Нейрорегенераторная терапия травматической болезни спинного мозга: роль и перспективы использования трансплантации стволовых клеток

А.Ю. Зайцев, А.С. Брюховецкий
ЗАО Клиника восстановительной интервенционной неврологии и терапии «НейроВита»

Neuroregenerative therapy of spinal cord trauma: role and perspectives of stem cells transplantation
(Literature Review)
A.Yu. Zaytsev, A.S. Bryukhovetsky
Clinic of Reparative Interventional Neurology and Therapy «NeiroVita» Lmd.

В обзоре представлены современные представления о состоянии проблемы, существующих подходах и данные экспериментальных и клинических исследований по трансплантации различных типов стволовых клеток при травматической болезни спинного мозга на экспериментальных моделях у животных и в клинической практике. Показана перспективность применения клеточных технологий в коррекции неврологического дефицита при повреждении спинного мозга и неоднозначность данной проблемы. Рассмотрены возможные осложнения применения клеточной терапии в эксперименте и клинической практике, обсуждаются перспективы дальнейшего развития.

Ключевые слова: спинной мозг, стволовые клетки, клеточная трансплантация.

It is a review of the problem, modern approaches and experimental and clinical data on different stem cells transplantation in the treatment of spinal cord traumas in experimental animals and in clinical practice. Cellular technologies might be used in neurological deficiency state in spinal cord injuries, but their usage is controvresial. Possible complications of cellular therapy in experiment and clinical practice and further usage are discussed.

Key words: spinal cord, stem cells, cellular transplantation.

Введение

Неуклонный рост научно-технического прогресса привел к постоянно увеличивающейся урбанизации и механизации жизни населения. В свою очередь, это породило гигантские масштабы травматизма, что позволяет рассматривать данную проблему уже не только как медицинскую, а как острую социально-экономическую. Ежегодно в индустриально развитых странах мира от травм и их последствий погибают сотни тысяч людей и еще миллионы людей получают тяжелые увечья. В течение нескольких десятилетий травматические повреждения стали третьей по частоте причиной смерти (после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний) и первой причиной смерти в наиболее молодом и трудоспособном возрасте (18–45 лет).

По данным разных авторов, частота повреждений позвоночника и спинного мозга составляет от 0,44 до 4% всех травм (от 320 до 654 пострадавших на 10 млн населения), а статистический анализ позволяет прогнозировать 800 и более травмированных на 10 млн населения в ближайшем будущем. При этом отмечается постоянный значительный рост позвоночно-спинномозговой травмы (ПСМТ), и несмотря на значительные достижения в хирургии и анестезиологии-реаниматологии смертность от данной патологии остается достаточно высокой. Она колеблется от 16% до 64% пострадавших, в зависимости от уровня и тяжести повреждения позвоночника и спинного мозга. Сходным образом обстоит дело и с последствиями ПСМТ. В Российской Федерации ежегодно более 8000 человек становятся инвалидами вследствие ПСМТ [1]. Экономические затраты на лечение и медико-социальную реабилитацию пациентов с последствиями ПСМТ значительны. К примеру, только в США они составляют 14,5 млрд долларов в год.

Лечение травмы спинного мозга (СМ) является одной из наиболее трудных проблем современной неврологии и нейрохирургии. Со времен Рамон-и-Кахаля общепризнано, что не существует способов восстановления поврежденного СМ. Традиционно считалось, что возможность регенерации СМ резко ограничена в связи с необратимыми морфологическими изменениями в нервной ткани после повреждения. Однако за последнее время накоплены огромные экспериментальные данные и ограниченный клинический материал, свидетельствующий о принципиальной возможности регенерации в центральной нервной системе (ЦНС) и возможном восстановлении ее нарушенных функций [2–4]. Полученные научные факты позволяют с современных позиций пересмотреть канонизированные представления о регенераторном потенциале и саногенетических механизмах в ЦНС, а также предложить новые стратегии и концепции лечения повреждений СМ (рис.). Большинство исследователей в этой области полагают, что будущее принадлежит технологиям регенераторной медицины. Основным инструментом регенераторной медицины являются различные клеточные технологии от трансплантации клеток (клеточная терапия) до генотерапии и тканевой инженерии [5, 6].

Клеточная терапия травматического повреждения СМ

В начале XX в. были предприняты первые попытки восстановления СМ с помощью трансплантации. Так, F. Tello в 1911 г. впервые применил трансплантацию кожного нерва бедра на модели ушиба СМ у собак [9]. Значительно позже, в 1940 г., O. Sugar и R.W. Gerard обнаружили спраутинг аксонов реципиента после трансплантации седалищного нерва в область перерезки СМ крыс, а C.C. Kao в 1977 г. показал возможность развития аксонов хозяина сквозь прижившуюся часть седалищного нерва у собак. В 80-х гг. XX столетия исследования вначале P.M. Richardson с соавт. в 1980 г. [10], а затем A.J. Aguayo продемонстрировали

Современные подходы к нейрорегенераторной терапии травматической болезни спинного мозга

миелинизацию аксонов с последующей их регенерацией после трансплантации периферического нерва зрительного тракта в мост мозга в случае благоприятного клеточного окружения [11]. Однако данных за восстановление утраченных функций ЦНС в этих экспериментальных работах получено не было.

В середине 90–х гг. XX столетия исследования шванновских клеток, выделенных из периферических нервов в экспериментальных моделях повреждения СМ, демонстрировали многообещающие результаты. Способность продуцировать миелин и ряд нейротрофических факторов (BDNF, NGF, реснитчатый фактор) [12, 13] выявила возможность участия шванновских клеток в аксональной регенерации. Трансплантация шванновских клеток на модели неполного повреждения СМ у крыс приводила к регенерации аксонов в области повреждения и к ограниченному аксональному росту краниальнее и каудальнее нанесенной травмы [14]. Однако в исследовании, опубликованном двумя годами раньше, спраутинга аксонов вне зоны повреждения отмечено не было [15]. Есть мнение, что трансплантация шванновских клеток приводит к ремиелинизации аксонов СМ по периферическому типу [2]. Описано несколько трансплантаций шванновских клеток больным с ТБСМ. Так Z. Hui с соавт. в 2005 г. представили частичное восстановление моторных функций СМ и чувствительности по шкале ASIA после хирургической трансплантации фетальных шванновских клеток 48 пациентам с ПСМТ не менее чем через год после повреждения [16]. Данные были подтверждены нейрофизиологическими методами исследования (ЭМГ, вызванные потенциалы). Никаких осложнений, связанных с трансплантацией клеток и проведением оперативного вмешательства отмечено не было. S. Ji–Hong с соавт. в 2005 г. также показали улучшение неврологических показателей по шкале ASIA после трансплантации шванновских клеток 37 пациентам [17].

Возможно, генетические модификации шванновских клеток с целью увеличения выделения нейротрофических факторов улучшат результаты лечения пациентов с ТБСМ [18, 19]. Во всяком случае, в некоторых сравнительных экспериментальных исследованиях была продемонстрирована более выраженная возможность скопления в пределах СМ, увеличения роста аксонов и их ремиелинизации при трансплантации генмодифицированных шванновских клеток [20]. Также наблюдалось частичное восстановление паретичных конечностей у экспериментальных животных.

В экспериментах на крысах активация макрофагов путем контакта с периферическими нервами и последующей трансплантацией в СМ уменьшает повреждение ткани и способствует восстановлению функции СМ. Сейчас закончена I фаза (в Израиле и Бельгии) и продолжается II фаза (в Израиле и США) клинических испытаний активированных макрофагов, которые предварительно показывают эффективность проводимой терапии в течение двух недель после травмы [3].

Все же основные исследования клеточной терапии связаны с применением различных типов стволовых клеток.

Трансплантация эмбриональных стволовых клеток и фетальных тканей

Клиническое применение трансплантации стволовых клеток (СК) для лечения повреждения СМ началось в 90–х гг. XX столетия. Этому в первую очередь способствовало выделение эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) из бластоцисты мыши M.J. Evans и M.H. Kaufman [21], введение термина «эмбриональная стволовая клетка» G.R. Martin в 1981 г. [22], выявление способности клеток человеческой эмбриональной карциномы дифференцироваться в нейроноподобные и другие типы клеток [23–25]. В настоящее время свойства ЭСК достаточно хорошо изучены. Им свойственна бесконечная пролиферация симметричным делением, клоногенность (способность образования из одной первоначальной линии ЭСК целой линии генетически идентичных СК), плюрипотентность (возможность формирования любого из 200 клеточных типов) [26, 27]. При этом описаны случаи трансплантации как СК эмбриональных тканей, так и ЭСК (из бластоцисты).

Первую трансплантацию эмбриональной нервной ткани произвел G. Conte в 1907 г., а позднее R. May в 1957 г. [5]. Трансплантации были проведены в головной мозг и в переднюю камеру глаза млекопитающих. В этих экспериментальных исследованиях был отмечен рост трансплантированной эмбриональной ткани, ее функциональная активность и дифференциация клеточных элементов. Трансплантацию эмбриональной ткани на модели спинальной травмы представили A. Bjorklund и U. Stenevi в 1984 г. [28]. Была показана возможность использования эмбриональной ткани в качестве «моста» для регенерации центральных аксонов через дефект ткани СМ. Растущие аксоны регенерировали в эмбриональный трансплантат с формированием связей. Однако, несмотря на улучшение некоторых функций СМ, прорастания сквозь эмбриональные клетки отмечено не было, что, вероятно, связано с ростом аксонов нейрональных клеток трансплантата с формированием новых синаптических связей.

Применение трансплантации ЭСК на модели спинальной травмы показало, что они способны встраиваться в поврежденные участки СМ, дифференцироваться в правильном направлении и принимать участие в нормальном развитии клеток СМ [29–31]. В работах O. Brustle, G.E. Duncan и R. McKay была показана дифференцировка ЭСК в олигодендроциты с последующей миелинизацией аксонов у взрослых крыс [32]. В России А.С. Брюховецкий в 90-х гг. XX столетия продемонстрировал возможность аксонального роста с прорастанием через глиальный рубец при трансплантации ЭСК в область хирургического пересечения СМ у крыс [33]. При этом отмечалось некоторое восстановление утраченных функций СМ.

В настоящее время описано несколько клинических исследований по трансплантации фетальных тканей у больных с последствиями ПСМТ. Первая успешная трансплантация фетальных тканей у пациентов с ПСМТ и повреждениями ГМ была произведена А.С. Брюховецким и соавт. в 1993 г. в рамках закрытой программы Министерства обороны Российской Федерации. Несколько позднее этой же группой исследователей с целью трансплантации стали применять суспензию клеток эмбриона до 12 недель гестации, которые также показали эффективность восстановления функций СМ и ГМ [5]. С.С. Рабинович с соавт. в 2000 г. провели пересадки эмбриональной ткани у пациентов с последствиями ЧМТ и ПСМТ [34, 35]. В данных клинических исследованиях была показана не только клиническая эффективность трансплантации, но и иммунологическая безопасность метода [36].

В ряде исследований не удалось обнаружить прорастание аксонов сквозь трансплантат более чем на 1–2 мм в каудальную часть СМ после трансплантации фетальной ткани [37–39]. Напротив, трансплантация ЭСК на модели СМ у новорожденных щенков показала спраутинг аксонов более чем на 4 мм дистальнее от места повреждения [40].

Несмотря на обнадеживающие данные экспериментальных и клинических исследований трансплантация эмбриональных тканей и ЭСК может являться причиной неудовлетворительных результатов и различного рода осложнений. Наиболее важной проблемой трансплантации ЭСК является иммунологическое отторжение реципиентом [41]. Несмотря на то, что ЭСК изначально являются иммунотолерантными, по мере их «созревания» они приобретают иммуногенные свойства [42]. Независимо от подбора донора и реципиента по антигенам главного комплекса гистосовместимости и учитывая успехи иммуносупрессивной терапии, вероятность отторжения остается крайне большой. Кроме того, существует реальная угроза туморогенной опасности трансплантации ЭСК, что было показано в экспериментах на животных (формирование тератом после трансплантации ЭСК у крыс) [43, 44]. Невозможность воспроизведения многочисленных факторов (механическое натяжение, разнообразные электрические поля, комплексы структурных микроокружений для нормальной активации необходимых генов, нормальная экспрессия генов) для корректной дифференцировки представляет высокий риск образования опухолей после трансплантации ЭСК [42]. Нельзя обойти вниманием и этические проблемы использования фетальных тканей и ЭСК. Например, в США разрешено использовать только имеющиеся в наличии линии ЭСК [2].

Таким образом, несмотря на обнадеживающие данные об аксональном росте и восстановлении утраченных функций СМ как в экспериментальных моделях на животных, так и при клиническом применении, трансплантация эмбриональной ткани и ЭСК не могут быть рекомендованы к широкому клиническому применению из-за иммунологических, религиозных и этических проблем, возможности образования опухолей. В свою очередь, только ЭСК имеют полный потенциал для репарации ЦНС. Именно ЭСК могут размножаться и дифференцироваться в клетки новых тканей, мигрировать и интегрироваться в существующие ткани, активировать гены, стимулирующие репарацию, индуцировать дегенерирующие клетки к восстановлению.

Попытки решения проблемы иммунных реакций при использовании ЭСК в настоящее время связаны со способностью изменить характеристики ЭСК с помощью генно-инженерных манипуляций, терапевтического клонирования, выращивания человеческих органов в организме животных и создания банка эмбрионов со специфическими иммунными характеристиками [42]. Однако при использовании генно-инженерных манипуляций и клонирования высок риск появления генетических мутаций, которые сложно определить до трансплантации, а данных о функциональности клеток при выращивании человеческих органов в организме животных на сегодняшний день не получено. Создание банка ЭСК или эмбрионов связано с серьезными этическими и религиозными проблемами.

Трансплантация нейрональных стволовых клеток

Следующим направлением в регенераторной клеточной терапии можно считать трансплантацию предшественников нейрональных клеток или нейрональных стволовых клеток (НСК), которые получают из нейроэпителия эмбриона [45]. Это клетки, которые получили нейрональную дифференцировку путем направленного культивирования СК. НСК наиболее часто используются в экспериментальной трансплантации для лечения моделей неврологических заболеваний (паркинсонизм, болезнь Кребба, болезнь Гентингтона, боковой амиотрофический склероз, инсульт и др.), в том числе и при повреждении СМ [2]. Сегодня точно не известно, какие типы дифференцированных нейрональных клеток необходимы для замещения утраченных функций ЦНС. Поэтому нейрональные клетки-предшественники могут идеально подходить для этой цели, так как показана возможность их нейрональной дифференцировки, аксонального роста с предположительным морфологическим доказательством образования нового синапса и иммунологическим доказательством образования холинергических, серотонинергических, ГАМК-ергических, глицинергических и глутаматергических нейронов [32, 46, 47].

Первой демонстрацией успешного лечения и восстановления повреждения СМ были эксперименты J.W. McDonald с соавт. в 2000 г. [30]. На модели постконтузионной кисты СМ была выявлена дифференцировка ЭСК в нейрональные клетки-предшественники, которые впоследствии были успешно пересажены. Трансплантированные клетки выжили, мигрировали на большие расстояния и дифференцировались на 3 основных типа клеток нервной ткани: нейроны, астроциты и олигодендроциты. У экспериментальных животных было отмечено значительное восстановление функций СМ. Параллельно S. Liu с соавт. в 2000 г. была показана возможность значительной ремиелинизации с правильными анатомическими характеристиками после трансплантации нейрональных клеток предшественников в поврежденную взрослую нервную систему [29]. Более того, имплантация, выживание и миграция более чем на 1 см от места введения были продемонстрированы с помощью магниторезонансной томографии с меченными парамагнетическими агентами НСК и полимеразциклической реакции в реальном времени [30]. Y. Fujiwara с соавт. в 2004 г. после внутривенного введения НСК из фетального гиппокампа продемонстрировали их миграцию в область повреждения СМ, дифференцировку в нейроны, астроциты и олигодендроциты и восстановление утраченных неврологических функций у иммунокомпетентных крыс [48]. A. Iwanami с соавт. в 2006 г. также показал возможность уменьшения неврологического дефицита после трансплантации НСК мартышкам с экспериментальной травмой СМ и иммуногистохимическими доказательствами дифференцировки этих клеток в нейроны, астроциты и олигодендроциты [49]. Усиление регенераторного потенциала НСК связывают, в первую очередь, с направлением дифференцировки в нейроны и олигодендроциты путем различных генно-инженерных манипуляций [50, 51].

К сожалению описания клинического применения трансплантации НСК у пациентов с ТБСМ как в раннем, так и в отдаленных периодах заболевания не найдено. Поэтому изучение применения трансплантации НСК должно быть продолжено, в том числе и с позиций доказательной медицины.

НСК неспособны к неограниченному росту, так как подчиняются лимиту Хайфлика (40 делений *in vitro*) и, соответственно, теоретически имеют более низкий репаративный потенциал. Трансплантация НСК также не исключает иммунологическое отторжение, этические и религиозные проблемы [2].

Таким образом, накоплен опыт экспериментального и клинического применения трансплантации НСК при повреждении СМ. Однако ее широкое применение сдерживается теми же проблемами, которые характерны для ЭСК. Попыткой обойти серьезные ограничения применения ЭСК и НСК явились исследования стволовых клеток выделенных из дифференцированных тканей (постнатальные или соматические СК) взрослого организма (костный мозг, головной мозг, печень и т.д.).

Трансплантация соматических стволовых клеток (ССК)

После обнаружения СК в различных органах, включая СМ, НСК стали получать из различных типов клеток (гемопоэтические и мезенхимальные клетки костного мозга, стволовые клетки пуповинной крови и т.д.) [52]. Уникальной способностью ССК является пластичность, то есть способность дифференцироваться в клетки, характерные для других тканей (например, гемопоэтическая стволовая клетка при определенных условиях может превращаться в клетки с основными характеристиками нейронов) [53, 54]. В отличие от ЭСК соматические стволовые клетки (ССК) имеют ограниченный пролиферативный потенциал с симметричным делением при самовоспроизведении и асимметричным делением при трансформации в клетки-предшественники, мульти- или унипотентность, ограниченную способность роста в культуре. Однако, в отличие от дифференцировочного потенциала, «терапевтический потенциал» ССК неограничен. К тому же, до конца не ясно различие между дифференцировочным потенциалом ЭСК и ССК. Имеется мнение, что этот потенциал у различных СК одинаков [42].

В экспериментальных моделях на животных и в предварительных экспериментах на людях с заболеванием ЦНС показана эффективность трансплантации различного типа ССК (мезенхимальные клетки, обонятельные обкладочные клетки, гемопоэтические клетки), так как данные клетки могут дифференцироваться в нейрогенном направлении.

НСК из обкладочных обонятельных клеток (обкладочные клетки обонятельного анализатора, обкладочные обонятельные клетки нейронального эпителия, обонятельные оболочечные клетки, глиобонятельные клетки)

Клетки обонятельной выстилки — это особые глиальные клетки, схожие со шванновскими клетками и астроцитами. Они встречаются и в периферической нервной системе в ЦНС совместно с обонятельными аксонами [55]. Нейроны обонятельного эпителия уникальны тем, что в течение жизни они постоянно обновляются и направляют рост аксонов из периферической нервной системы в ЦНС [2]. Природа НСК, полученных из биоптатов обонятельной области слизистой оболочки носа, остается неясной. Это могут быть как клетки обонятельного нейронального эпителия, так и клетки базального слоя «обонятельного эпителия». Однако, невзирая на это, для них характерно образование нейросфер независимо от возраста доноров, экспрессия нестина и нейрональных маркеров глии и нейронов [56]. Получить обкладочные нейроэпителиальные клетки (ОНК) можно как из эмбрионов (фетальные ОНК) [57], так и непосредственно от человека или животного (аутогенные ОНК), которому будет проводиться трансплантация.

Впервые обкладочные нейроэпитальные клетки (ОНК) из обонятельной области слизистой оболочки носа взрослого человека были выделены F.J. Roisen с соавт в 2001 г. из биоптатов после септопластики и турбинэктомии [58]. В 2004 г. X. Zhang с соавт. также сумел получить НСК из обонятельной области слизистой оболочки носа [59]. Кроме того, L.A. Carter с соавт. и X. Chen с соавт. в 2004 г. показали возможность дифференцировки клеток базального слоя обонятельного эпителия в нейрональном направлении [60, 61]. В дальнейших работах было продемонстрировано, что ОНК обладают мультипотентностью, а их дифференцировка зависит от наличия в культуральной среде тканеспецифичных растворимых факторов (например, при добавлении в культуру гепатоцитов, клетки нейросфер экспрессировали альбумин и ферритин, кардиомиоцитов – α-актин и тропонин I и т.д.) [56]. Применение трансплантации ОНК в экспериментальном лечении ТБСМ показало высокую эффективность аксональной регенерации. ОНК способны дифференцироваться в нейроны и олигодендроциты, мигрировать в близлежащие ткани, способствовать аксональному росту на длинные расстояния и миелинизировать оголенные аксоны в культуре [2, 62]. G. Raisman с соавт. на модели одностороннего повреждения пирамидного тракта у крыс показали аксональный рост в дистальную культю СМ, дифференцировку в шванновские и фибробластоподобные клетки с формированием оболочки регенерирующих аксонов после пересадки ОНК с использованием трансплантата–проводника [63]. В данной работе было продемонстрировано формирование нормальных взаимосвязей с нейронами и последующим покрытием новых аксонов олигодендроцитами. Наблюдение за животными показало восстановление условного рефлекса после трансплантации ОНК. Наличие аксональной регенерации, миграции ОНК и выживания этих клеток, по крайней мере, спустя 6 месяцев после трансплантации также было обнаружено S. Tiansheng с соавт., S. Huiyong с соавт. и H.Y. Shen с соавт. в 2005 г. на модели экспериментального повреждения СМ у крыс [64–66]. Liu в 2001 г. и L.M. Ramer с соавт. в 2004 г. продемонстрировали возможность уменьшения неврологического дефицита на модели полного перерыва СМ у крыс [67]. Возможно, что механизм действия ОНК может быть связан с выделением нейротрофических факторов [68].

В настоящее время проводится I–II фаза нескольких клинических испытаний [69]. По данным F. Feron с соавт. (2005) трансплантация ОНК оперативным путем трем пациентам с ПСМТ на торакальном уровне не привела к развитию серьезных осложнений в периоперационном периоде [70]. Однако пока еще рано судить об онкологической безопасности, так как после трансплантации прошел всего 1 год. К тому же не представлена клиническая эффективность метода. Завершение I фазы слепого контролируемого клинического испытания планируется через 2 года.

В России в клинике «НейроВита» проведено 18 оперативных трансплантаций аутогенных ОНК в специальном биодеградируемом геле «Сферогель» (тканевая инженерия СМ) как чистой культуры, так и комбинации аутогенных ОНК с аутогенными гемопоэтическими стволовыми клетками ($CD34^+$) (неопубликованные данные). Непосредственно от клеточной трансплантации осложнений выявлено не было (образования опухолей, «плюс»–ткань в месте трансплантации и т.д.), но интра– и послеоперационные осложнения имели место (спинальный шок, массивная кровопотеря, ликворная гипертензия, ликворея и т.д.). У 50% пациентов отмечалось частичное регрессирование неврологической симптоматики.

Таким образом, экспериментальные и клинические исследования свидетельствуют о возможной высокой эффективности трансплантации обкладочных обонятельных клеток нейронального эпителия у пациентов с ТБСМ в позднем периоде. Клинических данных трансплантации ОНК недостаточно, чтобы судить об их окончательной безопасности и эффективности.

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК)

Эти клетки были впервые выделены А.Я. Фриденштейном в середине 70–х гг. XX века. Источником ММСК служат различные ткани организма, но наибольшая их популяция определяется в костном мозге. Альтернативой получения ММСК рассматривают жировую ткань, периферическую и пуповинную кровь [71]. Впервые в эмбриогенезе ММСК обнаруживаются в нервном гребне. В дальнейшем ММСК мигрируют с целью образования каркаса и управления развитием паренхимы будущих внутренних органов [72]. В постнатальном онтогенезе ММСК служат источником соединительной, хрящевой, костной, мышечной, жировой тканей и т.д., участвуют в поддержании пролиферации прогениторных клеток. Выяснена возможность дифференциации ММСК в различные клетки организма (адипоциты, миофибробласты, строму кроветворной ткани, остеоциты и хондроциты) [73, 74], в том числе и нейрональные клетки. При этом показано, что ММСК могут спонтанно экспрессировать нейрональные маркеры [75]. J. Kohyama с соавт. в 2001 г. обнаружили дифференцировку ММСК костного мозга в нейроны и глию, которые впоследствии формировали аксоны, экспрессировали нейронспецифические маркеры (MAP2, NF, Nestin, GFAP) и отвечали на стимулы как функционально зрелые нейроны [76]. J.R. Sanchez–Ramos с соавт. и L. Buzanska с соавт. в 2001 г. индуцировали дифференцировку ММСК пуповинной крови в нейрональные клетки под действием ретиноевой кислоты и некоторых факторов роста (EGF, BDNF) [77, 78]. J. Vanquero с соавт. в 2006 г. продемонстрировали эффективность трансплантации стромальных клеток костного мозга крысам с экспериментальной параплегией задних лап. Причем непосредственная трансплантация в область повреждения была более эффективной по сравнению с системным введением в хвостовую вену [79]. В исследовании C.V. Borlongan с соавт. в 2004 г. также была продемонстрирована невозможность миграции ММСК через гематоэнцефалический барьер. Однако ММСК стимулировали нейро– и ангиогенез [80]. L. Urdzikova с соавт. в 2006 г. при экспериментальном повреждении СМ у крыс путем сжатия с помощью раздувания баллона, трансплантировали меченные оксидом железа ММСК [81]. Было отмечено накопление меченых клеток в области повреждения при гистологическом исследовании и улучшение поведенческих функций по шкале Basso–Beattie–Bresnehan locomotor (BBB). Восстановление функции СМ после трансплантации ММСК крысам с экспериментальной моделью травмы СМ отмечали M. Koda с соавт. в 2005 г. и D. Cizkova с соавт. в 2006 г. [82, 83].

С другой стороны, М.А. Александровой с соавт. в 2006 г. не удалось обнаружить нейрональное развитие ММСК, не содержащих НСК ни в условиях культивирования, ни после трансплантации в головной мозг (ГМ) крысам, подвергнутым гипоксии. Несмотря на существующее мнение о влиянии клеточного микроокружения на дифференцировку клеток, для ММСК этого отмечено не было. Также не было зафиксировано миграции трансплантированных культур ММСК по тканям ГМ. Трансплантация ММСК приводила к сильнейшему глиозу, инвазии макрофагов, а сами ММСК быстро резорбировались. Однако отмечалось прорастание отростков нейронов в область трансплантата, что указывает на стимуляцию аксонального роста после трансплантации [84]. Полученные данные подтверждаются многочисленными исследованиями, которые демонстрируют возможность выделения ММСК различных цитокинов, трофических и ростовых факторов, что, в свою очередь, приводит к аксональному росту и стимуляции роста сосудов [85, 86].

Описано клиническое наблюдение восстановления моторной функции нижних конечностей и чувствительности после трансплантации ММСК пуповинной крови в область повреждения СМ на уровне TX–TXII после ляминэктомии [87]. Данные о снижении неврологического дефицита были подтверждены нейрофизиологическими методами исследования. Однако, по мнению А.В. Берсенева, в этой работе не было проведено четкой дифференцировки принадлежности клеток к различным клеточным популяциям. Соответственно, нельзя исключить возможности действия других клеток, например, моноцитов и их предшественников.

Необходимо отметить, что после трансплантации ММСК существует угроза возникновения гетеротопических оссификатов [88]. Имеются данные об образовании диффузных кальцификатов легких у собак и кальцификатов в миокарде у крыс после трансплантации костного мозга. Однако результаты экспериментальных исследований J. Gao с соавт. в 2001 г. и S.M. Devine с соавт. в 2003 г. по системной трансплантации ММСК крысам и обезьянам не показали образования гетеротопических оссификатов [89, 90]. Также не было отмечено образования оссификатов после внутривенной трансфузии аллогенных ММСК людям. Хотя отдаленные результаты данных исследований неизвестны.

Кроме того, имеются данные о спонтанной онкогенной трансформации ММСК человека в культуре без участия факторов роста при длительном культивировании и о преобразовании этих клеток в саркому Юинга [91]. С другой стороны, имеются данные о прямом противоопухолевом действии ММСК при саркоме Капоши из-за подавления протеинкиназы-Akt [92].

Еще одним свойством ММСК является их иммуномодулирующее действие [93]. Экспериментальные ксеногенные и аллогенные трансплантации на модели инфаркта миокарда у крыс, иммунокомпетентных состояний различных животных, а также при несовершенном остеогенезе и различных лейкозах у людей показали отсутствие и возможность подавления реакции трансплантата против хозяина после применения ММСК [94]. Такие иммунорегуляторные свойства ММСК выгодно отличают их от других видов СК [83]. В настоящее время разработаны методы получения и применения аутогенного клеточного материала.

Таким образом, применение трансплантации ММСК с целью лечения ТБСМ в позднем периоде может приводить к регрессу неврологической симптоматики. Однако применение трансплантации ММСК не может в настоящее время быть рекомендовано к широкому клиническому применению из-за возможности развития гетеротопических оссификатов и опухолей. Поэтому необходимы дополнительные доклинические исследования. Хотя в настоящее время в Южной Корее проводится I фаза клинических испытаний трансплантации ММСК.

Гемопоэтические стволовые клетки

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) сегодня является наиболее изученной. Именно трансплантации ГСК открыли эру клинической клеточной трансплантологии, когда для лечения некоторых заболеваний крови были проведены пересадки костного мозга [95]. Первые трансплантации костного мозга были выполнены G. Mathe и E. Thomas в 1965–1968 гг. для лечения больных с ятрогенной гемопоэтической недостаточностью. В России первая трансплантация костного мозга была осуществлена А.Е. Барановым в 1974 г. Длительный опыт применения трансплантации ГСК в онкогематологии показал достаточную безопасность наряду с выраженной клинической эффективностью.

Наиболее достоверным методом измерения количества ГСК является анализ колоний *in vitro* (проба гемопоэтических предшественников на КОЭ) [95]. Однако для данного метода необходимы длительные сроки постановки пробы. Поэтому наиболее часто ГСК определяют по экспрессии определенных поверхностных антигенов. Для человеческих ГСК фенотипический набор экспрессируемых маркеров определяется как CD34$^+$, CD59$^+$, Thy1$^+$, CD38$^-$, C-kit$^-$, lin$^-$. При этом в основном подсчет и выделение ГСК основывается на определении CD34$^+$ клеток. Отсортированные на прочном флюориметре клетки кроме истинных самоподдерживающихся ГСК также содержат короткоживущие предшественники и небольшое количество нестволовых клеток [42].

В настоящее время ГСК получают из костного мозга (CD34$^+$ экспрессируют 1–4% клеточного состава), периферической (CD34$^+$ экспрессируют 0,1% клеточного состава) и пуповинной/плацентарной крови [95]. Наряду с ММСК и ОНК стволовые клетки крови интересны с клинической точки зрения, так как при их трансплантации можно использовать аутогенную модель клеточной терапии. Наиболее привлекательным способом получения ГСК является их мобилизация в периферическую кровь с помощью гранулоцитарного (Г-КСК) или гранулоцитарно-макрофагального (ГМ-КСК) колониестимулирующего фактора за счет блокирования клеточного фактора 1 в костном мозге [42]. При этом количество ГСК из периферической крови в два раза больше, чем из пунктата костного мозга. Кроме того, они лучше приживаются при аллогенных трансплантациях. В то же время использование аутогенного материала позволяет избежать иммунологических осложнений.

Исследования свойств ГСК показали их высокий пролиферативный потенциал, способность к мультилинейной дифференцировке и трансдифференцировке *in vivo* и *in vitro* [26]. Открытие способности ГСК трансдифференцироваться в нейральные линии в сочетании с доступностью ГСК сместило фокус внимания на применение ГСК в качестве многообещающего подхода замещения клеток при поражении ЦНС [53, 82, 96]. Было проведено значительное число исследований, изучающих регенеративную способность ГСК при ишемическом повреждении ГМ путем мобилизации собственных ГСК (эндогенный подход), либо трансплантации ГСК (экзогенный подход) [97, 98]. A.E. Willing с соавт. в 2003 г. показали, что клетки костного мозга грызунов мигрируют в ГМ при трансплантации предварительно облученным реципиентам и дифференцируются на микроглию и астроциты [99]. При этом внутривенный путь введения оказался более эффективным, чем интраартериарный. O.E. Sigurjonsson с соавт. в 2003 г. показали, что большое количество взрослых ГСК человека, введенных в СМ эмбриона цыпленка дифференцируется в нейроны [100]. Автор приходит к выводу, что в костном мозге человека есть популяция ГСК, которая имеет нейрогенетический потенциал и в соответствующем микроокружении может дифференцироваться в нейроны. M. Chopp с соавт. в 2000 г. [101] и S. Koshizuka с соавт. в 2004 г. [102] продемонстрировали, что трансплантация ГСК из костного мозга в поврежденный СМ мышей улучшила функциональное восстановление задних конечностей. Мыши после трансплантации могли ходить, частично распределяя свой вес на задних лапах, тогда как в контрольной группе животных этого не отмечалось. Некоторые трансплантированные ГСК, выжившие в месте повреждения, дифференцировались в глиальные клетки и нейрональные предшественники.

Интересно отметить, что мобилизация ГСК предварительным введением Г-КСФ может оказывать нейропротективное воздействие при повреждениях ЦНС. Несколько преклинических исследований отметило функциональное улучшение у крыс с очаговой церебральной ишемией после подкожного введения Г-КСФ за счет мобилизации ГСК из костного мозга и анти-апоптозного действия [81, 97, 103]. Однако данный факт нуждается в дальнейшем серьезном изучении.

Имеется клиническое наблюдение трансплантации аутогенных клеток костного мозга с подкожным введением Г-КСФ у 5 пациентов с ПСМТ в позднем периоде [104]. После проведенной трансплантации у всех пациентов наблюдалось улучшение сенсорной чувствительности и движения в течение 7 месяцев (у 4 пациентов с A до C по шкале ASIA, у одного пациента с A до B по шкале ASIA). Выраженных осложнений у пациентов отмечено не было.

В России в клинике «НейроВита» имеется опыт субарахноидальной трансплантации аутогенных ГСК более чем у 75 пациентов с ТБСМ в позднем периоде с оценкой неврологического статуса с помощью специально разработанных шкал, международных шкал (ASIA, ISCSCI-92, FIM) и нейрофизиологических методов исследования (ЭНМГ, ССВП, транскраниальная магнитная стимуляция, ЭЭГ) [105]. Результаты исследований показывают эффективность применяемой методики более чем у 50% пациентов. При этом серьезных осложнений ни у одного пациента отмечено не было.

В то же время есть ряд научных работ, которые показывают возможность участия ГСК в развитии формирования опухолей, усилении их ангиогенеза, образовании метастатической ниши и прогрессировании опухолевого роста [106]. Однако длительный опыт клинического применения трансплантации ГСК в онкогематологии показывает их безопасность.

Ряд серьезных осложнений при трансплантации костного мозга и ГСК был отмечен в связи с токсичностью криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) [107]. У ряда пациентов отмечалось развитие энцефалопатии, комы, судорог и дыхательной недостаточности. Снижение концентрации ДМСО до 5% и «отмывка» ГСК перед трансплантацией позволяет избежать развития осложнений и не влияет на жизнеспособность CD34$^+$ клеток.

Таким образом, экспериментальные работы на модели повреждения головного и спинного мозга подготовили базу для возможности внедрения трансплантации ГСК у пациентов с ТБСМ в позднем периоде. Длительный опыт применения трансплантации ГСК в онкогематологии показывает не только безопасность данной методики, но и дает реальные преимущества перед трансплантацией других видов стволовых клеток. Только для ГСК разработаны и проверены в течение длительного времени методы забора, культивирования и длительного хранения, которые широко применяются в клинической практике. Разработанные методы использования аутогенного материала исключают возможность появления иммунологических осложнений в виде реакции «трансплантат против хозяина» и почти сводят на нет этические, религиозные и многие правовые вопросы клинической клеточной трансплантологии. В то же время клинический опыт применения трансплантации ГСК при ТБСМ почти отсутствует.

Заключение

Многочисленные экспериментальные работы по исследованию свойств различных стволовых клеток и трансплантации на моделях повреждения СМ показывают возможность их применения в клинической практике. Если применение эмбрионального материала сдерживается в основном этическими и религиозными проблемами, то трансплантация ССК может с успехом использоваться для лечения различных заболеваний, в том числе и у пациентов неврологического и нейрохирургического профилей. Безусловно, полностью экстраполировать данные экспериментальных работ в клиническую практику будет невозможно. Но даже частичное восстановление неврологического дефицита может существенно улучшить социальную адаптацию и качество жизни многих пациентов.

Искусственное сдерживание внедрения клеточных технологий, связанное с боязнью трансформации «взрослых» стволовых клеток в различного рода опухоли, в большей степени надуманно и без накопления клинического опыта никогда не будет преодолено. Тем более, что немногочисленные пилотные исследования показывают эффективность и безопасность трансплантации различных СК. Организация контролируемых рандомизированных исследований, а тем более – мультицентровых испытаний, к сожалению, сдерживается рядом морально-этических аспектов и иногда – отсутствием финансовых средств для их проведения.

В то же время, экспериментальные и клинические исследования не могут на сегодняшний день ответить на достаточно простые и актуальные вопросы, связанные с трансплантацией СК. Даже в проводимых на I–II стадиях разных рандомизированных исследованиях в области клеточных технологий при ТБСМ не получен ответ о необходимом количестве СК, клеточной структуре трансплантата и длительности терапии, необходимой для восстановления нарушенной функции СМ. Также это касается способов и путей введения СК. Экспериментально показано, что трансплантация СК с той или иной степенью эффективности может осуществляться внутривенным, субарахноидальным (интратекальным) введением, применением различных подходов тканевой инженерией СМ. Учитывая строение гематоэнцефалического барьера человека и его защитные функции, внутривенные трансплантации не скоро найдут клиническое применение у пациентов с ТБСМ. Показания и противопоказания к субарахноидальному введению и, особенно, к тканевой инженерии СМ в настоящий момент четко не определены. Наш небольшой опыт клинического применения трансплантации ОНК демонстрирует, что показаниями для оперативной тканевой инженерии с реконструкцией позвоночника и СМ может быть наличие у больного сдавления СМ; ликвородинамических нарушений и/или полный функциональный перерыв СМ при отсутствии эффекта от предыдущих субарахноидальных трансфузий СК в течение 1 года. Расширение показаний допустимо, но необходимо учитывать постоянно существующий риск оперативного вмешательства, так как большое количество пациентов неоднократно оперировано до применения клеточных технологий. Последующие оперативные вмешательства на позвоночнике и СМ обычно сопровождаются типичными осложнениями (кровопотеря, трудность пластики твердой мозговой оболочки с развитием ликвореи, формирования грубого рубцово-спаечного процесса и т.д.). Абсолютные и относительные противопоказания к субарахноидальной трансфузии АГСК были представлены в предыдущей нашей публикации и также нуждаются в уточнении и обсуждении.

Остается неясным срок ПСМТ и возраст пациентов, у которых возможно применение клеточных технологий. Трансплантация ССК в острейший, острый и, возможно, в ранний период ТБСМ, вероятно, не приведет к достижению желаемых результатов из-за выраженности процессов воспаления, перекисного свободнорадикального окисления липидов и связанной с ними гибелью клеток. Поэтому трансплантацию СК более целесообразно проводить через 2–6 месяцев после ПСМТ. Уменьшение пула СК с возрастом ограничивает в настоящее время использование клеточных технологий у пациентов пожилого и старческого возраста. Однако, как было показано выше, это утверждение не относится к ММСК.

Сегодня многим исследователям становится ясно, что вряд ли экспериментальные исследования на животных смогут дать ответы на эти и многие другие вопросы. Только клинические исследования покажут окончательную безопасность и эффективность трансплантации СК. С другой стороны, необоснованное и необдуманное применение клеточных технологий может навредить как пациенту, так и еще не до конца сложившейся методике.

Таким образом, в настоящее время созданы необходимые патофизиологические и экспериментальные предпосылки для начала применения трансплантации СК у пациентов с ТБСМ. Однако для доказательства безопасности и эффективности трансплантации СК, выработки клинических аспектов трансплантации необходимо быть крайне осторожными, глубоко изучать каждый случай клеточной трансплантации и ее осложнений, подключить современные методы медицинской генетики и молекулярной биологии. Несомненно, будущее современной медицины во многом связано с развитием новых клеточных технологий, но только путь серьезных и взвешенных исследований и решений приведет к истине.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Леонтьев М.А. Эпидемиология спинальной травмы и частота полного анатомического повреждения спинного мозга. В кн.: Актуальные проблемы реабилитации инвалидов. 2003 Новокузнецк: 37–8.

2. Kakulas B.A. Neuropathology: the foundation for new treatments in spinal cord injury. Spinal Cord 2004; 42(10): 549–63.

3. ьYoung W. Bases for Hope in Spinal Cord Injury. http://sci.rutgers.edu.

4. Tsai E.C., Tator C.H. Neuroprotection and regeneration strategies for spinal cord repair. Curr. Pharm. Des. 2005; 11(10): 1211–22.

5. Брюховецкий А.С. Трансплантация нервных клеток и тканевая инженерия мозга при нервных болезнях. 2003 М.: ЗАО "Клиника восстановительной интервенционной неврологии и терапии "НейроВита": 398.

6. Берсенев А.В. Клеточная трансплантология – история, современное состояние и перспективы. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2005; 1: 49–56.

7. Горелова Л.Е. Из истории переливания крови человеку с лечебной целью. РМЖ 2002; 10: 25.

8. Деев Р.В. Научное наследие Александра Максимова и современность. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2005; 1: 4–8.

9. Станков Д.С., Катунян П.И., Крашенинников М.Е., Онищенко Н.А. Нейротрансплантация в лечение травмы спинного мозга. Вестник трансплантологии и искусственных органов 2003; 1: 44–52.

10. Richardson P.M., McGuinness U.M., Aguayo A.J. Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. Nature 1980; 284: 264–5.

11. Шевелев И.Н., Басков А.В., Яриков Д.Е., Борщенко И.А. Восстановление функции спинного мозга: современные возможности и перспективы исследования. Вопросы нейрохирургии 2000; 3: http://www.medlit.ru/medrus/jurbur.htm.

12. Acheson A., Barker P.A., Alderson R.F. et al. Detection of brain–derived neurotrophic factor–like activity in fibroblasts and Schwann cells: inhibition by antibodies to NGF. Neuron 1991; 7: 265–75.

13. Friedman B., Scherer S.S. Rudge J.S. et al. Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin–related Schwann cells in vivo. Neuron 1992; 9: 295–305.

14. Xu X.M., Chen A., Guenard V. et al. Bridging Schwann cell transplants promote axonal regeneration from both the rostral and caudal stumps of transected adult rat spinal cord. J. Neurocytol. 1997; 26: 1–16.

15. Xu X.M., Guenard V., Kleitman N., Bunge M.B. Axonal regeneration into Schwann cell–seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. J. Comp. Neurol. 1995; 351: 145–60.

16. Hui Z., Yansheng L., Yaping F. et al. Intraspinal transplantation of human fetal Schwann cells in paraplegic patients. First International Spinal Cord Injury Treatment and Trials Symposium. Abstracts and free papers 2005; Hong–Kong.

17. Ji–Hong S., Hui Z., Yan–Sheng L. et al. Rudimentary study on transplantation of Schwann cells for the repair of acute complete spinal cord injuri. First International Spinal Cord Injury Treatment and Trials Symposium. Abstracts and free papers 2005; Hong–Kong.

18. Menei P., Montero–Menei C., Whittemore S.R. et al. Schwann cells genetically modified to secrete human BDNF promote enhanced axonal regrowth across transected adult rat spinal cord. Eur. J. Neurosci. 1998; 10: 607–21.

19. Sayers S.T., Khan N., Ahmed Y. et al. Preparation of brain–derived neurotrophic factor– and neurotrophin–3–secreting Schwann cells by infection with a retroviral vector. J. Mol. Neurosci. 1998; 10: 143–60.

20. Weider N., Blesch A., Grill R.J., Tuszynski M.H. Nerve growth factor–hypersecreting Schwann cell grafts augment and guide spinal cord axonal growth and remyelinate central nervous system axons in a phenotypically appropriate manner that correlates with expression of L_1. J. Comp. Neurol. 1999; 413: 495–506.

21. Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluri–potential cells from mouse embryos. Nature 1981: 292: 154–6.

22. Martin G.R. Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned to tera–tocarcinoma stem sells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 198l; 78: 7634–8.

23. Wobus A.M., Holzhausen H., Jakel P., Schoneich J. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from mouse embryo. Exp. Cell Res. 1984; 152: 212–9.

24. McBurney M.W., Reuhl K.R., Ally A.I. Differentiation and maturation of embryonal carcinoma–derived neurons in cell culture. J. Neurosci. 1988; 8: 1063–73.

25. Brustle O. Building brain: neuronal chimeras in the study of nervous system development and repair. Brain Pathol. 1999; 9: 527–45.

26. Викторов И.В. Стволовые клетки мозга млекопитающих: биология стволовых клеток in vivo и in vitro. Известия АН. Серия Биологическая 2001; 6: 646–55.

27. Репин В.С., Ржанинова А.А., Шаменков Д.А. Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная биология и медицина. М.: «Реметэкс» 2002: 175.

28. Bjorklund A., Stenevi U. Intracerebral neural transplants neuronal replacement and reconstruction of damages circuitries. Ann. Rev. Neurosci. 1984; 7: 279–308.

29. Liu S., Qu Y. Stewart T.J. et al. Embrionic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 2000; 97: 6126–31.

30. McDonald J.W., Liu X.Z., Qu Y. et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate, and promote recovery in injured rat spinal cord. Nat. Med. 2000; 5: 1410–2.

31. Wichterle H., Lieberam I., Porter J.A. et al. Directed differention of embryonic stem cells into motor neurons. Cell. 2002; 110: 385–97.

32. Lanza R., Gearhart J., Hogan B. et al. Essentials of Stem Cell Biology. 2005: 548.

33. Брюховецкий А.С., Ушаков С.О. Клинико–патогенетическое обоснование применения фетальных тканей человека при заболеваниях нервной системы. В кн.: Трансплантация фетальных тканей человека. М. 1996: 57–9.

34. Рабинович С.С., Селедцов В.И., Астраков С.В. и др. Клеточная терапия в системе реанимации больных с тяжелой черепно–мозговой травмой. Вестник интенсивной терапии 2004; 4: 24–7.

35. Рабинович С.С., Тарабан В.Я., Повещенко О.В. и др. Возможности трансплантационного лечения спинномозговых травм (описание двух случаев). В кн.: Клинические аспекты клеточной и тканевой терапии. Омск 2000: 142–7.

36. Селедцов В.И., Рабинович С.С, Кащенко Э.А. и др. Иммунологические и клинические аспекты применения клеточной терапии в лечении последствий черепно–мозговой травмы. Клеточные технологии в биологии и медицине 2006;

37. Mori F., Himes B.T., Kowada M. et al. Fetal spinal cord transplants rescue some axotomized rubrospinal neurons from retrograde cell death in adult rats. Exp. Neurol. 1997; 143: 45–60.

38. Bamber N.I., Li H., Aebischer P., Xu X.M. Fetal spinal cord tissue in mini–guidance channels promotes longitudinal axonal growth after grafting into hemisected adult rat spinal cords. Neural. Plas. 1999; 6: 103–21.

39. Jakeman L.B., Reier P.J. Axonal projections between fetal spinal cord transplants and the adult rat spinal cord: a neuroanatomical tracing study of local interactions. J. Comp. Neurol. 1991; 307: 311–34.

40. Diener P.S., Bregman B.S. Fetal spinal cord transplants support the development of target reaching and coordinated postural adjustments after neonatal cervical spinal cord injury. J. Neurosci. 1998; 18: 763–76.

41. Отеллин В.А. Морфологическое обоснование применения метода нейротрансплантации в клинике. Вопросы нейрохирургии 1999; 4:

42. Пальцев М.А. Введение в молекулярную медицину. М.: «Медицина» 2004: 496.

43. Fujikawa T., Oh S.H., Pi L. et al. Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cells–derived insulin–producing cells. Am. J. Pathol. 2005; 166: 1781.

44. Rubio D., Garcia–Castro J., Martin M.C. Spontaneus human adult stem cells transformation. Cancer Res. 2005; 65: 3035.

45. Цымбалюк В.И., Медведев В.В. Нейрогенные стволовые клетки. Киев 2005: 596.

46. Onifer S.M., Cannon A.B., Whittemore S.R. Altered differentiation of CNS neural progenitor cells after transplantation into the injured adult rat spinal cord. Cell Transplant. 1997; 6: 327–38.

47. Whittemore S.R. Neuronal replacement strategies for spinal cord injury. J. Neurotrauma 1999; 16: 667–73.

48. Fujiwara Y., Tanaka N., Ishida O. at al. Intravenously injected neural progenitor cells of transgenic rats can migrate to the injured spinal cord and differentiate into neurons, astrocytes and oligodendrocytes. Neurosci. Lett. 2004; 366(3): 287–91.

49. Iwanami A., Kaneko S., Nakamura M. et al. Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. J. Neurosci. Res. 2005; 80 (2): 182–90.

50. Hofstetter C., Holmstrom N., Lilja J. et al. Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts and directed differentiation improves outcome. Nat. Neurosci. 2005; 8 (3): 259–60.

51. Setoguchi T., Nakashima K., Takizawa T. et al. Treatment of spinal cord injury by transplantation of fetal neural precursor cells engineered to express BMP inhibitor. Exp. Neurol. 2004; 189(1): 33–44.

52. Kuehnle I., Goodell M.A. The therapeutic potential of stem cells from adults. BMJ 2002; 325: 372–6.

53. Mezey E., Chandross K.J., Harta G. et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. Science 2000; 290: 1779¯82.

54. Brazelton T.R., Rossi F.M., Keshet G.I., Blau H.M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. Science 2000; 290: 1775¯9.

55. Берсенев А.В. Выделение и характеристика нейральных стволовых клеток из обонятельной области слизистой оболочки носа млекопитающих. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2006 1(3): 33–4.

56. Murrell W., Feron F., Wetzig A. et al. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. Dev. Dyn. 2005; 233(2): 496–515.

57. Zhuojing L., Ming Y. The culture of olfactory ensheathing cells in vitro from human embryo. First International Spinal Cord Injury Treatment and Trials Symposium. Abstracts and free papers 2005; Hong–Kong.

58. Roisen F.J., Klueber K.M., Lu C.L. et al. Adult human olfactory stem cells. Brain Res. 2001; 890: 11–22.

59. Zhang X., Klueber K.M., Guo Z. et al. Adiult human olfactory neural progenitors cultured in defined media. Exp. Neural. 2004; 186: 112–23.

60. Carter L.A., MacDonald J.L., Roskams A.J. et al. Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. J. Neurosci. 2004; 24: 5670–83.

61. Chen X., Fang H., Schwob J. Multipotency of purified, transplanted globose basal cells in olfactory epithelium. J. Comp. Neural. 2004; 469: 457–74.

62. Ramon C.A., Plant G.W., Avila J., Bunge M.B. Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. J. Neurosci. 1998; 18: 3803–15.
63. Raisman G. A promising therapeutic approach to spinal cord repair (editorial). J. R. Soc. Med. 2003; 96: 259–61.
64. Tiansheng S., Jixin R., Wu J. et al. Transplantation of olfactory ensheathing cells for the treatment of spinal cord injury. First International Spinal Cord Injury Treatment and Trials Symposium. Abstracts and free papers 2005; Hong-Kong.
65. Huiyong S., Tang Y., Wu Y.F. et al. Experimental and clinical observation olfactory ensheathing cells: Migratory property after being transplanted in spinal cord. First International Spinal Cord Injury Treatment and Trials Symposium. Abstracts and free papers 2005; Hong-Kong.
66. Shen H.Y., Tang Y., Wu Y.F. et al. The influences of transplanted olfactory ensheathing cells of axonal regeneration in adult rat spinal cord. First International Spinal Cord Injury Treatment and Trials Symposium. Abstracts and free papers. 2005; Hong-Kong.
67. Ramer L.M, Au E., Richter M.W. Peripheral olfactory ensheathing cells reduce scar and cavity formation and promote regeneration after spinal cord injury. J. Comp. Neurol. 2004; 473(1): 1–15.
68. Bianco J.I., Perry C., Harkin D.G. et al. Neurotrophin 3 Promotes Purification and Proliferation of Olfactory Ensheathing Cells From Human Nose. GLIA 2004; 45: 111–23.
69. Берсенев А.В. Аутотрансплантация обкладочных клеток обонятельного анализатора для лечения травмы спинного мозга – австралийское исследование. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2005; 1: 13–4.
70. Fe´ron F., Perry C., Cochrane J. et al. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury. Brain 2005; 128: 2951–60.
71. Мусина Р.А., Бекчанова Е.С., Сухих Г.Т. Сравнительная характеристика мезенхимальных стволовых клеток, полученных из разных тканей человека. Клеточные технологии в биологии и медицине 2005; 2: 89–94.
72. Кухарчук А.Л., Радченко В.В., Сирман В.М. Регенеративная медицина: Направления, достижения, проблемы и перспективы развития. Часть II: Стволовые пространства. Украінский медичний часопис 2004; 3(41) – V-VI: 99–107.
73. Шумаков В.И., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е. и др. Костный мозг как источник получения мезенхимальных клеток для восстановительной терапии поврежденных органов. Вестник трансплантологии и искусственных органов 2002; 4: 7–11.
74. Корочкин Л.И. Стволовые клетки как генетическая проблема. Вестник ВОГиС 2004; 8(2): 73–80.
75. Tondreu T., Lagneaux L., Dejeneffe M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. Differentiation 2004; 72(7): 319–26.
76. Kohyama J., Abe H., Shimazaki T. Brain from bone: Efficient «meta-differentiation» of marrow stromaderived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. Differentiation 2001; 68: 235–44.
77. Shanchez-Ramos J.R., Song S., Kamath S.G. et al. Expression of neural markers in human umbilical cord blood. Exp. Neurol. 2001; 171; 109–15.
78. Buzanska L., Machaj E.K., Zablocka B. et al. Human cord blood derived neurons, astrocytes and oligodendrocytes. Toxicol. In Vitro 2005; 19(7): 991–9.
79. Vanquero J., Zurita M., Oya S., Santos M. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: Systemic or local administration? Neurosci. Lett. 2006; 394(1): 1–6.
80. Borlongan C.V., Saporta S., Poulos S.G. et al. Viability and survival of hNT neurons determine degree of functional recovery in grafted ischemic rats. Neuro. Rep. 1998; 9: 2837–42.
81. Urdzikova L., Jendelova P., Glogarova K. et al. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. J. Neurotrauma 2006; 23(9): 1379–91.
82. Koda M., Okada S., Nakayama T. et al. Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice. Neuroreport. 2005; 16(16): 1763–7.
83. Cizkova D., Rosocha J., Vanicky I. et al. Transplants of Human Mesenchymal Stem Cells Improve Functional Recovery After Spinal Cord Injury in the Rat. Cell. Mol. Neurobiol. 2006; 26(7-8):1165–78.
84. Александрова М.А., Сухих Г.Т., Чайлахян Р.К. и др. Сравнительный анализ дифференцировки и поведения нейральных и мезенхимальных стволовых клеток человека in vitro и in vivo. Клеточные технологии в биологии и медицине 2006; 1: 44–52.
85. Kurozumi K., Nakamura K., Tamiya T. et al. Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. Mol. Ther. 2005; 11(1): 96–104.
86. Wislet-Gendebien S., Bruyere F., Hans G. et al. Nestin-positive mesenchymal stem cells favour the astroglial lineage in neural progenitors and stem cells by releasing active BMP4. BMC Neurusci. 2004; 5(1): 1–33.
87. Берсенев А.В. Трансплантация клеток пуповинной крови в область повреждения спинного мозга – анализ первого клинического наблюдения. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2006; 1(3): 30–1.
88. Деев Р.В., Берсенев А.В. Роль стволовых стромальных (мезенхимальных) стволовых клеток в формировании гетеротопических оссификатов. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2005; 1: 46–8.
89. Gao J., Dennis J.E., Muzic R.F. et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. Cells Tissues Organs 2001; 169(1): 12–20.
90. Devine S.M., Cobbs C., Jennings M. et al. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. Blood 2003; 101(8): 2999–3001.
91. Берсенев А.В. Изучение спонтанной онкогенетической трансформации мезенхимальных стволовых клеток человека в культуре. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2005; 1: 14–6.
92. Khakoo A.Y., Pati S., Anderson S.A. et al. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. J. Exp. Med. 2006; 203(5): 1235–47.
93. Кругляков П.В., Лохматова Е.А., Климович В.Б., Зарицкий А.Ю. Мезенхимальные стволовые клетки и иммунопатологические состояния организма. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2006; 3(5): 36–41.
94. Григорян А.С. Трансплантация мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток для лечения реакции «трансплантат против хозяина». Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2006; 3(5): 31–2.
95. Румянцев А.Г., Масчан А.А. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей. М.: «МИА» 2003: 910.
96. Mezey E., Key S., Vogelsang. G. et al. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003; 100: 1364–9.
97. Lu C.Z., Xiao B.G. G-CSF and neuroprotection: a therapeutic perspective in cerebral ischaemia. Biochem. Soc. Trans. 2006; 34(6): 1327–33.
98. Zhao Z.M., Li H.J., Liu H.Y. et al. Intraspinal transplantation of $CD34^+$ human umbilical cord blood cells after spinal cord hemisection injury improves functional recovery in adult rats. Cell. Transplant. 2004; 13(2): 113–22.
99. Willing A.E., Vendrame M., Mallery J. et al. Mobilized peripheral blood cells administered intravenously produce functional recovery in stroke. Cell. Transplant. 2003; 12: 449–54.
100. Sigurjonsson O.E., Perreault M.C., Egeland T. et al. Adult human hemopoietic stem cells produce neurons efficiently in the regenerating chicken embryo spinal cord. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005; 5: 5227–32.
101. Chopp M., Zhang X.H., Li Y. et al Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. Neuroreport. 2000; 11: 3001–5.
102. Koshizuka S., Okada S., Okawa A. et al. Transplanted hematopoietic stem cells from bone marrow differentiate into neural lineare cells and promote functional recovery after spinal cord injury in mice. J. Neuropathol. Neurol. 2004; 63(1): 64–72.
103. Fujiki M., Furukawa Y., Kobayashi H. et al. Geranylgeranylacetone limits secondary injury, neuronal death, and progressive necrosis and cavitation after spinal cord injury. Brain Res. 2005; 1053(1-2): 175–84.
104. Yoon H.A. Treatment of complete spinal cord injury patients by autologus bone marrow cell transplantation and administration of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). Materials of the First International Spinal Cord Injury Treatment and Trials Symposium. Abstracts and free papers 2005; Hong-Kong.
105. Зайцев А.Ю., Красавин И.В., Брюховецкий А.С. и др. Динамика клинико-электонейромиографических показателей у пациентов с хроническим повреждением спинного мозга при лечении аутогенными гемопоэтическими стволовыми ($CD34^+$) клетками. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2006; 3(5): 48–53.
106. Берсенев А.В. Прогенераторные клетки костного мозга участвуют в метастазировании опухолей. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2006; 1(3): 17–8.
107. Берсенев А.В. Судороги и кома как осложнения, связанные с токсичностью криопротектора (ДМСО) при трансфузии гемопоэтических клеток в клинике трансплантации костного мозга. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2006; 1(3): 31–2.