

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПУТЕЙ ЛОКАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ГЕНОВ ПРИ ТРАВМЕ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ: КОРРЕЛЯЦИИ ПАРАМЕТРОВ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ

УДК 61–001:575

Поступила 12.10.2012 г.



Г.Ф. Шаймарданова, к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярных основ патогенеза¹;
Я.О. Мухамедшина, ассистент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии²;
Ю.А. Чельшев, д.м.н., профессор, зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии²

¹Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань, Республика Татарстан, 420111, ул. Лобачевского, 2/31;

²Казанский государственный медицинский университет, Казань, Республика Татарстан, 420012, ул. Бултерова, 49

Цель исследования — оценить эффективность посттравматической регенерации спинного мозга крысы при немедленном однократном введении в область повреждения мононуклеарных клеток крови пуповины человека, трансфицированных плазмидой rBud-VEGF-FGF2, и прямой инъекции данной плазмиды. При этом решали две задачи: выявить корреляции между морфологическими и функциональными показателями спинного мозга и оценить количество S100B⁺-клеток в условиях локальной доставки генов *vegf* и *fgf2* на клеточных носителях или при прямой генной терапии.

Материалы и методы. Крыс после дозированной контузионной травмы спинного мозга на уровне T_{viii} разделили на четыре группы. Животным одной группы в область повреждения вводили мононуклеарные клетки крови пуповины, трансфицированные плазмидой rBud-VEGF-FGF2, другой группы — в аналогичных условиях вводили те же клетки, трансфицированные плазмидой rEGFP-N2. Животным еще двух групп в ту же область инъецировали в одном случае плазмиду rBud-VEGF-FGF2, в другом — то же количество плазмиды rEGFP-N2.

Результаты. Установлена прямая отрицательная корреляция между площадью участка повреждения и показателем восстановления двигательной функции в опытах с прямой инъекцией плазмиды rBud-VEGF-FGF2. Наибольший коэффициент корреляции получен на расстоянии 5 мм от эпицентра травмы. При трансплантации клеток, трансфицированных этой плазмидой, такая корреляция отсутствует. Количество S100B⁺-клеток в наружных зонах белого вещества на расстоянии 1,5 см от эпицентра травмы в условиях прямой доставки генов возрастает на 46% ($p < 0,05$). При введении клеток крови пуповины, трансфицированных плазмидой rBud-VEGF-FGF2, этот показатель увеличивается на 55% ($p < 0,05$).

Заключение. В ходе регенерации после контузионной травмы спинного мозга уменьшение области повреждения и связанное с этим восстановление двигательной функции осуществляются более эффективно при прямой генной терапии, чем при доставке тех же генов на клеточных носителях.

Ключевые слова: спинной мозг; регенерация спинного мозга; локальная доставка генов; клетки крови пуповины; плазмиды VEGF, FGF2.

Для контактов: Шаймарданова Гульнара Фердинантовна, тел. раб. (843)231-90-51, тел. моб. 8-917-867-36-92; gulfnara_kzn@rambler.ru

English

The Assessment of Efficiency of Local Delivery Pathways of Therapeutic Genes in Murine Spinal Cord Injury: Correlation of Structure and Function Parameters

G.F. Shaymardanova, PhD, Research Worker, the Laboratory of Molecular Basics of Pathogenesis¹;

Y.O. Mukhamedshina, Tutor, the Department of Histology, Cytology and Embryology²;

Y.A. Chelyshev, D.Med.Sc., Professor, Head of the Department of Histology, Cytology and Embryology²

¹Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Kazan Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Lobachevskogo St., 2/31, Kazan, Republic of Tatarstan, 420111;

²Kazan State Medical University, Butlerova St., 49, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation, 420012

The aim of the investigation was to assess the efficiency of posttraumatic regeneration of murine spinal cord in immediate single administration of human umbilical cord mononuclear blood cells transfected by pBud-VEGF-FGF2 plasmid, and direct injection of this plasmid in the damage area. Two problems were to be solved: to reveal the correlation between morphological and functional spinal cord indices and estimate the amount of S100B⁺-cells in the conditions of local delivery of *vegf* and *fgf2* genes on cellular carriers or in direct gene therapy.

Materials and Methods. The rats after dosing contusion spinal cord injury (T_{viii} level) were divided into four groups. One group animals were administered umbilical cord mononuclear blood cells transfected by pBud-VEGF-FGF2 plasmid in damage area, the animals of another group were administered the same cells transfected by pEGFP-N2 plasmid in similar conditions. The animals of other two groups were injected pBud-VEGF-FGF2 plasmid in the same area in one case, and another — the same amount of pEGFP-N2 plasmid.

Results. We established direct negative correlation between the damage area size and the motor function recovery index in experiments with a direct injection of pBud-VEGF-FGF2 plasmid. The highest correlation coefficient was obtained at the distance of 5 mm away from injury epicenter. In case of transplantation of cells transfected by this plasmid there was no correlation. The number of S100B⁺-cells in exterior zones of white matter at the distance of 1.5 cm from the injury epicenter under the conditions of direct gene delivery increased by 46% ($p < 0.05$). If umbilical cord blood cells transfected by pBud-VEGF-FGF2 plasmid were administered the index grew by 55% ($p < 0.05$).

Conclusion. In the course of regeneration after contusion spinal cord injury, the damage area reduction and related motor function recovery is more effective in direct gene therapy compared to the delivery of the same genes on cellular carriers.

Key words: spinal cord; spinal regeneration; local gene delivery; umbilical cord blood cells; VEGF, FGF2 plasmids.

Одним из перспективных направлений в терапии травмы спинного мозга является локальная доставка генов нейротрофических факторов в составе плазмидных векторов. Сконструированная нами плазида pBud-VEGF-FGF2 [1] одновременно и независимо экспрессирует гены сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и фактора роста фибробластов основного (FGF2). Выбор генов данных факторов обусловлен тем, что эти факторы являются одновременно нейротрофическими и ангиогенными. Известно, что при раздельной их доставке в область повреждения при травме спинного мозга VEGF стимулирует нейрогенез, выживание, миграцию нейронов и рост аксонов [2], а FGF2 — рост аксонов и восстановление двигательной функции [3, 4], способствует дифференциации предшественников макроглии в зрелые клетки [5, 6]. В литературе имеются данные о синергизме действия этих факторов на ангиогенез *in vitro* и *in vivo* [7], что дает основания для изучения их сочетанного действия на посттравматическую регенерацию. Однако непосредственное введение белковых молекул в организм и в спинной мозг в частности характеризуется низкой эффективностью и возникновением различного рода осложнений [8, 9]. Более безопасным способом увеличения содержания нейротрофических факторов в ткани реципиента представляется введение генов, кодирующих необходимые факторы. Нас заинтересовала

возможность совместного введения генов *vegf* и *fgf2* в зону травмы спинного мозга.

В наших экспериментах мы используем два способа доставки этих генов: прямой (инъекция ДНК-содержащих векторов) и клеточно-опосредованный (предполагает применение клеток как носителей терапевтических генов).

Для доставки терапевтических генов на клеточных носителях изучают дифференцированные, стволовые, индуцированные плюрипотентные и прогениторные клетки [10, 11]. Критериями отбора клеток, предназначенных для трансплантации, являются: высокая выживаемость, контролируемая дифференцировка, онкогенная и инфекционная безопасность, возможность трансфекции терапевтическими генами с высокой эффективностью их экспрессии в тканях реципиента. Использование клеток крови пуповины в качестве источника стволовых и прогениторных клеток представляется достаточно перспективным в связи с их низкой иммуногенностью, доступностью, простотой и безопасностью получения, способностью выдерживать длительное хранение, возможностью использования аутологичного материала [12, 13]. Трансплантация клеток крови пуповины человека при травме спинного мозга сдерживает воспалительную реакцию, оказывает нейротрофическое действие, стимулирует неоваскуляризацию [14–16].

Ранее при изучении эффективности двух способов доставки генов *vegf* и *fgf2* непосредственно в зону травматического повреждения спинного мозга крысы [17–19] нами установлено, что прямая инъекция плазмидной ДНК мало уступает по эффективности доставке тех же терапевтических генов на клеточных носителях, а по показателям восстановления двигательной функции, изменению размеров патологических полостей превосходит ее. Однако в этих работах не проведен анализ возможных корреляций между структурными и функциональными параметрами. Кроме того, при терапии травмы спинного мозга для оценки результативности нейрорегенерации представляется важным изучить состояние клеток конкретных популяций. Астроциты являются наиболее многочисленной популяцией глиальных клеток, которые обеспечивают поддержание гомеостаза в мозге и нарушение функции которых немедленно приводит к развитию нейродегенерации [20, 21]. В условиях совместной доставки генов *vegf* и *fgf2* численность популяции астроцитов при травме спинного мозга не изучалась.

Цель исследования — в условиях локальной доставки генов *vegf* и *fgf2* в составе плазмидной конструкции pBud-VEGF-FGF2 при опосредованном клетками крови пуповины и при прямом введении плазмиды в область травматического повреждения выявить возможные корреляции между морфологическими и функциональными параметрами спинного мозга; оценить количество астроцитов по наличию специфического белка S100B.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 52 белых крысах, самках и самцах, массой 200–250 г. Животных содержали в стандартных условиях при свободном доступе к воде и корму согласно этическим правилам, принятым в Казанском государственном медицинском университете. Опыты проводились в полном соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.). Крыс наркотизировали путем внутрибрюшинной инъекции хлоралгидрата (80 мг/мл, 0,4 мл на 100 г массы).

Дозированную контузионную травму спинного мозга воспроизводили после ламинэктомии на уровне T_{viii} [22].

Для экспериментов по клеточно-опосредованной доставке генов осуществляли забор крови пуповины человека и выделение мононуклеарной фракции клеток описанным ранее методом [23]. Полученные клетки трансфицировали плазмидой pBud-VEGF-FGF2 путем электропорации и вводили животным 1-й опытной группы сразу после нанесения травмы. Животным 1-й контрольной группы в аналогичных условиях вводили те же клетки крови пуповины, трансфицированные плазмидой pEGFP-N2.

В опытах с прямой генной терапией животным 2-й опытной группы в ту же область инъектировали плазмиду pBud-VEGF-FGF2, а 2-й контрольной группы — то же количество плазмиды pEGFP-N2.

Начиная с 7-х суток после травмы крыс всех групп тестировали в открытом поле через день по методу D.M. Basso с соавт. [24]. Через 30 сут после нанесения травмы животных наркотизировали и транкардиально перфузировали 4% раствором параформальдегида (4°C). Фрагмент спинного мозга забирали вместе с поперечными срезами спинного мозга изменяя суммарную площадь участка повреждения [17–19]. Для оценки линейной корреляции между значениями применяли корреляционный анализ Пирсона и статистический пакет в составе программы Origin Pro 7.0.

На криостатных поперечных срезах спинного мозга на расстоянии 1,5 см от эпицентра травмы непрямым иммунопероксидазным методом выявляли S100B⁺-клетки (Sigma, разведение 1:100). Количество их подсчитывали на оцифрованных изображениях в четырех фиксированных зонах морфометрии [18]. Просмотр препаратов и оцифровку изображений проводили на микроскопе Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Германия).

Результаты. В ходе сравнения общей площади повреждения в группах животных через 30 сут после разных способов доставки терапевтических генов установлено, что при прямой инъекции плазмиды этот показатель на расстоянии 5 мм от эпицентра травмы в 2 раза, а на расстоянии 3 мм — в 1,5 раза меньше, чем при генно-клеточной терапии (рис. 1).

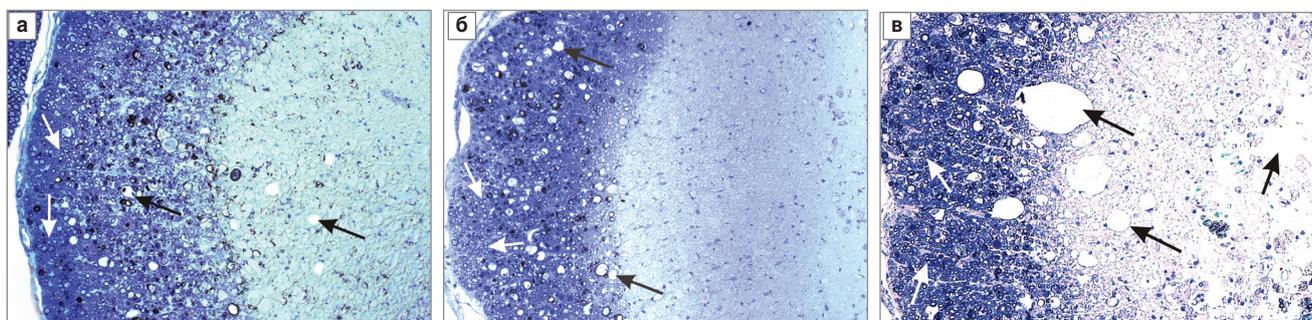


Рис. 1. Фрагмент белого вещества спинного мозга крысы (30 сут после травмы) на расстоянии 5 мм от эпицентра травматического повреждения на уровне T_{viii}: а — при введении клеток крови пуповины, трансфицированных pBud-VEGF-FGF2; б — при прямом введении плазмиды pBud-VEGF-FGF2; в — при введении клеток крови пуповины, трансфицированных pEGFP-N2. Черные стрелки указывают на полости, образующиеся в результате повреждения, белые стрелки — на миелиновые волокна. Поперечные срезы окрашены метиленовым синим; х20

Тестирование животных в открытом поле выявило отсутствие двигательной функции задних конечностей как в обеих опытных, так и в обеих контрольных группах до 6-х суток после травмы. У крыс 1-й (с введением клеток крови пуповины, трансфицированных плазмидой rEGFP-N2) и 2-й (с введением плазмиды rEGFP-N2) контрольных групп зарегистрировано постепенное частичное самовосстановление произвольных движений с $3,3 \pm 0,9$ и $7,7 \pm 0,5$ балла в первые две недели после операции до $4,9 \pm 1,0$ и $8,1 \pm 0,9$ балла — в последние две недели эксперимента. У животных 2-й опытной группы с прямым введением плазмиды rBud-VEGF-FGF2 показатель восстановления двигательной функции составлял $6,8 \pm 1,6$ балла в первые две недели после операции и возрастал до $14,0 \pm 1,7$ балла в последние две недели эксперимента. Это на 2 балла выше, чем у животных 1-й опытной группы с трансплантацией клеток крови пуповины, трансфицированных плазмидой rBud-VEGF-FGF2.

У животных с прямой инъекцией плазмиды rBud-VEGF-FGF2 (2-я опытная группа) к 30-м суткам после нанесения травмы обнаружена отрицательная корреляция между площадью участка повреждения и показателем восстановления двигательной функции (рис. 2). Для срезов на расстоянии 5 мм от эпицентра травмы коэффициенты корреляции оказались выше, чем на расстоянии 3 мм. Так, на расстоянии 5 мм в роstralном направлении $r = -0,85$; $p = 0,002$, а в каудальном направлении $r = -0,87$; $p = 0,009$; на расстоянии 3 мм в роstralном направлении $r = -0,73$; $p = 0,024$; а в каудальном направлении $r = -0,21$; $p = 0,56$. В эксперименте с трансплантацией клеток крови пуповины, трансфицированных плазмидой rBud-VEGF-FGF2, такая корреляция отсутствует. В контрольных группах корреляция между площадью участка повреждения и показателем восстановления двигательной функции не выявлена.

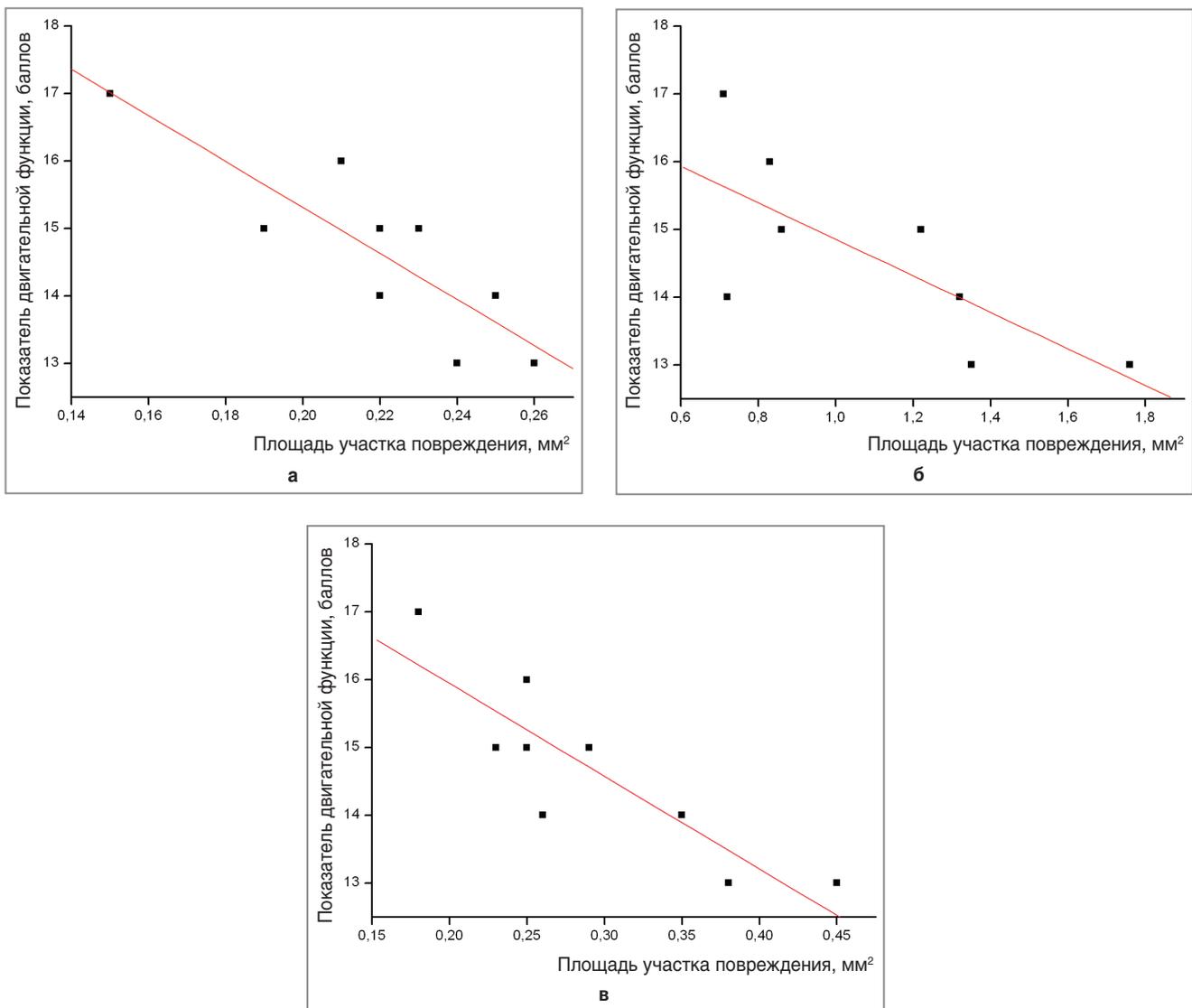


Рис. 2. Распределение значений показателя двигательной функции и площади повреждения на расстоянии 5 мм (а) и 3 мм (б) в роstralном направлении и на расстоянии 5 мм в каудальном направлении (в) от эпицентра травмы при прямой инъекции плазмиды rBud-VEGF-FGF2 в область контузионного повреждения спинного мозга (к 30-м суткам после нанесения травмы)

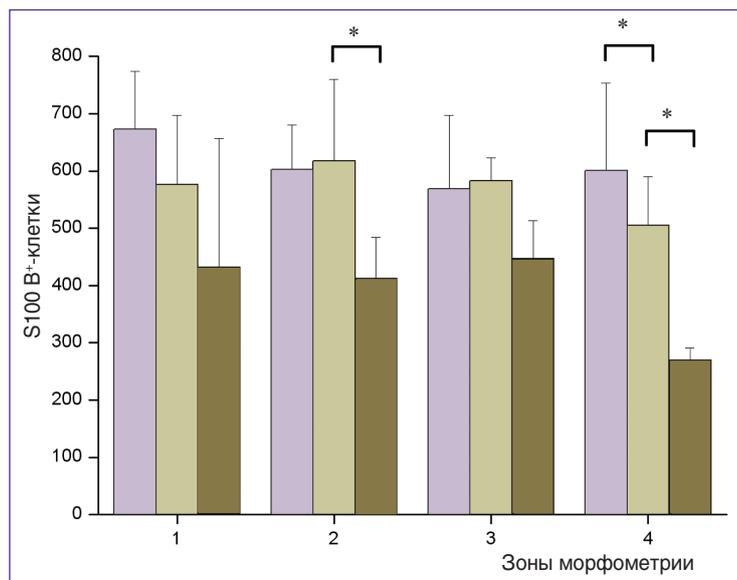


Рис. 3. Количество S100B⁺-клеток в белом веществе спинного мозга крысы на расстоянии 1,5 см от эпицентра на 30-е сутки эксперимента. Сиреневые столбики — 1-я опытная группа с введением мононуклеарных клеток крови пуповины, трансфицированных плазмидой pBud-VEGF-FGF2; светло-зеленые столбики — 2-я опытная группа с введением плазмиды pBud-VEGF-FGF2; темно-зеленые столбики — 1-я контрольная группа с введением мононуклеарных клеток крови пуповины, трансфицированных плазмидой pEGFP-N2; * — $p < 0,05$

К 30-м суткам эксперимента количество S100B⁺-клеток в наружных зонах белого вещества на расстоянии 1,5 см от эпицентра травмы в условиях прямой доставки генов возрастает на 46% ($p < 0,05$). При введении клеток крови пуповины, трансфицированных плазмидой pBud-VEGF-FGF2, этот показатель увеличивается на 55% ($p < 0,05$) (рис. 3).

Обсуждение. Выявленная нами прямая отрицательная корреляция между площадью участка повреждения спинного мозга и показателем восстановления двигательной функции в опытах с прямой инъекцией плазмиды pBud-VEGF-FGF2 указывает на первостепенное значение (среди других многочисленных факторов, контролирующих нейрорегенерацию при травме спинного мозга) фактора присутствия матрикса сохраненной ткани для роста регенерирующих нервных волокон. В сопоставлении с результатами доставки трансгенов на клеточных носителях эти данные подтверждают высокую эффективность прямой генной терапии и обосновывают ее практическое применение.

Наибольший коэффициент корреляции вычислен на расстоянии 5 мм от эпицентра травмы. Это наблюдение согласуется с нашими ранними результатами [18, 19], свидетельствующими о том, что на расстоянии 3 мм от эпицентра травмы деструктивные изменения в спинном мозге более выражены, чем на расстоянии 5 мм. В экспериментах с прямой инъекцией плазмиды нами установлена лучшая сохранность серого и белого вещества. Это способствует лучшему прорастанию миелиновых волокон в зону регенерации и восстановлению двигательной активности.

К 30-м суткам при трансплантации клеток, трансфицированных плазмидой pBud-VEGF-FGF2, корреляция между площадью участка повреждения и показателем восстановления двигательной активности отсутствует. Этот результат может быть связан со слабой экспрессией трансгенов, доставляемых с клетками, недостаточной секрецией молекулярных факторов, синтезированных с участием трансгенов в этих клетках или с гибелью трансфицированных клеток после трансплантации в область повреждения.

Увеличение экспрессии специфического белка астроцитарной глии S100B в случае прямой генной терапии и при введении трансфицированных терапевтическими генами мононуклеарных клеток крови пуповины может оказывать положительное влияние на регенерацию спинного мозга. Более выраженное увеличение количества S100B⁺-клеток при клеточно-опосредованной терапии по сравнению с прямой инъекцией плазмиды может быть связано с известной способностью мононуклеарных клеток крови пуповины сдерживать воспалительную реакцию и оказывать нейротрофическое влияние или с выработкой специфических факторов, поддерживающих выживание и дифференцировку астроцитов [25, 26].

В условиях локальной доставки терапевтических генов *vegf* и *fgf2* модуляция фенотипа астроцитов и увеличение численности популяции S100B-иммунопозитивных клеток могут отражать позитивный процесс реконструкции поврежденной ткани в ходе нейрорегенерации, что важно для предотвращения нежелательных клеточных реакций, сдерживания дегенерации, ограничения воспалительного ответа и стимулирования неоваскуляризации. Секретируемый астроцитами белок S100B, действуя в физиологических наномолярных концентрациях, оказывает нейротрофическое влияние, поддерживая выживание нейронов и рост аксонов [15, 27]. Кроме того, позитивная роль увеличения численности популяции S100B⁺-клеток подтверждается представлением о том, что многие молекулы, вырабатываемые астроцитами, оказывают нейротрофическое паракринное влияние на клетки-мишени в области повреждения, а сами астроциты образуют адекватный матрикс для роста аксонов.

Заключение. В ходе регенерации после контузионной травмы спинного мозга уменьшение области повреждения и связанное с этим восстановление двигательной функции осуществляются более эффективно при прямой генной терапии, чем при доставке тех же генов на клеточных носителях.

Работа выполнена при поддержке государственного контракта ФЦП Министерства образования и науки Российской Федерации №16.512.11.2101, гранта ОПТЭК 2012 г., гранта Российского фонда фундаментальных исследований №12-04-31092-мол_а.

Авторы выражают благодарность Р.Р. Исламову, А.П. Киясову, А.А. Ризванову за предоставление плазмиды рBud-VEGF-FGF2 и И.И. Салафутдинову за получение и трансфекцию клеток крови пуповины человека.

Литература

1. Чельшев Ю.А., Шаймарданова Г.Ф., Мухамедшина Я.О., Исламов Р.Р., Ризванов А.А., Салафутдинов И.И. Способ стимулирования нейрорегенерации с помощью генетических конструкций. Патент РФ 2459630 С1. 2012.
2. Mackenzie F., MacRuhberg C. Diverse roles for VEGF-A in the nervous system. *Development* 2012 Apr; 139(8): 1371–80.
3. Mofteh M., Landry M., Nagy F., Cabelguen J.M. Fibroblast growth factor-2 mRNA expression in the brainstem and spinal cord of normal and chronic spinally transected urodeles. *J Neurosci Res* 2008 Nov 15; 86(15): 3348–3358.
4. Guzen F.P., Soares J.G., de Freitas L.M., Cavalcanti J.R., Oliveira F.G., Araújo J.F., Cavalcante Jde. S., Cavalcante J.C., do Nascimento E.S. Jr., de Oliveira Costa M.S. Sciatic nerve grafting and inoculation of FGF-2 promotes improvement of motor behavior and fiber regrowth in rats with spinal cord transaction. *Restor Neurol Neurosci* 2012; 30(3): 265–275.
5. Ohori Y., Yamamoto S., Nagao M., Sugimori M., Yamamoto N., Nakamura K., Nakafuku M. Growth factor treatment and genetic manipulation stimulate neurogenesis and oligodendrogenesis by endogenous neural progenitors in the injured adult spinal cord. *J Neurosci* 2006 Nov 15; 26(46): 11948–11960.
6. Yang Y.L. Effect of adenovirus-mediated basic fibroblast growth factor gene transfer in vivo on oligodendrocyte cell numbers throughout ventrolateral white matter following spinal cord injury in rats. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2012 Aug; 34(4): 348–352.
7. Seghezzi G., Patel S., Ren C.J., Gualandris A., Pintucci G., Robbins E.S., Shapiro R.L., Galloway A.C., Rifkin D.B., Mignatti P. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol* 1998 Jun 29; 141(7): 1659–1673.
8. Apfel S.C. Nerve growth factor for the treatment of diabetic neuropathy: what went wrong, what went right, and what does the future hold? *Int Rev Neurobiol* 2002; 50: 393–413.
9. Чельшев Ю.А., Мухамедшина Я.О., Шаймарданова Г.Ф., Николаев С.И. Прямая доставка терапевтических генов для стимулирования посттравматической нейрорегенерации. *Неврологический вестник (журнал им. В.М. Бехтерева)* 2012; 64(1): 76–83.
10. Чельшев Ю.А., Викторов И.В. Клеточные технологии ремиелинизации при травме спинного мозга. *Неврологический вестник (журнал им. В.М. Бехтерева)* 2009; 1: 49–55.
11. Gerin C.G., Madueke I.C., Perkins T., Hill S., Smith K., Haley B., Allen S.A., Garcia R.P., Paunesku T., Woloschak G. Combination strategies for repair, plasticity, and regeneration using regulation of gene expression during the chronic phase after spinal cord injury. *Synapse* 2011 Dec; 65(12): 1255–1281.
12. Deng X.Y., Zhou R.P., Lu KW., Jin D.D. Lithium chloride combined with human umbilical cord blood mesenchymal stem cell transplantation for treatment of spinal cord injury in rats. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2010 Nov; 30(11): 2436–2439.
13. Kim J.Y., Jeon H.B., Yang Y.S., Oh W., Chang J.W. Application of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in disease models. *World J Stem Cells* 2010 April 26; 2(2): 34–38.
14. Kaner T., Karadag T., Cirak B., Erken H.A., Karabulut A., Kiroglu Y., Akkaya S., Acar F., Coskun E., Genc O., Colakoglu N. The effects of human umbilical cord blood transplantation in rats with experimentally induced spinal cord injury. *J Neurosurg Spine* 2010 Oct; 13(4): 543–551.
15. Chua S.J., Bielecki R., Yamanaka N., Fehlings M.G., Rogers I.M., Casper R.F. The effect of umbilical cord blood cells on outcomes after experimental traumatic spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 2010 Jul 15; 35(16): 1520–1526.

16. Yao L., He C., Zhao Y., Wang J., Tang M., Li J., Wu Y., Ao L., Hu X. Human umbilical cord blood stem cell transplantation for the treatment of chronic spinal cord injury. *Neural Regen Res* 2013; 8(5): 397–403.

17. Шаймарданова Г.Ф., Мухамедшина Я.О., Ризванов А.А., Салафутдинов И.И., Чельшев Ю.А. Применение плазмидного вектора с генами vegf и fgf2 при травматическом повреждении спинного мозга крысы. *Клеточные технологии в биологии и медицине* 2012; 4: 200–204.

18. Шаймарданова Г.Ф., Мухамедшина Я.О., Архипова С.С., Салафутдинов И.И., Ризванов А.А., Чельшев Ю.А. Посттравматические изменения спинного мозга крысы при трансплантации мононуклеарных клеток крови пуповины человека, модифицированных генами vegf и fgf2. *Морфология* 2011; 6: 36–42.

19. Шаймарданова Г.Ф., Мухамедшина Я.О., Ризванов А.А., Салафутдинов И.И., Чельшев Ю.А. Эффект трансплантации в область травматического повреждения спинного мозга крысы мононуклеарных клеток крови пуповины человека, экспрессирующих рекомбинантные гены VEGF и FGF2. *Морфология* 2012; 142(4): 31–36.

20. Matyash V., Kettenmann H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev* 2010 May; 63(1–2): 2–10.

21. Allaman I., Bélanger M., Magistretti P.J. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci* 2011 Feb; 34(2): 76–87.

22. Лебедев С.В., Тимофеев С.В., Жарков А.В., Шипилов В.Г., Чельшев Ю.А., Масгутова Г.А., Чехонин В.П. Нагрузочные тесты и метод ВВВ при оценке двигательных нарушений после контузионной травмы спинного мозга. *Бюлл эксп биол и мед* 2008; 145(10): 471–476.

23. Rizvanov A.A., Kiyasov A.P., Gazizov I.M., et al. Human umbilical cord blood cells transfected with VEGF and L(1)CAM do not differentiate into neurons but transform into vascular endothelial cells and secrete neuro-trophic factors to support neurogenesis — a novel approach in stem cell therapy. *Neurochem Int* 2008 Dec; 53(6–8): 389–394.

24. Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 1995 Feb; 12(1): 1–21.

25. Shen C.T., Foo N.H., Liu W.S., Chen S.H. Infusion of human umbilical cord blood cells ameliorates hind limb dysfunction in experimental spinal cord injury through anti-inflammatory, vasculogenic and neurotrophic mechanisms. *Pediatr Neonatol* 2008 Jun; 49(3): 77–83.

26. Adami C., Sorci G., Blasi E., Agneletti A.L., Bistoni F., Donato R. S100B expression in and effects on microglia. *Glia* 2001 Feb; 33: 131–142.

27. Rothermundt M., Peters M., Prehn J.H., Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech* 2003 Apr; 60(6): 614–632.

References

1. Chelyshev Yu.A., Shaymardanova G.F., Mukhamedshina Ya.O., Islamov R.R., Rizvanov A.A., Salafutdinov I.I. *Sposob stimulirovaniya neyroregeneratsii s pomoshch'yu geneticheskikh konstruktsey* [The method of neuroregeneration stimulation using genetic makers]. Patent RF 2459630 C1. 2012.
2. Mackenzie F., MacRuhberg C. Diverse roles for VEGF-A in the nervous system. *Development* 2012 Apr; 139(8): 1371–80.
3. Mofteh M., Landry M., Nagy F., Cabelguen J.M. Fibroblast growth factor-2 mRNA expression in the brainstem and spinal cord of normal and chronic spinally transected urodeles. *J Neurosci Res* 2008 Nov 15; 86(15): 3348–3358.
4. Guzen F.P., Soares J.G., de Freitas L.M., Cavalcanti J.R., Oliveira F.G., Araújo J.F., Cavalcante Jde. S., Cavalcante J.C., do Nascimento E.S. Jr., de Oliveira Costa M.S. Sciatic nerve grafting and inoculation of FGF-2 promotes improvement of motor behavior and fiber regrowth in rats with spinal cord transaction. *Restor Neurol Neurosci* 2012; 30(3): 265–275.
5. Ohori Y., Yamamoto S., Nagao M., Sugimori M., Yamamoto N.,

- Nakamura K., Nakafuku M. Growth factor treatment and genetic manipulation stimulate neurogenesis and oligodendrogenesis by endogenous neural progenitors in the injured adult spinal cord. *J Neurosci* 2006 Nov 15; 26(46): 11948–11960.
6. Yang Y.L. Effect of adenovirus-mediated basic fibroblast growth factor gene transfer in vivo on oligodendrocyte cell numbers throughout ventrolateral white matter following spinal cord injury in rats. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2012 Aug; 34(4): 348–352.
7. Seghezzi G., Patel S., Ren C.J., Gualandris A., Pintucci G., Robbins E.S., Shapiro R.L., Galloway A.C., Rifkin D.B., Mignatti P. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol* 1998 Jun 29; 141(7): 1659–1673.
8. Apfel S.C. Nerve growth factor for the treatment of diabetic neuropathy: what went right, what went wrong, and what does the future hold? *Int Rev Neurobiol* 2002; 50: 393–413.
9. Chelyshev Yu.A., Mukhamedshina Ya.O., Shaymardanova G.F., Nikolaev S.I. Pryamaya dostavka terapevticheskikh genov dlya stimulirovaniya posttravmaticheskoy neyroregeneratsii [Direct delivery of therapeutic genes to stimulate posttraumatic neuroregeneration]. *Nevrologicheskiy vestnik (zhurnal im. V.M. Bekhtereva) — Neurological Bulletin named after V.M. Bekhterev* 2012; 64(1): 76–83.
10. Chelyshev Yu.A., Viktorov I.V. Kletochnye tekhnologii remielinizatsii pri travme spinnogo mozga [Cellular technologies of remyelination in spinal cord injury]. *Nevrologicheskiy vestnik (zhurnal im. V.M. Bekhtereva) — Neurological Bulletin named after V.M. Bekhterev* 2009; 1: 49–55.
11. Gerin C.G., Madueke I.C., Perkins T., Hill S., Smith K., Haley B., Allen S.A., Garcia R.P., Paunesku T., Woloschak G. Combination strategies for repair, plasticity, and regeneration using regulation of gene expression during the chronic phase after spinal cord injury. *Synapse* 2011 Dec; 65(12): 1255–1281.
12. Deng X.Y., Zhou R.P., Lu K.W., Jin D.D. Lithium chloride combined with human umbilical cord blood mesenchymal stem cell transplantation for treatment of spinal cord injury in rats. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2010 Nov; 30(11): 2436–2439.
13. Kim J.Y., Jeon H.B., Yang Y.S., Oh W., Chang J.W. Application of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in disease models. *World J Stem Cells* 2010 April 26; 2(2): 34–38.
14. Kaner T., Karadag T., Cirak B., Erken H.A., Karabulut A., Kiroglu Y., Akkaya S., Acar F., Coskun E., Genc O., Colakoglu N. The effects of human umbilical cord blood transplantation in rats with experimentally induced spinal cord injury. *J Neurosurg Spine* 2010 Oct; 13(4): 543–551.
15. Chua S.J., Bielecki R., Yamanaka N., Fehlings M.G., Rogers I.M., Casper R.F. The effect of umbilical cord blood cells on outcomes after experimental traumatic spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 2010 Jul 15; 35(16): 1520–1526.
16. Yao L., He C., Zhao Y., Wang J., Tang M., Li J., Wu Y., Ao L., Hu X. Human umbilical cord blood stem cell transplantation for the treatment of chronic spinal cord injury. *Neural Regen Res* 2013; 8(5): 397–403.
17. Shaymardanova G.F., Mukhamedshina Ya.O., Rizvanov A.A., Salafutdinov I.I., Chelyshev Yu.A. Primenenie plazmidnogo vektora s genami vegf i fgf2 pri travmaticheskom povrezhdenii spinnogo mozga krysy [The use of plasmid vector with VEGF and FGF2 genes in murine spinal cord injury]. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine — Cellular technologies in biology and medicine* 2012; 4: 200–204.
18. Shaymardanova G.F., Mukhamedshina Ya.O., Arkhipova S.S., Salafutdinov I.I., Rizvanov A.A., Chelyshev Yu.A. Posttravmaticheskoe izmeneniya spinnogo mozga krysy pri transplantatsii mononuklearnykh kletok krovi pupoviny cheloveka, modifitsirovannykh genami vegf i fgf2 [Posttraumatic changes of murine spinal cord in the transplantation of human umbilical cord blood mononuclear cell modified by VEGF and FGF2 genes]. *Morfologiya — Morphology* 2011; 6: 36–42.
19. Shaymardanova G.F., Mukhamedshina Ya.O., Rizvanov A.A., Salafutdinov I.I., Chelyshev Yu.A. Effekt transplantatsii v oblast' travmaticheskogo povrezhdeniya spinnogo mozga krysy mononuklearnykh kletok krovi pupoviny cheloveka, ekspressiruyushchikh rekombinantnye geny VEGF i FGF2 [The transplantation effect of human umbilical cord blood cells expressing recombinant VEGF and FGF2 genes in the damage area of spinal cord injury in rats]. *Morfologiya — Morphology* 2012; 142(4): 31–36.
20. Matyash V., Kettenmann H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev* 2010 May; 63(1–2): 2–10.
21. Allaman I., Bélanger M., Magistretti P.J. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci* 2011 Feb; 34(2): 76–87.
22. Lebedev S.V., Timofeev S.V., Zharkov A.V., Shipilov V.G., Chelyshev Yu.A., Masgutova G.A., Chekhonin V.P. Nagruzochnye testy i metod VVV pri otsenke dvigatel'nykh narusheniy posle kontuzionnoy travmy spinnogo mozga [Stress tests and VVV method in the assessment of motor disturbances after contusion spinal brain injury]. *Bull Eksp Biol Med — Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2008; 145(10): 471–476.
23. Rizvanov A.A., Kiyasov A.P., Gazizov I.M., et al. Human umbilical cord blood cells transfected with VEGF and L(1)CAM do not differentiate into neurons but transform into vascular endothelial cells and secrete neuro-trophic factors to support neurogenesis — a novel approach in stem cell therapy. *Neurochem Int* 2008 Dec; 53(6–8): 389–394.
24. Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 1995 Feb; 12(1): 1–21.
25. Shen C.T., Foo N.H., Liu W.S., Chen S.H. Infusion of human umbilical cord blood cells ameliorates hind limb dysfunction in experimental spinal cord injury through anti-inflammatory, vasculogenic and neurotrophic mechanisms. *Pediatr Neonatol* 2008 Jun; 49(3): 77–83.
26. Adami C., Sorci G., Blasi E., Agneletti A.L., Bistoni F., Donato R. S100B expression in and effects on microglia. *Glia* 2001 Feb; 33: 131–142.
27. Rothermundt M., Peters M., Prehn J.H., Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech* 2003 Apr; 60(6): 614–632.