Гидрогелевый матрикс на основе биосовместимых карбомеров для восполнения дефектов нервной ткани

Г.А. Фомина[1], Р.Ф. Масгутов [1], В.Г. Штырлин [2], Ю.И. Зявкина [2], Ю.А. Челышев [1]

[1]Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, Казанский государственный медицинский университет

[2] НИЛ Координационных соединений Химического института им. А.М. Бутлерова, Казанский государственный университет

Hydrogel of biocompatible carbomers as matrix for elimination of neural tissue defects

G.A. Fomina [1], R.F. Masgutov [1], V.G. Shtyrlin [2], Yu.I. Zyavkina [2], Yu.A. Chelyshev [1]

[1] Department of Histology, Cytology and Embryology, Kazan State Medical University

[2] Butlerov Chemistry Institute of Kazan State University, Coordination Compounds Laboratory

На моделях формирования диастаза седалищного нерва крысы и последующего его преодоления при помощи кондуита нерва, а также полной перерезки спинного мозга мыши на уровне Т9 исследовано влияние гидрогелевого матрикса из синтетических биосовместимых материалов на эффективность регенерации нервных волокон. Матрикс на основе полиакриловой кислоты (ПАК) поддерживает восстановление двигательной функции седалищного нерва. К 30 суткам эксперимента посттравматическое выживание нейронов спинального ганглия L5, по сравнению с контролем (пустая трубка), увеличивается в случае применения Carbopol® 971P NF на 12,3%, а при введении в трубку ПАК – на 20,2%. К этому сроку в группе с ПАК количество средних нейронов на 10,8% больше, чем в группе с Carbopol. При этом количество регенерирующих миелиновых волокон в группе с ПАК на 10,3% превышает их количество в группе с Carbopol. Введение запатентованной композиции М4 из аминокислот и микроэлементов в гидрогелевый матрикс на основе ПАК или Carbopol изменяет характер его влияния на восстановление чувствительности кожи конечности в пользу Carbopol и не влияет на восстановление двигательной функции. Включение композиции М4 в гидрогелевый матрикс на основе ПАК или Carbopol в одинаковой мере поддерживает выживание больших нейронов и не влияет на количество выживающих нейронов других популяций в спинальном ганглии. В присутствии М4 ПАК более эффективно стимулирует регенерацию миелиновых волокон, чем Carbopol. Введение в разрыв спинного мозга мыши Carbopol с композицией М4 улучшает восстановление двигательной функции. Полученные результаты свидетельствуют о том, что синтетические биосовместимые материалы ПАК и Carbopol по-разному влияют на регенерацию нервных волокон в центральной и периферической нервной системе. Они могут найти применения для улучшения результатов посттравматической регенерации периферического нерва и спинного мозга.

Ключевые слова: регенерация нерва, спинной мозг, гидрогелевый матрикс.–

Short-term effects of biocompatible materials were examined on functional posttraumatic recovery of rat sciatic nerve and mice spinal cord. Transected nerve regeneration across 5 mm gaps within silicone tubes filled with synthetic hydrogels of sodium salts of 2%polyacrylic acid (PAA) or 1,8% Carbopol® 971P NF or 8% sodium salt of carboxymethylcellulose were investigated. Functional recovery was assessed using the sciatic functional index until 30 days after nerve injury. Supportive influence of PAA was shown on motor and sensory function recovery of nerve. At the 30th the survival of L5 DRG neurons increased in group with Carbopol by 12,3%, in case of PAA by 20,2% to compare with negative control group (plain tube without matrix). By day 30 after the operation the number of middle size neurons in group with PAA exceeds by 10,8% in comparison with Carbopol group. In these conditions the number of myelinated fibers exceeded by 10,3%. Addition of patented composition M4 consisting of amino acids and microelements to the PAA or Carbopol hydrogels improved the sensory reactions from the hind paw skin. On the model of complete transection of mice spinal cord at T9 it has been shown increase of locomotor repair assessed in Basso, Beathie, Bresnahan (1995) open field rating scale under the influence of mixture of Carbopol and M4 composition. The received results testify that synthetic biocompatible materials PAA and Carbopol differently influence regeneration in the central and peripheral nervous system. Thus, investigated scaffolds as suitable conduit could be useful for improving regeneration of the peripheral nerve or spinal cord after an injury.

Key words: nerve regeneration, spinal cord, hydrogel.

Для эффективной посттравматической нейрорегенерации представляется актуальной реконструкция тканевого матрикса в потенциальном пространстве роста аксонов [1]. Этот подход активно разрабатывается как для ЦНС [2, 3], так и для периферического нерва [4]. Для подобных задач наиболее исследованы природные биоматериалы, такие как коллаген [5], фибрин [6, 7], фибронектин [8]. В последнее время особое внимание уделяется гидрогелевым матриксам на основе синтетических биосовместимых и биодеградируемых материалов, таких как полиэфиры полилактид-ко-гликолид [9], полиметакрилаты [10, 11] и др. Поиск синтетических биоматериалов для поддержания процесса нейрорегенерации активно продолжается. К подобным материалам стали предъявлять дополнительные требования. Для более эффективной нейропротекции и стимулирования регенерации нервных волокон имплантируемый биоматрикс на основе синтетических биоматериалов должен сочетаться с нейротрофическими факторами [12, 13], фармакологическими нейропротекторами и стимуляторами нейрорегенерации [14, 15].

В работе проведена оценка эффективности посттравматической регенерации нервных волокон в периферическом нерве и спинном мозге в условиях имплантации в разрыв нервной ткани гидрогеля на основе биосовместимых карбомеров – полиакриловой кислоты (ПАК) и Carbopol® 971P NF.

Адрес для корреспонденции:
Фомина Галина Андреевна
420141, Казань, Габишева, 25-26; тел. 8(904)762-92-01); galina2526@gmail.com

ПАК образует высоковязкие, кристаллические гидрогели [16], которые хорошо сочетаются с лекарственными, физиологически активными веществами и ферментами [17]. Карбомеры Carbopol являются полимерами акриловой кислоты, сшитой с алильными эфирами пентаэритритола или дивинилгликоля, образуют гелевую матрицу, обеспечивающую пролонгацию действия активных фармацевтических субстанций [18], и превосходят часто используемый для этой цели полимер — натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) [18].

В работе проведено сравнение эффективности регенерации нервных волокон при использовании этих биоматериалов и КМЦ, положительно зарекомендовавшей себя как поддерживающая среда для фармакологических нейропротекторов и стимуляторов регенерации периферического нерва [19, 20].

В эксперименте и клинике на сегодняшний день остается практически нереализованным подход с локальным применением фармакологических нейропротекторов и стимуляторов роста нервных волокон, подводимых к месту повреждения нервной ткани. Между тем, наши предыдущие исследования с прицельной доставкой к шванновским клеткам, расположенным в области травмы нервных проводников, фармакологического стимулятора регенерации нерва ксимедона указывают на перспективность подобного подхода [19]. В качестве отдельной задачи в работе исследовано влияние композиции аминокислот и микроэлементов (М4), введенной в гидрогелевый матрикс на основе ПАК или Carbopol. Композиция М4 включает десять природных аминокислот (валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, триптофан, метионин, лизин, серин, гистидин и глутаминовая кислота) и ряд микроэлементов (медь (II), марганец (II), кобальт (II), кальций (II), литий (I)), является малотоксичной и запатентована на предмет возможного применения в медицине [21]. Широкий спектр биологического действия композиций аминокислот и олигопептидов с микроэлементами [21, 22] даёт основание полагать, что их системное воздействие на организм осуществляется через ЦНС в тесной взаимосвязи с иммунной системой. Эта проблема интенсивно разрабатывается в отношении нейропептидов [23], но не аминокислот самих по себе.

Материал и методы

Эксперименты на седалищном нерве проведены на белых беспородных крысах–самцах весом 150–200 г (n = 32). Для опытов со спинным мозгом использовали белых беспородных мышей–самок весом 30–50 г (n=27). Животных содержали в пластмассовых клетках при температуре 18–20°С со свободным доступом к воде и пище.

Тубуляция седалищного нерва крысы. У животных под уретановым наркозом (600 мг/кг, внутрибрюшинно) в левом седалищном нерве на уровне середины бедра формировали диастаз длиной 5 мм. Центральный и периферический концы нерва соединяли силиконовой трубкой (НИИРП, Россия) длиной 7 мм и внутренним диаметром 2,2 мм. Трубку фиксировали при помощи четырех эпиневральных швов мононитью 8.0 с атравматической иглой (Целита, Россия). Непосредственно перед фиксацией в трубку вводили гелевый матрикс на основе натриевой соли 1,8% Carbopol® 971P NF (Noveon), натриевой соли 2% ПАК (Aldrich, м.в. 3000000) или 8% натриевой соли КМЦ (Pierre Fabre). Значения pH для гидрогелей Carbopol и ПАК поддерживали в пределах pH 6,3–7,3 путём добавления к растворам набухших полимеров гидроксида натрия (Sigma), контроль pH осуществляли на pH–метре Thermo Orion 420A+. У животных опытных групп в гидрогелевый матрикс на основе ПАК или Carbopol вводили композицию аминокислот и микроэлементов М4 с общим содержанием аминокислот 9%. Первым контролем служили животные с введением в трубку только ПАК или Carbopol без композиции М4. Во второй контрольной группе животные были прооперированы в тех же условиях, но тубуляцию нерва проводили при помощи пустой трубки.

О восстановлении функции двигательных нервных волокон судили по функциональному индексу седалищного нерва [24]. Восстановление функции афферентных нервных волокон определяли, тестируя чувствительность кожи конечности [25]. Функциональные тесты во всех группах проводили на 2, 7, 11, 14, 18, 21, 25 и 28–е сут. после операции. Достоверность различий оценивали по Стьюденту.

Через 30 суток после операции под уретановым наркозом (600 мг/кг) после ламинэктомии выделяли спинальные ганглии L5 на стороне операции, фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезвоживали и заключали в парафин по стандартной методике. Одновременно забирали 5 мм фрагмент периферического отрезка нерва дистальнее места травмы, фиксировали в 2,5% глутаральдегиде и 2% растворе четырехокиси осмия и заливали в эпон–аралдит. Полутонкие срезы, окрашенные метиленовым синим, использовали для подсчета количества миелиновых волокон. На парафиновых срезах спинального ганглия толщиной 7 мкм подсчитывали количество выживающих нейронов [26]. Оценивали количество малых (< 30 мкм^2), средних (30–50 мкм^2) и больших (> 50 мкм^2) нейронов с видимыми ядрышками [26, 27].

У мышей под уретановым наркозом (600 мг/кг, внутрибрюшинно) после ламинэктомии производили полную перерезку спинного мозга на уровне Т9. Животным опытной группы в разрыв спинного мозга вводили гель на основе ПАК или Carbopol в количестве 0,0036–0,0040 г, содержащий композицию М4. Контролем служили животные без введения в разрыв спинного мозга гидрогелевого матрикса, а также мыши, которым в гидрогелевый матрикс не вводили композицию М4. В течение пяти дней после операции животные получали 1% раствор цефазолина (6 мг/кг) для предотвращения послеоперационных осложнений. Ежедневно принудительно опорожняли мочевой пузырь. Восстановление локомоторной функции оценивали при помощи теста в открытом поле [28] на 2, 7, 11, 14, 18, 21, 25 и 28–е сут. после операции. Статистическую обработку результатов проводили методом ANOVA, а также с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Во всех экспериментальных группах с тубуляцией функциональный индекс седалищного нерва возрастает к 7–м сут. после операции. В группе животных с введением в трубку гидрогелевого матрикса на основе ПАК этот показатель, по сравнению с животными из группы с пустой трубкой увеличивается на 21, 25 и 28–и сут. после операции соответственно на 25,1%, 20,4% и 20,9% ($P < 0,05$). На 21 сут. после операции функциональный индекс седалищного нерва в группе животных с ПАК на 27,2% больше ($P < 0,05$), чем у животных с КМЦ. Carbopol и КМЦ не влияли на восстановление двигательной функции нерва.

Различия по показателю восстановления чувствительности кожи конечности в сравнении с контролем (группа с пустой трубкой) зарегистрированы только в случае с ПАК. При этом данный показатель на сроках 11, 14, 18 и 28 сут. возрастает соответственно на 17,3%, 18,7%, 11,2% и 13% ($P < 0,05$). В экспериментальной группе с ПАК на 21, 25 и 28–е сутки после операции зарегистрировано увеличение показателя восстановления чувствительной функции нерва соответственно на 30,1%, 40,1%, 40,2% ($P<0,05$), по сравнению с одноименным показателями у животных в группе с Carbopol.

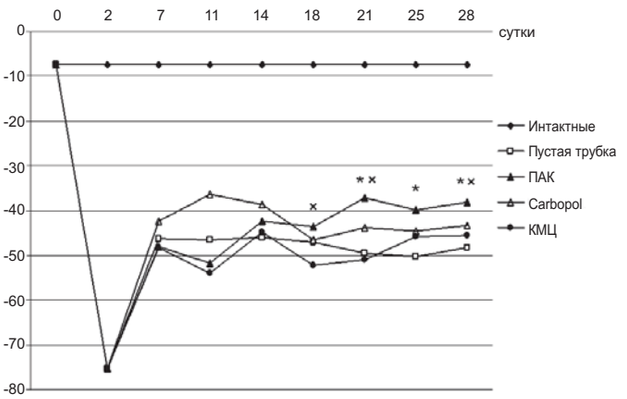


*Рис. 1. Функциональный индекс седалищного нерва после его перерезки и формирования кондуита с гидрогелевым матриксом. По оси ординат — значения функционального индекса: * — P < 0,05 при сравнении показателей опытных групп и группы животных с пустой трубкой (контроль); × — P < 0,05 при сравнении ПАК и КМЦ*

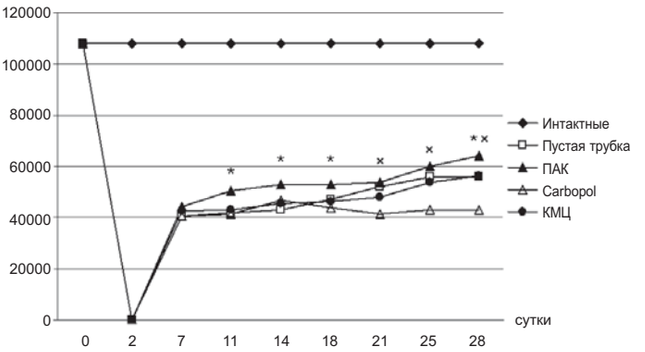


*Рис. 2. Динамика восстановления чувствительной функции кожи после перерезки седалищного нерва и формирования кондуита с гидрогелевым матриксом. По оси ординат — значения чувствительной функции в относительных единицах: * — P < 0,05 при сравнении показателей опытных групп и группы животных с пустой трубкой (контроль); × — P < 0,05 при сравнении ПАК и Carbopol*

Анализ функциональных тестов свидетельствует, во-первых, о том, что включение в состав кондуита нерва гидрогелевого матрикса оказывает стимулирующее влияние на рост нервных волокон. Во-вторых, из протестированных биосовместимых материалов по критериям восстановления двигательной и чувствительной функции более эффективным оказался матрикс на основе ПАК.

Гелевый матрикс на основе Carbopol и ПАК (в большей степени) оказывает нейропротекторное действие в отношении чувствительных нейронов. Посттравматическое выживание этих нейронов в спинальном ганглии L5, по сравнению с контролем (пустая трубка), увеличивается на 12,3% (P < 0,05), в случае введения в трубку Carbopol, а при введении ПАК — на 20,2% (P < 0,05), различий в сравнении с КМЦ зарегистрировано не было.

Количество выживающих после травмы нерва больших нейронов в группе с ПАК по сравнению с группой животных с пластикой нерва при помощи пустой трубки, увеличивается на 9,4% (P<0,05). Различия в количестве больших нейронов при формировании кондуита нерва с Carbopol или КМЦ не выявлены. Количество средних нейронов при введении в трубку геля на основе Carbopol и ПАК превышает данный показатель у животных с пластикой нерва пустой трубкой соответственно на 22,2% (P < 0,05) и 29,7% (P < 0,05). Различия при сравнении групп с КМЦ не зарегистрированы. Количество средних нейронов в группе ПАК на 10,8% (P < 0,05) превышает количество этих нейронов у животных с содержанием в трубке Carbopol. Различия в количестве малых нейронов не зарегистрированы.

Количество миелиновых волокон к 30 суткам, в группах (ПАК, Carbopol и КМЦ) не отличается от контроля (пустая трубка). При этом количество регенерирующих миелиновых волокон в группе с ПАК на 10,3% (P < 0,05) превышает их количество в группе с Carbopol.

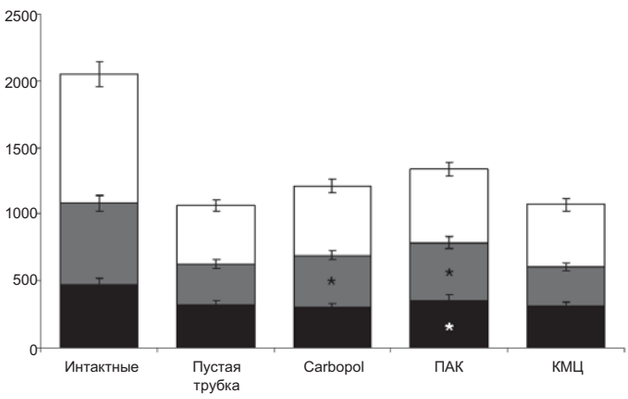


*Рис. 3. Распределение нейронов по популяциям в спинальном ганглии L5 к 30 суткам после перерезки седалищного нерва и формирования кондуита с гидрогелевым матриксом. Черные области – большие нейроны, серые – средние нейроны, белые – малые нейроны. По оси ординат – относительное количество нейронов: * – P < 0,05 при сравнении показателей с группой животных с пустой трубкой*

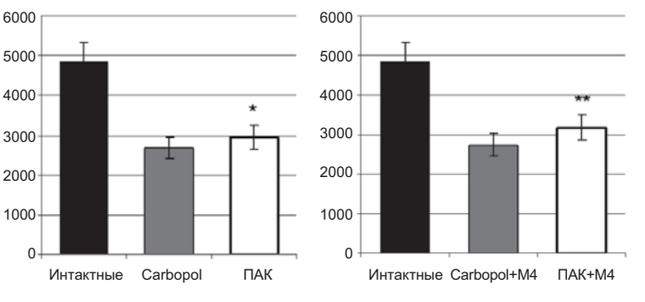


*Рис. 4. Количество миелиновых волокон в периферическом отрезке нерва на 30 сутки после тубуляции нерва с гидрогелевым матриксом. По оси ординат — количество миелиновых волокон: * – P < 0,05 при сравнении ПАК и Carbopol; ** – P < 0,05 при сравнении ПАК+M4 и Carbopol+M4*

Введение композиции М4 в гидрогелевый матрикс на основе ПАК или Carbopol не изменяет показатель двигательной функции седалищного нерва, однако при этом улучшается показатель восстановления чувствительности кожи конечности в случае использования Carbopol. На 21, 25 и 28-е сут. после тубуляции седалищного нерва данный показатель в группе с Carbopol+М4 увеличивается соответственно на 21,7%, 15,6% и 14,9% (P < 0,05), по сравнению с контролем (матрикс на основе Carbopol без композиции).

Введение композиции М4 в гидрогелевый матрикс на основе ПАК не оказывает положительного влияния на восстановление чувствительности. Практически на всех сроках тестирования ПАК без добавления композиции М4 в большей мере поддерживает восстановление чувствительности нерва, чем ПАК+М4 (в среднем на 36,6%, P < 0,05).

После травмы нерва количество выживающих больших нейронов в группе Carbopol+М4 увеличивается на 13,8% (P < 0,05), по сравнению с контролем (Carbopol), и на 14,2% (P < 0,05) в группе с ПАК+М4, по сравнению с контролем (ПАК). По критерию посттравматического выживания этих нейронов ПАК на 14,9% (P < 0,05) более эффективен, чем Carbopol. Композиция М4, введенная в состав гидрогелей, не оказывает влияния на количество средних нейронов. Количество малых нейронов в группе с ПАК на 15,8% (P < 0,05) больше по сравнению с ПАК+М4.

Подсчет миелиновых волокон в периферическом отрезке нерва крысы показывает более эффективное влияние композиции в случае применения ПАК. Так, в группе ПАК+М4 данный показатель на 8,6% (P < 0,05) больше, чем в группе Carbopol+М4.

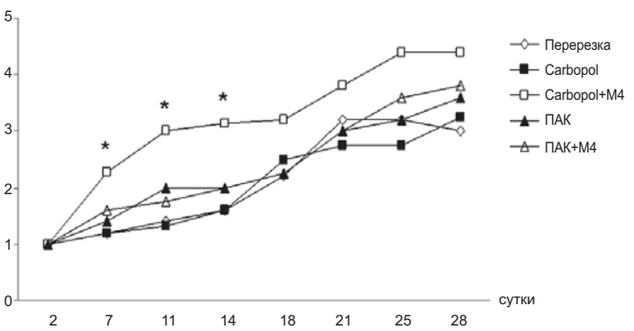


Рис. 5. Динамика восстановления локомоторной функции при тестировании в открытом поле после перерезки спинного мозга мыши и введения в разрыв гидрогелевого матрикса. По оси ординат — показатель теста:
** – P < 0,05 при сравнении Carbopol+M4 с Carbopol, а так же с контролем (перерезка спинного мозга без введения гидрогелевого матрикса в разрыв)*

У мышей после полной перерезки спинного мозга на уровне Т9 восстановление локомоторной функции начинается к концу первой недели в виде незначительных движений конечностей и к 30-м сут. характеризуется подвижностью в голеностопном и коленном суставах. Наибольшие значения показателя локомоторной активности зарегистрированы при введении в разрыв спинного мозга Carbopol с композицией М4 и на 7, 11 и 14-е сут. после операции данный показатель выше соответственно на 52,6%, 46,6% и 50,9% (P < 0,05), по сравнению с животными контрольной группы (перерезка спинного мозга без введения гидрогеля в разрыв). В группе животных с введением в разрыв Carbopol+М4 на тех же сроках выявлено увеличение показателя локомоторной активности соответственно на 47,2%, 55,6% и 47,1% (P < 0,05) по сравнению с животными контрольной группы с введением в разрыв только Carbopol.

Из всех протестированных в настоящей работе биосовместимых материалов ПАК проявила себя как наиболее эффективная среда для поддержания посттравматической регенерации периферического нерва. Под влиянием ПАК показано более динамичное восстановление двигательной и чувствительной функции нерва. Последний показатель коррелирует с наиболее выраженным позитивным влиянием ПАК на посттравматическое выживание чувствительных нейронов. Однако, введение композиции в состав данного гидрогеля, по-видимому изменяет его структуру и не позволяет волокнам регенерировать. С другой стороны, композиции несут противоположный эффект при использовании с Carbopol, что хорошо прослеживается при травме спинного мозга на ранних сроках тестирования. Отсутствие сдвигов в количестве миелиновых волокон в периферическом отрезке нерва на фоне положительной динамики показателей функциональных тестов и количества выживающих чувствительных нейронов можно объяснить тем, что к 30-м сут. после травмы нерва и формирования его кондуита из центрального в периферический отрезок прорастают преимущественно безмиелиновые волокна.

Достаточно велика вероятность того, что аминокислоты из применённой нами композиции способны участвовать в сборке олигопептидов, которые служат молекулярными «строительными лесами» в составе гидрогелевого матрикса и формируют направляющие пути в пределах тканевых дефектов. Подобные самособирающие системы из олигопептидов могут не только формировать тканевый матрикс, но и позитивно влиять на внутриклеточные сигнальные пути, поддерживая выживание нейронов и рост аксонов в центральной и периферической нервной системе. Это предположение согласуется с данными, представленными в работе Ellis-Behnke et al. [29], в которой даны обнадёживающие результаты по регенерации аксонов ЦНС и восстановлению функции при формировании в области разрыва зрительного тракта специального матрикса из самособирающихся нановолокон, состоящих из олигопептида с последовательностью аргинин – аланин – аспартат – аланин.

При поддержке гранта РФФИ №07-04-00746-а.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Schmidt C.E, Leach J.B. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. Ann. Rev. Biomed. 2003; 5: 293-347.

2 . Novikova L.N, Novikov L.N, Kellerth J.O. Biopolymers and biodegradable smart implants for tissue regeneration after spinal cord injury. Curr. Opin. Neurol. 2003 Dec; 16(6): 711-5.

3. Nomura H., Tator C.H, Shoichet M.S. Bioengineered strategies for spinal cord repair. J. Neurotrauma. 2006 Mar-Apr; 23(3-4): 496-507.

4. Bellamkonda R.V. Peripheral nerve regeneration: An opinion on channels, scaffolds and anisotropy. Biomaterials 2006; 27: 3515-8.

5. Yoshii S., Oka M. Peripheral nerve regeneration along collagen filaments. Brain Research 2001; 888:158-62.

6. Choi B.H., Han S.G., Kim S.H. et al. Autologous fibrin glue in peripheral nerve regeneration in vivo. Microsurgery 2005; 25(6): 495-9.

7. Nakayama K., Takakuda K., Koyama Y. et al. Enhancement of peripheral nerve regeneration using bioabsorbable polymer tubes packed with fibrin gel. Artificial Organs 2007; 31(7):500-8.

8. Phillips J.B., King V.R., Ward Z. et al. Fluid shear in viscous fibronectin gels allows aggregation of fibrous materials for CNS tissue engineering. Biomaterials 2004 Jun; 25(14): 2769-79.

9. Evans G.R.D., Brandt K., Widmer M.S. et al. In vivo evaluation of poly(L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. Biomaterials 1999; 20: 1109-15.

10. Belkas J.S., Munro C.A., ShoichetьM.S. et al. Long–term in vivo biomechanical properties and biocompatibility of poly(2–hydroxyethyl methacrylate–co–methyl methacrylate) nerve conduits. Biomaterials 2005; 2(6): 1741–9.

11. Yu T.T., Shoichet M.S. Guided cell adhesion and outgrowth in peptide–modified channels for neural tissue engineering. Biomaterials 2005; 26: 1507–14.

12. Yang Y., De Laporte L., Rives C.B. et al. Neurotrophin releasing single and multiple lumen nerve conduits. Controlled Release 2005; 104: 433–6.

13. Piotrowicz A., Shoichet M.S. Nerve guidance channels as drug delivery vehicles. Biomaterials 2006 Mar; 27(9): 2018–27.

14. Verreck G., Chun I., Li Y. et al. Preparation and physicochemical characterization of biodegradable nerve guides containing the nerve growth agent sabeluzole. Biomaterials 2005; 26: 1307–15.

15. Masgutov R., Raginov I., Fomina G. et al. Stimulation of the rat's sciatic nerve regeneration by local treatment with xymedon®. Cell Mol. Neurobiology 2006; 26(7–8): 1411–9.

16. Осипова Е.А. Водорастворимые комплексообразующие полимеры. Соросовский образовательный журнал 1999; 8: 40–7.

17. Lomas R.J., Jennings L.M., Fisher J. ey al. Effects of a per acetic acid disinfection protocol on the biocompatibility and biomechanical properties of human patellar tendon allografts. Cell Tissue Bank 2004; 5(3): 149–60.

18. Hosmani A.H. Carbopol and its pharmaceutical significance: A review. Pharmainfo.net. 2006 Feb; 17; 1–19.

19. Масгутов Р.Ф., Фомина Г.А., Рагинов И.С. и др. Стимуляция ксимедоном регенерации энтубулированного нерва. Морфологические ведомости 2005; 1(2): 22–4.

20. Масгутов Р.Ф., Фомина Г.А., Рагинов И.С. и др. Пути влияния ксимедона на рост аксонов in vitro и in vivo. Морфологические ведомости 2005; 3(4): 66–9.

21. Залялютдинова Л.Н., Захаров А.В., Штырлин В.Г. и др. Композиция аминокислот с микроэлементами и кальцием, обладающая противо–опухолевой, антидепрессивной и противоаритмической активностью. Патент № 2151596 C1 RU от 27.06.2000. № 94104169/14. МКИ7A61K31/197,33/24. Бюллетень изобретений и открытий 2000; 18.

22. Штырлин В.Г., Хафизьянова Р.Х., Залялютдинова Л.Н. и др. Композиция аминокислот с микроэлементами, обладающая противо–опухолевой и антигипоксической активностью. Патент № 2125874 C1 RU от 10.02.1999. № 94025068/14. МКИ6A61K31/195,9/08. Бюллетень изобретений и открытий 1999; 4: 474.

23. Siemion Z., Kluczyk A., Cebrat M. The peptide molecular links between the central nervous and the immune systems. Amino Acids 2005; 29: 161–76.

24. Inserra M.M. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. Microsurgery 1998; 18(2): 119–24.

25. Greulich M., Riecker K., Lanz U.et al. Evaluation of digital nerve sensitivity following reconstruction. Chir. Forum Exp. Klin. Forsch 1977; Apr: 90–4.

26. Henken D., Battisti W., Chesselet M. Expression of bb–preprotachykinin mRNA and tachykinins in rat dorsal root ganglion cells following peripheral or central axotomy. Neuroscience 1990; 39(3): 733–42.

27. Lawson S. Morphological and biochemical cell types of sensory neurons. Sensory Neurons: Diversity, Development, Plasticity, Oxford Univ. New York 1992; 27–59.

28. Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. Neurotrauma 1995; 12(1): 1–21.

29. Ellis–Behnke R.G., Liang Y.–X., You S.–W. et al. Nano neuro knitting: peptide nanofiber scaffold for brain repair and axon regeneration with functional return of vision. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006; 103(13): 5054–9.

Поступила 15.10.2007