

Федеральное бюджетное учреждение науки  
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова

УДК 57.017.35

№ ИНГЗ 0108-2015-0061

№ НИОКТР АААА-А16-116120810101-8

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБР РАН



Васильев А.В.

« 27 » декабря 20 17 г.

ОТЧЕТ

по проекту Программы фундаментальных исследований Президиума РАН  
«Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий»

«Разработка новой биомедицинской технологии лечения повреждений нервной  
ткани, основанной на использовании клеток взрослого человека, происходящих из  
нервного гребня»

заключительный

Руководитель проекта  
зав. лабораторией  
доктор биол. наук  
чл.-корр. РАН

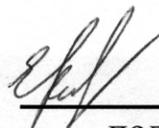
 27.12.17 Воротеляк Е.А.

Москва 2017

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы:

Заведующий лабораторией,  
д.б.н. , чл.-корр.

 24.12.2017 Е.А. Воротеляк  
подпись, дата

Исполнители темы:

Главный научный  
сотрудник, д.б.н

 27.12.2017 М.А. Александрова  
подпись, дата

Главный научный сотрудник,  
д.б.н., проф.

 27.12.2017 В.В. Терских  
подпись, дата

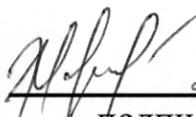
Старший научный  
сотрудник, д.б.н.

 27.12.2017 Ю.В. Суханов  
подпись, дата

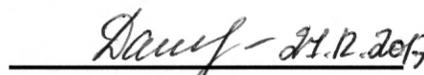
Старший научный сотрудник,  
к.б.н.

 27.12.2017 Е.В. Киселева  
подпись, дата

Научный сотрудник, к.б.н.

 24.12.2017 Э.С. Черных  
подпись, дата

Научный сотрудник, к.б.н.

 24.12.2017 Э.Б. Дашинимаев  
подпись, дата

Научный сотрудник, к.б.н.

 27.12.2017 О.С. Роговая  
подпись, дата

Научный сотрудник, к.б.н.

 27.12.2017 К.К. Сухинич  
подпись, дата

Младший научный сотрудник

 27.12.2017 А.В. Косых  
подпись, дата

Аспирант

 27.12.2017 А.К. Бейлин  
подпись, дата

## СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	4
1. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСТНАТАЛЬНЫХ КЛЕТОК НЕРВНОГО ГРЕБНЯ ВОЛОСЯНОГО ФОЛЛИКУЛА	5
1.1 ВЛИЯНИЕ НЕЙРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА ЭКСПРЕССИЮ МАРКЕРОВ ПКНГ-ВФ В КУЛЬТУРЕ	5
1.2 ВЛИЯНИЕ НЕЙРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА МИГРАЦИЮ ПКНГ-ВФ В КУЛЬТУРЕ	7
2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПКНГ-ВФ С ТКАНЯМИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ	9
2.1 МОДЕЛЬ ПЕРЕЖИВАЮЩИХ СРЕЗОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШИ В КУЛЬТУРЕ	9
2.2 МОДЕЛЬ НЕЙРОТРАНСПЛАНТАЦИИ ПКНГ-ВФ В ГОЛОВНОЙ МОЗГ МЫШИ	10
2.2.1 ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНОГО КЛЕТОЧНОГО КОМПОНЕНТА ТРАНСПЛАНТАТА	10
2.2.2 ИЗУЧЕНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ТРАНСПЛАНТАТА	11
3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПКНГ-ВФ С ТКАНЯМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ	12
СТАТЬИ И ТЕЗИСЫ В СБОРНИКАХ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ РАБОТЫ	14

## РЕФЕРАТ

Отчёт 15 с., 1 ч., 3 раздела, 8 рис.

Ключевые слова – биотехнологический клеточный продукт, волосяной фолликул, нервный гребень, нейральный трансплантат, жизнеспособность, интеграция трансплантата, модель трансплантации в головной мозг и область поврежденного периферического нерва.

Объектом исследования являются компоненты биотехнологического продукта, предназначенного для лечения повреждений нервной ткани, а также модели на животных и культурах клеток для испытания этих компонентов.

Целью данного проекта является создание компонента из постнатальных клеток нервного гребня волосяного фолликула для разработки биотехнологического продукта, предназначенного для стимуляции восстановления нервной ткани и ее функций.

## 1. ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСТНАТАЛЬНЫХ КЛЕТОК НЕРВНОГО ГРЕБНЯ ВОЛОСЯНОГО ФОЛЛИКУЛА

В ходе работы были исследованы свойства постнатальных клеток нервного гребня волосяного фолликула (ПКНГ-ВФ) в различных моделях *in vitro* и *in vivo*. Первоначально были доработаны протоколы выделения ПКНГ-ВФ мыши и человека, полученные культуры были охарактеризованы (Рисунок 1). Показано, что, исходя из экспрессии маркеров нервного гребня (НГ) (Nestin, p75NTR), ПКНГ-ВФ (Рисунок 1.В, 1.Г) соответствуют эмбриональным клеткам НГ (Рисунок 1.А, 1.Б), а значит обладают их нейральным потенциалом.

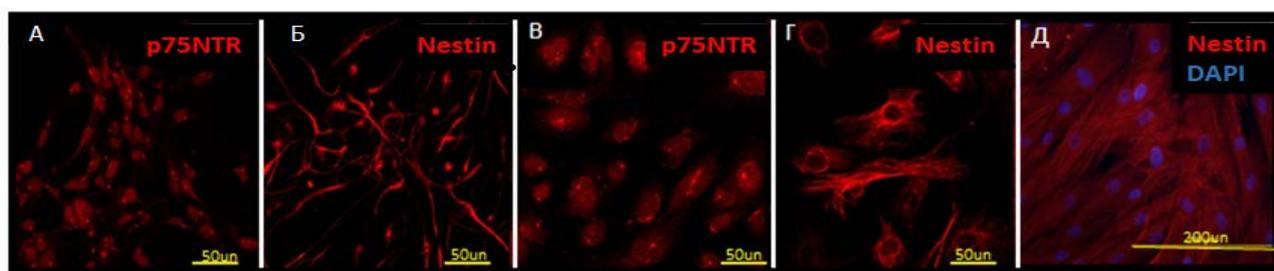


Рисунок 1 - Иммуногистохимическое окрашивание адгезивных культур на маркеры НГ (Nestin, p75NTR). А, Б - эмбриональные клетки НГ мыши. В, Г - ПКНГ-ВФ мыши. Д - клетки ПКНГ-ВФ человека. Ядра окрашены DAPI.

### 1.1 ВЛИЯНИЕ НЕЙРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА ЭКСПРЕССИЮ МАРКЕРОВ ПКНГ-ВФ В КУЛЬТУРЕ

Для подробного изучения свойств ПКНГ-ВФ, как клеток НГ, обладающих нейральным потенциалом, была проведена серия экспериментов по влиянию факторов, секретируемых нейральной тканью на статус ПКНГ-ВФ в культуре. В качестве источника нейральных агентов были выбраны эмбриональные ткани головного (ГМ) и спинного (СМ) мозга мыши ранней и поздней стадий развития (12.5Е и 18.5Е соответственно), поскольку в эмбриональный период секретируется широкий спектр факторов, отвечающих за регулирующих регуляцию нейрогенеза. При изучении культур ПКНГ-ВФ, культивированных в средах, кондиционированных клетками ГМ и СМ от 12.5Е и 18.5Е, на 14 и 21 сутки было отмечено отсутствие экспрессии маркеров зрелых нейронов (NeuN, Neurofilaments, Tyrosine Hydroxylase) и астроцитов (GFAP). Однако показана экспрессия маркера миелина (MBP), нейрального маркера Tuj1, а также маркеров стволовых клеток НГ (Nestin, p75NTR). Было показано, что в ходе культивирования в среде, кондиционированной клетка СМ18.5Е, экспрессия p75NTR на 14 сутки исчезала, но

восстанавливается к 21 суткам. В связи с этим был проведен детальный анализ экспрессии маркеров НГ (*nestin*, *p75NTR*) методом ПЦР в реальном времени. Результаты представлены на рисунке 2. Было показано, что факторы эмбрионального СМ поддерживают экспрессию маркеров нервного гребня ПКНГ-ВФ, в то время как присутствие факторов эмбрионального ГМ в культуре приводит к снижению уровня экспрессии *p75NTR*.

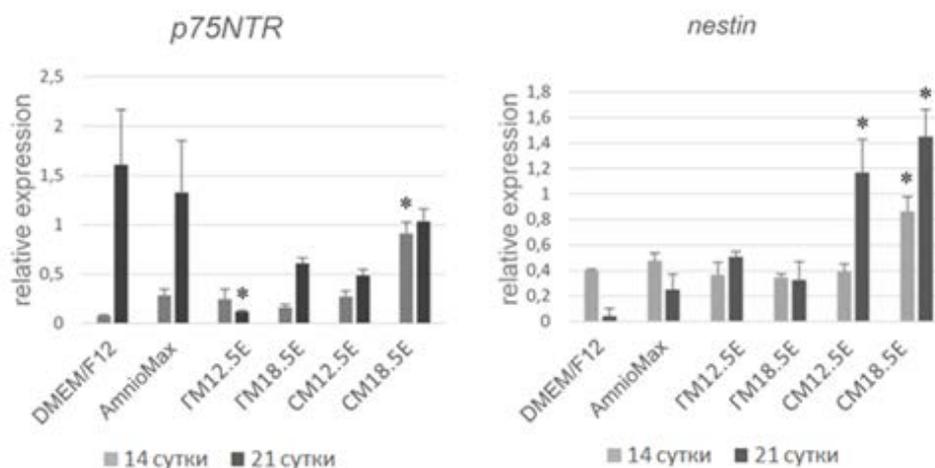


Рисунок 2 - Относительная экспрессия *p75NTR* и *nestin* в ПКНГ-ВФ, культивированных в кондиционированных средах 14 и 21 день. Данные ПЦР в реальном времени. Экспериментальные группы: ГМ - кондиционированная среда культуры клеток головного мозга стадий 12.5E и 18.5E. СМ - кондиционированная среда культуры клеток спинного мозга стадий 12.5E и 18.5E. Контрольные группы: среда DMEM/F12 и среда AmnioMax. (\* -  $P < 0.05$ , one-way ANOVA, Tukey's post hoc test).

Помимо этого, в ходе эксперимента была исследована пролиферативная активность ПКНГ-ВФ. Было отмечено, что во всех культурах происходило снижение числа пролиферирующих клеток, окрашенных антителами к маркеру пролиферации Ki67, кроме культуры с кондиционером CM18.5E, для которой показано увеличение уровня пролиферации к 21 суткам, по сравнению с показателями на 14 сутки и другими экспериментальными группами (Рисунок 3).

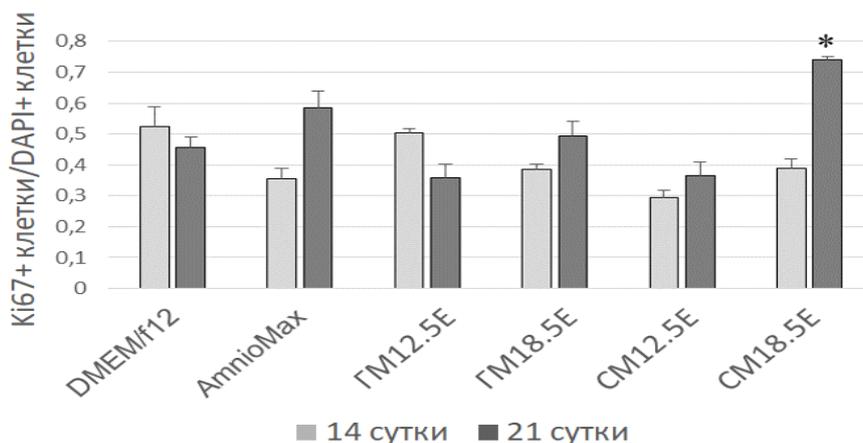


Рисунок 3 - Пролиферативная активность ПКНГ-ВФ в кондиционированных средах. Окрашивание антителами к маркеру пролиферации Ki67 через 14 и 21 день культивирования. Процентное отношение Ki67-положительных клеток к общему числу клеток, меченных ядерным красителем DAPI. Пролиферативная активность на нулевой день культивирования была принята за "1". Экспериментальные группы: ГМ - кондиционированная среда культуры клеток головного мозга стадий 12.5E и 18.5E. СМ - кондиционированная среда культуры клеток спинного мозга стадий 12.5E и 18.5E. Контрольные группы: среда DMEM/F12 и среда AmnioMax. (\*- P <0.03, one-way ANOVA, Tukey's post hoc test).

## 1.2 ВЛИЯНИЕ НЕЙРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА МИГРАЦИЮ ПКНГ-ВФ В КУЛЬТУРЕ

В следующей серии экспериментов была исследована способность ПКНГ-ВФ к миграции, как характерной особенности клеток НГ, позволяющей им заселять и принимать участие в формировании органов в процессе эмбриогенеза. В экспериментах были использованы суспензии клеток эмбриональной центральной нервной системы (ЦНС) (ГМ, СМ от 12.5E и 18.5E), а также постнатальной периферической (ПНС) – седалищного нерва (СН).

В модели миграции были использованы культуры ранних пассажей, полученные из вибрисс трансгенных мышей, несущих ген GFP под промотором актина. Суспензию GFP+ клеток ПКНГ-ВФ помещали в центр лунки культурального плато, а на периферии – суспензию клеток нервной системы в капле коллагенового геля. Результаты представлены на рисунке 4. Было показано, что в присутствии суспензии клеток ГМ и СМ стадии развития E18.5 миграция клеток НГВФ значительно снижена, в то время как для стадии E12.5 ингибирование скорости миграции меньше или она совпадает с контрольными группами, что коррелирует с поведением клеток НГ в ходе эмбрионального развития: в стадию 12.5E идет активная миграция НГ, тогда как на 18.5E и далее в постнатальном периоде происходит заселение таргетных органов, дифференцировка, формирование ниши. Помимо этого, было отмечено, что в присутствии клеток СН ингибирования не происходит, ПКНГ-ВФ сохраняют свои миграционные потенции.

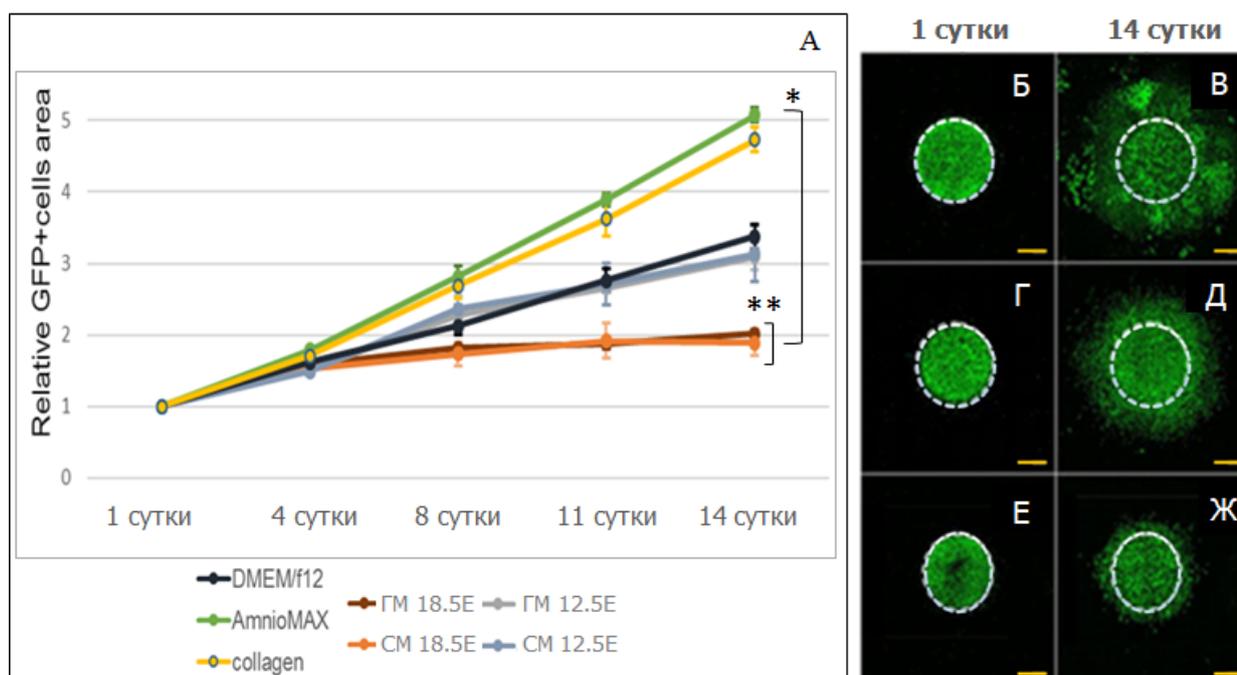


Рисунок 4 - Миграция ПКНГ-ВФ в присутствии эмбриональных нейральных тканей. А - Динамика миграции ПКНГ-ВФ в присутствии суспензии клеток ГМ и СМ, полученных от эмбрионов мыши 12.5Е и 18.5Е в сравнении с контрольными группами в присутствии коллагена и чистых сред для культивирования. Б-Ж - Миграция GFP+ ПКНГ-ВФ на 1 и 14 сутки эксперимента. Б, В - ПКНГ-ВФ в среде AmnioMax. Г, Д - ПКНГ-ВФ в кондиционированной ГМ12.5Е среде. Е, Ж - ПКНГ-ВФ в кондиционированной ГМ18.5Е среде. Масштабный отрезок – 2 мм. (\* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.05$ , one-way ANOVA, Tukey's post hoc test).

Таким образом, было показано, что нативные ПКНГ-ВФ сохраняют свой статус стволовых клеток нервного гребня в присутствии факторов эмбриональной ткани. Отмечено, что ПКНГ-ВФ обладают тканеспецифичной реакцией на нейральные факторы среды, поскольку только кондиционер эмбриональных клеток СМ стимулировал пролиферацию ПКНГ-ВФ. Показано, что одной из перспективных областей применения ПКНГ-ВФ является восстановление повреждения ПНС.

## 2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПКНГ-ВФ С ТКАНЯМИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

На следующем этапе работ было изучено влияние ткани головного мозга на ПКНГ-ВФ. В работе были также использованы культуры ранних пассажей, полученные из вибрисс трансгенных мышей, несущих ген GFP под промотором актина, что позволило успешно отслеживать судьбу клеток трансплантата, взаимодействовавших с тканью мозга реципиента. Исследование было проведено на двух моделях: переживающих срезов (*in vitro*) и нейротрансплантации в головной мозг (*in vivo*). Был рассчитан оптимальный объем ПКНГ-ВФ для обоих экспериментов: 500 000 клеток в 10 мкл *in vitro* и 500 000 клеток в 1,5 мкл *in vivo*. В работе были исследованы четыре различных типа культур. В первую очередь часть культур НГВФ мыши подвергли предварительной дифференцировке в нейральном направлении в среде Neurobasal Differentiation Kit. Далее, с использованием метода висячей капли, были получены клеточные сфероиды из интактных и предифференцированных культур.

### 2.1 МОДЕЛЬ ПЕРЕЖИВАЮЩИХ СРЕЗОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШИ В КУЛЬТУРЕ

На модели переживающих срезов было показано, что клетки ПКНГ-ВФ успешно заселяют всю поверхность среза живого мозга мыши, интегрируют в ткань мозга на глубину до 150 мкм (Рисунок 5.А). На данной модели было показано, что форма внесения ПКНГ-ВФ (суспензия или сфероиды) не влияет на характер интеграции клеток в ткань мозга, и выражается только в плотности распределения клеток в ткани мозга: клетки суспензии образуют равномерно разветвленную сеть, тогда как из клеток из сфероидов образует локальные, постепенно разрастающиеся островки (Рисунок 5.Б). Была отмечена активная пролиферация ПКНГ-ВФ в контакте с нейральной тканью в первые сутки эксперимента, снижающаяся к 7 суткам (Рисунок 5.Г). Показано отсутствие экспрессии характерных маркеров НГ (Nestin, p75NTR) ПКНГ-ВФ на 7 сутки и наличие экспрессии даблкортина (маркера нейральных предшественников и незрелых нейронов) (Рисунок 5.В).

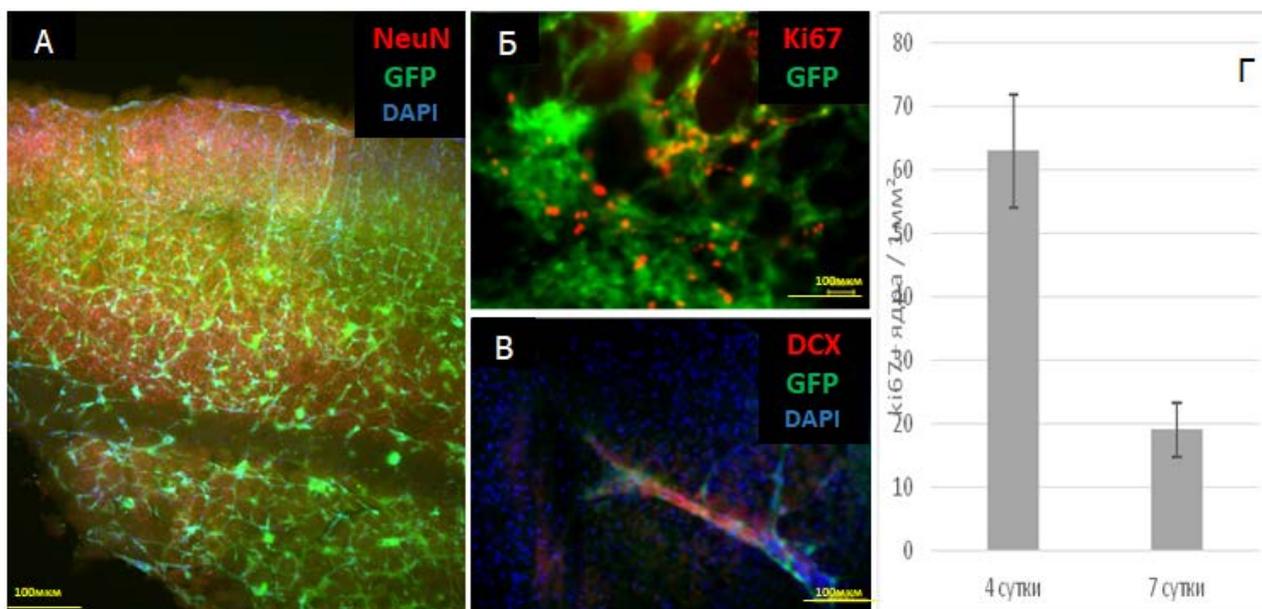


Рисунок 5 - Иммуногистохимический анализ переживающих срезов головного мозга мыши в контакте с ПКНГ-ВФ. А - GFP+ ПКНГ-ВФ (зеленый) на переживающих срезах. 7 сутки. Общий вид. Нейроны среза мозга окрашены антителами NeuN (красный). Ядра окрашены DAPI (синий). Б - Ядра пролиферирующих ПКНГ-ВФ окрашены антителами к Ki67 (красный). 4 сутки. Сфероиды. В - Экспрессия даблкортина (DCX) (маркера нейральных предшественников и незрелых нейронов) (красный) ПКНГ-ВФ (зеленый). Ядра окрашены DAPI. 7 сутки. Суспензия. Масштабный отрезок – 100 мкм. Г - Сравнение уровня пролиферации ПКНГ-ВФ в контакте с тканью мозга на 4 и 7 сутки в культуре. Подсчет производился исходя из числа Ki67+ ядер (маркер пролиферации) на единицу площади поверхности среза.

Таким образом, было показано, что ПКНГ-ВФ способны интегрироваться с тканями ГМ, а также способны к дифференцировке в нейральном направлении под их влиянием.

## 2.2 МОДЕЛЬ НЕЙРОТРАНСПЛАНТАЦИИ ПКНГ-ВФ В ГОЛОВНОЙ МОЗГ МЫШИ

### 2.2.1 ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНОГО КЛЕТОЧНОГО КОМПОНЕНТА ТРАНСПЛАНТАТА

На модели нейротрансплантации ПКНГ-ВФ был проведен сравнительный анализ трансплантатов, сформированных интактными и предифференцированными клетками в форме клеточной суспензии и сфероидов. Трансплантация проводилась стереотаксически в головной мозг мыши по координатам от брегмы: +0.45 мм, латерально 2 мм, 2.5 мм в глубину. Иммуногистохимический анализ срезов головного мозга на 7, 14, 21 и 30 сутки после операции показал реципрокное прорастание волокон ПКНГ-ВФ в окружающие ткани мозга (Рисунок 6.А) и врастание отростков клеток реципиента в трансплантат (Рисунок 6.Б, 6.В). Показано, что для всех типов трансплантата характерно отсутствие интенсивной глиальной реакции реципиента, как в случае трансплантации фибробластов (Рисунок 6.Г). Отмечено, что трансплантат, сформированный ПКНГ-ВФ, подвергшимися предварительной дифференцировке, переживает дольше интактных, до 30 дней (Рисунок 6.Д). Кроме того, предифференцированные клетки

обладали более высоким потенциалом к миграции в тканях головного мозга реципиента - более 700 мкм от области трансплантации (Рисунок 6.Е).

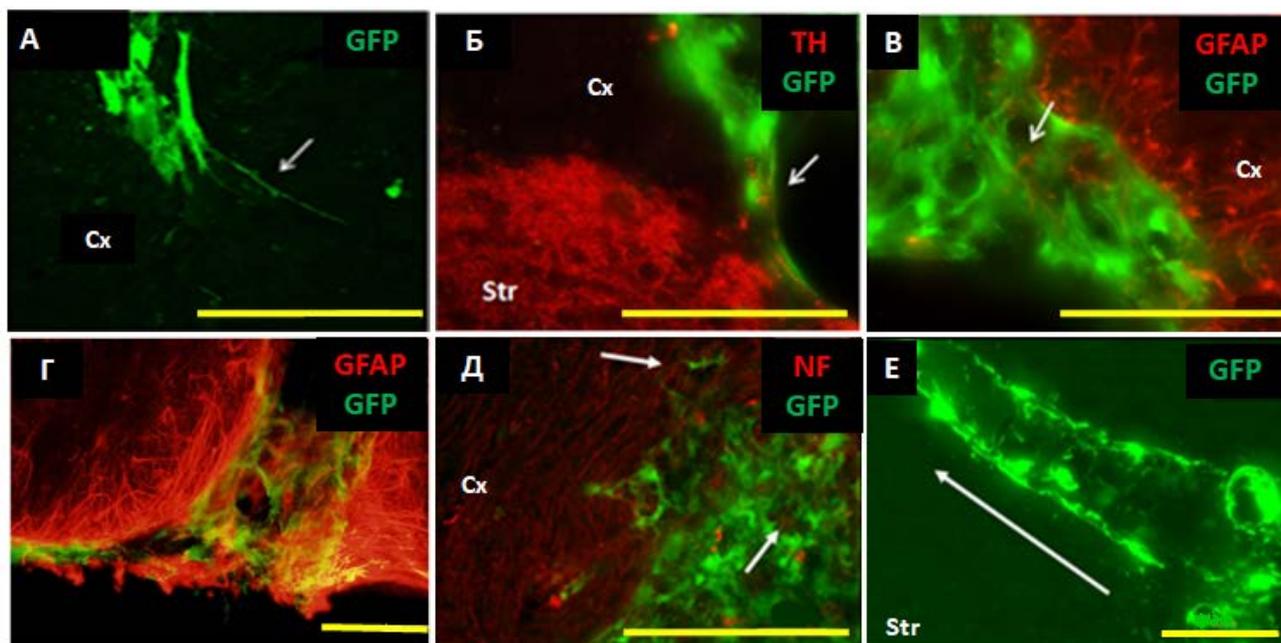


Рисунок 6 - Иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга мыши после проведения трансплантаций GFP+ ПКНГ-ВФ (зеленый). А - Вростание отростков GFP+ ПКНГ-ВФ в ткань мозга реципиента. 14 сутки. Б, В - Вростание волокон тирозингидроксилазных нейронов (Б), окрашенных антителами к ТН (красный) и волокон астроцитов (Г), окрашенных антителами к GFAP (красный) в трансплантат (зеленый). 21 сутки. Суспензия интактных ПКНГ-ВФ. Г - Глиальная реакция на трансплантацию GFP+ мышинных эмбриональных фибробластов (зеленый). Астроциты окрашенных антителами к GFAP (красный). 7 сутки. Контроль. Д - Вростание волокон нейтрофиламентов (anti-NF, красный) в трансплантат (зеленый). 30 сутки. Суспензия предифференцированных ПКНГ-ВФ. Е - Миграция предифференцированных GFP+ ПКНГ-ВФ. Сх – кора ГМ, Str – стриатум. Масштабный отрезок – 100 мкм.

### 2.2.2 ИЗУЧЕНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ТРАНСПЛАНТАТА

В дальнейшем были исследованы вероятные дополнительные компоненты трансплантата, способные влиять на его жизнеспособность.

Было показано, что при включении белков матрикса (на примере коллагена и матригеля) в состав трансплантата, происходит снижение миграции клеток из области трансплантата, а также не наблюдается увеличение срока жизни трансплантата, по сравнению с трансплантациями «чистой» суспензии ПКНГ-ВФ.

Было исследовано влияние гормона эритропоэтина (ЭПО) на ПКНГ-ВФ, который, помимо участия в процессах гемопоэза, обладает антиапоптотическими свойствами. По результатам МТТ-теста показано, что ЭПО в концентрации 1 нг/мл способен стимулировать пролиферацию клеток ПКНГ-ВФ в культуре. Результаты представлены на рисунке 7.

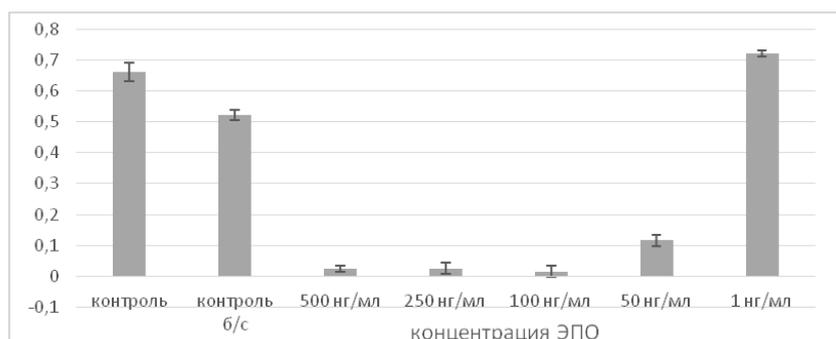


Рисунок 7 - Воздействие гормона ЭПО на пролиферацию ПКНГ-ВФ. МТТ-тест

В связи с известными протекторными свойствами мезенхимных стволовых клеток при трансплантациях, был проведен ряд экспериментов с использованием мезенхимных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) и клеток дермальной папиллы (ДП) в составе трансплантата. Была показана низкая выживаемость клеток МСК ЖТ уже на 7 сутки после нейротрансплантации, которая привела к гибели всего трансплантата. В тоже время, при наличии клеток ДП в составе вводимой суспензии, была показана интеграция в ткани мозга реципиента. Дальнейшая серия трансплантаций с использованием клеток ДП показала оптимальное соотношения двух культур клеток волосяного фолликула в составе трансплантата. Было показано, что, если доля клеток ДП составляла 10-20% от общего объем трансплантируемой суспензии (500 000 клеток), происходило переживание трансплантатом срока в 20 суток.

### 3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПКНГ-ВФ С ТКАНЯМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

В рамках следующего этапа работы были разработаны протоколы исследования взаимодействия ПКНГ-ВФ с тканями периферической нервной системы. Были отработаны микрохирургические методы введения трансплантата на модели травмы седалищного нерва. Стандартизированная травма периферического нерва была получена с помощью хирургического зажима типа «москит», обладающего самыми тонкими рабочими поверхностями и фиксатором положения (Рисунок 8.А).

В работе были исследованы три метода трансплантации клеток. Во-первых, была произведена прямая доставка клеток в седалищный нерв через прокол эпинеурия и введение суспензии клеток (300 000 клеток в 2 мкл) (Рисунок 8.Б).

Другим подходом было обертывание поврежденного нерва желатиновой губкой "Спонгостан" (SPONGOSTAN). Предварительно было показано, что ее пористая структура

подходит для заселения фибробластами человека, а также ПКНГ-ВФ. Метод совмещения изображений оптических срезов (z-stack) цифрового флуоресцентного микроскопа Keyence VZ-9000 позволил выявить клетки на различной глубине носителя (Рисунок 8.Е).

Третьим подходом было микрохирургическое наложение шва. Для этого нерв пересекался и сшивался таким образом, что губка оказывалась посередине (Рисунок 8.Г, 8.Д). Несмотря на техническую работоспособность данной модели, наиболее оптимальным вариантом является прокол нерва и введение суспензии. В результате суспензионного метода трансплантации в ткани седалищного нерва были обнаружены мигрирующие жизнеспособные ПКНГ-ВФ (Рисунок 8.В). Однако, поскольку в случае пересечения нерва целесообразно использовать жесткий внешний каркас, спонгостан может выступать в роли скаффолда.

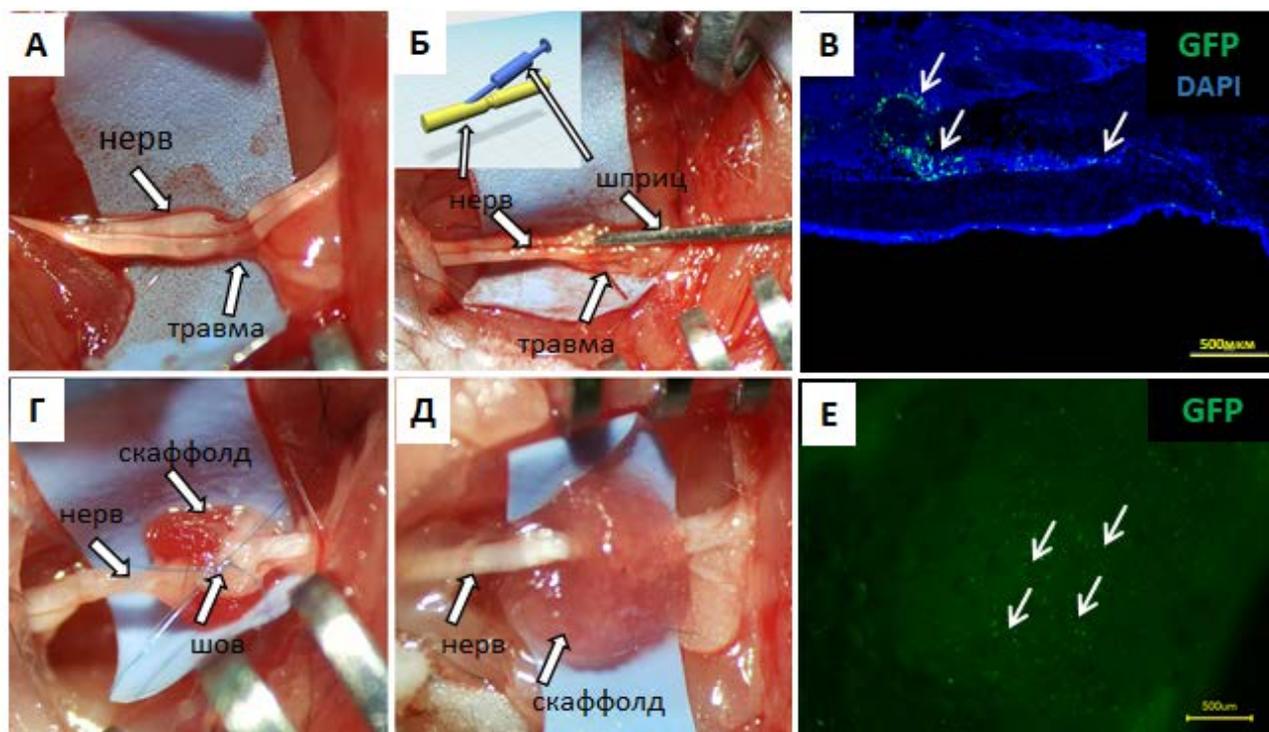


Рисунок 8 - Модели трансплантации ПКНГ-ВФ в область повреждения седалищного нерва. А - Травма мозга. Б - Инъекция суспензии ПКНГ-ВФ. На врезке представлена 3д-модель, иллюстрирующая операцию. В - GFP+ ПКНГ-ВФ (зеленый) в седалищном нерве после инъекции суспензии. Ядра окрашены DAPI (синий). Г - Микрохирургический шов нерва и скаффолда. Д - Скаффолд расположенный над областью травмы. Е - GFP+ ПКНГ-ВФ (зеленый), расположенные в толще скаффолда "Спонгостан".

В результате работы были изучены ПКНГ-ВФ с точки зрения их нейрального потенциала. О наличии в волосяном фолликуле ниши, заселенной популяцией клеток, происходящих из нервного гребня было известно достаточно давно. Также рядом исследователей было показано, что ПКНГ-ВФ обладают сходными свойствами с эмбриональными клетками НГ и профилем экспрессии генов (Sieber-Blum et al., 2003, Sulewski, Kirsner, 2010, Sieber-Blum et al, 2010). Нами были модифицированы известные методики получения ПКНГ-ВФ, а также было подтверждено

соответствие ПКНГ-ВФ эмбриональным. В серии экспериментов отмечено, что миграционные способности ПКНГ-ВФ в присутствии эмбриональных нейральных факторов коррелируют с таковыми в процессе развития. Однако экспрессия маркеров ПКНГ-ВФ зависит от типа нейральной ткани, а именно, клетки эмбрионального СМ стимулируют пролиферацию и поддерживают экспрессию маркеров НГ ПКНГ-ВФ. Таким образом, нами было показано, что ПКНГ-ВФ отвечают на воздействие нейральных тканей, что позволяет считать популяцию ПКНГ-ВФ удобным источником клеток для задач регенеративной нейробиологии.

В рамках поставленных задач были разработаны наиболее эффективные методики трансплантации ПКНГ-ВФ в головной мозг и периферический нерв, а также были изучены возможные компоненты трансплантата. Доказано, что ПКНГ-ВФ не вызывают отторжения тканями реципиента и эффективно интегрируются с тканями мозга. Отмечена способность ПКНГ-ВФ к самостоятельной дифференцировке в нейральном направлении в контакте с тканью мозга. Показано, что предифференцировка клеток трансплантата в нейральном направлении увеличивает его жизнеспособность на 7 суток. Помимо основного клеточного компонента трансплантата нами была показана эффективность включения в его состав клеток дермальной папиллы в качестве протекторного компонента, а также использования антиапоптотических свойств эритропоэтина.

Кроме того, была разработана модель и микрохирургические подходы к трансплантации клеток и заселенного скаффолда в поврежденный периферический нерв.

ПО РЕЗУЛЬТАТАМ РАБОТЫ БЫЛИ ОПУБЛИКОВАНЫ СТАТЬИ И ТЕЗИСЫ В СБОРНИКАХ:

1. Kosykh A., Ngarnjariyawat A., Vasylovska S., Konig N., Trolle C., Lau J., Mikaelyan A., Panchenko M., Carlsson P.O., Vorotelyak E., Kozlova E.N. Neural crest stem cells from hair follicles and boundary cap have different effects on pancreatic islets in vitro: *International Journal of Neuroscience*. - 2015. - 125/ 7. - 547-554.
2. Sukhinich, K.K., Kosykh A.V., Aleksandrova M.A. Differentiation and Cell-Cell Interactions of Neural Progenitor Cells Transplanted into Intact Adult Brain: *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2015. - 160/1. - 115-122.
3. Сухинич К.К., Косых А.В., Александрова М.А. Дифференцировка и межклеточные взаимодействия нейральных прогениторных клеток, трансплантированных во взрослый интактный мозг: *Клеточные технологии в биологии и медицине*. – 2015. - №3. - 139-48.
4. Косых А.В. Трансплантация клеток нервного гребня волосяного фолликула мыши в головной мозг мыши: Сборник тезисов X школы-конференции молодых ученых Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. - 2014. - 27-28.

5. Косых А.В., Сухинич К.К., Воротеляк Е.А., Александрова М.А. Конфокальная микроскопия срезов мозга мыши после трансплантации клеток нервного гребня: Сборник тезисов XXV Российской конференции по электронной микроскопии и 2-ой Школы молодых ученых «Современные методы электронной и зондовой микроскопии в исследованиях наноструктур и наноматериалов». -2014. - Т.2. - 594-595.
6. Kosykh A., Beilin A., Vorotelyak E. Hair follicle neural crest stem cells interaction with mouse brain: Book of abstracts, 17th meeting of the European hair research society. - 2016. - 45-46.
7. Косых А.В., Воротеляк Е.А. Взаимодействие клеток нервного гребня волосяного фолликула с головным мозгом мыши: Сборник тезисов XVII конференции-школы с международным участием «Актуальные проблемы биологии развития». - 2016. - 23-24.
8. Бейлин А.К., Косых А.В., Сухинич К.К., Воротеляк Е.А. Определение нейрального потенциала клеток нервного гребня волосяного фолликула при трансплантации в головной мозг мыши: Сборник тезисов XVII конференции-школы с международным участием «Актуальные проблемы биологии развития». - 2016. - 9-10.
9. **Beilin A., Kosykh A., Sukhinich K., Vorotelyak E. Hair follicle associated neural crest stem cells interact with mouse brain tissue: Supplement to the Journal of Investigative Dermatology. – 2017. - 137/10. – 240. DOI: 10.1016/j.jid.2017.07.272. Индексируется в системе WoS. - Q1**
10. **Калабушева Е.П., Чермных Э.С., Терских В.В., Воротеляк Е.А. Сохранение специализированного фенотипа клеток дермальной папиллы волосяного фолликула человека в условиях культивирования // Известия РАН. Серия биологическая. 2017. № 4. С. 360-369. DOI: 10.7868/S0002332917040063. (РИНЦ). (Kalabusheva E.P., Chermnykh E.S., Terskikh V.V., Vorotelyak E.A. Preservation of a specialized phenotype of dermal papilla cells of a human hair follicle under cultivation conditions // Biology Bulletin. 2017. V. 44. 4. P. 363-371. DOI: 10.1134/S1062359017040069.**

Отчет утвержден Ученым советом ИБР РАН 06 декабря 2017 г., протокол № 9.