

## ОБЗОРЫ

DOI: 10.23868/201703001

**СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ ПОСЛЕ ТРАВМЫ: ПЕРСПЕКТИВЫ ГЕННОЙ И КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ**

М.Н. Карагяур<sup>1,2</sup>, П.И. Макаревич<sup>1,2</sup>, Е.К. Шевченко<sup>1,2</sup>, Д.В. Стамбольский<sup>1</sup>,  
Н.И. Калинина<sup>1</sup>, Е.В. Парфёнова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт экспериментальной кардиологии, Российский кардиологический научно-производственный комплекс, Москва, Россия

**Modern approaches to peripheral nerve regeneration after injury: the prospects of gene and cell therapy**

M.N. Karagyaour<sup>1,2</sup>, P.I. Makarevich<sup>1,2</sup>, E.K. Shevchenko<sup>1,2</sup>, D.V. Stambolsky<sup>2</sup>, N.I. Kalinina<sup>1</sup>, Ye.V. Parfyonova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Institute of Experimental Cardiology, Russian Cardiology Research and Production Complex, Moscow, Russia

Врожденный потенциал периферических нервов к регенерации после повреждения ограничен, что затрудняет восстановление нерва при тяжелой травме и зачастую приводит к стойкой утрате трудоспособности. Существующие подходы к терапии поврежденных нервов не способны поддерживать в течение необходимого времени выживание нервных клеток и рост нейритов — ключевых факторов регенерации нервов. Этот недостаток может быть компенсирован использованием геннотерапевтических и клеточных препаратов, обеспечивающих в области повреждения повышение уровня ключевых регуляторов роста нервов — нейротрофических факторов и белков внеклеточного матрикса. В данной работе приведены краткие сведения о механизмах и основных этапах регенерации периферической нервной системы. Проведен обзор современных подходов к индукции восстановительного процесса, основанных на использовании генной и клеточной терапии. Учитывая сложность и многофакторность механизмов, ответственных за восстановление структуры и функции нервов, обосновывается перспективность комбинированных воздействий, включающих сочетание генных, клеточных и тканеинженерных технологий.

**Ключевые слова:** регенерация нерва, генная терапия, клеточная терапия, нейротрофические факторы, нейроны, шванновские клетки, клеточный пласт.

**Введение**

Травмы нервных стволов и сплетений являются самой частой причиной как временной, так и стойкой утраты трудоспособности [1, 2] в связи с важной функцией периферической нервной системы (ПНС) и ее ограниченным потенциалом к восстановлению после повреждения [2].

Существующие методы терапии поврежденных нервных стволов позволяют добиваться восстановления после легкой травмы периферических нервов, однако при тяжелых, застарелых или сочетанных травмах (особенно с высоким уровнем повреждения) эти подходы оказываются бессильны.

В физиологических условиях нейроны ПНС постоянно находятся во взаимных трофических отношениях с органами-мишенями и своими сателлитными клетками (шванновские клетки, или леммоциты). Контакт нервного волокна с иннервируемым органом и окружающими шванновскими клетками поддерживает последние в дифференцированном, нормаль-

Natural potency of peripheral nerves to regenerate after injury is limited by time and ability of neurons to recuperate. It results in loss of function and disability of impaired subject. Existing therapeutic approaches are not capable to support nerve survival and neurite outgrowth for a sufficient period of time. This problem can be solved by application of novel gene therapeutic drugs and cell-based approaches. Present review focuses on mechanisms of nerve repair and key stages of peripheral nerve system regeneration after injury. The study provides a systematic overview of biologically active molecules involved and gives a prospect of new methods in treatment of injured nerves.

**Keywords:** nerve regeneration, gene therapy, cell therapy, neurotrophic factors, neuron, Schwann cells, cell sheet.

ном трофическом и функциональном состоянии. В то же время сами шванновские клетки и иннервируемые органы продуцируют биологически активные молекулы, «питающие» нейроны (в т.ч. и нейротрофические факторы), и за счет контактного взаимодействия поддерживают их покоящийся, нерегенерирующий фенотип, препятствуя росту и ветвлению нервных волокон. Нейротрофические факторы, связываясь с рецепторами на поверхности нейрита, формируют комплекс, который эндоцитируется и ретроградным аксональным транспортом доставляется в тело нейрона. Активация рецепторов запускает сигнальные каскады, поддерживающие выживание и функционирование нейрона. Разрыв нервных волокон нарушает трофику как денервированных органов и тканей, так и самих нейронов, что является основным сигналом к запуску регенеративных процессов. В поврежденных нейронах и денервированных тканях активизируется экспрессия «генов репарации» [3], среди которых особо нужно выделить гены

e-mail: darth\_max@mail.ru

факторов роста и их рецепторов. Регенерирующие нейроны на конце поврежденного аксона формируют особую структуру — конус роста, который на своей поверхности несет большое количество рецепторов к белковым молекулам, управляющим ростом и навигацией аксона. К ним относят факторы роста (в т.ч. нейротрофические и ангиогенные), белки матрикса и навигационные молекулы. Формируя фило- и ламеллоподии, конус роста «ощупывает» окружающее пространство, и, если аттрактивный сигнал преобладает над репеллентным, это приводит к удлинению регенерирующего нейрита [3]. Шванновские клетки дистального фрагмента нерва после утраты контакта с нервным волокном приобретают премиелинизирующий (пролиферирующий) фенотип, делятся и мигрируют в область повреждения [3, 4]. Там леммоциты фагоцитируют остаточный миелин, а затем выстраиваются по ходу разрушенных нервных волокон и, активно экспрессируя трофические факторы (NGF, BDNF, VEGF, HGF, IGF-I, GDNF и др.) [3, 4], привлекают в освободившийся соединительнотканый чехол отростки уцелевших волокон проксимального отрезка нерва. Вступая в контакт с растущим нейритом, шванновские клетки покрывают его миелином, способствуя формированию в миелинизируемых аксонах основных функциональных доменов — перехватов Ранвье [5]. Когда нейрит достигает органа-мишени, то происходит остановка его роста и начинается синаптогенез, т.е. формирование и созревание пре- и постсинапса [6].

Однако без внешней стимуляции всплеск продукции нейротрофических факторов после травмы носит непродолжительный характер, и через месяц процесс регенерации нерва, как правило, прекращается [3]. За это время даже в самых благоприятных условиях нейриты успевают прорасти не более, чем на несколько сантиметров (при средней скорости роста 0,5–1,0 мм/сут.), и, если к этому моменту нервные волокна не успели сформировать контакты со своими мишенями или повреждение нерва произошло на высоком уровне, то нейриты останавливают свой рост, а нейроны погибают или атрофируются из-за недостатка трофики.

Для восполнения недостатка трофических воздействий может быть использовано введение экзогенных нейротрофических факторов роста в виде белков, их генов, встроенных в векторные конструкции (плазмиды или вирусы) или в виде продуцирующих эти факторы клеток, в том числе и генетически модифицированных.

#### **Биологические свойства факторов роста, стимулирующих регенерацию нерва**

Основные факторы роста, участвующие в восстановлении нерва и являющиеся наиболее перспективными «инструментами» для стимуляции этого процесса, в том числе при использовании в клинической практике, можно разделить на 4 группы: нейротрофические факторы, факторы роста, протеазы и матриксные белки.

Группа нейротрофических факторов включает 3 основных семейства: нейротрофины (NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5), глиальные нейротрофические факторы (GDNF и Art) и нейропозитические цитокины (CNTF и IL-6). Они играют ключевую роль в развитии, пластичности и регенерации структур центральной и периферической нервных систем. Рецепторы

нейротрофических факторов локализуются на поверхности нейронов, шванновских клеток и эндотелиоцитов. Связывание нейротрофических факторов с соответствующими рецепторами активирует сигнальные пути RAS/ERK, PI3K, PLC- $\gamma$ , SNT и JAK-STAT, стимулируя рост нейритов, формирование моторной концевой пластинки, а через увеличение экспрессии антиапоптогенных (Bcl-2) и подавление экспрессии проапоптогенных (Forkhead1 и Bax) факторов транскрипции поддерживает выживание поврежденных нейронов [7, 8].

Нейротрофические факторы обладают избирательностью в поддержании жизнедеятельности нервных клеток, что, по-видимому, связано с различиями в распределении рецепторов на мембране нейронов разных типов. Так, NGF поддерживает выживание и рост нейритов чувствительных, симпатических и холинергических нейронов, в то время как BDNF проявляет свою активность в отношении моторных, симпатических, дофаминергических и ганглиозных нейронов [7], а GDNF является мощным нейропротектором моторных и симпатических нейронов и обеспечивает элонгацию чувствительных и симпатических нейритов [7].

Помимо нейротрофинов существуют факторы роста других модальностей, которые, тем не менее, проявляют нейротрофическую активность. К ним относят *семейства ангиогенных факторов*: факторы роста фибробластов (FGFs), факторы роста эндотелия сосудов (VEGFs).

Семейство FGFs человека включает белки, кодируемые 22 различными генами: FGF1-FGF14, FGF16-FGF23 [9]. FGFs экспрессируются во многих органах и тканях, где действуют интра- и паракринно, а FGF2 и FGF1 были обнаружены в ЦНС. Уровень их экспрессии увеличивается после травмы и ишемии ЦНС. FGFs реализуют свои биологические эффекты на нейроны через связывание с тирозинкиназными рецепторами FGFR1-3 и последующую активацию RAS/ERK, PI3K, PLC- $\gamma$  сигнальных путей [10], что оказывает протективное действие на нейроны, стимулирует их адгезию к матриксу и рост нейритов. В частности, FGF2 обладает протективным действием по отношению к зрелым чувствительным и моторным нейронам [9].

К семейству факторов роста эндотелия сосудов (VEGFs) относят, по меньшей мере, 7 представителей: VEGF-A-VEGF-E и PLGF-1, -2. Представители данного семейства стимулируют регенерацию нерва как напрямую (нейротрофическая активность), так и опосредованно (через стимуляцию ангиогенеза) [11, 12]. Для VEGF известно 3 тирозинкиназных рецептора, причем в нервной системе на телах и конусах роста нейронов, а также на шванновских клетках был обнаружен только рецептор Flk-1 (VEGFR-2) [11, 13, 14], активация которого запускает PI3K, PLC- $\gamma$  и RAS/ERK сигнальные пути. Помимо этого, VEGF конкурентно связывается с другими рецепторами на поверхности нейритов — нейропелинами (NP1 и NP2), препятствуя их взаимодействию с семафоринами Sema3A, 3C, 3D и 3F [14] и ограждая тем самым конусы роста аксонов от подавляющей активности семафоринов. Эффект связывания VEGF с рецепторами Flk-1 и NP1 проявляется в увеличении выживаемости чувствительных, моторных и симпатических нейронов, шванновских клеток [12, 13], а также в стимуляции пролиферации и миграции последних [11, 14].

Кроме того, нейротрофическая активность показана для белков из семейств эпидермального фактора роста (EGF) и инсулиноподобного фактора роста (IGF) [7, 15, 16].

*Протеазы, стимулирующие регенерацию нервных волокон*

К растворимым белковым факторам, способствующим восстановлению периферического нерва, относятся и протеолитические ферменты. Они очищают соединительнотканый «чехол» поврежденного нерва от фибрина и ингибирующих матриксных белков: фибрина, F-спондина, белков миелина [17], а также высвобождают из матрикса и активируют иммобилизованные в нем факторы роста [18]. Такими свойствами обладают урокиназный и тканевой активаторы плазминогена (uPA и tPA), сам плазминоген, а также матриксные металлопротеиназы. На поверхности конуса роста аксона, шванновских клеток и эндотелиоцитов экспрессируются рецепторы, концентрирующие данные ферменты в точке роста, что позволяет осуществлять более точный и эффективный протеолиз локально по ходу роста нерва или снабжающего его сосуда [18, 19]. Также через эти рецепторы (uPAR, AlItR, PAR-1) могут быть активированы Src, FAK-киназы, RAS/ERK и JAK/STAT сигнальные пути, контролирующие миграцию, адгезию, дифференцировку, выживаемость, пролиферацию и апоптоз шванновских клеток и эндотелиоцитов, а также продвижение конуса роста [20].

*Белки внеклеточного матрикса, стимулирующие регенерацию нервов*

Помимо растворимых факторов роста возможность успешной регенерации нервных волокон определяется наличием подходящего внеклеточного матрикса и соотношением аттрактивных и репеллентных сигналов. В процессе развития периферической нервной системы шванновские клетки продуцируют коллаген IV типа, ламинины, энтактин/нидоген и гепаран-сульфат протеогликаны, а фибробласты — коллагены I и III типов, а также фибронектин [21]. Ламинины и фибронектин являются основными внеклеточными матриксами, стимулирующими рост нейритов *in vivo*. Для взаимодействия с ламинином на поверхности нейронов имеются интегриновые рецепторы  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$  и  $\alpha 6\beta 1$ , а интегрины  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 1$  и  $\alpha V\beta 8$  служат для связывания с фибронектином. Связывание интегринов конуса роста с ламинином или фибронектином является сигналом к перестройке цитоскелета и элонгации аксона [22].

Помимо матриксов-стимуляторов роста нейритов существуют матриксы-ингибиторы (протеогликаны внеклеточного матрикса и фибрин), которые в физиологических условиях ограничивают формирование коллатералей и нежелательный рост аксона, а после травмы тормозят регенерацию нерва [23, 24]. Уменьшение влияния данных матриксов (например, за счет локального протеолиза) способствует лучшему росту и регенерации поврежденных аксонов.

Процесс регенерации нервных волокон является сложным и многофакторным, и зачастую ресурсов самого организма не хватает на эффективное его завершение, особенно при тяжелых, комбинированных и высоких (по уровню повреждения) травмах. Без

дополнительного терапевтического или хирургического вмешательства улучшить прогноз при таких травмах практически невозможно. Основные подходы к стимуляции восстановления нерва изложены ниже. В данном обзоре мы не касаемся традиционных хирургических методов лечения травм периферических нервов, которые подробно проанализированы в других обзорах [25–27].

**Перспективные подходы к регенерации поврежденного периферического нерва**

*Особенности генной терапии для регенерации нерва*

Экзогенное введение нейротрофических факторов в период острой травмы периферического нерва позволяет увеличить количество выживших нейронов и ускорить регенерацию, что в конечном итоге приводит к восстановлению структуры и функции поврежденного нерва [28]. Однако относительно высокая стоимость производства и очистки рекомбинантных белков, кратковременное их действие и необходимость многократного введения в высоких дозах из-за их нестабильности ограничивает применение данных препаратов в клинической практике. Помимо этого, показано развитие негативных эффектов нейротрофинов при локальном введении для стимуляции регенерации нервов. Основным из них считают чрезмерное ветвление нейритов регенерирующего нервного волокна, что может приводить к формированию невром, множественной иннервации мышечных волокон и неправильному прорастанию нерва [29]. Для решения этой проблемы исследователи предлагают использовать селективные ингибиторы каскада PI3K, который контролирует ветвление нервного волокна, при сохранении активности RAS/ERK, обеспечивающего выживание нейронов и элонгацию аксонов *in vitro* [29–31]. К сожалению, мы не располагаем данными о проведении аналогичных исследований *in vivo*.

Альтернативой использованию рекомбинантных белков является генная терапия вирусными или плазмидными конструкциями, несущими гены нейротрофинов (рис. 1). Генная терапия, прежде всего, способствует пролонгированной экспрессии терапевтического фактора, что позволяет при необходимости специфично изменять активность определенного типа клеток. На сегодняшний день существует множество исследований, посвященных использованию вирусных векторов с генами факторов роста для терапии травмы нерва. Свое применение в этой области нашли рекомбинантные адено-, ленти-, аденоассоциированные вирусы (AAB) и векторы на основе вируса простого герпеса (ВПГ). При помощи вирусных конструкций в ткани поврежденного нерва доставляли гены различных нейротрофических, ангиогенных и морфогенных факторов и факторов транскрипции: эритропоэтина, NGF, GDNF, BDNF, HGF, VEGF, BMP-7, Vcl-2 [32, 33].

Генная модификация непосредственно нейронов направлена на повышение выживаемости этих клеток в поврежденной ткани, а также на стимуляцию чувствительности к факторам роста и хемоаттрактантам. С помощью вирусных векторов в нейроны доставляют гены различных транскрипционных факторов, например, антиапоптотических, или гены рецепторов к факторам роста. Для доставки трансгена в тела нейронов могут быть использованы век-

торы на основе ВПГ, AAV2, аденовирусов и лентивирусов [32], однако клиническое применение ВПГ и аденовирусов ограничено довольно выраженной вирус-опосредованной токсичностью для организма. В то же время рекомбинантные лентивирусы и AAV2 лишены этого недостатка и способны обеспечить достаточно продолжительную экспрессию трансгена [34]. Безопасность векторов на основе AAV 2-го серотипа была подтверждена рядом клинических исследований, в том числе у больных болезнью Альцгеймера.

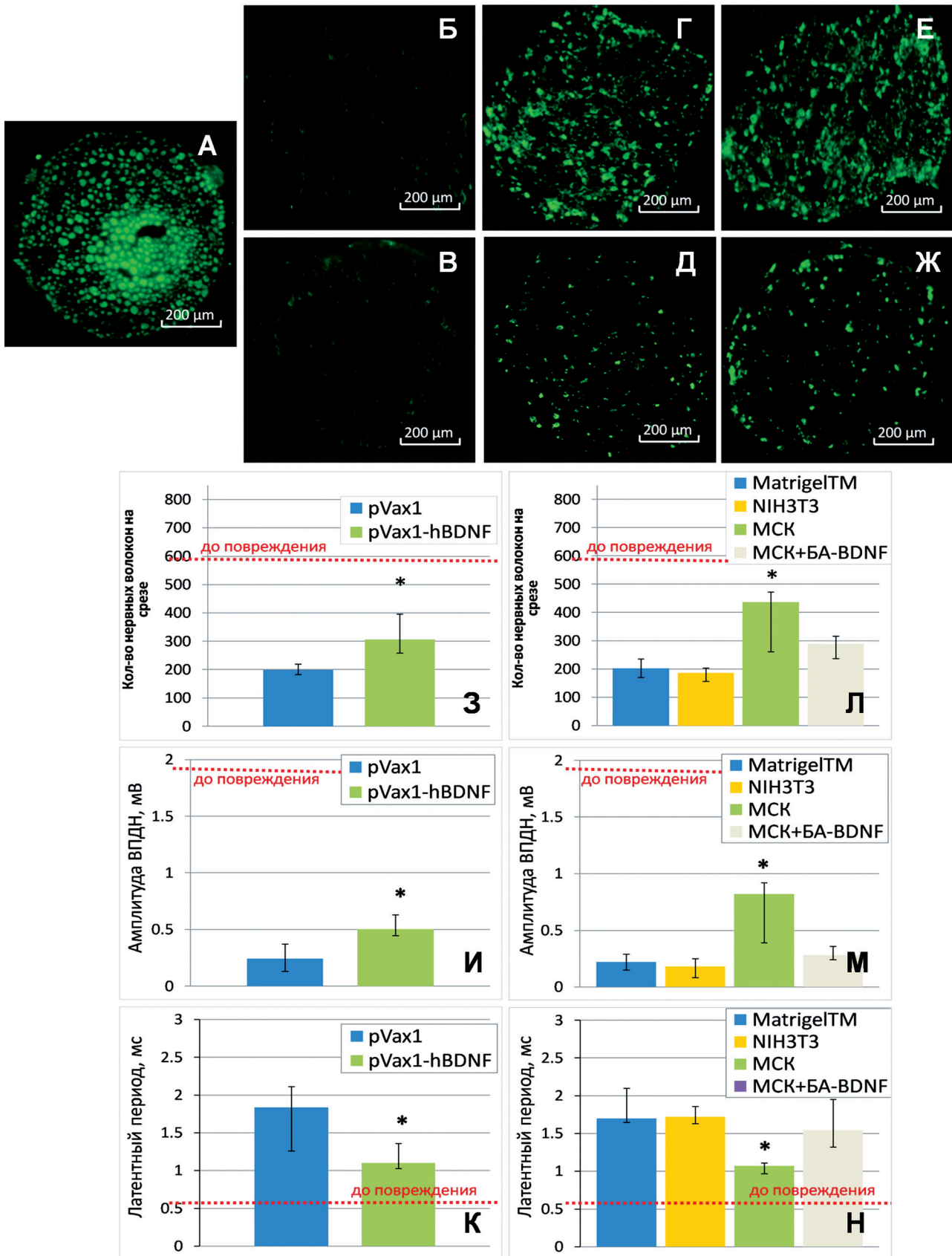
Помимо доставки генов в тела нейронов AAV2, аденовирусы и лентивирусы могут быть использованы для генетической модификации шванновских клеток — основных продуцентов биологически активных молекул при восстановлении нерва. С помощью вирусных векторов в эти клетки можно доставлять гены нейротрофических и ангиогенных белков, компонентов внеклеточного матрикса и других секреторных факторов, повышая тем самым паракринную активность леммоцитов и их регенеративный потенциал.

Эффективность генной терапии поврежденных нервов вирусными конструкциями была подтверждена экспериментально: выживало большее количество нейронов, нервные волокна быстрее восстанавливались и миелинизировались, а мышцы меньше подвергались атрофии, и в них активнее шел ангиогенез [32, 33]. Многие из опробованных биологически активных молекул не являлись классическими нейротрофическими факторами, но, запуская смежные сигнальные каскады и воздействуя на отдельные этапы регенерации нерва, в итоге привели к восстановлению его функции. Важно отметить, что вирусные конструкции обеспечивают успешную регенерацию нерва даже при периферической доставке, например, инъекции в область проекции поврежденных нервов (в подушечку стопы или внутримышечно при повреждении седалищного нерва [35, 36], а также в стекловидное тело при повреждении зрительного нерва [37]).

Тем не менее, использование вирусных векторов для доставки в клетки человека оставляет открытым вопрос безопасности такой терапии (попадание вирусного вектора в нецелевые клетки и ткани, возможное встраивание генома вируса в геном человека, иммунный ответ и аллергические реакции), поэтому исследуют альтернативные методы доставки кДНК в клетки поврежденного периферического нерва. Прежде всего это касается плазмидной ДНК, безопасностью которой подтверждена в большом количестве клинических работ [38, 39]. Так, было показано эффективное восстановление седалищного нерва крысы после соединения концов травмированного нерва при помощи аутонервной вставки и последующего введения плазмиды, кодирующей VEGF и FGF2, в проксимальный и дистальный отрезки нерва, а также в саму вставку [40, 41]. На модели травмы зрительного нерва у крыс также удалось добиться значительного ускорения его восстановления при нанесении на поперечный срез трансплантата, соединяющего концы зрительного нерва, раствора плазмиды pcDNA3 с геном GDNF, совместно с ее введением в стекловидное тело [42]. Для восстановления моторных нервных волокон, по нашему мнению, более удобным и предпочтительным способом доставки является внутримышечная инъекция генетической конструкции. В таком случае мышечные волокна благодаря усиленной продукции нейротрофических факторов не только стимулируют выживание поврежденных нейронов, но и, создавая градиент концентрации нейротрофинов в тканях, обуславливают аттракцию регенерирующих аксонов. Так, в наших работах плазмиды, несущая ген BDNF, при введении в денервированную мышцу стимулировала восстановление структуры (рост большего числа аксонов) и проводимости (восстановление скорости и амплитуды вызванных потенциалов действия нерва, ВПДН) малоберцового нерва мышцы после травматического (раздавливание и растяжение) (рис. 2) и ишемического повреждения (по сравнению с мышцами контрольной группы) [43].



**Рис. 1.** Основные подходы к регенерации периферического нерва после травмы с помощью генной и клеточной терапии



**Рис. 2.** Восстановление структуры и проводимости травмированного общего малоберцового нерва под действием генетических конструкций и клеточных препаратов (собственные данные):

А–Ж – общий малоберцовый нерв (дистальное места травмы) через 4 сут. после повреждения:  
 А – до повреждения; Б – введение pVax1; В – pVax1-hBDN; Г – MatrigelTM (контроль); Д – NIH3T3; Е – ММСК;  
 Ж – ММСК + БА-BDNF (блокирующие антитела к BDNF). Иммунофлуоресцентная микроскопия криосрезов. Зеленое окрашивание – белок нейрофиламентов NF200. Ув. × 200.

Л–К – восстановление структуры и проводимости нерва под действием клеточных препаратов (Л–Н) [подробнее – 49] и плазмид, кодирующих факторы роста (З–К) [подробнее – 33,43]. \* –  $p < 0,01$ ,  $n = 10-15$

Известно, что амплитуда ВПДН прямо пропорциональна количеству функциональных нервных волокон, а латентный период (время проведения ВПДН по нерву), характеризующий толщину безмиелиновых волокон и степень миелинизации миелинизированных, обратно пропорционален скорости проведения ВПДН по нерву.

Существуют данные о лучшем выживании нейронов и более полном восстановлении структуры и функции нерва у мышей при использовании комбинации плазмид, кодирующих разные факторы роста, чем при использовании этих плазмид по-отдельности [44]. По-видимому, это обусловлено разной чувствительностью отдельных компонентов периферического нерва (нервные волокна разной модальности, леммоциты, фибробласты и эндотелиоциты) к отдельным факторам роста и необходимостью переключения между «репертуарами» регуляторных молекул в ходе смены различных этапов регенерации нерва [7, 8]. На сегодняшний день не существует ни одного завершеного клинического испытания геннотерапевтического препарата для восстановления поврежденного нерва, которое позволило бы однозначно судить об эффективности или неэффективности «моноклонной» плазмидной терапии для восстановления травмированного нерва. Однако эффективность монокомпонентных плазмидных препаратов для стимуляции терапевтического ангиогенеза и регенерации ткани в клинических исследованиях уже оказалась ниже ожидаемой даже для таких мощных митогенов и общепризнанных стимуляторов регенерации, как VEGF165 и bFGF [45, 46]. Вероятно, это связано с многофакторностью и многоэтапностью регенераторных процессов. Судя по всему, в регенеративной медицине ближайшего будущего будет наблюдаться переход от монотерапии к использованию комбинации различных биологически активных веществ или их генов, стимулирующих разные этапы и стороны процесса регенерации. С этой точки зрения наиболее перспективными комбинациями препаратов для генной терапии поврежденного нерва могли бы быть комбинации генов нескольких нейротрофических факторов, нейротрофического и ангиогенного факторов, нейротрофического фактора и протеазы.

Несмотря на перспективность применения прямой генной терапии для стимуляции процессов регенерации в случае острых повреждений тканей, недостатком ее является временная задержка в экспрессии кДНК факторов роста после прямых инъекций в ткань, что обусловлено необходимостью доставки вирусной или плазмидной ДНК в ядро клетки и накоплением белкового продукта в месте повреждения до терапевтической концентрации (в течение 2–3 дней). Компенсировать этот недостаток можно доставкой экзогенных нейротрофических факторов роста в первые дни после травмы в виде рекомбинантных белков или препаратов секретама клеток — например, кондиционированной среды, содержащей растворимые белковые факторы, а также внеклеточные везикулы (микровезикулы и экзосомы), высвобождаемые стволовыми или прогениторными клетками.

#### *Перспективы использования клеточной терапии для регенерации периферического нерва*

В постнатальном периоде регенеративные резервы организма поддерживаются резидентными прогениторными и стволовыми клетками, способными

к дифференцировке и обладающими специфической паракринной активностью. Использование первичных (аутогенных или аллогенных) культур клеток, в том числе генетически модифицированных, является одним из наиболее перспективных подходов в регенеративной медицине вообще и при травме периферического нерва в частности (рис.1). Так, в доклинических исследованиях было показано, что эмбриональные, гемопоэтические и мезенхимальные стволовые клетки, а также тканеспецифические стволовые клетки: нейральные, кожи и волосных фолликулов — в большинстве случаев стимулируют восстановление большего, чем в группах контроля, числа аксонов, а также способствуют их лучшей миелинизации и функционированию нерва [47].

Схожая эффективность разных типов стволовых клеток в этих исследованиях может говорить об общности механизмов стимуляции ими регенераторных процессов. По-видимому, таким механизмом является паракринная активность стволовых и прогениторных клеток. Многочисленными исследованиями показано, что секретом прогениторных и стволовых клеток содержит широчайший набор биологически активных молекул, включающий ангиогенные и нейротрофические факторы роста (NGF, BDNF, GDNF, VEGF, HGF, bFGF, SDF, IGF-1), протеазы и матриксные белки [48, 49], стимулирующие регенеративные процессы в поврежденном нерве. Ранее нами было показано, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) жировой ткани, нанесенные в область механического повреждения большеберцового нерва мыши в виде суспензии в Matrigel™, эффективно стимулировали восстановление структуры и проводимости нерва, а также функции денервированных мышц [50] (рис. 2). В то же время блокирование нейротрофических факторов (BDNF, GDNF и VEGF) с помощью нейтрализующих антител подавляло или нивелировало регенеративный эффект трансплантированных ММСК, что указывает на продукцию ими нейротрофических факторов, как на один из основных механизмов их терапевтической активности [50]. Усиление этой продукции за счет генетической модификации может значительно повысить эффективность клеточной терапии. Это было продемонстрировано нами при трансплантации в ишемизированные скелетные мышцы ММСК жировой ткани, генетически модифицированных аденоассоциированным вирусным вектором, несущим ген VEGF. На модели тяжелой ишемии задней конечности мыши, вызывающей обширные некрозы мышц с разрушением нервных волокон, такие клетки значительно лучше восстанавливали перфузию конечности кровью и уменьшали повреждение тканей, чем немодифицированные ММСК [51]. Сходство в строении, функционировании и регенерации кровеносной и нервной систем [52] дает основания полагать, что генетическая модификация трансплантируемых клеток, увеличивающая продукцию ими нейротрофических или ангиогенных факторов, является перспективным подходом к восстановлению периферических нервов после повреждений. Это подтверждается результатами работ, в которых локальная трансплантация генетически модифицированных шванновских, нейральных стволовых клеток и ММСК амниотической жидкости, гиперэкспрессирующих факторы роста (NGF, NT-3, GDNF, CNTF, FGF-2), восстанавливала структуру и функцию поврежденного нерва значительно

лучше, чем такие же клетки без модификации [33]. Тем не менее, несмотря на все успехи доклинических исследований по влиянию модифицированных или немодифицированных клеток на восстановление травмированного нерва, данные о проводимых аналогичных клинических испытаниях на сегодняшний день отсутствуют.

Результаты последних исследований указывают на то, что для эффективной стимуляции регенерации чрезвычайно важно обеспечить более-менее длительные выживание и функционирование трансплантированных клеток локально в месте повреждения. В то же время хорошо известно, что трансплантация клеток в виде суспензии, вводимой путем прямых инъекций в ткань, приводит к гибели до 70–90% клеток в первые дни после трансплантации [53]. Эта проблема может быть решена путем трансплантации клеток в виде самозаселяющихся или самоорганизующихся структур, таких как графты из различных естественных или искусственных матриц, заселенных клетками, в том числе и генетически модифицированными, продуцирующими нейротрофические факторы. Такие графты выполняют не только функции носителей клеток, способствующих их лучшему выживанию после трансплантации, но и могут участвовать в навигации роста волокон, а также физически соединять концы нерва при нарушении его анатомической целостности. Показано, что использование графтов, заселенных генетически модифицированными клетками, продуцирующими нейротрофические факторы, позволяет добиться более полного и эффективного восстановления структуры и функции нерва, чем использование бесклеточных конструкций [54, 55].

Одним из возможных подходов к формированию графтов, не содержащих ксеногенных и/или химических компонентов в своем составе, является недавно получившая распространение методика «клеточных пластов», предложенная в 1999 г. проф. Т. Okano [56, 57]. Такие конструкции представляют собой многослойные структуры из жизнеспособных клеток в окружении наработанного ими при культивировании внеклеточного матрикса. Достаточная механическая прочность клеточных пластов позволяет легко ими манипулировать и локализовать их в области дефекта ткани. Благодаря этому данная технология нашла свое применение в офтальмологии, кардиологии, оториноларингологии и других отраслях хирургии, причем за последние 2–3 года количество клинических исследований в этой области практически удвоилось [58]. Нашей группой также активно разрабатывались методы по использованию пластов из ММСК жировой ткани [59] или прогениторных клеток сердца для стимуляции ангиогенеза [60, 61] и кардиомиопластики в зоне инфаркта [62].

При репарации нервных стволов клеточные пласты подходят для формирования биоактивных матриц-носителей в зоне критического дефекта нерва, хирургического шва или травмы. Создавая противовоспалительное микроокружение и секреторную в область повреждения факторы роста, которые способствуют регенерации, росту и защите нейритов, такие клеточные «проводники» отлично выполняют функцию локальных стимуляторов восстановления. Кроме того, с применением описанных выше методов генетической модификации клеток с помощью вирусов, терапевтический паракринный эффект клеток может быть дополнительно усилен для получения совершенно уникальных результатов.

С учетом функции леммоцитов они являются наиболее логичным объектом для создания матриц-носителей с целью стимуляции восстановления нерва. И действительно, из них были успешно сконструированы пласты, в которых клетки сохраняли свою паракринную активность и располагались вдоль нанотрубочек, имитировавших нейриты [63]. С использованием коллагенового геля такие конструкции удавалось свернуть в трубчатую структуру и пересадить крысам с критическим дефектом (от 5 до 15 мм) седалищного нерва. У животных закрытие 5 мм дефекта и восстановление морфологии нерва происходило за 4 недели, а к 8 неделе наблюдались признаки прорастания нейритов и аксональной регенерации и в группе с дефектом размером 15 мм [64]. Следует отметить, что упомянутый выше внеклеточный матрикс, нарабатываемый клетками во время получения пластов, играет не последнюю роль, так как было показано, что децеллюляризованные клеточные пласты, состоящие из белков матрикса шванновских клеток, вызывают отращивание нейритов от нейральных клеток PC12 и увеличивают экспрессию в них генов белков миелинового чехла нерва [65].

Учитывая сложность и многофакторность механизмов, ответственных за восстановление структуры и функции нервов, наиболее перспективными следует признать комбинированные воздействия, включающие сочетание генных, клеточных и тканеинженерных технологий. Комбинированные воздействия особенно важны в случаях тяжелых повреждений нервов со значительным расхождением концов, делающим невозможным их прямое соединение хирургическими методами. Недавние работы показали, что использование агарозного скаффолда (каркаса), имеющего линейное многоканальное строение, заполненного генетически модифицированными сингенными ММСК костного мозга, продуцирующими BDNF, в сочетании с прямой инъекцией лентивирусного вектора, экспрессирующего BDNF, в дистальный сегмент поврежденного седалищного нерва крысы, значительно улучшало регенерацию нерва при 15 мм расхождении концов. Такое комбинированное воздействие не уступало по эффективности «золотому стандарту» в лечении повреждений такого рода – использованию аутографтов [66]. Следует отметить, что ММСК, например, жировой ткани, которая является более доступным материалом по сравнению с леммоцитами и может быть относительно легко получена для аутогенного использования, представляют собой один из наиболее перспективных типов постнатальных прогениторных клеток для создания тканеинженерных конструкций, в том числе и для репарации периферических нервов. ММСК вырабатывают широчайший спектр как нейротрофических, так и ангиогенных факторов роста, и в ряде работ о них говорят, как о клетках, выполняющих координирующую роль в сопоставленном росте нерва и сосуда при регенерации ткани. Более того, для ММСК разработан спектр способов вирусной модификации для экспрессии цитокинов и факторов роста [67]. Это делает их привлекательным объектом для конструирования тканевых проводников, используемых для регенерации нерва. Нашей группой разработаны методы получения клеточных пластов из ММСК человека и животных, а также децеллюляризованных препаратов внеклеточного матрикса [68]. Это позволяет создавать как высокоэффективные графты, эффект которых опирается

на паракринную активность клеток, так и безопасные и длительно хранимые конструкции на основе внеклеточного матрикса.

### Заключение

В настоящее время в биомедицине имеется целый арсенал перспективных методов, которые позволяют стимулировать восстановление дефектов и повышать жизнеспособность клеток при травмах периферических нервов. Однако достичь этого с помощью рекомбинантных белков сложно и дорого из-за необходимости поддержания их высокой тканевой концентрации в течение длительного времени, а существующие фармакологические средства иных классов не обладают эффективностью при обширных дефектах или тяжелых повреждениях. Именно при таких типах повреждений, требующих комплексного и длительного лечения, методы генной, клеточной терапии и тканевой инженерии могут в лучшей степени проявить свой потенциал в стимуляции восстановления структуры и функции периферических нервов. На наш взгляд, терапия с использованием тканеинженерных конструкций на основе клеток (в том числе генетически модифицированных) и синтезируемого ими внеклеточного матрикса является наиболее перспективным направлением в области разработки методов многофакторного комплексного воздействия на процессы регенерации периферических нервов. При тяжелых патологиях она может

стать наиболее эффективной вспомогательной технологией, дополняющей хирургические методы восстановления целостности нерва. При этом на самых ранних сроках после травмы целесообразно применение рекомбинантных трофических факторов, содержащих их клеточных продуктов (кондиционированная среда, микровезикулы, экзосомы и т.п.) либо продуцирующих их клеток. Это позволит оперативно воспрепятствовать гибели большого числа поврежденных нейронов и шванновских клеток, а также предотвратит обширное повреждение тканей. В случае необходимости поддержания регенерации нерва в течение продолжительного времени обязательным компонентом терапии становятся плазмидные или вирусные векторы, кодирующие нейротрофические и другие факторы роста.

Несомненно, для широкого применения данного подхода в клинических испытаниях и практике требуется систематизировать имеющиеся данные доклинических исследований, разработать оптимальные сроки и объем такой терапии вместе с решением вопросов безопасности, связанных как с применением вирусных векторов, так и с обеспечением и контролем стабильности клеточных материалов.

### Благодарности

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №16-45-03007).*

### ЛИТЕРАТУРА:

1. Одинак М.Ж., Живолупов С.А. Заболевания и травмы периферической нервной системы. Санкт-Петербург: СпецЛит; 2009.
2. Шевелев И.Н. Травматические поражения плечевого сплетения. Москва: Издательство «ИП Андреева Т.М.»; 2005.
3. Goldberg J.L. How does an axon grow? *Genes & Development* 2003; 17(8): 941-58.
4. Hoke A., Redett R., Hameed H. et al. Schwann cells express motor and sensory phenotypes that regulate axon regeneration. *J. Neurosci.* 2006; 26(38): 9646-55.
5. Simons M., Trajkovic K. Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J. Cell Sci.* 2006; 119(Pt 21): 4381-9.
6. Sanes J.R., Lichtman J.W. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu. Rev. Neurosci.* 1999; 22: 389-442.
7. Гомазков О.А. Нейротрофическая регуляция и стволовые клетки мозга. Москва: Икар; 2006.
8. Boyd J.G., Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol. Neurobiol.* 2003; 27(3): 277-323.
9. Dono R. Fibroblast growth factors as regulators of central nervous system development and function. *Amer. J. Physiol.-Regulat. Integ. Compar. Physiol.* 2003; 284(4): R867-81.
10. Bottcher R.T., Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocr. Rev.* 2005; 26(1): 63-77.
11. Hobson M.I., Green C.J., Terenghi G. VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy. *J. Anat.* 2000; 197 (Pt 4): 591-605.
12. Storkebaum E., Carmeliet P. VEGF: a critical player in neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* 2004; 113(1): 14-8.
13. Zachary I. Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. *Neurosignals* 2005; 14(5): 207-21.
14. Bagnard D., Vaillant C., Khuth S.T. et al. Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor. *J. Neurosci.* 2001; 21(10): 3332-41.
15. Russo V.C., Gluckman P.D., Feldman E.L. et al. The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocr. Rev.* 2005; 26(7): 916-43.
16. Bazley L.A., Gullick W.J. The epidermal growth factor receptor family. *Endocr. Relat. Cancer* 2005; 12 Suppl 1: S17-27.
17. Chantry A., Gregson N., Glynn P. Degradation of myelin basic protein by a membrane-associated metalloprotease: neural distribution of the enzyme. *Neurochem. Res.* 1992; 17(9): 861-7.
18. Siconolfi L.B., Seeds N.W. Induction of the plasminogen activator system accompanies peripheral nerve regeneration after sciatic nerve crush. *J. Neurosci.* 2001; 21(12): 4336-47.
19. Pittman R.I., Ivins J.K., Buettner H.M. Neuronal plasminogen activators: cell surface binding sites and involvement in neurite outgrowth. *J. Neurosci.* 1989; 9(12): 4269-86.
20. D'Alessio S.B., Blasi F. The urokinase receptor as an entertainer of signal transduction. *Bioscience* 2009; 14: 4575-87.
21. McGarvey M.L., Baron-Van Evercooren A., Kleinman H.K. et al. Synthesis and effects of basement membrane components in cultured rat Schwann cells. *Dev. Biol.* 1984; 105(1): 18-28.
22. Letourneau P. Axonal Pathfinding: Extracellular Matrix Role. In: Squire L.R., editor. *Encyclopedia of Neuroscience*. V. 1. Oxford: Academic Press; 2009. p. 1139-45.
23. Snow D.M., Lemmon V., Carrino D.A. et al. Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. *Exp. Neurol.* 1990; 109(1): 111-30.
24. Katoh-Semba R., Matsuda M., Kato K. et al. Chondroitin sulphate proteoglycans in the rat brain: candidates for axon barriers of sensory neurons and the possible modification by laminin of their actions. *Eur. J. Neurosci.* 1995; 7(4): 613-21.
25. Reddi D., Curran N. Chronic pain after surgery: pathophysiology, risk factors and prevention. *Postgrad. Med. J.* 2014; 90(1062): 222-7.
26. Hems T.E. Timing of surgical reconstruction for closed traumatic injury to the supraclavicular brachial plexus. *J. Hand Surg. Eur. Vol.* 2015; 40(6): 568-72.
27. Konofaos P., Ver Halen J.P. Nerve repair by means of tubulization: past, present, future. *J. Reconstr. Microsurg.* 2013; 29(3): 149-64.
28. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J. Anat.* 1999; 194: 1-14.
29. Klimaschewski L., Hausott B., Angelov D.N. The pros and cons of growth factors and cytokines in peripheral axon regeneration. *Int. Rev. Neurobiol.* 2013; 108: 137-71.
30. Kimpinski K., Mearow K. Neurite growth promotion by nerve growth factor and insulin-like growth factor-1 in cultured adult sensory neurons: role of phosphoinositide 3-kinase and mitogen activated protein kinase. *J. Neurosci. Res.* 2001; 63(6): 486-99.
31. Edstrom A., Ekstrom P.A. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in neuronal survival and axonal outgrowth of adult mouse dorsal root ganglia explants. *J. Neurosci. Res.* 2003; 74(5): 726-35.
32. Mason M.R., Tannemaat M.R., Malessy M.J. et al. Gene therapy for the peripheral nervous system: a strategy to repair the injured nerve? *Curr. Gene Ther.* 2011; 11(2): 75-89.

33. Карагяур М.Н. Влияние мезенхимальных стволовых клеток на восстановление периферического нерва после травмы [диссертация]. Москва [РФ]: НИИЗК ФГБУ РКНПК МЗ РФ; 2013.
34. Tannemaat M.R., Verhaagen J., Malessy M. The application of viral vectors to enhance regeneration after peripheral nerve repair. *Neuro. Res.* 2008; 30(10): 1039-46.
35. Chattopadhyay M., Walter C., Mata M. et al. Neuroprotective effect of herpes simplex virus-mediated gene transfer of erythropoietin in hyperglycemic dorsal root ganglion neurons. *Brain* 2009; 132(Pt 4): 879-88.
36. Chen Y., Wang D., Wang Z. et al. Effect of adenovirus expressing NGF on sciatic nerve injury in rats. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2009; 23(8): 947-53.
37. Martin K.R., Quigley H.A., Zack D.J. et al. Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003; 44(10): 4357-65.
38. Powell R.J., Goodney P., Mendelsohn F.O. et al. Safety and efficacy of patient specific intramuscular injection of HGF plasmid gene therapy on limb perfusion and wound healing in patients with ischemic lower extremity ulceration: results of the HGF-0205 trial. *J. Vasc. Surg.* 2010; 52(6): 1525-30.
39. Kibbe M.R., Hirsch A.T., Mendelsohn F.O. et al. Safety and efficacy of plasmid DNA expressing two isoforms of hepatocyte growth factor in patients with critical limb ischemia. *Gene Ther.* 2016; 23(4): 306-12.
40. Чельшев Ю.А., Мухамедшина Я.О., Шаймарданова Г.Ф. и соавт. Прямая доставка терапевтических генов для стимулирования посттравматической нейрорегенерации. *Неврологический вестник* 2012; XLIV(1): 76-83.
41. Масгутов Р.Ф., Салафутдинов И.И., Богов А.А. (мл.) и др. Стимуляция посттравматической регенерации седалищного нерва крысы с помощью плазмиды, экспрессирующей сосудистый эндотелиальный фактор роста и основной фактор роста фибробластов. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2011; VI(3): 67-70.
42. Ge J., Li Y., Zhuo Y. et al. Peripheral nerve and transgene cells transplantation in the treatment of experimental neuropathy of SD rats. *Yan Ke Xue Bao* 1998; 14(3): 121-5.
43. Karagyaour M., Dyikanov D., Makarevich P. et al. Non-viral transfer of BDNF and uPA stimulates peripheral nerve regeneration. *Biomed. Pharmacother.* 2015; 74: 63-70.
44. Pereira Lopes F.R., Martin P.K., Frattini F. et al. Double gene therapy with granulocyte colony-stimulating factor and vascular endothelial growth factor acts synergistically to improve nerve regeneration and functional outcome after sciatic nerve injury in mice. *Neuroscience* 2013; 230: 184-97.
45. Gupta R., Tongers J., Losordo D.W. Human studies of angiogenic gene therapy. *Circ. Res.* 2009; 105(8): 724-36.
46. Makarevich P.I., Rubina K.A., Diykanov D.T. et al. Therapeutic angiogenesis using growth factors: current state and prospects for development. *kardiologiia* 2015; 55(9): 59-71.
47. Fairbairn N.G., Meppelink A.M., Ng-Glazier J. et al. Augmenting peripheral nerve regeneration using stem cells: a review of current opinion. *World J. Stem Cells* 2015; 7(1): 11-26.
48. Kalinina N., Kharlampieva D., Loguinova M. et al. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. *Stem Cell Res. Ther.* 2015; 6: 221-32.
49. Makridakis M., Roubelakis M.G., Vlahou A. Stem cells: insights into the secretome. *Biochim. Biophys. Acta* 2013; 1834(11): 2380-4.
50. Lopatina T., Kalinina N., Karagyaour M. et al. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. *PLoS One* 2011; 6(3): e17899.
51. Shevchenko E.K., Makarevich P.I., Tsokolaeva Z.I. et al. Transplantation of modified human adipose derived stromal cells expressing VEGF165 results in more efficient angiogenic response in ischemic skeletal muscle. *J. Transl. Med.* 2013; 11: 138-52.
52. Serini G., Bussolino F. Common cues in vascular and axon guidance. *Physiology (Bethesda)* 2004; 19: 348-54.
53. Amer M.H., White L.J., Shakesheff K.M. The effect of injection using narrow-bore needles on mammalian cells: administration and formulation considerations for cell therapies. *J. Pharm. Pharmacol.* 2015; 67(5): 640-50.
54. Fang Y., Mo X., Guo W. et al. A new type of Schwann cell graft transplantation to promote optic nerve regeneration in adult rats. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2010; 4(8): 581-9.
55. Song M., Chen S.Z., Han H. et al. An experimental study on repair of peripheral nerve injury by transplantation of microcapsulated NGF-expressing NIH 3T3 cells. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* 2005; 21(1): 53-7.
56. Yamato M., Kikuchi A., Kohsaka S. et al. Novel manipulation technology of cell sheets for tissue engineering. In: Ikada Y., Okano T., editors. *Proceedings of the 3rd International Symposium on Tissue Engineering for Therapeutic Use. Tissue Engineering for Therapeutic Use* 3; 1998 Sep 4-8; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1999. p. 99.
57. Matsuura K., Utoh R., Nagase K. et al. Cell sheet approach for tissue engineering and regenerative medicine. *J. Control Release* 2014; 190: 228-39.
58. Elloumi-Hannachi I., Yamato M., Okano T. Cell sheet engineering: a unique nanotechnology for scaffold-free tissue reconstruction with clinical applications in regenerative medicine. *J. Intern. Med.* 2010; 267(1): 54-70.
59. Makarevich P.I., Boldyreva M.A., Gluhanyuk E.V. et al. Enhanced angiogenesis in ischemic skeletal muscle after transplantation of cell sheets from baculovirus-transduced adipose-derived stromal cells expressing VEGF165. *Stem Cell Res. Ther.* 2015; 6: 204-14.
60. Makarevich P., Boldyreva M., Dergilev K. et al. Transplantation of cell sheets from adipose-derived mesenchymal stromal cells effectively induces angiogenesis in ischemic skeletal muscle. *Genes and Cells* 2015; X(3): 68-77.
61. Makarevich P.I., Dergilev K.V., Tsokolaeva Z.I. et al. Delivery of genetically engineered adipose-derived cell sheets for treatment of ischemic disorders-development of application in animal models. *Mol. Ther.* 2015; 23(1): 262.
62. Дергилев К.В., Макаревич П.И., Меньшиков М.Ю. и др. Тканеинженерные конструкции на основе пластов клеток для регенеративной медицины. *Гены и клетки* 2016; XI(3): 23-32.
63. Pesirikan N., Chang W., Zhang X. et al. Characterization of schwann cells in self-assembled sheets from thermoresponsive substrates. *Tissue Eng. Part A* 2013; 19(13-14): 1601-9.
64. Georgiou M., Bunting S.C., Davies H.A. et al. Engineered neural tissue for peripheral nerve repair. *Biomaterials* 2013; 34(30): 7335-43.
65. Junka R., Yu X. Novel acellular scaffold made from decellularized schwann cell sheets for peripheral nerve regeneration. *Reg. Engin. Transl. Med.* 2015; 1(1): 22-31.
66. Gao M., Lu P., Lynam D. et al. BDNF gene delivery within and beyond templated agarose multi-channel guidance scaffolds enhances peripheral nerve regeneration. *J. Neural. Eng.* 2016; 13(6): 066011.
67. Shevchenko E., Makarevich P., Tsokolaeva Z. et al. Restoration of blood flow in ischemic mouse hind limb after administration of plasmid constructions and genetically modified adipose-derived stromal cells. *Mol. Med.* 2011; 4: 23-8.
68. Нимирицкий П.П., Дусь Т.А., Григорьева О.А. и др. Клеточные пласты из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека и получение препаратов внеклеточного матрикса методом децеллюляризации. *Технологии живых систем* 2016; 13(6): 4-13.

Поступила: 16.11.2016