor*. – 2015. – T. 21. – C. 3179–3185.
287. A cocktail hydrogel promoting the functional interneurons regeneration of human neural progenitor cells for brain injury therapy / D. Zhang [et al.] // *Journal of Advanced Research*. – 2026. – T. 81. – C. 657–672.
288. Role of Matrix Metalloproteinases and Therapeutic Benefits of Their Inhibition in Spinal Cord Injury / H. Zhang [et al.] // *Neurotherapeutics*. – 2011. – T. 8, № 2. – C. 206–220.
289. Chitosan scaffolds induce human dental pulp stem cells to neural differentiation: potential roles for spinal cord injury therapy / J. Zhang [et al.] // *Cell and Tissue Research*. – 2016. – T. 366, № 1. – C. 129–142.
290. Intravenous transplantation of olfactory bulb ensheathing cells for a spinal cord hemisection injury rat model / L. Zhang [et al.] // *Cell Transplantation*. – 2019. – T. 28, № 12. – C. 1585–1602.
291. Potential therapeutic effect of olfactory ensheathing cells in neurological diseases: neurodegenerative diseases and peripheral nerve injuries / L. Zhang [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – T. 14. – C. 1280186.
292. Combining therapeutic strategies with rehabilitation improves motor recovery in animal models of spinal cord injury: A systematic review and meta-analysis / L. Zhang [et al.] // *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*. – 2025. – T. 68, № 3. – C. 101911.
293. A 3D Fiber-Hydrogel Based Non-Viral Gene Delivery Platform Reveals that microRNAs Promote Axon Regeneration and Enhance Functional Recovery Following Spinal Cord Injury / N. Zhang [et al.] // *Advanced Science*. – 2021. – T. 8, № 15. – C. 2100805.
294. Co-transplantation of neural stem cells and NT-3-overexpressing schwann cells in transected spinal cord / X. Zhang [et al.] // *Journal of Neurotrauma*. – 2007. – T. 24, № 12.

295. Hyaluronic acid-fibrin interpenetrating double network hydrogel prepared in situ by orthogonal disulfide cross-linking reaction for biomedical applications / Y. Zhang [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2016. – T. 38. – C. 23–32.
296. Optimized, visible light-induced crosslinkable hybrid gelatin/hyaluronic acid scaffold promotes complete spinal cord injury repair / X. Zhao [et al.] // *Biomedical Materials*. – 2022. – T. 17, № 2. – C. 024104.
297. Olfactory ensheathing cell transplantation inhibits P2X4 receptor overexpression in spinal cord injury rats with neuropathic pain / Z. Zheng [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 2017. – T. 651. – C. 171–176.
298. Construction methods and biomedical applications of PVA-based hydrogels / Y. Zhong [et al.] // *Frontiers in Chemistry*. – 2024. – T. 12. – C. 1376799.
299. Polycaprolactone electrospun fiber scaffold loaded with iPSCs-NSCs and ASCs as a novel tissue engineering scaffold for the treatment of spinal cord injury / X. Zhou [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2018. – T. 13. – C. 6265–6277.
300. Cell-based and stem-cell-based treatments for spinal cord injury: evidence from clinical trials / C. M. Zipser [et al.] // *The Lancet Neurology*. – 2022. – T. 21, № 7. – C. 659–670.
301. Functional Recovery of Chronic Paraplegic Pigs After Autologous Transplantation of Bone Marrow Stromal Cells / M. Zurita [et al.] // *Transplantation*. – 2008. – T. 86, № 6. – C. 845–853.