

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

УДК 616.832-001-085:577:611.013(048.8)

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
В ЛЕЧЕНИИ ТРАВМ СПИННОГО МОЗГА****Кузнецов С.Б., Корель А.В.***ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, Новосибирск, e-mail: sergei_kuznetsov@yahoo.com*

Несмотря на успехи в медицине и развитие хирургической техники, сегодняшняя клиническая терапия повреждений спинного мозга в значительной степени неэффективна. Травмы спинного мозга по-прежнему остаются одними из самых сложных патологий, известных человечеству, не поддающихся терапевтическому лечению и с очень пессимистичным прогнозом. Достижения в биологии стволовых клеток за последние десятилетия показали, что стволовые клетки разного происхождения могут обеспечить неисчерпаемый источник нейронов и глиальных клеток для клеточной терапии, а также оказывать нейрозащитное действие на травмированную ткань, открывая тем самым новые горизонты для тканевой инженерии и регенеративной медицины. В этом обзоре мы приводим особенности стволовых клеток, происходящих из разных источников, и обсуждаем достижения в клеточной терапии травм спинного мозга. Акцент был сделан на применении индуцированных плюрипотентных клеток (ИПК) и взрослых мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Далее мы рассматриваем особенности мезенхимальных стволовых клеток, происходящих из костного мозга и адипозной ткани в применении к лечению травм спинного мозга, а также последние и наиболее значимые результаты исследований *in vitro* и *in vivo*, посвященных регенеративным и нейрозащитным свойствам МСК.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные клетки, мезенхимальные стволовые клетки, травма спинного мозга, клеточная терапия

THE USE OF STEM CELLS IN THE TREATMENT OF SPINAL CORD INJURIES**Kuznetsov S.B., Korel A.V.***Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Y.L. Tsivyan, Novosibirsk, e-mail: sergei_kuznetsov@yahoo.com*

Despite advances in medicine and the development of surgical techniques, today's clinical therapy for spinal cord injuries is largely ineffective. Spinal cord injuries are still one of the most difficult pathologies known to mankind, which are not amenable to therapeutic treatments and with a very pessimistic forecast. Advances in stem cell biology over the past decades have shown that stem cells of different origin can provide an inexhaustible source of neurons and glial cells for cell therapy, and also have a neuroprotective effect on injured tissue, thus opening new horizons for tissue engineering and regenerative medicine. In this review, we present the features of stem cells originating from different sources, and discuss the achievements in cell therapy of spinal cord injuries. Emphasis was placed on the use of induced pluripotent cells (IPC) and adult mesenchymal stem cells (MSCs). Next, we consider the features of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue as applied to the treatment of spinal cord injuries, as well as the latest and most significant results of *in vitro* and *in vivo* studies on the regenerative and neuroprotective properties of MSC.

Keywords: induced pluripotent cells, mesenchymal stem cells, spinal cord injury, cell therapy

Повреждение спинного мозга – механическая травма или следствие заболевания – часто приводит к необратимым для пациента последствиям. Поврежденные аксоны центральной нервной системы слабо подвержены регенерации, что ведет к полному или частичному параличу организма ниже точки повреждения спинного мозга, мучительному не только физически, но и морально для пациента. Большинство таких травм являются результатом дорожно-транспортных происшествий, криминальных нападений, промышленных аварий и других несчастных случаев. Но повреждение спинного мозга может быть результатом не физических травм, а инфекций, недостаточного кровотока и опухолей. В настоящее время лечение травм спинного мозга в основном ограничивается введени-

ем высоких доз стероидов для предотвращения отека спинного мозга и уменьшения вторичного воспалительного процесса, но эффективность такого лечения невысока. Частота травм спинного мозга во всем мире составляет в среднем 40–80 пострадавших на миллион человек, при этом, по данным Всемирной Организации Здравоохранения за 2013 г., ежегодно повреждения спинного мозга повсеместно получают от 250 000 до 500 000 человек. До совсем недавнего времени повреждение спинного мозга означало пожизненное заключение пациента в инвалидном кресле. Однако в последнее десятилетие в мире были проведены обширные исследования по использованию стволовых клеток при лечении травм спинного мозга. С точки зрения научных достижений открытие и использование стволовых клеток

для лечения заболеваний и травм является одной из важных вех в медицине. Если какое-либо открытие в медицине и можно назвать революционным, то это использование стволовых клеток в регенеративных процессах любого типа. Ученые из разных стран и лабораторий использовали различные стволовые клетки – эмбриональные, индуцированные плюрипотентные, взрослые стволовые клетки из различных тканей. Стволовые клетки разного происхождения в своей исходной форме не дифференцированы и способны под воздействием специфических факторов направленно дифференцироваться в нужный тип клеток. Терапия стволовыми клетками, а точнее, трансплантация стволовых либо дифференцированных клеток используется для восстановления тканей или органов, которые были повреждены в ходе заболевания или травмы. Трансплантация стволовых клеток пациентам с травмами спинного мозга имеет очень большой потенциал в их лечении и полном восстановлении, а значит, в возвращении к привычному для них образу жизни.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) имеют максимальный потенциал для дифференцировки в любые типы клеток, из которых состоит взрослый организм. Однако использование эмбриональных клеток в медицине ограничено целым рядом причин. Среди них на первых местах стоят этические причины, так как источником этих клеток могут быть только человеческие эмбрионы на стадии бластоцисты. Кроме того, есть и биологические причины, ограничивающие использование эмбриональных клеток в медицине, а именно, стволовые клетки, полученные из эмбрионов, будут являться аллогенными для пациента, что приведет к иммунному конфликту между клетками и организмом пациента. Мы подробно описали все ограничения на использование эмбриональных клеток в медицине в обзоре [1]. Своеобразной революцией в биологии и медицине стало открытие способов перепрограммирования дифференцированных клеток в плюрипотентные, подобные эмбриональным стволовым клеткам, которые называют индуцированными плюрипотентными клетками (ИПК). Перепрограммирование позволяет использовать клетки самого пациента, например фибробласты кожи, для получения плюрипотентных клеток с последующей направленной дифференцировкой. Методы перепрограммирования дифференцированных клеток описаны нами в том же обзоре [1]. В последние пару десятилетий в биологии активно развивались способы направленной дифферен-

цировки стволовых клеток для получения желаемых клеточных типов. К настоящему времени уже накоплен опыт получения нужных типов клеток из различных тканевых стволовых клеток, называемых мультипотентными, чей потенциал ниже, чем у плюрипотентных. В этом обзоре мы представляем результаты исследования свойств индуцированных плюрипотентных клеток и мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток и перспективы их использования при лечении травм спинного мозга.

Индукцированные плюрипотентные клетки. В 1999 г. Макдональд с коллегами впервые продемонстрировали эффективность трансплантации клеток предшественников нейронов в поврежденный спинной мозг [2]. Они получали клетки предшественников из мышечных эмбриональных стволовых клеток и пересаживали их в спинной мозг крысы через 9 дней после травмы. Привитые клетки дифференцировались в нейроны, олигодендроциты и астроциты в поврежденной ткани и мигрировали вдоль rostrocaudальной оси от пораженного эпикавентрального центра. По прошествии восстановительного периода животные с трансплантированными клетками показали способность поддерживать вес тела на задних ногах и частично передвигаться. В мире было проведено множество экспериментов с трансплантацией клеток предшественников нейронов в зону повреждения спинного мозга. Кроме эмбриональных стволовых клеток использовали и другие источники клеток предшественников, например головной мозг. Понятно, что все эксперименты проводились с клетками и тканями животных, и переносить эти эксперименты в клиническую медицину по этическим соображениям было невозможно. В 2006 г. японские ученые показали, что в фибробластах мыши можно восстановить плюрипотентность через экзогенную экспрессию четырех транскрипционных факторов, Oct3 / 4, Sox2, c-Myc и Klf4, которые в соматических дифференцированных клетках не активны, превратив их, таким образом, в индуцированные плюрипотентные клетки (ИПК) [3]. Разнообразные типы ИПК млекопитающих были получены различными методами, и каждый из этих типов имеет разные биологические свойства. Прежде чем начать клиническое использование самих ИПК или клеток на основе их дифференцировки, необходимо провести детальную оценку клеток, включая потенциалы их дифференцировки и онкогенную активность в различном микроокружении для определения их безопасности и эффективности при трансплантации клеток. Исследователи из Японии [4] продемонстрировали направлен-

ную нейронную дифференцировку ИПК мыши и исследовали их терапевтический потенциал в модели повреждения спинного мозга мыши. Нейронные стволовые клетки и клетки предшественники, полученные из ИПК мышей, были предварительно оценены как неонкогенные путем их трансплантации в мозг иммунодефицитных мышей. После проверки такие клетки были пересажены в спинной мозг мышей на 9 день после клинической имитации травмы. Трансплантированные клетки дифференцировались во все три нейронные линии без образования тератом или других опухолей. Они также принимали участие в повторной миелинизации и индуцировали рост аксонов, способствуя восстановлению функциональной моторики организма. При вполне успешном завершении экспериментов авторы, тем не менее, считают, что их результаты являются лишь первым шагом к клиническому применению стволовых клеток. Смешанная группа исследователей из Испании и Австралии в своей статье [5] отмечает, что по-прежнему недостаточно информации о специфике дифференцировки трансплантированных нейронных стволовых клеток (НСК), происходящих из ИПК, в поврежденном спинном мозге. Они трансплантировали НСК, полученные из индуцированных плюрипотентных клеток, которые получили перепрограммированием соматических клеток взрослого человека, крысам через 0 или 7 дней после клинической имитации травмы спинного мозга, и оценивали потенциал восстановления моторики и локомоцию животных. Они также гистологически анализировали приживание, пролиферацию и дифференцировку НСК в наростной ткани в спинном мозге в течение 7, 21 и 63 дней после трансплантации. В конечный момент времени большинство привитых клеток дифференцировались в нервные и астроглиальные линии, но не в олигодендроциты, тогда как некоторые привитые клетки оставались недифференцированными и пролиферирующими. Предварительное воспаление тканей поврежденного спинного мозга индуцировало пролиферацию пересаженных клеток и, следовательно, существуют возможные риски, связанные с трансплантацией нейронных стволовых клеток, полученных из ИПК. Существуют опубликованные сообщения о негативных результатах использования ИПК для лечения травм спинного мозга. В двух статьях [6, 7] показано, что, несмотря на способность дифференцироваться в нервные клетки, клетки предшественники, происходящие из ИПК, не показали существенного улучшения функционирования организма после транс-

плантации. Кроме того, требуется много времени для создания и оценки ИПК [8], что делает эти клетки нереалистичным инструментом для персонализированной ИПК-терапии, поскольку оптимальное время для трансплантации стволовых клеток приходится на подострую фазу [9]. Как следствие этих фактов получается: либо ИПК должны иметь донорское происхождение, тем самым пропуская основной фактор, которым они привлекательны в первую очередь, либо они должны трансплантироваться в хронические фазы травмы [10], а поздняя трансплантация показала плохие результаты. Более важным является то, что индуцированные плюрипотентные клетки, как и эмбриональные стволовые клетки, не лишены тератогенной и онкогенной активности [11–13]. Японский исследователь Окано в своей статье [14] описывает, что вторичные нейросферы, полученные из различных ИПК мыши, способны к дифференцировке в клетки нервной системы и образованию тератом после трансплантации в спинной мозг иммунодефицитных мышей NOD / SCID. Автор с коллегами обнаружили, что происхождение (источник соматических клеток) ИПК является решающим фактором, определяющим потенциальную онкогенность нервных клеток и клеток предшественников, полученных из ИПК, и что их онкогенность обусловлена постоянным присутствием недифференцированных клеток во вторичных нейросферах. Далее указывается, что нейронные стволовые клетки, полученные из ИПК без *c-Myc* гена, отбираемые без использования селективных препаратов, показали устойчивую онкогенность. При этом в химерных мышцах, полученных с их участием, тератом не выявлено. Кроме того, ученые исследовали, может ли трансплантация неонкогенных нейронных стволовых клеток на основе Nanog-ИПК способствовать восстановлению локомоторной функции в модели повреждения спинного мозга мыши. В результате они обнаружили, что должным образом предварительно оцененные клетки, основанные на клонах ИПК, могут быть перспективным источником клеток для будущей трансплантационной терапии травм спинного мозга. Хотя использование донорских клеток не является оптимальным, группа финских исследователей [7] решили проверить эффективность лечения травм спинного мозга индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками аллогенного, или даже ксеногенного, происхождения. При аллогенной трансплантации ИПК крайне важно исследовать влияние терапии стволовыми клетками на функциональное

восстановление после травмы спинного мозга с использованием фармакологически иммуносупрессированных иммунокомпетентных моделей животных. Они изучили функциональный результат трансплантации человеческих нервных стволовых клеток, полученных из ИПК, в поврежденный спинной мозг мыши в подострой стадии, используя такролимус в качестве иммунодепрессанта. Для экспериментов использовали мышей линии C57BL/6J, которые не являются иммунодефицитными. Эксперименты показали, что человеческие нервные стволовые клетки, трансплантированные в спинной мозг фармакологически иммуносупрессированным мышам, обеспечивали плохую долгосрочную выживаемость и не смогли улучшить функциональное восстановление после травмы спинного мозга. Авторы предположили, что недостаточный эффект терапии на основе ИПК, наблюдаемый в их экспериментах, может быть связан с недостаточным иммунодепрессивным эффектом, обеспечиваемым монотерапией такролимусом в сочетании с иммуногенностью трансплантированных клеток и сложным микроокружением поврежденного спинного мозга. Тем не менее группа китайских ученых провела метаанализ публикаций 2011–2017 гг. [15], в которых приводились результаты экспериментов по использованию ИПК в лечении травм спинного мозга у крыс. В анализ были включены 79 статей с результатами лечения 212 крыс. По совокупности результатов их систематического обзора и метаанализа поддерживается гипотеза о том, что трансплантация ИПК из эмбриональных легочных фибробластов человека и эмбриональных фибробластов мыши улучшает восстановление локомоторной функции у крыс, подвергнутых клинической травме спинного мозга, и представляет собой, по существу, перспективный для клинической медицины инструмент.

Коллектив японских исследователей в своей статье [16] отмечает, что основная масса исследований в области трансплантации стволовых клеток в зону повреждения спинного мозга были сделаны на грызунах. Поскольку существуют значительные различия в нейроанатомии и иммунологических ответах между грызунами и приматами, то крайне важно определить эффективность и безопасность трансплантированных аллогенных нейральных предшественников, полученных из эмбриональных стволовых клеток в модели повреждения спинного мозга у нечеловекообразных приматов. В этом исследовании авторы использовали ЭСК как источник нейральных предше-

ственников, а не ИПК, но мы включили их результаты в свой обзор. Авторы использовали нейральные предшественники, полученные из эмбриональных стволовых клеток обыкновенной мармозетки, которые они трансплантировали взрослым мармозеткам в эпицентр травмы спинного мозга через 14 дней после поражения. В контрольной группе вместо клеток вводили забуференный фосфатом физиологический раствор. В присутствии низкой дозы такролимуса несколько привитых клеток выживали без образования опухолей и дифференцировались в нейроны, астроциты или олигодендроциты. Иммуоэлектронное микроскопическое исследование показало, что привитые олигодендроциты, полученные из нейральных предшественников, способствовали ремиелинизации демиелинизированных аксонов. Кроме того, некоторые привитые нейроны образовывали синаптические связи с клетками-хозяевами, а некоторые трансплантированные нейроны были миелинизированы клетками-хозяевами. В конце концов, восстановление функционального состояния организма значительно улучшилось в группе трансплантации по сравнению с контрольной группой. В совокупности их результаты показывают, что аллогенная трансплантация нейральных предшественников у нечеловекообразного примата способствовала функциональному восстановлению после травмы спинного мозга без выявленной онкогенности. Еще в одном исследовании не человекообразных приматов, а именно, на макаках резус, показали положительные результаты, связанные с использованием стволовых клеток. Используя взрослые обезьяны нейронные стволовые клетки для трансплантации, Немати с коллегами [17] показали, что сенсорная и моторная функция улучшаются быстрее, чем у контрольных животных. Кроме того, контрольные животные проявляли только некоторые движения в суставах, тогда как животные, инъецированные стволовыми клетками, проявляли активные движения конечностями.

Российско-китайский коллектив ученых в своем обзоре [18] пишет, что недавние исследования показали схожесть морфологических характеристик, плюрипотентностей и самообновления, а также свойств экспрессии генов у ЭСК и ИПК. Однако по сравнению с ЭСК, низкий процент нейральных предшественников имеет тенденцию дифференцироваться в нейронные линии при направленной дифференцировке ИПК. Поэтому разработка эффективной программы индукции, ориентированной на нейронную линию, важна для клинического примене-

ния индуцированных стволовых клеток. Эксперименты также показали увеличение частоты возникновения раковых опухолей в ЦНС после трансплантации нейронов, полученных из ИПК, и это может быть результатом продолжительной экспрессии факторов транскрипции во время перепрограммирования, что имеет тенденцию увеличивать появление тератом. Ученые, работающие в этом направлении, улучшили схему перепрограммирования с использованием аденовирусных транспозонов или прямой трансдукции белка. При необходимости вводятся факторы транскрипции для достижения перепрограммирования и снижения скорости опухолеобразования клонированных потомков ИПК.

Группа ученых из Техаса (США) провела серию экспериментов с ИПК, которые являются потенциально неограниченным аутологичным источником клеток и обеспечивают хорошую способность к регенерации тканей, особенно при повреждении спинного мозга. В статье [19] они пишут, что, несмотря на значительный прогресс, достигнутый в использовании нейронных клеток-предшественников, полученных из ИПК, в клинических испытаниях остаются некоторые проблемы. Среди них – разработка неинвазивного способа получения исходных клеток и более безопасное их перепрограммирование и очистка нейральных предшественников до трансплантации. В своем исследовании авторы разработали безопасный и экономически эффективный способ получения клинически приемлемых нейральных предшественников. Они выделяли клетки от мочи пациентов и перепрограммировали их в ИПК не интегрирующимися в геном векторами на основе вируса Сендай, затем проводили направленную дифференцировку. Нейральные предшественники очищали с помощью антитела A2B5, специфически распознающего гликоганглиозид на клеточной поверхности клеток нейронной линии. Чтобы проверить функциональность полученных клеток, они переносили их в поврежденный торакальный отдел спинного мозга. Через восемь недель после трансплантации привитые клетки выжили, интегрировались в поврежденный спинной мозг и дифференцировались в нейроны и клетки глии. Авторы указывают, что их особый акцент был сделан на источнике получения клеток, способах их перепрограммирования, дифференцировки и очистки специально предназначенных для решения вопросов для трансплантации при моделировании восстановления после травм спинного мозга.

Тем не менее временной фактор для успешного восстановления функций спинного мозга после травм остается самым важным. Японские авторы Нагоши и Окано в своем обзоре [20] пишут, что для получения ИПК и нейральных предшественников у пациента требуется около 6 месяцев (индукция соматических клеток в ИПК и их дифференцировка в нейральные предшественники требуют по 3 месяца каждый). Кроме того, для оценки качества полученных клеток, включая их онкогенный потенциал, потребуется больше года. Поскольку оптимальное время для трансплантации клеток находится в подострой фазе (через 2–4 недели после травмы), нереалистично пересаживать аутологичные ИПК-производные нейральные предшественники в течение этого временного окна. По данным этих авторов, на 2017 г. было проведено всего несколько исследований, в которых использовали трансплантацию нейральных предшественников в хронической стадии травмы спинного мозга. Поскольку большинство пациентов с травмой спинного мозга находятся в хронической фазе, необходимо постоянно искать способы выявления регенеративной эффективности привитых клеток-предшественников, возможно путем оценки микросреды поврежденного спинного мозга и проведения комбинаторной терапии с помощью лекарств. Введение лекарств или трофических факторов является еще одной стратегией для содействия регенерации поврежденного спинного мозга. Поскольку терапевтическая эффективность трансплантации нейральных предшественников при хронической стадии травмы спинного мозга не была установлена, возможно, комбинационная терапия, использующая специфичные препараты повысит регенеративный эффект. В хронической стадии на месте травмы образуется глиальный шрам, который препятствует прорастанию аксонов, и особенностью клеток шрамовой ткани является экспрессия хондроитинсульфатов, которые ингибируют рост аксонов [21, 22]. Хондроитинсульфаты (CSPG) являются мощными ингибиторами роста клеток центральной нервной системы у взрослых. Использование фермента хондроитиназы ABC (ChABC) для снижения ингибирующих свойств CSPG в экспериментальных моделях повреждения спинного мозга показало существенное улучшение функций в поврежденном спинном мозге. Английские авторы в своем обзоре [23] рассматривают доказательства того, что лечение травм спинного мозга на хронической стадии с помощью ChABC может оказывать многократное положительное влияние

на восстановление после травмы спинного мозга. К ним относятся содействие регенерации поврежденных аксонов, пластичность неповрежденных путей и нейропротекция поврежденных нейронов. Что еще более важно, было продемонстрировано, что терапия с помощью ChABC способствует значительному восстановлению функций организма у животных с поврежденным спинным мозгом. Таким образом, существуют надежные доклинические данные, свидетельствующие о положительном эффекте лечения хондроитиназой ABC после травмы спинного мозга. Кроме того, эти эффекты были воспроизведены в нескольких различных моделях травм с независимым подтверждением в разных лабораториях, что обеспечивает важную валидацию ChABC в качестве перспективной терапевтической стратегии. Комбинирование терапии хондроитиназой с трансплантацией нейральных предшественников, полученных из ИПК, существенно расширяет временные рамки для лечения травм спинного мозга и позволяет добиваться положительного эффекта даже на хронической стадии болезни, по крайней мере у экспериментальных животных. Тем не менее ученые ищут и другие подходы, чтобы иметь возможность восстанавливать поврежденный спинной мозг на острой и подострой стадиях заболевания. Одним из таких подходов является использование мезенхимальных стволовых клеток.

Мезенхимальные стволовые клетки. Источником получения мезенхимальных стволовых клеток традиционно считается костный мозг [24]. Однако пункция костного мозга является достаточно инвазивной процедурой, и в костном мозге присутствуют две популяции стволовых клеток: мезенхимальные стволовые и гемопоэтические стволовые. При выделении мезенхимальных стволовых приходится освобождаться от гемопоэтических стволовых клеток, что требует дополнительного времени на очистку и проверку выделенных клеток. Кроме костного мозга МСК присутствуют и в жировой ткани. Мезенхимальные стволовые клетки, полученные из жировой (адипозной) ткани, по-видимому, являются идеальной популяцией стволовых клеток для практической регенеративной медицины, потому что они практически лишены недостатков, присущих эмбриональным стволовым и индуцированным плюрипотентным клеткам. Кроме того, из-за их аутологичного происхождения они являются неиммуногенными, они многочисленны и легкодоступны для выделения. Несмотря на то, что МСК из адипозной ткани проис-

ходят из мезодермальных линий, несколько доклинических исследований показали, что использование адипозных МСК в регенеративной медицине не ограничивается мезодермальной тканью, но также распространяется как на экзодермальные, так и на эндодермальные ткани и органы.

Терапевтические особенности и безопасность МСК были описаны для нескольких заболеваний центральной нервной системы, включая амиотрофический боковой склероз, болезнь Альцгеймера и Паркинсона, рассеянный склероз, инсульт и травматическую травму головного мозга [25]. Изрядное количество авторов сообщают, что трансплантации МСК могут стимулировать регенерацию после травмы спинного мозга [26–28]. Мезенхимальные стволовые клетки, как было показано, регулируют иммунный ответ ткани после имплантации в место повреждения [29]. Более того, есть свидетельства, что трансплантированные МСК помогают принимающим аксонам прорасти в привитый (подсаженный) спинной мозг [30]. В предыдущие десятилетия было проведено множество экспериментальных исследований для разработки возможных вариантов лечения пациентов с повреждениями спинного мозга. Многие исследования показали определенную позитивную степень морфологических изменений, частично сопровождающихся восстановлением двигательных функций и поведенческих реакций в различных животных моделях [31, 32]. Препятствиями для трансплантационной терапии на основе клеток остаются низкие показатели выживаемости привитых клеток после трансплантации в поврежденный спинной мозг, удержание привитой клетки на месте поражения без миграции, заполнение образовавшейся полости поражения.

Несмотря на широкие исследования возможностей аутологичной трансплантации МСК при регенерации повреждений ЦНС, точные механизмы действия МСК на окружающие ткани все еще недостаточно ясны. В настоящее время признано, что эффективность трансплантации МСК основана на секреции широкого спектра веществ, которые вырабатываются либо клетками-реципиента, либо самими МСК (паракринная функция). Также известно, что МСК выделяют несколько факторов роста, таких как нейротрофический фактор мозга (BDNF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста нервной системы (NGF), которые играют важную роль в питании и защите нейронов [33]. После трансплантации МСК способны проявлять прямую нейрозащитную функцию, уменьшая чувствитель-

ность нейронов к лигандам глутаматных рецепторов и изменяя экспрессию генов, что указывает на связь между терапевтическим эффектом МСК и активацией пластичности клеток в поврежденной ЦНС [34]. Кроме того, что трансплантированные МСК формируют свое микроокружение, они могут дифференцироваться в миелинирующие клетки, которые ремиелинируют демиелинированные аксоны. Эти ремиелинированные аксоны, покрытые миелином и окруженные базальной мембраной, в экспериментах демонстрируют улучшенную проводимость [35, 36]. Как и в случае с индуцированными плюрипотентными клетками, сравнение аутологичной и аллогенной трансплантации в острой и подострой фазах травмы спинного мозга у собак показало, что аутологичные МСК из спинного мозга дают лучший терапевтический эффект и лучшую выживаемость клеток по сравнению с аллогенными; однако, несмотря на меньший эффект улучшения нейральных функций, аллогенная имплантация МСК имеет некоторые преимущества практического аспекта: например, возможность хранить клетки в клеточном депозитории, сокращенное время подготовки клеток к трансплантации и стоимость самой подготовки, а также возможность использования гораздо большего числа клеток [37].

По морфологическим и фенотипическим характеристикам адипозные МСК и МСК из костного мозга существенно не различаются. Полученные из жировой ткани МСК имеют фенотип и профиль генной экспрессии, аналогичные таковым у МСК из костного мозга [38], и их можно легко индуцировать в ранние и зрелые нейроэктодермальные клетки с использованием метода, описанного немецкими учеными [39]. МСК из адипозной ткани пролиферируют значительно быстрее, чем МСК из костного мозга и также выделяют множество факторов роста, таких как фактор роста гепатоцитов (HGF) и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), которые могут ускорять регенерацию поврежденного спинного мозга. Кроме того, жировая ткань содержит более многочисленные популяции МСК, чем костный мозг [40]. Так, только от 0,001 до 0,01% мононуклеарных клеток костного мозга являются стволовыми [41], а из 1 г жировой ткани можно выделить 5×10^3 стволовых клеток, что в 500 раз больше, чем из эквивалентного количества костного мозга [42], что делает адипозные МСК(ж) перспективным объектом для регенеративной медицины. Группа бельгийских ученых [43] выяснили, что МСК, выделенные из костного мозга, экспрессируют нейрон-

ные и глиальные белки (Nestin, Tuj-I, β -тубулин, тирозингидроксилаза [TH], MAP-2 и GFAP). После нескольких пассажей они отметили увеличение экспрессии более зрелых нейронных / глиальных белков (TH, MAP-2 и GFAP) после воздействия нейронной индукционной среды, что подтвердило дифференцировку МСК в нейроны и астроциты. А их израильские коллеги [44] продемонстрировали экспрессию 12 нейронных генов, 8 генов, связанных с нейродопаминергической системой, и 11 факторов транскрипции с нейронным значением в МСК человека. Их результаты показывают, что, в отличие от клеток, которые не экспрессируют нейронные гены, человеческие МСК предрасположены к дифференциации в нейронные и глиальные линии в специфических условиях. Это также объясняет относительную легкость, с которой МСК, трансплантированные в центральную нервную систему (ЦНС), дифференцируются в различные функциональные типы нейронных клеток. Однако чешские ученые [45] в своих экспериментах с МСК из адипозной ткани показали, что предифференцированные в нейральные сферы стволовые клетки *in vitro* экспрессируют NCAM, NG2, S100 и p75. Количественная РТ-ПЦР с различными интервалами после нейронной индукции показала повышенную экспрессию глиальных маркеров NG2 и p75 и маркеров нейрального предшественника NCAM и Nestin. Они также выявили три различных типа мембранных токов в этих клетках, однако ни один из них не указывал на зрелый фенотип нейронов. В экспериментах *in vivo* предифференцированные клетки выживали лучше, чем МСК из адипозной ткани, и тесно взаимодействовали с тканями хозяина, покрывая хозяйские аксоны и олигодендроциты. Некоторые трансплантированные клетки были NG2- или CD31-позитивными, но в них не были обнаружены специфические нейронные маркеры. Итальянские ученые показали, что нейротрофические особенности AMSC обладают своей специфической способностью экспрессировать не только секретлируемые нейротрофины / нейротропные молекулы, но также кодирующие гены структурных белков, имитирующие астроцитарную функцию в поддержании метаболизма нейронов и функции в центральной нервной системе, а также возможность дифференцироваться в астроциты [46].

В экспериментах китайских ученых на крысах человеческие стволовые клетки, выделенные из адипозной ткани и из костного мозга, показали сходную экспрессию поверхностных белков, а МСК из адипоз-

ной ткани показали более высокую пролиферативную активность с более высокой экспрессией фактора роста сосудистых эндотелиальных клеток, фактора роста гепатоцитов и BDNF, чем МСК из костного мозга. После трансплантации крысам и те, и другие клетки мигрировали в поврежденный спинной мозг без дифференцировки на глиальные или нейронные элементы. Трансплантация стволовых клеток из адипозной ткани заметно влияла на микроокружение в зоне повреждения спинного мозга и характеризовалась значительным увеличением количества нейротрофического фактора BDNF. Отмечалось также усиление ангиогенеза, повышенное число сохранившихся аксонов, уменьшение числа ED1-позитивных макрофагов и замедление образования полости. Эти изменения сопровождались улучшением функционального восстановления [47]. Наконец, американские ученые выявили, что в отличие от МСК из адипозной ткани, в клетках из костного мозга было обнаружено раннее начало репликативного старения при пролиферации *in vitro* [48].

В результате ряда экспериментов выяснилось еще одно преимущество стволовых клеток из адипозной ткани. Трансплантированные МСК в очаг повреждения спинного мозга подвергаются воздействию не только цитотоксических веществ, возникающих из-за повреждения тканей, но и недостатка кислорода и питательных веществ, вызванных плохим снабжением кровеносными сосудами. Недавние исследования показали, что МСК из адипозной ткани могут иметь повышенную толерантность к гипоксии и более низкие уровни питания по сравнению с МСК из костного мозга. Известно, что живые клетки нуждаются в кислороде для выживания, но уровень кислорода может влиять на жизнеспособность и пролиферацию. Коллектив японских ученых [49] сообщил, что гипоксия усиливает скорость пролиферации МСК из адипозной ткани. Они показали, что экспрессия генов Oct3/4 и Nanog, в качестве маркеров стволовых клеток, и секретируемых факторов роста была увеличена в состоянии гипоксии. Кроме того, гипоксический стресс также стимулировал в этих клетках образование ангиогенных цитокинов, таких как VEGF53 [50, 51]. В другом исследовании японские ученые [52] показали, что МСК из адипозной ткани более устойчивы к недостатку питательных веществ. Так, они лучше пролиферируют в культуральной среде, содержащей мало (2%) сыворотки, чем МСК из костного мозга в таких же условиях. Также авторами было показано, что стволовые клетки из адипозной ткани секретируют более

высокие уровни ростовых факторов HGF и VEGF, по сравнению с МСК из костного мозга. Ну и наконец, основной вопрос, важный в рамках нашего обзора, существуют ли различия в дифференцировке МСК разного происхождения в направлении нейронных линий? Эксперименты китайских исследователей [53] прояснили ситуацию. Они установили, что доля недифференцированных стволовых клеток из адипозной ткани, экспрессирующих белок нестин, значительно больше, чем доля таких же клеток из костного мозга. Более того, после нейронной дифференцировки уровень экспрессии нейронных и глиальных маркеров в МСК из адипозной ткани значительно выше, чем уровень экспрессии соответствующих маркеров в стволовых клетках из костного мозга. Уровни микро-РНК и факторов роста NGF и BDNF, экспрессированные в адипозных МСК, значительно выше, чем аналогичные показатели в МСК из костного мозга на разных стадиях до и после нейроэктодермальной дифференцировки. Тот факт, что жировой ткани в организме больше и она более доступна, чем костный мозг, свидетельствует о том, что мезенхимальные стволовые клетки из жировой ткани более предпочтительны, чем МСК из костного мозга в практическом клиническом использовании.

В нынешнем своем обзоре мы кратко представили преимущества и недостатки стволовых клеток разного происхождения. Хотя стволовые клетки были описаны достаточно давно, лишь пару десятилетий назад они привлекли к себе пристальное внимание, и их вновь открытые свойства дали надежду на лечение неврологических заболеваний, в том числе травмы спинного мозга. После открытия возможностей получать плюрипотентные и мультипотентные стволовые клетки из взрослого организма, а также разработки способов направленной дифференцировки таких клеток, появилось большое количество исследований в области клеточной терапии травм спинного мозга. Исследования проводились не только на животных моделях, но и на пациентах травматологических клиник. И у экспериментальных животных, и у людей трансплантация стволовых клеток улучшала моторную и сенсорную функции. Множественными исследованиями было показано, что индуцированные плюрипотентные клетки, при всех своих достоинствах, уступают мезенхимальным стволовым клеткам при лечении травм спинного мозга. Ряд авторов показали, что трансплантированные MSC могут не только модифицировать микроокружение в нервной ткани после повреждения, но и частично восстанавливать ее функции.

Для улучшения результатов такого лечения необходимо изучить механизмы действия и поведение стволовых клеток в патологической среде после трансплантации, чтобы определить наилучшие временные рамки, наиболее эффективные пути и способы доставки стволовых клеток после травмы. Эти и многие другие вопросы по-прежнему требуют ответа до того, как MSC или другие типы клеток могут быть переведены в рутинную клиническую практику.

Список литературы

1. Корель А.В., Кузнецов С.Б. Направленное перепрограммирование соматических клеток: преимущества и недостатки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (Обзор литературы) // Сибирский Научный Медицинский Журнал. 2018. Т. 38. № 4. С. 21–29.
2. McDonald J.W., Liu X.Z., Qu Y., Liu S., Mickey S.K., Turetsky D., Gottlieb D. I., Choi D.W. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat. Med.* 1999. no. 5. P. 1410–1412.
3. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* vol. 2006. 126. no. 4. P. 663–676.
4. Nori S, Tsuji O, Okada Y, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Therapeutic potential of induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Brain Nerve.* 2012, Jan; 64(1):17-27.
5. López-Serrano C., Torres-Espín A., Hernández J., Alvarez-Palomo A.B., Requena J., Gasull X., Edel M.J., Navarro X. Effects of the Post-Spinal Cord Injury Microenvironment on the Differentiation Capacity of Human Neural Stem Cells Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Transplant.* 2016, Oct; 25(10):1833-1852. DOI: 10.3727/096368916X691312.
6. Lu P., G. Woodruff, Y. Wang et al., Long-distance axonal growth from human induced pluripotent stem cells after spinal cord injury. *Neuron.* 2014. vol. 83. no. 4. P. 789–796. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.07.014.
7. Pomeschchik Y., Puttonen K.A., Kidin I., Ruponen M., Lehtonen S., Malm T., Akesson E., Hovatta O., Koistinaho J. Transplanted Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Progenitor Cells Do Not Promote Functional Recovery of Pharmacologically Immunosuppressed Mice with Contusion Spinal Cord Injury. *Cell Transplant.* 2015. 24(9): 1799-812. DOI: 10.3727/096368914X684079. Epub 2014 Sep 8.
8. Ozaki M., Iwanami A., Nagoshi N. et al. Evaluation of the immunogenicity of human iPSC cell-derived neural stem/progenitor cells in vitro. *Stem Cell Research.* 2017. vol. 19. P. 128–138.
9. Nishimura S., Yasuda A., Iwai H. et al. Time-dependent changes in the microenvironment of injured spinal cord affects the therapeutic potential of neural stem cell transplantation for spinal cord injury. *Molecular Brain.* 2013. vol. 6. no. 1. P. 3. DOI: 10.1186/1756-6606-6-3.
10. Nutt S.E., Chang E.A., Suhr S.T. et al. Caudalized human iPSC-derived neural progenitor cells produce neurons and glia but fail to restore function in an early chronic spinal cord injury model. *Experimental Neurology.* 2013. vol. 248. P. 491–503.
11. Tsuji O., Miura K., Okada Y. et al. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010. vol. 107. no. 28. P. 12704–12709.
12. Okubo T., Iwanami A., Kohyama J. et al. Pretreatment with a γ -secretase inhibitor prevents tumor-like overgrowth in human iPSC-derived transplants for spinal cord injury. *Stem Cell Reports.* 2016. vol. 7. no. 4. P. 649–663. DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.08.015.
13. Iida T., Iwanami A., Sanosaka T. et al. Whole-genome DNA methylation analyses revealed epigenetic instability in tumorigenic human iPSC cell-derived neural stem/progenitor cells. *Stem Cells.* 2017. vol. 35. no. 5. P. 1316–1327.
14. Okano H. Regeneration of the central nervous system using iPSC cell-technologies. *Rinsho Shinkeigaku.* 2009 Nov; 49(11):825-6.
15. Chuan Qina, Yun Guo, De-Gang Yang, Ming-Liang Yang, Liang-Jie Du, Jian-Jun Li. Induced Pluripotent Stem Cell Transplantation Improves Locomotor Recovery in Rat Models of Spinal Cord Injury: a Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Cell Physiol Biochem.* 2018; 47:1835-1852. DOI: 10.1159/000491064.
16. Iwai Hiroki, Hiroko Shimada, Soraya Nishimura, Yoshiomi Kobayashi, Go Itakura, Keiko Hori, Keigo Hikishima, Hayao Ebise, Naoko Negishi, Shinsuke Shibata, Sonoko Sabu, Yoshiaki Toyama, Masaya Nakamura, Hideyuki Okano. Allogeneic Neural Stem/Progenitor Cells Derived From Embryonic Stem Cells Promote Functional Recovery After Transplantation Into Injured Spinal Cord of Nonhuman Primates. *Stem Cells Translational Medicine.* 2015; 4:708–719.
17. Nemati S.N., Jabbari R., Hajinasrollah M., ZareMehrdjerdi, H. Azizi N., Hemmesi K., et al. Transplantation of adult monkey neural stem cells into a contusion spinal cord injury model in rhesus macaque monkeys. *Cell J.* 2014; 16:117-130.
18. Zhang Chao, Karen A. Egiazyryan, Andrei P. Ratyev, Victor M. Feniksov, Haixiao Wu, Vladimir P. Chekhonin. Progress in the study of stem cell transplantation for the repair of spinal cord injury. *Russian Open Medical Journal.* 2017, vol. 6. Issue 3. Article CID e0303 DOI: 10.15275/rusomj.2017.0303.
19. Liu Ying, Yiyang Zheng, Shenglan Li, Haipeng Xue, Karl Schmitt, Georgene W. Hergenroeder, Jiaqian Wu, Yuanyuan Zhang, Dong H. Kim, Qilin Cao. Human neural progenitors derived from integration-free iPSCs for SCI therapy. *Stem Cell Res.* 2017. March; 19: 55–64. DOI: 10.1016/j.scr.2017.01.004.
20. Nagoshi N., Okano H. Applications of induced pluripotent stem cell technologies in spinal cord injury. *J. Neurochem.* 2017 Jun; 141(6):848-860. DOI: 10.1111/jnc.13986.
21. Silver J., Miller J.H. Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004. 5. 146–156.
22. Takeda A., Okada S., Funakoshi K. Chondroitin sulfates do not impede axonal regeneration in goldfish spinal cord. *Brain Res.* 2017. Oct 15. 1673:23-29. DOI: 10.1016/j.brainres.2017.08.004.
23. Bradbury E.J., Carter L.M. Manipulating the glial scar: chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury. *Brain Res Bull.* 2011, Mar 10;84(4-5):306-16. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2010.06.015.
24. Friedenstein A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation.* 1970. 3(4):393–403.
25. Laroni A., Novi G., Kerlero de Rosbo N., Uccelli A. Towards clinical application of mesenchymal stem cells for treatment of neurological diseases of the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013. Dec; 8(5):1062-76. DOI: 10.1007/s11481-013-9456-6.
26. Bhanot Y., Rao S., Ghosh D., Balaraju S., Radhika C.R., Satish Kumar K.V., Autologous mesenchymal stem cells in chronic spinal cord injury. *Br. J. Neurosurg.* 2011. 25. 516–522
27. Sun Kyu Oh, Sang Ryong Jeon, Current Concept of Stem Cell Therapy for Spinal Cord Injury: A Review. *Korean J. Neurotrauma.* 2016. Oct; 12(2): 40–46. DOI: 10.13004/kjnt.2016.12.2.40.
28. Zadroga A., Jezierska-Woźniak K., Czarzasta J., Barczewska M., Wojtkiewicz J., Maksymowicz W. Therapeutic Potential of Olfactory Ensheathing Cells and Mesenchymal Stem Cells in Spinal Cord Injuries. *Stem Cells Int.* 2017; 2017:3978595. DOI: 10.1155/2017/3978595. Epub 2017 Feb 16.
29. Karamouzian S., Nematollahi-Mahani S.N., Nakhuae N., Eskandary H. Clinical safety and primary efficacy of bone marrow mesenchymal cell transplantation in subacute spinal cord injured patients. *Clin Neurol Neurosurg.* 2012. Sep; 114(7):935-9. DOI: 10.1016/j.clineuro.2012.02.003.

30. Hofstetter C.P., Schwarz E.J., Hess D., Widenfalk J., El Manira A., Prockop D.J., Olson L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. Feb 19; 99(4):2199-204.
31. Kadoya K., Lu P., Nguyen K., Lee-Kubli C., Kumamaru H., Yao L., Knackert J., Poplawski G., Dulin J.N., Strobl H., Takashima Y., Biane J., Conner J., Zhang S.C., Tuszynski M.H. Spinal cord reconstitution with homologous neural grafts enables robust corticospinal regeneration. *Nat. Med.* 2016. 22. 479–487. DOI: 10.1038/nm.4066.
32. Adler A.F., Lee-Kubli C., Kumamaru H., Kadoya K., Tuszynski M.H. Comprehensive Monosynaptic Rabies Virus Mapping of Host Connectivity with Neural Progenitor Grafts after Spinal Cord Injury. *Stem Cell Reports*. 2017. Jun 6; 8(6): 1525–1533. DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.04.004.
33. Li Y., Chopp M. Marrow stromal cell transplantation in stroke and traumatic brain injury. *Neurosci Lett*. 2009. Jun 12; 456(3): 120–123. DOI: 10.1016/j.neulet.2008.03.096.
34. Papazian I., Kyrargyri V., Evangelidou M., Voulgari-Kokota A., Probert L. Mesenchymal Stem Cell Protection of Neurons against Glutamate Excitotoxicity Involves Reduction of NMDA-Triggered Calcium Responses and Surface GluR1, and Is Partly Mediated by TNF. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Mar. 19(3): 651. DOI: 10.3390/ijms19030651.
35. Sasaki M., Honmou O., Akiyama Y., Uede T., Hashi K., Kocsis J.D. Transplantation of an Acutely Isolated Bone Marrow Fraction Repairs Demyelinated Adult Rat Spinal Cord Axons. *Glia*. 2001. Jul; 35(1): 26–34.
36. Inoue M., Honmou O., Oka S., Houkin K., Hashi K., Kocsis J.D. Comparative analysis of remyelinating potential of focal and intravenous administration of autologous bone marrow cells into the rat demyelinated spinal cord. *Glia*. 2003. V. 44(2). P.111-118. DOI: 10.1002/glia.10285.
37. Jung D.I., Ha J., Kang B.T., Kim J.W., Quan F.S., Lee J.H., Woo E.J., Park H.M. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *J. Neurol. Sci.* 2009. Oct 15; 285(1-2):67-77. DOI: 10.1016/j.jns.2009.05.027. Epub 2009 Jun 24.
38. Fernandes M., Valente S.G., Sabongi R.G., Gomes dos Santos J.B., Leite V.M., Ulrich H., Nery A.A., José da Silva Fernandes M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *Neural Regen Res*. 2018. Jan; 13(1): 100–104. DOI: 10.4103/1673-5374.224378.
39. Hermann A., Liebau S., Gastl R., Fickert S., Habisch H.J., Fiedler J. et al. Comparative analysis of neuroectodermal differentiation capacity of human bone marrow stromal cells using various conversion protocols. *J. Neurosci Res*. 2006. 83: 1502–1514.
40. Toyserkani N.M., Christensen M.L., Sheikh S.P., Sørensen J.A. Adipose-Derived Stem Cells. New Treatment for Wound Healing? *Annals of Plastic Surgery*. 2015. Vol. 75. Number 1. July. p.117-123.
41. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine in the field of plastic and reconstructive surgery. *Journal of Oral Biosciences*. 2013. Vol. 55. Issue 3. p.132–136. DOI: 10.1016/j.job.2013.04.005.
42. Zhou Z., Chen Y., Zhang H., Min S., Yu B., He B., Jin A. Comparison of mesenchymal stromal cells from human bone marrow and adipose tissue for the treatment of spinal cord injury. *Cytherapy*. 2013. Apr. 15(4):434-48. DOI: 10.1016/j.jcyt.2012.11.015. Epub 2013 Feb 1.
43. Tondreau T., Lagneaux L., Dejeneffe M., Massy M., Mortier C., Delforge A., Bron D. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation*. 2004. Sep; 72(7):319-26.
44. Blondheim N.R., Levy Y.S., Ben-Zur T., Burshtein A., Cherlow T., Kan I., Barzilai R., Bahat-Stromza M., Barhum Y., Bulvik S., Melamed E., Offen D. Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition. *Stem Cells Dev*. 2006. 15, p. 141-164.
45. Arboleda D., Forostyak S., Jendelova P., Marekova D., Amemori T., Pivonkova H., Masinova K., Sykova E. Transplantation of predifferentiated adipose-derived stromal cells for the treatment of spinal cord injury. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2011. Oct; 31(7):1113-22. DOI: 10.1007/s10571-011-9712-3. Epub 2011 Jun 1.
46. Lattanzi W., Geloso M.C., Saulnier N., Giannetti S., Puglisi M.A., Corvino V., Gasbarrini A., Michetti F. Neurotrophic features of human adipose tissue-derived stromal cells: in vitro and in vivo studies. *J. Biomed Biotechnol.* 2011. 2011:468705. DOI: 10.1155/2011/468705. Epub 2011 Dec 15.
47. McDaniel J.S., Antebi B., Pilia M., Hurtgen B. J., Belenkiy S., Necsoiu C., Cancio L. C., Rathbone C. R., Batchinsky A.I. Quantitative Assessment of Optimal Bone Marrow Site for the Isolation of Porcine Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2017. 2017: 1836960. DOI: 10.1155/2017/1836960.
48. Vidal M.A., Walker N.J., Napoli E., Borjesson D.L. Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue. *Stem Cells Dev*. 2012. 21: 273–283.
49. Yamamoto Y., Fujita M., Tanaka Y., Kojima I., Kanatani Y., Ishihara M., Tachibana S. Low oxygen tension enhances proliferation and maintains stemness of adipose tissue-derived stromal cells. *Biores Open Access*. 2013. 2(3):199–205.
50. Rasmussen J.G., Frobert O., Pilgaard L., Kastrup J., Simonsen U., Zachar V., Fink T. Prolonged hypoxic culture and trypsinization increase the pro-angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells. *Cytherapy*. 2011. Mar; 13(3):318-28. DOI: 10.3109/14653249.2010.506505.
51. Hsiao S.T., Lokmic Z., Peshavariya H., Abberton K.M., Dusting G.J., Lim S.Y., Dilley R.J. Hypoxic Conditioning Enhances the Angiogenic Paracrine Activity of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Stem cells and development*. 2013. V. 22(10). p.1614-23. DOI: 10.1089/scd.2012.0602.
52. Katsuno T., Ozaki T., Saka Y., Furuhashi K., Kim H., Yasuda K., Yamamoto T., Sato W., Tsuboi N., Mizuno M., Ito Y., Imai E., Matsuo S., Maruyama S. Low serum cultured adipose tissue-derived stromal cells ameliorate acute kidney injury in rats. *Cell Transplant*. 2013. 22(2):287–297.
53. Zhang H.T., Liu Z.L., Yao X.Q., Yang Z.J., Xu R.X. Neural differentiation ability of mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue: a comparative study. *Cytherapy*. 2012. Sep. 14/10. p. 1203–1214. DOI: 10.3109/14653249.2012.711470.