

**Смирнов Владимир Александрович**

**ПРИМЕНЕНИЕ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННО-  
ПЛАЦЕНТАРНОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА НА ЛАБОРАТОРНОЙ  
МОДЕЛИ КОНТУЗИОННОЙ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА  
ТЯЖЕЛОЙ СТЕПЕНИ**

14.01.18 – нейрохирургия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н. В. Склифосовского Департамента Здравоохранения города Москвы» и Лаборатории стволовых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» МЗ РФ.

**Научные руководители:**

**Гринь Андрей Анатольевич** – доктор медицинских наук, руководитель научного отдела неотложной нейрохирургии НИИ СП им. Н. В. Склифосовского.

**Рябов Сергей Иванович** – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории стволовых клеток Национального медицинского исследовательского центра кардиологии МЗ РФ.

**Официальные оппоненты:**

**Мануковский Вадим Анатольевич** – доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по клинической работе ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе».

**Тихонова Татьяна Александровна** – кандидат медицинских наук, профессор кафедры морфологии Медико-биологического факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова».

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России».

Защита состоится «\_\_\_»\_\_\_\_\_201\_ года в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 850.010.02 при Государственном бюджетном учреждении здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н. В. Склифосовского Департамента Здравоохранения города Москвы» (129090, Москва, Большая Сухаревская площадь, д.3).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н. В. Склифосовского Департамента Здравоохранения города Москвы» и на сайте [www.sklifos.ru](http://www.sklifos.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_»\_\_\_\_\_201\_ года

**Ученый секретарь диссертационного совета**

Доктор медицинских наук, профессор

**А.А. Гуляев**

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ В ДИССЕРТАЦИИ

АД – артериальное давление.

ГБО – гипербарическая оксигенация.

ДК – дендритные клетки.

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота.

ИЛ – интерлейкин.

ИФН $\gamma$  – интерферон-гамма.

КПКЧ – клетки пуповинной крови человека.

МРТ – магнитно-резонансная томография.

МСК – мезенхимальные стволовые клетки.

НПВС – нестероидные противовоспалительные средства.

НСК – нейрональные стволовые клетки.

ПСМТ – позвоночно-спинномозговая травма.

РТПХ – реакция трансплантат-против-хозяина.

СК – стволовые клетки.

СРБ – С-реактивный белок.

ССВП – соматосенсорные вызванные потенциалы.

ТМО – твердая мозговая оболочка.

ТСМ – травма спинного мозга.

ФНО $\alpha$  – фактор некроза опухолей-альфа.

ЦНС – центральная нервная система.

ШК – шванновские клетки.

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки.

ASIA – Американская ассоциация спинальной травмы (American spine injury association).

BDNF – нейротрофический фактор мозга (brain-derived neurotrophic factor).

bFGF – основной фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor).

BMP – костный морфогенный белок (bone morphogenic protein).

BrdU – бромдезоксиуридин.

CD – кластер дифференцировки (cluster of differentiation).

CNTF – цилиарный нейротрофический фактор (ciliary neurotrophic factor).

ES-like SCs – эмбриональноподобные стволовые клетки (embryonic cell-like stem cells).

FDA – Управление по санитарному надзору за пищевыми продуктами и медикаментами (Food and Drug Administration).

GCSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (granulocyte colony-stimulating factor).

GDNF – глиальный нейротрофический фактор (glial-derived neurotrophic factor).

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок (glial fibrillary acidic protein).

GLP – рекомендации по лабораторной практике (Good Laboratory Performance).

GPCs – глиальные клетки-предшественники (glial progenitor cells).

HGF – гепатоцитарный фактор роста (hepatocyte growth factor).

HLA – антигены лейкоцитов человека (human leucocyte antigens).

IGF – инсулиноподобный фактор роста (insulin-like growth factor).

iPSCs – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (induced pluripotent stem cells).

MAP – связанный с микротрубочками белок (microtubule-associated protein).

MAPCs – взрослые мультипотентные прогениторные клетки (multipotent adult progenitor cells).

MBP – основной белок миелина (myelin basic protein).

MHC – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex).

MPs – предшественники мотонейронов (motoneuron progenitors).

MPSCs – мультипотентные стволовые клетки (multipotent stem cells).

NCC – клетки нервного гребня (neural crest cells).

NGF – фактор роста нервов (nerve growth factor).

NO – оксид азота.

NPCs – нейрональные клетки-предшественники (neural progenitor cells).

NT – нейротрофин.

OECs – клетки ольфакторной выстилки (olfactory ensheathing cells).

OPCs – предшественники олигодендроцитов (oligodendrocyte progenitor cells).

PLP – протеолипидный белок (proteolipid protein).

PNS – первичные нейросферы (primary neurospheres).

SD – среднеквадратичное отклонение (standard deviation).

SNS – вторичные нейросферы (secondary neurospheres).

USSCs – соматические стволовые клетки с неограниченным потенциалом (unrestricted somatic stem cells).

VEGF – эндотелиальный фактор роста (vascular endothelial growth factor).

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность проблемы**

Травма спинного мозга – это повреждение структуры центральной нервной системы, развивающееся вследствие переломов и/или вывихов позвонков различных отделов позвоночного столба. В структуре всех видов травматических повреждений элементов ЦНС травма спинного мозга занимает далеко не первое место [Бабиченко Е.И. (1994)], однако тяжесть состояния пациента и, по сути, практически полное отсутствие эффективных патогенетических методов лечения делают эту патологию серьезной проблемой для современной медицины.

В современном мире частота травмы спинного мозга постоянно растет. Среди взрослых людей частота ТСМ составляет, в среднем, 5 случаев на 100 тысяч населения в год [Исаев А.А. и соавт. (2008)]. В России более 80% пострадавших составляют мужчины наиболее активного и трудоспособного возраста – до 30 лет [Крылов В.В. и соавт. (2013); Furlan J.C. et al. (2009)]. Частота травмы спинного мозга в России составляет примерно 90 случаев на 1 млн. населения в год (для травмы позвоночника – примерно 130 тыс. человек в год, из них 13 тыс. с нижней параплегией или тетраплегией) [Исаев А.А. с соавт. (2008); Крылов В.В. и соавт. (2013)].

За последние 2 десятилетия в хирургии позвоночника произошли большие изменения. Современные технологии позволяют выполнять с позвоночным столбом любые манипуляции: фиксировать позвонки, укорачивать и удлинять позвоночник, корректировать его ось и при этом создавать надежный спондилодез (костный блок), однако лечение повреждений самого спинного мозга ограничено лишь несколькими малоэффективными способами. При этом доступные и рутинно применяемые методы терапии являются сугубо симптоматическими и не обеспечивают воздействие на звенья патогенеза травматического процесса.

Одним из новых, недостаточно изученных, но наиболее многообещающих направлений, актуальных для пациентов с травмой спинного

мозга, является регенеративная медицина. С момента появления первых сообщений о возможности применения регенеративных технологий и, в частности, клеточной терапии при заболеваниях и травмах центральной нервной системы в 1970-х годах эффективность регенеративных технологий неоднократно оценивали и при травме спинного мозга. Хорошие результаты, полученные в подобных работах, позволяют надеяться на то, что регенеративная медицина может стать способом эффективного лечения этих тяжелых повреждений [Harris D.T. (2009); Volarevic V. Et al. (2013)].

В России в силу объективных причин экономического характера подобные лабораторные, доклинические и клинические исследования распространены в значительно меньшей степени, чем в некоторых западных странах. Однако необходимость поиска эффективных средств лечения повреждений спинного мозга и актуальность проблемы для клинической медицины не становятся от этого ниже.

В 2012 – 2017 годах на базе нескольких учреждений здравоохранения города Москвы был проведен ряд доклинических и клинических исследований, посвященных оценке эффективности применения клеточной терапии, в частности – с применением моноклеарных клеток пуповинной крови человека при травме спинного мозга. В данной работе представлены результаты доклинического исследования, которые позволяют предполагать, что применение клеточной терапии является безопасным и эффективным методом лечения травмы спинного мозга и может в будущем применяться для лечения пациентов с осложненной позвоночно-спинальной травмой.

### **Цель исследования**

Оценить безопасность и эффективность применения моноклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека при контузионной травме спинного мозга тяжелой степени у животных моделей.

### **Задачи исследования**

1. Оценить безопасность применения мононуклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека, исключить наличие побочных явлений и осложнений либо аллергических реакций при применении клеточной терапии у животных моделей травмы спинного мозга (крысы).
2. Оценить воспроизводимость применяемой модели травмы спинного мозга и применимость различных методов функциональной оценки двигательной активности конечностей при ушибах спинного мозга тяжелой степени у животных.
3. Оценить эффективность воздействия мононуклеарных клеток пуповинной крови человека у животных моделей контузионной травмы спинного мозга тяжелой степени на двигательную активность задних конечностей.
4. Определить оптимальные сроки и пути введения клеток пуповинно-плацентарной крови человека при ушибах спинного мозга тяжелой степени у животных моделей.

### **Научная новизна**

1. Выполнено подтверждение безопасности применения клеток пуповинной крови человека у животных моделей ушиба спинного мозга.
2. Проведен анализ эффективности воздействия регенеративных технологий на восстановление двигательной функции конечностей у животных моделей с травмой спинного мозга.
3. Проведен анализ воспроизводимости применяемой модели травмы спинного мозга у животных и применимости различных методов оценки двигательной функции при тяжелой контузионной травме спинного мозга.

4. Проведено сравнение эффективности клеточной терапии в лечении контузионной травмы спинного мозга у животных в различные сроки, а также при различных путях введения клеток.
5. Проведена оценка возможности организации клинических исследований на основании результатов доклинической работы на животных моделях.

### **Практическая значимость исследования**

1. В проведенном исследовании доказана безопасность применения моноклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека у животных моделей.
2. Результаты исследования свидетельствуют о соответствии применяемой модели травмы спинного мозга поставленным задачам, высоком уровне воспроизводимости модели.
3. Полученные данные свидетельствуют о необходимости четкого отбора и градации применяемых методов оценки двигательной активности в доклинических исследованиях.
4. В проведенном исследовании доказана эффективность клеточной терапии при контузионной травме спинного мозга тяжелой степени у животных моделей.
5. Результаты исследования позволяют рассматривать данный метод клеточной терапии как эффективный способ лечения ушибов спинного мозга и в дальнейшем формировать протоколы клинических исследований для оценки безопасности и эффективности клеточной терапии у человека.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Применение моноклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека является безопасным методом терапии, не имеет стойких и

- серьезных побочных эффектов, не вызывает осложнений и аллергических реакций как у животных, так и у человека.
2. Модель контузионной травмы спинного мозга тяжелой степени у животных является высоко воспроизводимой и соответствует необходимым требованиям, предъявляемым к доклиническим исследованиям методов лечения травмы спинного мозга.
  3. Оптимальными методами оценки двигательного дефицита у малых животных с ушибами спинного мозга тяжелой степени является оценка в открытом поле и плавательный тест. При контузионной травме тяжелой степени, в отличие среднетяжелой травмы, нагрузочные тесты (Ротарод, сужающаяся дорожка) не обладают достаточной чувствительностью, не отражают динамику восстановления и не могут эффективно применяться в исследованиях.
  4. Системное введение моноклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека животным моделям контузионной травмы спинного мозга тяжелой степени способствует восстановлению двигательной активности задних конечностей и объема движений в крупных суставах задних конечностей (тазобедренном, коленном, голеностопном).
  5. Системное применение моноклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека является безопасным и эффективным методом лечения ушибов спинного мозга тяжелой степени у животных и может в дальнейшем применяться в клинических исследованиях у пациентов с ушибами спинного мозга.

### **Апробация работы**

Основные положения диссертации доложены на:

1. I Национальном конгрессе по регенеративной медицине. – Москва. – 2013 г.
2. Симпозиуме «Новейшие методы клеточных технологий в медицине». – Новосибирск. – 2014 г.

3. Съезде европейской ассоциации нейрохирургов EANS-2014. – Прага, Чехия. – 2014 г.
4. Четырнадцатой всероссийской научно-практической конференции «Поленовские чтения». – Санкт-Петербург. – 2015 г.
5. Седьмом всероссийском съезде нейрохирургов. – Казань. – 2015 г.
6. II Национальном конгрессе по регенеративной медицине. – Москва. – 2015 г.
7. Восьмом международном ежегодном конгрессе по регенеративной медицине и стволовым клеткам (BIT 8<sup>th</sup> Annual World Congress on Regenerative Medicine and Stem Cells). – Пусан, Корея. – 2015 г.
8. Образовательном цикле «Спинальная нейрохирургия». – Петрозаводск. – 2016 г.
9. Пятнадцатой всероссийской научно-практической конференции «Поленовские чтения». – Санкт-Петербург. – 2016 г.
10. Конгрессе российского общества радиологов и рентгенологов. – Москва. – 2017 г.
11. Заседаниях проблемно-плановой комиссии НИИ СП имени Н.В. Склифосовского. – Москва. – 2015-2018 гг.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ в виде статей и тезисов в отечественных и зарубежных журналах и сборниках материалов конференций, из которых 9 опубликовано в изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий ВАК.

### **Внедрение результатов работы**

Результаты проведенного исследования внедрены в практику Лаборатории стволовых клеток Национального медицинского исследовательского центра кардиологии МЗ РФ, нейрохирургического отделения НИИ СП им. Н.В. Склифосовского.

На основе результатов проведенного исследования в Лаборатории стволовых клеток были проведены дополнительные исследования по применению клеточных технологий при повреждениях спинного мозга, в НИИ СП им. Склифосовского был разработан протокол и в 2014 – 2017 годах было проведено научно-клиническое исследование (стадия 2А) по системному применению клеток пуповинно-плацентарной крови человека при ушибах спинного мозга тяжелой степени на 20 пациентах.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов и списка литературы (содержащего 9 отечественных и 193 зарубежных источников). Текст диссертации изложен на 137 страницах машинописного текста, включает 17 рисунков и 5 таблиц.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Состав экспериментальных групп**

В доклиническое исследование было включено 211 животных. В процессе выполнения экспериментов из исследования были исключены 19 крыс. Критерии исключения включали в себя следующие факторы: 1) наличие произвольных движений у животных в первые сутки после нанесения травмы (неполноценность нанесения травмы); 2) развитие гнойно-септических осложнений (нагноение в области операционной раны); 3) наличие кожных язв либо эрозий в области нижних конечностей вследствие развития трофических нарушений; 4) аберрантное поведение животных (например, самостоятельное нанесение животными повреждений); 5) смерть животного. После исключения неподходящих животных анализ данных провели у 192 животных с контузионной травмой спинного мозга.

В рамках исследования было проведено 5 отдельных экспериментов:

1. Оценка эффективности восстановления двигательной функции конечностей при системном (внутривенном) применении концентрата

клеток пуповинно-плацентарной крови человека (КПКЧ) у животных с контузионной травмой спинного мозга тяжелой степени. [3 группы: а) крысы с контузионной травмой спинного мозга тяжелой степени и введением КПКЧ на 1 сутки после нанесения травмы (n = 24); б) Крысы с контузионной травмой спинного мозга и введением КПКЧ на 5 сутки после нанесения травмы (n = 32); в) Крысы с контузионной травмой спинного мозга и введением стерильного физиологического раствора (контрольная группа) (n = 44)].

2. Оценка эффективности восстановления двигательной функции задних конечностей с помощью плавательного теста, а также анализ дисперсии угла сгибания крупных суставов задних конечностей у животных с контузионной травмой спинного мозга при проведении клеточной терапии и без нее [2 группы: а) Крысы с контузионной травмой спинного мозга тяжелой степени и введением КПКЧ на 1 сутки после нанесения травмы (n = 8); б) Крысы с контузионной травмой спинного мозга тяжелой степени без дополнительного лечения (контрольная группа) (n = 9)].
3. Оценка эффективности восстановления двигательной функции конечностей при локальной (интраспинальное введение) клеточной терапии с применением КПКЧ у животных с контузионной травмой спинного мозга тяжелой степени [2 группы: а) Крысы с контузионной травмой спинного мозга тяжелой степени и интраспинальным введением КПКЧ на 1 сутки после нанесения травмы (n = 12); б) Крысы с контузионной травмой спинного мозга и интраспинальным введением стерильного физиологического раствора в аналогичном объеме (контрольная группа, группа самовосстановления) (n = 9)].
4. Сравнение эффективности восстановления двигательной функции конечностей при системной (внутривенное введение) и локальной (интраспинальное введение) клеточной терапии с применением КПКЧ у животных с контузионной травмой спинного мозга тяжелой степени [3

группы: а) Крысы с контузионной травмой спинного мозга тяжелой степени и интраспинальным введением концентрата КПКЧ на 1 сутки после нанесения травмы (n = 12); б) Крысы с контузионной травмой спинного мозга тяжелой степени и внутривенным введением концентрата КПКЧ на 1 сутки после нанесения травмы (n = 12); в) Крысы с контузионной травмой спинного мозга без клеточной терапии (контрольная группа) (n = 15)].

5. Оценка эффективности восстановления двигательной функции конечностей при системной (внутривенное введение) клеточной терапии с применением КПКЧ у животных с контузионной травмой спинного мозга тяжелой степени с применением нагрузочных тестов [2 группы животных: а) Крысы с контузионной травмой спинного мозга и внутривенным введением концентрата КПКЧ на 1 сутки после нанесения травмы (n = 7); б) Крысы с контузионной травмой спинного мозга и внутривенным введением стерильного физиологического раствора в аналогичном объеме (контрольная группа) (n = 8)].

### **Модель ушиба спинного мозга у крысы**

В качестве лабораторных животных использовали белых крыс рода Sprague-Dawley, исключительно самок, весом 250 – 350 граммов. Всех животных содержали в индивидуальных клетках в стандартных условиях клинично-биологической лаборатории: режим освещения 12 часов/12 часов, свободный доступ к воде и пище. Все хирургические вмешательства на животных проводили строго в асептических условиях, с использованием стерильного хирургического инструмента. Работу с животными и их содержание проводили в соответствии с международными рекомендациями GLP (Good Laboratory Performance), методическими рекомендациями по содержанию лабораторных животных (РД-АПК 3.10.07.02-09), международным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными (ГОСТ 33216-2014) и внутренними правилами Института.

Все хирургические вмешательства и последующие исследования, требующие фиксации животного, проводили под инъекционным наркозом. В состав комбинированной наркотизирующей смеси входили 5% раствор Кетамина (Калипсол) – 3,0 мл, 2% раствор Ксилазина (Ксила<sup>®</sup>) – 3,0 мл, 1% раствор Ацепромазина (Ветранквил) – 1,0 мл. Полученный раствор вводили внутримышечно либо внутрибрюшинно из расчета 0,1 мл раствора на 100 г веса животного. В послеоперационном периоде животных содержали в индивидуальных клетках с облегченным доступом к воде и пище. В связи с имеющимися особенностями экспериментальной модели (развитие пареза кишечника и нарушения функции тазовых органов по типу задержки у всех животных после нанесения травмы спинного мозга) всем животным дважды в день выполняли мануальное опорожнение мочевого пузыря и закрытый массаж кишечника через переднюю брюшную стенку.

Для нанесения травмы после предварительного выбривания шерсти на спине в положении животного на животе через линейный разрез длиной около 0,7 – 1,3 см остро и тупо выполняли доступ к задним отделам позвоночного столба на уровне Th7 – Th11 позвонков. После определения уровня позвонка Th9 с помощью высокооборотного бора выполняли ламинэктомию Th9. После удаления дужки позвонка визуализировали спинной мозг, покрытый тонкой прозрачной твердой мозговой оболочкой. Остистые отростки смежных позвонков фиксировали в специальном устройстве для исключения пролабирования и амортизации мягких тканей в момент нанесения травмы. В область ламинэктомического окна устанавливали направляющий ударного груза. Травму спинного мозга наносили по общепринятой технике «weight-drop». В соответствии с классификацией Basso et al. (1995) в исследовании использовали модель контузионной травмы спинного мозга тяжелой степени. Для этого использовали груз массой 10 г и диаметром сечения 2 мм, опускаемый под собственным весом по направляющему с высоты 25 мм. В момент нанесения травмы отмечалось формирование очага кровоизлияния в веществе спинного мозга в зоне удара. Послеоперационную рану ушивали послойно узловыми

рассасывающимися швами викрилом 4/0. Края кожного разреза фиксировали специальными металлическими скобками EZ-clips.

### **Концентрат клеток пуповинно-плацентарной крови человека**

В проведенном исследовании использовали образцы концентрата пуповинно-плацентарной крови человека, предоставленные банком пуповинной крови ООО «КриоЦентр» на некоммерческой основе. Микропробирки с концентратом моноклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека объемом 1,2 мл – «образцы-спутники» – доставляли в замороженном виде в транспортном сосуде Дюара в жидком азоте.

Для подготовки клеточной суспензии для дальнейшего введения животным производили отмывку образцов и доводили объем суспензии до конечного объема 45 мл. После центрифугирования при 600g в течение 10 минут супернатант удаляли, осадок и до 1,0 мл жидкости сохраняли в пробирке. Оценку жизнеспособности клеток проводили по стандартной методике с окрашиванием трипановым синим. Образцы с жизнеспособностью клеток ниже 87% утилизировали. Подсчет числа клеток в образце проводили стандартным методом световой микроскопии в клеточной камере.

## **Материалы и методы исследования**

### **Открытое поле**

Основным методом оценки двигательной активности задних конечностей у животных с ушибами спинного мозга в проведенном исследовании был тест «открытое поле» (open-field test).

Для проведения теста использовали круглую платформу черного цвета диаметром 1 метр с бортиком высотой 12 см по периметру. В задней части платформы устанавливали зеркало для одновременного наблюдения за обеими задними конечностями животного. Исследование двигательной активности конечностей у каждого животного проводили два независимых исследователя. Результаты анализа двигательной активности оценивали по шкале Basso-

Beattie-Bresnahan (BBB) [Basso et al. (1995)]. В процессе исследования последовательно оценивали следующие показатели двигательной активности: а) наличие/отсутствие движений в задних конечностях; б) при наличии движений в конечностях оценивали их структуру – наличие/отсутствие движений в каждом из трех суставов задних конечностей (тазобедренный, коленный, голеностопный); в) подтягивание конечностей; г) опора конечности на подошву стопы; д) поддержка животным веса собственного тела; е) наличие/отсутствие моделирования шага при ходьбе; ж) координация движений между передними и задними конечностями животного; з) положение стоп и пальцев задних конечностей при передвижении по площадке.

### **Плавательный тест**

В исследовании использовали одну из наиболее свежих модификаций плавательного теста, разработанную в лаборатории Martin Schwab в начале 2000-х годов [Liebscher et al. (2005)]. Животное помещали в прозрачный прямоугольный бассейн размерами 150 x 40 x 13 см, заполненный водой с температурой 23 – 25°C. Уровень воды не позволял животному касаться дна бассейна. На дне бассейна помещали зеркало, расположенное под 45° и обеспечивающее одновременное наблюдение за обеими конечностями животного. Задние конечности каждого животного маркировали 3 черными точками, соответствующими суставам конечностей (тазобедренный, коленный, голеностопный) – это облегчало процесс анализа двигательной функции в данных суставах в процессе наблюдения, а также позволило проводить автоматическую компьютерную обработку видеофайлов, записанных при проведении теста.

В процессе проведения теста анализировали следующие показатели: время выполнения теста, использование передних конечностей, расстояние между задними конечностями в процессе плавания, сила гребка задними конечностями и движения хвоста. Движения задних конечностей анализировали по трем суставам (тазобедренный, коленный, голеностопный)

по-отдельности. Анализ двигательной активности проводили в соответствии с 17-балльной шкалой Louisville (Louisville swim scale). Также выполняли оценку угла сгибания в каждом суставе задней конечности, по результатам которой вычисляли дисперсию угла сгибания каждого сустава.

### **Вращающийся барабан Ротарод**

Для проведения теста использовали прибор типа Ротарод, оценивающий способность животных к удержанию на вращающейся поверхности, а также их координацию и способность к балансировке. Животное помещали на вращающийся барабан прибора с малой скоростью вращения. Постепенно скорость вращения увеличивали. В процессе анализа регистрировали ряд показателей: время удержания на барабане, скорость вращения барабана в момент падения животного, использование животным передних и задних конечностей для балансировки и других.

### **Тест «сужающаяся дорожка»**

В исследовании использовали специальный тренажер, состоящий из сужающейся трапецевидной дорожки длиной 150 см, шириной от 10 до 2 см и высотой 1 м. В процессе исследования каждому животному давали 3 попытки. Анализ движений проводили в соответствии со следующей шкалой: 0 баллов при неспособности животного к прохождению по дорожке (при падении животного в самом начале дорожки); 0,5 баллов при прохождении животным половины дорожки; 1 балл при прохождении животным всей дорожки; 1,5 балла при наличии частичной нагрузки на задние конечности; 2 балла при удовлетворительном прохождении всей дорожки и наличии полной нагрузки на задние конечности. Результаты 3 попыток складывали вместе.

### **Гистологический анализ**

Для проведения гистологического анализа проводили выделение спинного мозга у наркотизированных и перфузированных животных.

Проводили обработку и фиксацию образцов, заливку в эпоксидную смолу и подготовку срезов толщиной 1 мкм. Полученные образцы окрашивали 1% раствором Толуидинового синего красителя. Анализ структуры спинного мозга в зоне повреждения и смежных сегментах, а также оценку числа демиелинизированных и ремиелинизированных волокон проводили с помощью световой микроскопии на микроскопе Leica 5000.

### **Статистический анализ данных**

Статистический анализ полученных данных проводили с применением программы Microsoft Excel. Для обработки данных и сравнения результатов в отдельных группах использовали однофакторный дисперсионный анализ и критерий Ньюмена-Кейлса. Достоверность различий принималась при  $p < 0,05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Оценка безопасности клеточной терапии**

Оценку безопасности клеточной терапии у животных моделей проводили на основании наличия либо отсутствия побочных эффектов или осложнений от проводимой терапии. За время проведения терапии, а также на протяжении всего обсервационного периода (8 недель) ни у одного животного из экспериментальных групп не было зафиксировано никаких побочных эффектов, как связанных с процедурой введения, так и с действием клеточного препарата.

### **Оценка воспроизводимости модели контузионной травмы спинного мозга**

У всех включенных в исследование животных травму спинного мозга наносили однотипно. После нанесения контузионной травмы у всех животных наблюдали развитие грубого двигательного дефицита. При этом важным критерием являлось наличие у животных параплегии в задних конечностях, так как именно это свидетельствует о полноценности нанесенной травмы. Всех животных, у которых сохранялись какие-либо движения в задних конечностях

либо в хвосте, из исследования исключали. В итоговом анализе оценивали эффективность лечения у 192 крыс из 211, при этом 12 крыс исключили из исследования по причине неполноценности нанесенной травмы. Таким образом, воспроизводимость примененной модели составила 94,3%, что является высоким показателем. Это свидетельствует о том, что данный тип модели является высоковоспроизводимым, а сравнение исходов и оценка эффективности лечения у данной модели травмы спинного мозга являются достоверными.

### **Оценка эффективности клеточной терапии в открытом поле**

В эксперимент по оценке эффективности применения концентрата моноклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека у животных с контузионной травмой спинного мозга тяжелой степени было включено 110 животных, разделенных на 3 группы. Кроме того для исключения влияния хирургического вмешательства и применявшегося наркоза была выделена дополнительная контрольная группа ламинэктомии (без нанесения травмы спинного мозга) ( $n = 10$ ).

В дополнительной группе ламинэктомии на протяжении всего эксперимента двигательный дефицит отсутствовал (21 балл по шкале BBB). Это свидетельствует о том, что хирургическое вмешательство и перенесенный животными наркоз не влияет на результат оценки двигательной функции.

Проведение клеточной терапии способствовало более эффективному восстановлению двигательной функции конечностей при анализе в открытом поле (Таб. 1, Рис. 1). Исходные показатели в трех группах были одинаковыми и составляли 0 баллов по шкале BBB. В контрольной группе (СМТ) основной период восстановления составлял 4 недели: за это время максимальный уровень восстановления не превышал 4 баллов по шкале BBB. Максимальный показатель, достигаемый животными из контрольной группы за весь период наблюдения (8 недель), составлял  $4,7 \pm 0,6$  баллов, при этом после четвертой недели эксперимента восстановление было минимальным и не превышало 1

балла. В экспериментальных группах уровень восстановления был достоверно более высоким. Уже к пятой неделе эксперимента у животных из обеих экспериментальных групп наблюдалось восстановления двигательной активности в задних конечностях до 7-8 баллов по шкале ВВВ. При этом динамика восстановления в обеих экспериментальных группах была достоверно лучше, чем в контрольной группе.

Таблица 1. Оценка двигательной функции задних конечностей в открытом поле по шкале ВВВ.

Группа	Число животных	Баллы ВВВ (ср ± СО)							
		1 нед	2 нед	3 нед	4 нед	5 нед	6 нед	7 нед	8 нед
СМТ	44	0,3±0,1	1,1±0,2	1,5±0,4	3,8±0,5	3,8±0,6	4,3±0,6	4,1±0,6	4,7±0,6
СМТ + КПК 1 сут	24	0,5±0,0	1,7±0,5	4,0±1,2 *	6,0±1,1	7,7±1,1 *	7,5±1,2 *	7,6±1,1 *	7,6±1,1 *
СМТ + КПК 5 сут	32	0,8±0,2	2,1±0,3	3,7±0,3 *	6,0±0,6	6,3±0,7 *	7,3±0,4 *	7,5±0,4 *	7,4±0,4 *

Комментарии: СМТ – спинномозговая травма, КПК – клетки пуповинной крови, ср – среднее значение, СО – стандартное отклонение; \* P < 0,05.

К концу обсервационного периода уровень восстановления в обеих экспериментальных группах был достоверно выше, чем в контрольной группе: 7,6 ± 1,1 балл и 7,4 ± 0,4 балла в экспериментальных группах и 4,7 ± 0,6 баллов в контрольной группе, соответственно. При этом уровень достоверности различий был высоким – критерий Ньюмена-Кейлса при сравнении результатов на 3, 5, 6, 7 и 8 неделях эксперимента не превышал 0,022 (P<0,05) – в таблице и на графике эти показатели отмечены знаком «\*». При сравнении данных экспериментальных и контрольной групп разница в уровне двигательной функции составила 16 – 19% по сравнению с нормальным значением (21 балл по шкале ВВВ) и 53 – 62% по сравнению с контрольной группой.

При сравнении результатов восстановления между животными из двух экспериментальных групп на протяжении всего периода наблюдения

достоверных различий получено не было – в каждом из контрольных исследований в течение 8 недель эксперимента показатели шкалы ВВВ достоверно не различались. Максимальный уровень восстановления животных также был одинаковым ( $7,6 \pm 1,1$  и  $7,4 \pm 0,4$  баллов, соответственно). Таким образом, сроки проведения клеточной терапии (1 либо 5 сутки) в остром периоде травмы спинного мозга достоверно не влияют на уровень восстановления и конечный исход лечения.

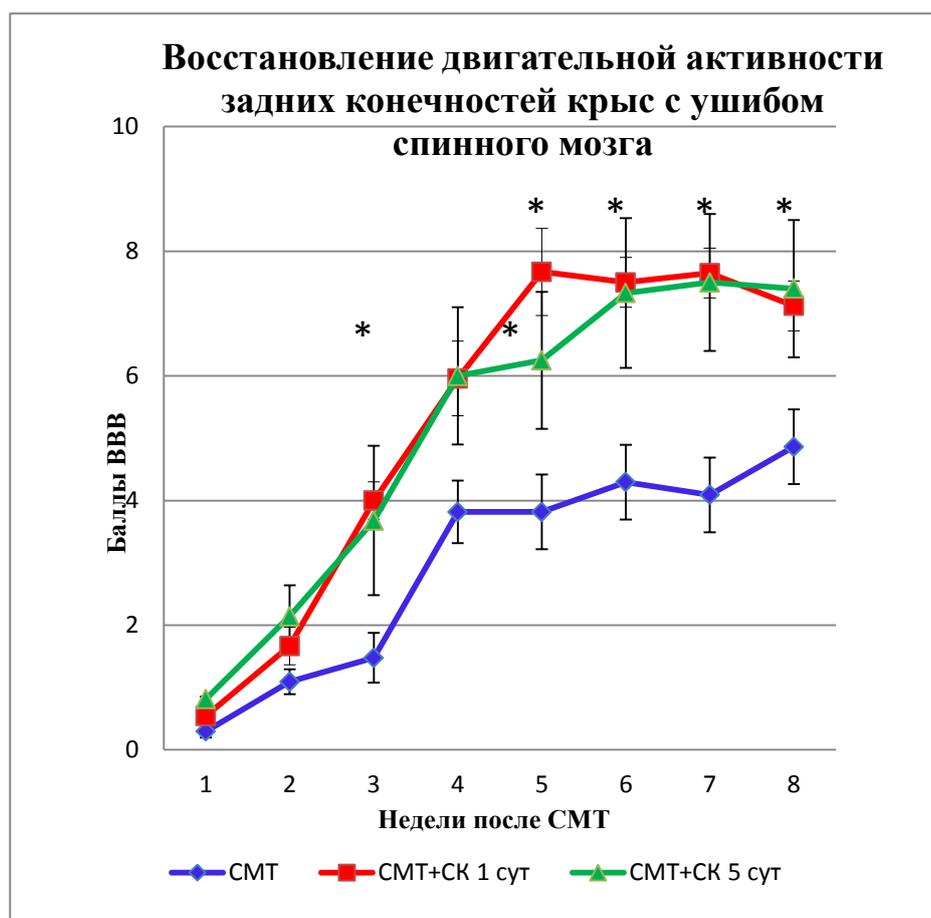


Рисунок 1. Оценка эффективности клеточной терапии у животных моделей контузионной травмы спинного мозга в открытом поле.

Комментарии: СМТ – спинномозговая травма, СК – стволовые клетки пуповинной крови; \*  $P < 0,05$ .

## **Применение нагрузочных тестов Ротарод и «сужающаяся дорожка»**

Применение нагрузочных тестов связано с необходимостью выполнения животными сложных двигательных маневров, требующих точного выполнения, высокого уровня координации и достаточной для выполнения мышечной силы. Соответственно, чувствительность этих методов в случае глубокого двигательного дефицита у животных с травмой спинного мозга относительно низкая.

По результатам оценки двигательной функции в открытом поле максимальные показатели животных достигали максимально 8 баллов по шкале BBB при проведении клеточной терапии. Такого уровня восстановления двигательной функции недостаточно для получения достоверных показателей в нагрузочных тестах. В тесте Ротарод животные из всех групп не были способны к удержанию на вращающемся барабане. В тесте с сужающейся дорожкой все животные также перемещались по стенду на расстояние от 1 до 5 сантиметров, двигаясь исключительно за счет передних конечностей. Таким образом, при использовании модели тяжелой контузионной травмы спинного мозга, в отличие от среднетяжелой травмы (применение нагрузочных тестов при среднетяжелой травме спинного мозга достоверно и является одним из наиболее показательных методов оценки двигательной функции) [Schwab M.E. et al. (1997)], применение нагрузочных тестов для оценки двигательной функции задних конечностей неэффективно и нецелесообразно.

## **Оценка дисперсии угла сгибания в плавательном тесте**

В исследовании было решено использовать в качестве основного показателя параметр дисперсии угла сгибания трех суставов задней конечности, точнее конкретно показатель взвешенной дисперсии. Именно взвешенная дисперсия позволяет достоверно оценить степень разброса величин углов сгибания, являющихся одинаково распределенными случайными величинами, а также оценить отклонение величин углов от их математического ожидания.

Дисперсию угла сгибания вычисляли по стандартной формуле:

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}$$

где  $x_i$  – максимальное значение угла сгибания в каждом из суставов,  $\bar{x}$  – минимальное значение угла сгибания в каждом из суставов,  $n$  – количество интервалов измерения.

Угол сгибания оценивали в 2 циклах исследования у каждого животного для каждой задней конечности по-отдельности. При этом оценивали дисперсию угла сгибания во всех трех суставах конечности – тазобедренном, коленном и голеностопном. Исследование проводили 1 раз в неделю в течение 6 недель после нанесения травмы.

Полученные данные свидетельствовали о том, что уровень восстановления двигательной активности задних конечностей выше в экспериментальной группе при сравнении в коленном и голеностопном суставах (Рис. 2, 3).

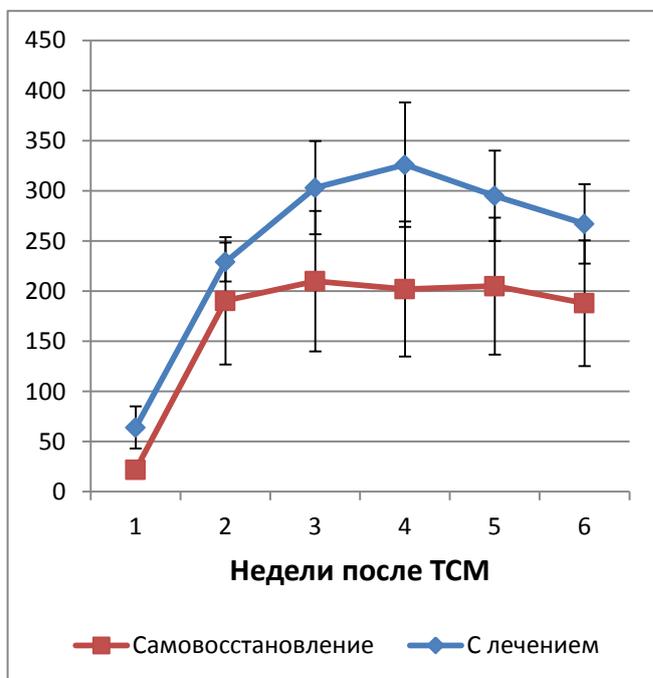


Рисунок 2. Оценка динамики дисперсии угла сгибания в коленном суставе ( $P < 0,05$ ).

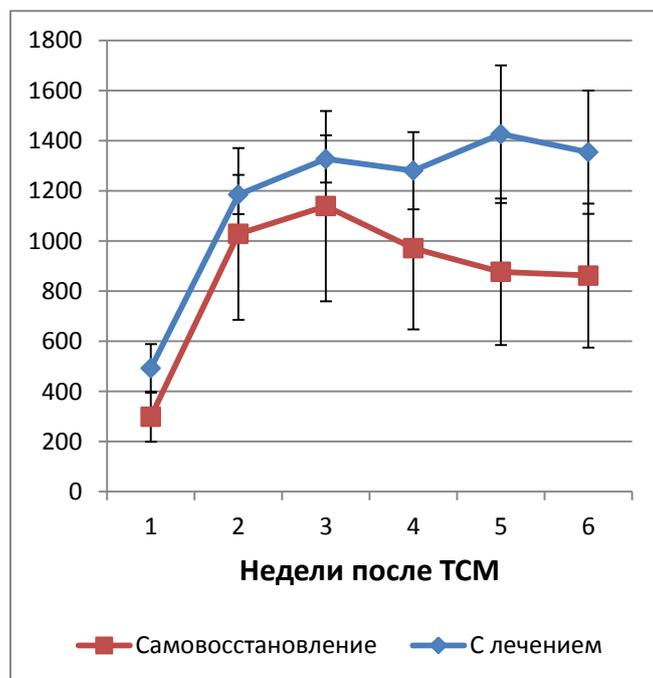


Рисунок 3. Оценка динамики дисперсии угла сгибания в голеностопном суставе ( $P < 0,05$ ).

При анализе разницы взвешенной дисперсии угла сгибания в тазобедренном суставе достоверных различий между группами обнаружено не было (Рис. 4), динамика восстановления объема движений в обеих группах была практически одинаковой ( $P < 0,05$ ). При этом, если результаты контрольной группы показывали однонаправленные изменения и динамика восстановления укладывалась в график стандартной параболы, то показатели экспериментальной группы в середине периода наблюдения показывали разнонаправленную динамику. Достаточная достоверность сравнения результатов ( $P < 0,05$ ) и отсутствие достоверных различий между группами животных свидетельствуют о том, что проведение клеточной терапии не обеспечивает восстановление двигательной активности в проксимальных отделах задних конечностей.

Динамика восстановления и конечный результат восстановления движений в коленном и голеностопном суставах в экспериментальной группе были достоверно выше, чем в контрольной группе. Результаты оценки в экспериментальной группе превышали таковые на 27 – 34% в отношении коленного сустава и на 24 – 42% в отношении голеностопного сустава, соответственно. Во всех случаях сравнения достоверность была высокой ( $P < 0,05$ ), ни в одном эксперименте значение  $P$  не превысило 0,028.

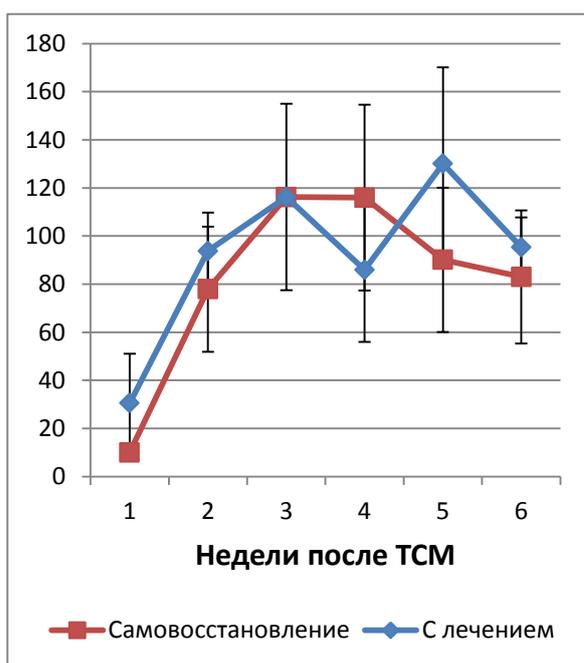


Рисунок 3. Оценка динамики дисперсии угла сгибания в тазобедренном суставе ( $P < 0,05$ ).

## **Сравнение эффективности системной и локальной клеточной терапии ушиба спинного мозга.**

Сравнение эффективности различных путей введения клеточной суспензии при ушибе спинного мозга у животных моделей проводили у 39 животных, разделенных на 3 группы, на основании шкалы ВВВ в открытом поле. В результаты эксперимента мы показали, что во всех трех группах животных наблюдалась однонаправленная динамика восстановления двигательной функции задних конечностей. Исходные показатели в трех группах были одинаковыми и составляли 0 баллов по шкале ВВВ. В обеих экспериментальных группах (внутривенное и внутриспинальное введение) динамика восстановления была выше, чем в контрольной группе. При этом, начиная с четвертой недели эксперимента различия между группами становились достоверными: значение  $P$  на 4, 5, 6, 7 и 8 неделях эксперимента не превышало 0,021. В этот же период эксперимента (с четвертой по восьмую недели периода наблюдения) показатели в каждой из двух экспериментальных групп были достоверно выше, чем в контрольной группе, что свидетельствует об эффективности применения как внутривенного, так и внутриспинального введения клеток пуповинной крови. Уровень восстановления в группе внутриспинального введения клеток пуповинной крови колебался от 16 до 19 % относительно нормального значения (21 балл по шкале ВВВ) и от 54 до 60% относительно результатов контрольной группы (Таб. 2, Рис. 5). В группе внутривенного введения уровень восстановления составил от 14 до 18% относительно нормального значения двигательной активности (21 балл по шкале ВВВ) и от 46 до 61% относительно контрольной группы. При сравнении результатов в двух экспериментальных группах достоверная разница была выявлена только в одном временном промежутке на пятой неделе эксперимента. В остальных сравнениях достоверных различий между уровнем восстановления в двух экспериментальных группах получено не было. Таким образом, проведение системной (внутривенной) и локальной (внутриспинальной) клеточной терапии достоверно способствует

восстановлению двигательной активности задних конечностей у животных с контузионной травмой спинного мозга. При этом эффективность восстановления при различных путях введения достоверно не различается, оба пути введения одинаково эффективны.

Таблица 2.

Сравнение эффективности клеточной терапии при системном (внутривенном) и локальном (внутриспинальном) введении.

	Число животных	Баллы BBB (ср ± СО)							
		1 нед	2 нед	3 нед	4 нед	5 нед	6 нед	7 нед	8 нед
<b>СК в/сп</b>	12		2,67±0,5	4,83±0,7	5,42±0,7*	7,06±0,4*#	7,25±0,4*	7,63±0,4*	8,38±0,34*
<b>СК в/в</b>	12	0,96±0,3	2,50±0,7	4,38±0,8	5,08±0,7*	5,36±0,6*	6,64±0,6*	7,09±0,5*	7,25±0,5*
<b>ТСМ самовосст</b>	15	1,10±0,2	1,86±0,2	3,30±0,24	4,23±0,4	4,63±0,4	4,73±0,5	5,27±0,4	5,13±0,4

Комментарии: СК и/сп – внутриспинальное введение клеток пуповинной крови. СК в/в – внутривенное введение клеток пуповинной крови. ТСМ самовосст – группа самовосстановления (контрольная). P < 0,05: \* - от ТСМ, # - от СК в/в.

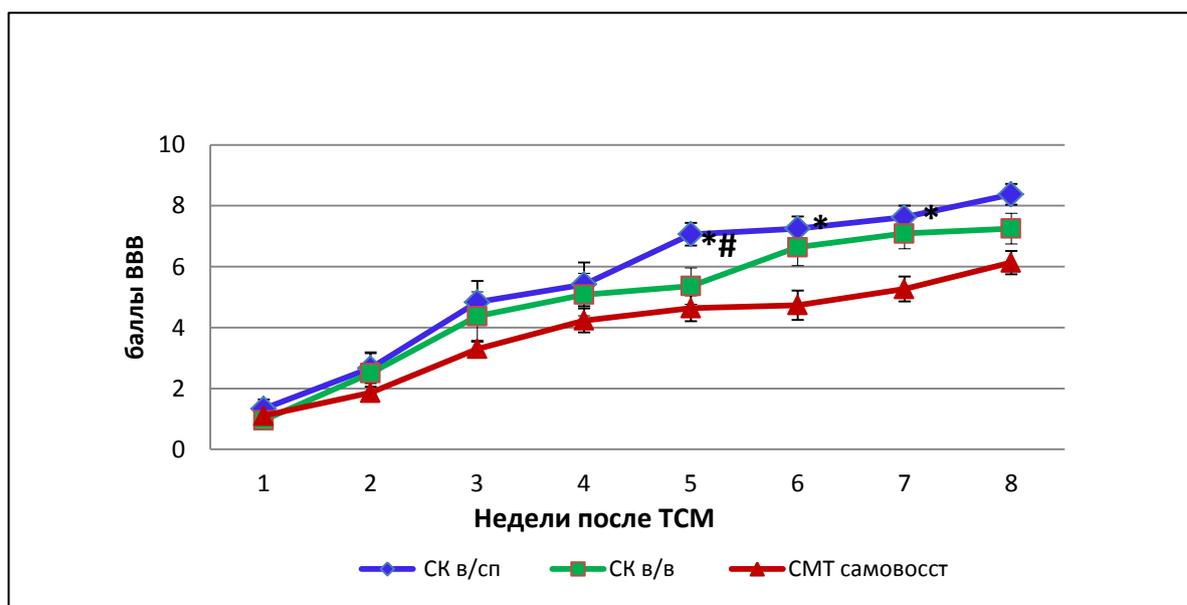


Рисунок 5. Сравнение эффективности клеточной терапии при системном (внутривенном) и локальном (внутриспинальном) введении.

## **Гистологический анализ структуры спинного мозга.**

Гистологический анализ использовали для оценки структуры очага повреждения, в том числе на более поздних стадиях – структуры очага кистозно-глиозно-фиброзной трансформации в зоне повреждения. Учитывая большие размеры очага повреждения по сравнению с полем микроскопа, отсутствие технической возможности точного выполнения серийных срезов и создания трехмерной структуры очага на их основе, сравнение размеров контузионного очага на различных этапах эксперимента по гистологическим срезам оказалось недостоверным, в исследовании эти данные не учитывали. В будущем этой цели в большей степени может соответствовать анализ результатов МРТ исследования, достоверность сравнения которых может оказывается выше. Также был проведен подсчет числа демиелинизированных и ремиелинизированных волокон белого вещества, однако достоверных различий между различными группами животных также получено не было.

Таким образом, по данным проведенного исследования системное применение КПКЧ обеспечивает восстановление двигательной активности задних конечностей животных до 16 – 19 % по сравнению с нормальным значением и до 53 – 62% по сравнению с контрольной группой. Эти данные коррелируют с результатами аналогичных исследований, в которых различия составляли 12 – 30 %. При этом никогда ранее не оценивали объем движений в суставах задних конечностей, что является важным показателем восстановления двигательной активности. По полученным данным клеточная терапия способствует увеличению объема движений во всех суставах задних конечностей, однако ее эффективность выше в отношении дистальных отделов конечностей (коленный и голеностопный суставы), чем проксимальных.

В целом, результаты доклинического исследования свидетельствуют о безопасности и высокой эффективности системной клеточной терапии с применением мононуклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека при контузионной травме спинного мозга у животных. Полученные данные

также позволяют рассматривать данный метод лечения как подходящий для дальнейших клинических исследований на пациентах с тяжелой осложненной травмой позвоночного столба.

## ВЫВОДЫ

1. Применение моноклеарных клеток пуповинной крови человека является безопасным методом регенеративной терапии контузионной травмы спинного мозга тяжелой степени у животных моделей. Ни у одного животного из экспериментальных и контрольных групп за все время исследования не было зафиксировано никаких нежелательных явлений проводимой клеточной терапии.
2. Примененная модель контузионной травмы спинного мозга тяжелой степени является подходящей для оценки эффективности терапии травмы спинного мозга в доклинических исследованиях и высоко воспроизводимой моделью. Она в высокой степени соответствует по структуре и клинической картине аналогичным повреждениям спинного мозга у человека. Воспроизводимость данной модели составляет 94,3%.
3. Оптимальными методами оценки двигательной активности конечностей у животных и, соответственно, анализа эффективности применения различных методов лечения при контузионной травме тяжелой степени являются открытое поле и плавательный тест. Нагрузочные тесты, такие как Ротарод или Сужающаяся дорожка, при ушибах спинного мозга тяжелой степени, в отличие от среднетяжелой и легкой травмы, не обладают достаточной чувствительностью и не отражают динамику восстановления. Применение данных тестов при использовании указанной модели не оправдано.
4. Клеточная терапия с применением моноклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека является эффективным методом лечения контузионной травмы спинного мозга тяжелой степени. Применение клеточной терапии способствует восстановлению двигательной активности задних конечностей до 16-19% по сравнению с нормальным значением и до 53 – 62% по сравнению с контрольной группой при анализе по шкале ВВВ в открытом поле, а также способствует

восстановлению объема движений в суставах задних конечностей по результатам плавательного теста. При этом клеточная терапия наиболее эффективна в отношении дистальных групп мышц конечностей и способствует более полному восстановлению движений в коленном и голеностопном суставах по сравнению с тазобедренным суставом.

5. В случае проведения терапии в остром периоде травматического процесса эффективность введения клеток пуповинной крови на 1 и 5 сутки после нанесения травмы достоверно не различается. Путь введения клеток пуповинно-плацентарной крови при проведении клеточной терапии не влияет на эффективность самой терапии, при этом системный (внутривенный) и локальный (внутриспинальный) пути введения являются одинаково эффективными.

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Павлович Е.Р., **Смирнов В.А.** и соавт. Динамика изменений морфологии серого и белого вещества спинного мозга при контузионном повреждении средней степени тяжести у крысы / Павлович Е.Р., Просвирнин А.В., Смирнов В.А., Звягинцева М.А., Рябов С.И. // Успехи современного естествознания.- 2012.- № 8.- С. 111.
2. Павлович Е.Р., **Смирнов В.А.** и соавт. Видеонаблюдение двигательной активности животных во время их плавания в бассейне. Объективизация информации о функциональном состоянии интактных и оперированных крыс и мышей / Павлович Е.Р., Рябов С.И., Просвирнин А.В., Смирнов В.А., Звягинцева М.А. // International Journal of Applied and Fundamental Research.-2013.- № 11.- Сс. 98 – 99.
3. **Смирнов В.А.** Введение клеток пуповинно-плацентарной крови человека помогает при тяжелой травме спинного мозга / Смирнов В.А., Рябов С.И., Гринь А.А., Чехонин В.П., Звягинцева М.А., Павлович Е.Р., Смирнов В.Н. // I Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине: материалы конгресса.- Москва.- 4-6 декабря 2013 года.- Сс. 54-55.
4. С.И. Рябов, **В.А. Смирнов.** Эффективность введения клеток плацентарно/пуповинной крови человека крысам с тяжелой травмой спинного мозга / С.И. Рябов, М.А. Звягинцева, Е.Р. Павлович, В.А. Смирнов, А.А. Гринь, В.П. Чехонин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014.-Том 157.- № 1.- Сс. 98 – 101.
5. **V.A. Smirnov et al.** Efficiency of Transplantation of Human Placental/Umbilical Blood Cells to Rats with Severe Spinal Cord Injury / S.I. Ryabov, M.A. Zvyagintseva, E.R. Pavlovich, V.A. Smirnov, A.A. Grin', V.P. Chekhonin // Bulletin of Experimental Biology and Medicine.- May 2014.-No.1 – Pp. 85 – 88.
6. **Smirnov V. et al.** Pathomorphological changes under contusion trauma of spinal cord in rat / Smirnov V., Pavlovich E., Prosvirnin A., Zvyagintseva M., Ryabov S. // European Journal of Natural History.- 2014.- Vol.1.- Pp. 21-23.
7. **Смирнов В.А.** Внутривенное введение клеток плацентарно-пуповинной крови улучшает восстановление двигательной функции после травмы спинного мозга / Смирнов В.А., Рябов С.И., Звягинцева М.А., Просвирнин А.В., Павлович Е.Р., Гринь А.А., Чехонин В.П.,

- Смирнов В.Н. // Новейшие методы клеточных технологий в медицине: материалы симпозиума.- Новосибирск.- 2 – 6 сентября 2014 года.
8. Ryabov S.I., **Smirnov V.A.** et al. Umbilical cord blood cells (HUCBCs) administration is effective in spinal cord injury in rats / Ryabov S.I., Smirnov V.A., Grin' A.A., Chekhonin V.P., Zvyagintseva M.A., Pavlovich E.R., Prosvirnin A.V., Smirnov V.N. // 6<sup>th</sup> Conference on Drug Discovery and Therapy: abstract book.- Dubai, U.A.E.- 10 – 12 Feb 2014.- P. 137.
  9. **Smirnov V.** et al. Efficiency of human umbilical cord blood administration in animal models with severe spinal cord traumatic injury / Smirnov V., Green A., Ryabov S., Zvyagintseva M., Pavlovich E., Chekhonin V. // Съезд европейского общества нейрохирургов EANS-2014.- Прага, Чехия.- 12 – 14 октября 2014 года.- С.177.
  10. Павлович Е.Р., **Смирнов В.А.** и соавт. Морфология эпендимы при повреждениях спинного мозга у лабораторных грызунов / Павлович Е.Р., Просвирнин А.В., Звягинцева М.А., Смирнов В.А., Рябов С.И. // Международный журнал экспериментального образования.- 2015.- № 6.- Сс. 123 – 124.
  11. Павлович Е.Р., **Смирнов В.А.** и соавт. Использование полутонки срезов спинного мозга мелких лабораторных грызунов для выявления пространственной организации серого и белого вещества в норме и в экспериментах / Павлович Е.Р., Просвирнин А.В., Звягинцева М.А., Смирнов В.А., Рябов С.И. // Международный журнал экспериментального образования.- 2015.- № 8.- Сс. 417 – 418.
  12. **Smirnov et al.** Human umbilical cord blood cells administration reduces behavioral deficit after severe spinal cord injury / Smirnov V.A., Ryabov S.I., Green A.A., Krylov V.V., Zvyagintseva M.A., Pavlovich E.R., Prosvirnin A.V. // European Spine Journal.- 2015.- Vol. 24.- № 3.- Pp. 657-658.
  13. **Смирнов В.А.** и соавт. Применение моноклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека на модели контузионной травмы спинного мозга тяжелой степени у крысы и человека / Смирнов В.А., Рябов С.И., Звягинцева М.А., Павлович Е.Р., Гринь А.А., Чехонин В.П. // Поленовские чтения: материалы XIV всероссийской научно-практической конференции, Санкт-Петербург, 15 – 17 апреля 2015 года.- С. 22.
  14. Ryabov S.I., **Smirnov V.A.** et al. Single injection of human umbilical cord blood cells can improve restoration of motor function after experimental severe spinal cord injury / Ryabov S.I., Smirnov V.A., Zvyagintseva M.A., Grin' A.A., Krylov V.V., Chekhonin V.P., Smirnov V.N. // World

- Conference on Regenerative Medicine: материалы конференции.-  
Лейпциг, Германия.- 21 – 23 октября 2015 года.- С. 269.
15. **Смирнов В.А.** и соавт. Применение концентрата мононуклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека при контузионной травме спинного мозга тяжелой степени у человека и животных / Смирнов В.А., Гринь А.А., Крылов В.В., Рябов С.И., Звягинцева М.А. // Поленовские чтения: материалы XV всероссийской научно-практической конференции, Санкт-Петербург, 13 – 15 апреля 2016 года.- С. 29.
16. С.И. Рябов, **В.А. Смирнов.** Коллагеновый имплантат и мононуклеарные клетки пуповинной крови позволяют восстановить движение задних конечностей после удаления участка спинного мозга / С.И. Рябов, М.А. Звягинцева, Е.О. Осидак, В.А. Смирнов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017.-Том 164.- № 9.- Сс. 377 – 380.
17. **V.A. Smirnov et al.** Collagen Implant and Mononuclear Cells of Umbilical Blood Allow the Restoration of Movements pf Hind Limbs after Removing the Site of Spinal Cord / S.I. Ryabov, M.A. Zvyagintseva, E.O. Osidak, V.A. Smirnov // Bulletin of Experimental Biology and Medicine.- January 2017.- No.9 – PP. 390 – 393.