

## ПРИМЕНЕНИЕ БИОДЕГРАДИРУЕМОГО СКАФФОЛДА НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА ПРИ ТЕРАПИИ ОТКРЫТОЙ ТРАВМЫ МОЗГА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Балябин А.В.<sup>1</sup>, Тихобразова О.П.<sup>2</sup>, Муравьева М.С.<sup>3</sup>, Ключев Е.А.<sup>2</sup>, Тимашов П.С.<sup>4</sup>, Баграташвили В.Н.<sup>4</sup>, Мухина И.В.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород, Россия, e-mail: info@nniito.ru, mukhinaiv@mail.ru

<sup>2</sup>Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия, e-mail: crl@nizhgma.ru

<sup>3</sup>Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия, e-mail: mukhina@neuro.nnov.ru

<sup>4</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем лазерных и информационных технологий Российской академии наук, Москва, Россия, e-mail: timashev.peter@gmail.com

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) возникает как следствие прямого механического воздействия на мозг, вызывает дегенерацию и гибель клеток в центральной нервной системе. Клеточная трансплантация зарекомендовала себя не только, как экспериментальный метод для изучения структурно-функциональных взаимосвязей, развития, нейропластичности, и регенерации во взрослой центральной нервной системе, но и недавно показала оптимистичные результаты в восстановлении функций после черепно-мозговой травмы. К сожалению, ЧМТ приводит к гибели большого числа мозговой паренхимы, поэтому одним из перспективных подходов, используемых в регенеративной медицине, является использование трехмерных биосовместимых скаффолдов, способных поддержать рост и интеграцию нервных клеток в месте повреждения. На модели экспериментальной открытой травмы мозга мышей линии C57BL/6j изучена биосовместимость биodeградируемого скаффолда, выполняющего роль носителя трансплантируемых клеток и замещающего матрикс нервной ткани при нейротрансплантации. 3D биodeградируемый скаффолд создан с использованием микростереолитографической техники путем комбинации модифицированного хитозана и гиалуроновой кислоты. В эксперименте по параметрам когнитивного поведения мышей (исследование долговременной при формировании условных рефлексов и кратковременной памяти при распознавания нового объекта), визуализации целостности ткани мозга с помощью высокопольной МРТ (9,4 Т) показано, что трансплантация 3D скаффолда на основе хитозана во время проведения реконструктивной терапии дефекта ткани мозга снижает когнитивный дефицит после травмы, восстанавливает целостность ткани мозга через 5 месяцев после травмы.

Ключевые слова: нейротравма, клеточная терапия, биodeградируемый скаффолд, биосовместимость, когнитивные расстройства.

## THE USE OF BIODEGRADABLE CHITOSAN SCAFFOLD IN THE TREATMENT OF TRAUMATIC BRAIN INJURIES IN THE EXPERIMENT

Balyabin A.V.<sup>1</sup>, Tikhobrazova O.P.<sup>2</sup>, Muravyeva M.S.<sup>3</sup>, Kluev E.A.<sup>2</sup>, Timashov P.S.<sup>4</sup>, Bagratashvili V.N.<sup>4</sup>, Mukhina I.V.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Institution «Privolzhsky Federal Research Medical Centre» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russia, e-mail: info@nniito.ru, mukhinaiv@mail.ru

<sup>2</sup> Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russia, e-mail: crl@nizhgma.ru

<sup>3</sup> Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia, e-mail: mukhina@neuro.nnov.ru

<sup>4</sup> Institute on Laser and Information Technologies of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, e-mail: timashev.peter@gmail.com

Traumatic brain injury (TBI) occurs, as a result, of direct mechanical insult to the brain, and induces degeneration and death in the central nervous system. Neuro- and cell transplantation have become widely recognized as powerful experimental tools for studying structure-function relationships, development, neuroplasticity, and regeneration in the adult central nervous system and have recently shown promise in the repair of brain injury and in the restoration of function after traumatic brain injury. Unfortunately, TBI causes extensive loss of cerebral parenchyma; however, no strategy for reconstruction has been clinically effective. It has been shown that one of the promising approaches used in regenerative medicine are three-dimensional biocompatible scaffolds capable to induce the growth of nerve cells. On the model of experimental brain injury C57BL/6j mice the biocompatibility of a biodegradable scaffold that serve as a carrier of transplantable cells and replacing the matrix of neural tissue in neurotransplantation were studied. Biodegradable 3D scaffold structure fabricated using microstereolithography technology by combination of

**modified chitosan and hyaluronic acid. Using parameters of the cognitive behavior of mice (the long-term study in the formation of conditioned reflexes and short term memory with recognition of the new object), visualization of the integrity of brain tissue by high field MRI (9,4 T) were shown that transplantation of a 3D scaffold based on chitosan reduced cognitive deficits after injury, and restored the integrity of brain tissue 5 months after injury in the experiment.**

---

Keywords: neurotrauma, cell therapy, biodegradable scaffold, biocompatibility, cognitive disorders

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) возникает как следствие прямого механического воздействия на мозг, вызывает дегенерацию и гибель клеток в центральной нервной системе (ЦНС), что приводит к расстройству передачи нервных импульсов, и, в свою очередь, становится причиной потери памяти. Отсутствие существенных успехов в эффективности медикаментозной терапии, резко ограниченные собственные резервные возможности головного мозга в отношении восстановления нервных клеток вызывают высокий научный интерес к разработке принципиально новых методов лечения тяжелой ЧМТ. Одним из наиболее перспективных методов может стать нейротрансплантация стволовых или прогениторных клеток [9]. Восстановление функций возможно за счет интеграции трансплантированных клеток в областях повреждения и стимуляции компенсаторно-восстановительных процессов в патологически измененных клетках реципиента. В России имеется небольшой опыт применения стволовых клеток для лечения ТГМ [3, 4, 5]. Проведен ряд трансплантаций малодифференцированных нейральных и кроветворных клеток больным с тяжелыми черепно-мозговыми травмами [2]. Было показано, что клеточная терапия почти в 4 раза снижает число неблагоприятных исходов и обеспечивает хорошее восстановление почти у половины пациентов, участвовавших в клинических испытаниях [1].

Актуальным направлением работ является разработка адекватных носителей для трансплантируемых клеток. Клинические и экспериментальные эффекты трансплантации клеток в составе трехмерных носителей на основе синтетических биodeградируемых материалов изучены недостаточно. В основном в литературе на первый план выходит проблема адекватных носителей, поддерживающих выживание, пролиферативную активность, способность к миграции трансплантируемых клеток. В тоже время искусственный носитель должен достаточно долгое время находиться в ткани мозга реципиента при трансплантации для того, чтобы стволовые клетки, поддерживая свой фенотип, могли выселяться в прилежащие ткани, стимулируя в них посттравматическое выживание нейронов и рост нервных волокон.

**Цель** исследования – изучить биосовместимость биodeградируемого трехмерного скаффолда на основе модифицированного гиалуриновой кислотой хитозана в экспериментах с открытой травмой мозга мышей.

**Материалы и методы исследования**

Работа выполнена на 8-10 недельных аутбредных мышах самцах линии C57BL/6 массой 20-22 г. (n=40). Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, данным в Приказе Минздрава России № 708н от 23.08.10 «Об утверждении Правил лабораторной практики» и были согласованы с этическим комитетом при ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России.

3D биodeградируемый скаффолд был создан с использованием микростереолитографической техники путем комбинации модифицированного хитозана (Поли[(1 → 4)-2-амино-2-деокси-β-D-глюкоза]) [6] и высокомолекулярной гиалуроновой кислоты [10].

Моделирование открытой черепно-мозговой травмы (ЧМТ) проводилось «weight-drop» способом [8] по оригинальной методике. Механическую травму наносили путем падения груза с тупой поверхностью, что обеспечивает ускорение головы при минимальном локальном воздействии в точке приложения травмирующей силы. Использование данной модели наиболее полно воспроизводит клиническую картину очагового повреждения, в том числе ушиба головного мозга, и позволяет изучать, помимо локальных, травматические изменения, сопровождающиеся вторичной гибелью нервных клеток в отдаленных отделах мозга, чувствительных к травме, таких как гиппокамп, зубчатая извилина, зрительный бугор, а также оценивать грубые двигательные нарушения, изменения тонкой координации движений, дефицит когнитивных функций.

Перед нанесением травмы, под изофлурановым наркозом фиксировали в стереотаксической установке для мышей «Narishige» (Япония). Голову животного прижимали к стальной пластине для избежания перелома челюсти и достижения горизонтального расположения свода черепа к торцевому участку груза. Затем на коже головы, свободной от шерсти, делали разрез и производили трепанацию фрезой костей черепа (d 4 мм, Bregma 0.82 mm). Твердая мозговая оболочка оставалась неповрежденной. Груз, представляющий собой стальной цилиндр, поднимался на заданную высоту, затем сбрасывался и наносил удар по области трепанационного окна (диаметр ударной части, соответствующей трепанационному окну, 3 мм; масса груза 4 грамма; высота поднятия груза 0,80 метра). После нанесения травмы в подлежащем мозговом веществе возникали повреждения в виде разрыва ТМО, образование очагов геморрагического ушиба или размозжения мозгового вещества, характерные для тяжелой черепно-мозговой травмы. После операции кожу животных ушивали, шов обрабатывали антисептическим раствором.

В ходе эксперимента животные случайным образом были разделены на группы: первая группа – интактные животные (n=10), вторая – контроль (ложнооперированные) животные (n=10), третья группа – контрольные животные (n=6), четвертая – опытные (n=5). Мышам

контрольной и опытной групп на седьмые сутки после моделирования ЧМТ в очаг повреждения имплантировали либо забуференный физиологический раствор (PBS, 30  $\mu$ l), либо биodeградируемый 3D скаффолд (размер 2x1 мм), соответственно. В группе ложнооперированных животных проводили те же процедуры (анестезия, трепанация костей черепа), за исключением моделирования ЧМТ и трансплантации. Мыши интактной группы не подвергались анестезии, моделированию ЧМТ и трансплантации.

Морфо-функциональными параметрами оценки биосовместимости скаффолда *in vivo* являлись визуализация целостности ткани мозга с помощью МРТ и тестирование когнитивного поведения мышей.

Для морфологической оценки биосовместимости разработанных скаффолдов с тканями мозга мыши [7] применены методы высокопольной МРТ на томографе Agilent Technologies DD2-400 9.4 T (400 MHz) с объемной катушкой M2M ( $H^1$ ). При томографии мозга мыши проводился мониторинг физиологических параметров животных, таких как температура, дыхание, ЭКГ на оборудовании фирмы SA Instruments с использованием программы PC-SAM при температуре окружающей среды 37°C. Для получения T<sub>2</sub>-взвешенных изображений использовалась импульсная последовательность MGEMS (multi gradient echo multi slice). MGEMS – стандартная последовательность (была предустановлена в программе VnmrJ, работающей с томографом) для создания анатомических изображений, которая заключается в использовании вместо фокусирующего 180-градусного радиочастотного импульса двух биполярных импульсов градиентного магнитного поля. Время повторения (TR) - 1000 мс, время эхо (TE, TE<sub>2</sub>) – от 1.5 до 2 мс, количество эхо от 6 до 8, угол поворота (flip angle) 90, размер матрицы 128x128, количество срезов 15, толщина срезов составляла 1 мм, поле зрения от 20x20 мм<sup>2</sup>. Общая длительность последовательности была 8 мин 32 сек.

Для функциональной оценки нарушений процессов обучения у животных на 10 сутки посттравматического периода вырабатывали условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ). Установка (Shuttle Box LE895, PanLab / Harvard Apparatus Испания; Stoelting, США) состояла из камеры (46x27x25) с электрифицированным решетчатым полом, разделенной на два отсека скользящей дверцей. Для электрической стимуляции использовался источник с фиксированным сопротивлением (LE100/26 Harvard Apparatus Испания; Stoelting, США). Подача электрокожного раздражения, положение дверки между отсеками и латентное время перехода в темный отсек, измеряемое с момента помещения животного в светлый отсек камеры, контролировались программой Shutavoid v1.8.03 (PanLab / Harvard Apparatus Испания; Stoelting, США). Регистрировали латентное время перехода (ЛВП) в темный отсек камеры при открытой дверке между отсеками. Тест заканчивался, когда животное вступало в

темный отсек или если животное не делало этого в течение 3 минут. Функции долговременной памяти изучали, оценивая сохранность у мышей УРПИ на 30 суток.

Для исследования нарушений функций непространственной гиппокамп опосредованной кратковременной памяти применяли тест распознавания нового объекта. Тест состоял из трех этапов: привыкание, обучение и тестирование. На 23 и 24 дни после моделирования ЧМТ животных помещали в центр квадратной арены (45x45x40 см) (LE802S PanLab / Harvard Apparatus Испания; Stoelting) на 10 минут для привыкания и уменьшения стресса, во время которого животные исследовали пустую арену. На 25 день на арену помещали два одинаковых объекта, расположенных на равном расстоянии. Мышей помещали в центр поля на 10 минут для исследования объектов (обучение). Через 24 часа животных снова помещали в центр арены с одним знакомым объектом и одним новым для регистрации исследовательского поведения в течение 10 минут (тестирование). В ходе эксперимента на этапах обучения и тестирования регистрировали совокупное время исследования знакомого и нового объектов. Исследовательское поведение включало реакции принюхивания (направление носа к объекту на расстоянии не более 2 см, касание объекта). Во время обучения и тестирования памяти поведение животных считали исследовательским, если реакции по отношению к объектам составляли не менее 10 секунд.

Видеорегистрация отдельных поведенческих актов поведения животных осуществлялась с помощью видеокамеры SONY SSC-G118 (Япония). Регистрация и анализ данных контролировались программой Smart v.3.0.03. (Panlab Harvard Apparatus Испания; Stoelting, США). Состояние функций памяти определяли, как дискриминационное время исследования нового объекта (DIR) по формуле:

$$Dir = [(доля\ времени\ исследования\ животным\ нового\ объекта - доля\ времени\ исследования\ знакомого\ объекта\ во\ время\ сеанса\ тестирования) / общее\ время\ исследования\ во\ время\ сеанса\ тестирования] \times 100.$$

Полученные результаты обрабатывались с помощью пакетов прикладных программ Statistica 5.5. Данные были проверены на нормальность распределения с помощью W-критерия Шапиро-Уилка. При малых объемах выборки ( $n \leq 10$ ) применяли непараметрические критерии: для двух зависимых выборок - критерий Вилкоксона, в случае двух независимых выборок - критерий Манна—Уитни. Различия между группами считали статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Полученные результаты поведенческих тестов свидетельствовали о нарушении у животных контрольной группы вследствие ЧМТ головного мозга способности к обучению. Во время сеанса обучения в контрольной группе мышей латентное время перехода (ЛВП)

достоверно превышало аналогичные показатели интактной и контрольной группы ложнооперированных животных ( $p < 0,05$ ), что обусловлено нарушением моторных функций ЦНС в результате ЧМТ. Через 24 часа после обучения латентное время перехода в темный отсек камеры в данной группе достоверно не отличалось от ЛВП при обучении ( $p > 0,05$ ) (рис. 1).

Через 24 часа после сеанса обучения в группе животных с имплантированием в очаг повреждения биodeградируемого хитозанового скаффолда, также как в интактной и контрольной группе ложнооперированных животных, ЛВП в темный отсек камеры статистически значимо увеличивалось по отношению ко времени при обучении ( $p < 0,05$ ). Кроме того, в опытной группе с имплантированием в очаг повреждения скаффолда ЛВП в 1,82 раза ( $p < 0,05$ ) превышало время перехода животных контрольной группы с введением в очаг повреждения раствора PBS (рис. 1).

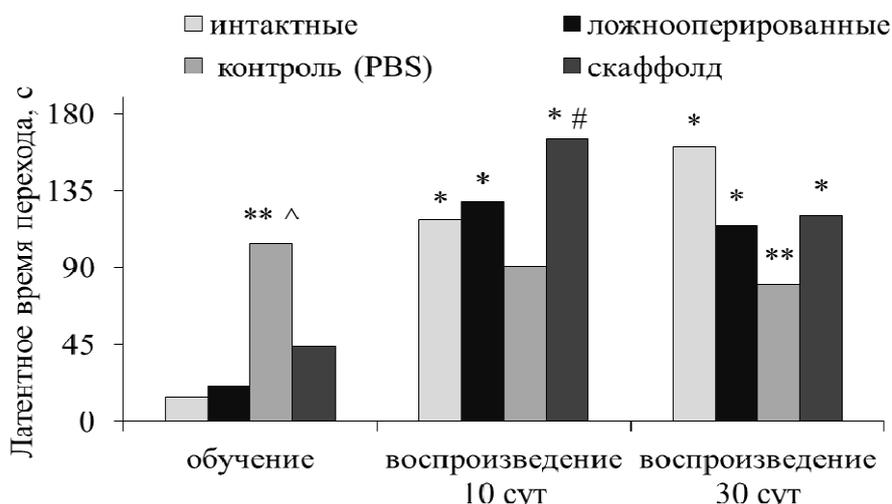


Рис. 1. Исследование способности к обучению и воспроизведению УРПИ мышей линии C57BL/6 в посттравматическом периоде

\* -  $p < 0,05$  по отношению к латентному времени перехода в темный отсек при обучении, критерий Вилкоксона; # -  $p < 0,05$  по отношению к контрольной группе животных, критерий Манна-Уитни; \*\* -  $< 0,05$  по отношению к интактной группе животных, критерий Манна-Уитни; ^ -  $< 0,05$  по отношению к контрольной группе ложнооперированных животных, критерий Манна-Уитни

Функции долговременной памяти оценивали по способности животных к воспроизведению УРПИ на 30 сутки посттравматического периода. В группе мышей с имплантированием через неделю после моделирования ЧМТ в очаг повреждения биodeградируемого хитозанового скаффолда, ЛВП в темный отсек камеры достоверно

превышало время при обучении ( $p < 0,05$ ), также как в интактной и контрольной группе ложнооперированных животных. И не отличалось от времени при проверке сохранности условнорефлекторного навыка на 10 сутки посттравматического периода ( $p > 0,05$ ).

Функции кратковременной памяти мышей оценивали в тесте «распознавания нового объекта» (NOR, Novel object recognition test) на 23-25 сутки посттравматического периода.

Анализ полученных результатов показал, что моделирование ЧМТ у животных контрольной группы приводило к значительным нарушениям гиппокамп зависимой кратковременной памяти. На этапе тестирования длительность исследовательского поведения нового объекта не превышала время исследования знакомого объекта. Дискриминационное соотношение исследования в контрольной группе с введением в очаг повреждения раствора PBS было достоверно меньше показателей интактной и контрольной группы ложнооперированных животных ( $p < 0,05$ ) (рис 2).

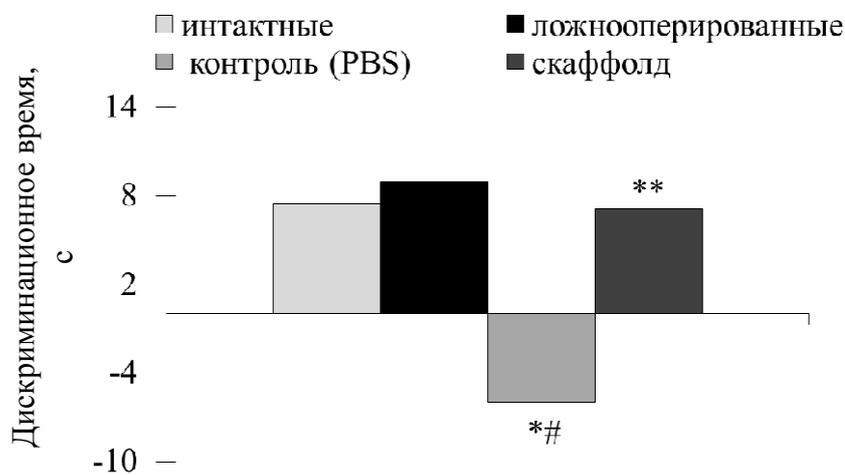


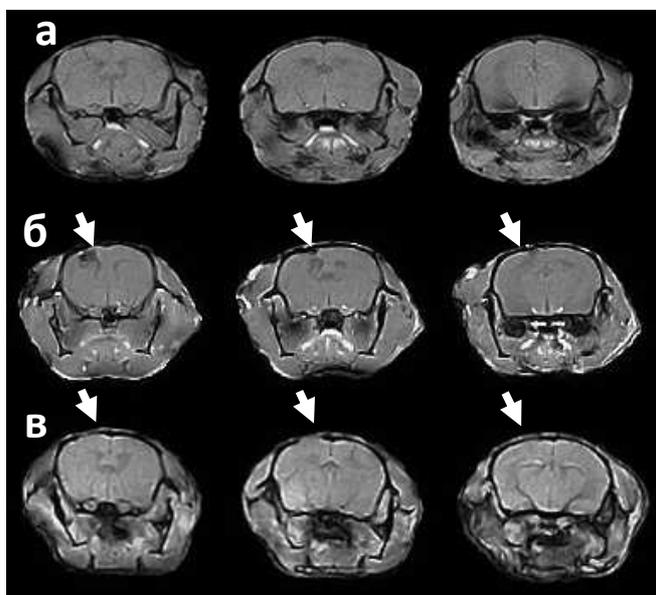
Рис. 2. Исследование функций кратковременной памяти мышей линии C57BL/6 в посттравматическом периоде

\* -  $p < 0,05$  по отношению к интактной группе; критерий Манна-Уитни; # -  $p < 0,05$  по отношению к группе ложнооперированных животных; критерий Манна-Уитни; \*\* -  $p < 0,05$  по отношению к контрольной группе животных (PBS); критерий Манна-Уитни

У мышей группы с имплантированием на 7 сутки после моделирования ЧМТ в очаг повреждения биodeградируемого хитозанового скаффолда время исследования нового объекта на этапе тестирования превышало время исследования знакомого объекта. Дискриминационное соотношение длительности исследования не отличалось от соотношения времени интактной и контрольной группы ложнооперированных животных ( $p > 0,05$ ), но в то же время статистически значимо превышало показатель контрольной группы с введением в очаг повреждения раствора PBS ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о

восстановлении функций CA1-CA3 полей гиппокамп зависимой кратковременной памяти распознавания (рис. 2).

Данные МРТ, полученные через 5 месяцев после перенесенной травмы показали, что ткань, образованная в месте введения скаффолда, сравнима с неповрежденной тканью головного мозга по интенсивности томограммы. В области очага не наблюдалось накопления жидкости, что выразилось бы в гиперинтенсивном сигнале и пересвеченной области на МРТ-изображении. Также в области травмы отсутствовало уплотнение ткани, о котором мог бы свидетельствовать гипоинтенсивный сигнал и спад интенсивности (затемнение). На рис. 3 (а, б, в) представлены МРТ-срезы головного мозга интактных мышей (а), мышей с инъекцией PBS-раствора (б) и мышей с внедренным в очаг повреждения биodeградируемым хитозановым скаффолдом (в). Как видно из рис. 3 мозг мыши со скаффолдом структурно не изменен и сравним с МРТ интактного мозга.



*Рис. 3 МРТ-изображения срезов головного мозга интактных мышей (а), мышей с инъекцией в очаг повреждения PBS-раствора (б) и мышей с имплантируемым в очаг повреждения биodeградируемым хитозановым скаффолдом (в). T2-взвешенные изображения получены с использованием импульсной последовательности MGEMS. Стрелками указана область травмы*

#### **Выводы:**

1. Через 5 месяцев после нейротрансплантации биodeградируемого скаффолда на основе модифицированного хитозана в комплексе с гиалуроновой кислотой по данным МРТ в области очага повреждения обнаружено образование однородной ткани, которая по интенсивности сравнима с интактной тканью, не имеет выраженной границы с интактной тканью, не накапливает жидкость и не имеет уплотнений.

2. ЧМТ головного мозга приводит к нарушению процессов обучения и долговременной памяти при формировании УРПИ, а также функций кратковременной памяти в посттравматическом периоде;

3. Имплантация через неделю после моделирования ЧМТ в очаг повреждения биodeградируемого хитозанового скаффолда оказывала положительное действие на способность животных к обучению условным рефлексам на 10 сутки и актуализации следов кратковременной и долговременной памяти в отдаленном периоде.

### **Заключение**

При моделировании ЧМТ у животных, вследствие нарушения неврологических функций, двигательного и эмоционального поведения, нарушалась способность к обучению, что согласуется с данными литературы. Поведенческие тесты выявили существенные улучшения восстановления когнитивных и моторных функций ЦНС у животных на фоне проведенной нейротрансплантации. Имплантирование через неделю после моделирования ЧМТ в очаг повреждения биodeградируемого о скаффолда оказывало протекторное действие, восстанавливая, вероятно, синаптическую пластичность нейронов головного мозга (коры, гиппокампа), лежащих в основе процессов обучения и памяти. Наблюдалось оптимизирующее действие на способность животных к обучению УРПИ на 10 сутки и актуализации следов кратковременной и долговременной памяти в отдаленном периоде.

Выявленные морфологические и функциональные параметры жизнедеятельности мышечной ткани свидетельствовали о биосовместимости биodeградируемого материала 3D скаффолда на основе модифицированного хитозана в комплексе с гиалуроновой кислотой. Интересным фактом явилось и то, что была сделана попытка частичного восстановления ткани, утраченной в результате травмы, которая в обычном случае навсегда остается невосполненной, так как на месте зоны повреждения остается киста, окруженная глиальным рубцом и заполненная ликвором. Трансплантация трехмерной оформленной биodeградируемой структуры способствовало формированию ткани мозга на месте поврежденной области при травме.

### **Список литературы**

1. Григорян А.С., Кругляков П.В. Клеточная терапия при травме головного мозга // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. IV, № 1. – С. 35-42.
2. Парлюк О.В. Результаты клеточной терапии, примененной в системе интенсивного лечения травматических ком / О.В. Парлюк, В.И. Селедцов, С.С. Рабинович, Г.В. Селедцова, С.В. Астраков, В.И. Ярошно, В.А. Козлов // Клеточная трансплантология и тканевая

инженерия. – 2008. – Т. III, № 3. – С. 51-55.

3. Селедцов В.И. Иммунологические и клинические аспекты применения клеточной терапии в лечении последствий черепно-мозговой травмы/ В.И.Селедцов, С.С.Рабинович, Э.А.Кашенко, М.А.Фельде, Н.В.Банул, О.В.Повещенко, С.В.Астраков, С.А.Савченко, М.Ю.Кафанова, Г.В.Селедцова, В.А. Козлов // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2006. – № 1. – С. 12-14.

4. Семенова Н.А. Влияние клеточной терапии на уровни метаболитов в структурах мозга детей с последствиями тяжелой черепно-мозговой травмы: исследование методом <sup>1</sup>H магнитно-резонансной спектроскопии / Н.А.Семенова, С.В.Сидорин, Т.А.Ахадов, Ж.Б.Семенова, А.В.Петрайкин, Е.В.Фуфаева, А.Н.Карлош // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011, №2. – С. 99-102.

5. Соколова И.Б. Восстановление ориентировочно-исследовательского поведения крыс после травмы головного мозга с помощью мезенхимальных стволовых клеток/ И.Б.Соколова, О.Р.Федотова, С.Г.Цикунов, Д.Г.Полынцев // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 1. – С. 26-29.

6. Akopova T.A. Solid-state synthesis of unsaturated chitosan derivatives to design 3D structures through two-photon-induced polymerization / T.A.Akopova, P.S.Timashev, T.S.Demina, K.N.Bardakova, N.V.Minaev, V.F.Burdukovskii, G.V.Cherkaev, L.V.Vladimirov, A.V.Istomin, E.A.Svidchenko, N.M.Surin, V.N.Bagratashvili // Mendeleev Communications, 2015, vol. 25: P. 280-282. DOI: 10.1016/j.mencom.2015.07.017

7. Denic A. MRI in Rodent Models of Brain Disorders / A.Denic, S.I.Macura, P.Mishra, J.D.Gamez, M.Rodriguez, I.Pirko // Neurotherapeutics, 2011, 8(1): P. 3–18.

8. Feeney D.M. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat/ D.M.Feeney, M.G.Boyeson, R.T.Linn, H.M.Murray, W.G.Dail // Brain Res 211, 1981. P. 67–77. DOI:10.1016/0006-8993(81)90067-6

9. Harting M.T. Subacute neural stem cell therapy for traumatic brain injury / M.T.Harting, E.LeeAnn, B.S.Sloan, F.Jimenez, J.Baumgartner, C.S.Cox //J. Surg. Res., 2009; 153(2): p. 188–194. DOI:10.1016/j.jss.2008.03.037.

10. Kufelt O. Hyaluronic Acid Based Materials for Scaffolding via Two-Photon Polymerization / O.Kufelt, A.El-Tamer, C.Sehring, S.Schlie-Wolter, B.N.Chichkov //Biomacromolecules, 2014, vol. 15 (2): p. 650–659. DOI: 10.1021/bm401712q.

#### **Рецензенты:**

Ведунова М.В., д.б.н., зав.лабораторией по разработке методов нейропротекции Института биологии и биомедицины, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский

государственный университет им. Н.И. Лобачевского» Министерства образования и науки Российской Федерации, г. Нижний Новгород;

Фраерман А.П., д.м.н., профессор ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Нижний Новгород