

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЯМОЙ И КЛЕТОЧНО-ОПОСРЕДОВАННОЙ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ КРЫС С КОНТУЗИОННОЙ ТРАВМОЙ СПИННОГО МОЗГА

А.А. Измаилов, М.Е. Соколов, Ф.В. Баширов, Ф.О. Фадеев, В.А. Маркосян, Р.Р. Гарифулин, А.Н. Лисюков, М.С. Кузнецов, Р.Р. Исламов

Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

Comparative analysis of efficiency of direct and cell-mediated gene therapy of rats with contusion spinal cord injury

A.A. Izmailov, M.E. Sokolov, F.V. Bashirov, F.O. Fadeev, V.A. Markosyan, R.R. Garifulin, A.N. Lisyukov, M.S. Kuznetsov, R.R. Islamov

Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Сегодня медицинское сообщество не располагает эффективными методами лечения травмы спинного мозга. Генная терапия (прямая или клеточно-опосредованная) является одним из перспективных подходов для успешного решения данной проблемы. Настоящее исследование сфокусировано на оценке терапевтической эффективности генов, кодирующих сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), ангиогенин (ANG) и нейрональную молекулу клеточной адгезии (NCAM) на модели контузионной травмы у крыс. Терапевтические гены в двух комбинациях (VEGF + GDNF + NCAM и VEGF + ANG + NCAM) вводили интратекально либо с помощью аденовирусных векторов, либо в клеточных носителях — генетически модифицированных мононуклеарных клетках крови пуповины человека. На 30 сутки после травмы спинного мозга анализировали сохранность миелиновых волокон белого вещества, эффективность экспрессии терапевтических генов и кинематику суставов задней левой конечности у подопытных животных.

Обе терапевтические комбинации генов оказали положительное воздействие на сохранность проводящих путей спинного мозга и восстановление объема движений суставов.

Ключевые слова: травма спинного мозга, аденовирусный вектор, мононуклеарные клетки крови пуповины человека, сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), ангиогенин (ANG), нейрональная молекула клеточной адгезии (NCAM), кинематика суставов задних конечностей.

Введение

Естественные ограничения регенерации в ЦНС являются одной из основных проблем лечения заболеваний головного и спинного мозга различной этиологии. Эффективных способов сдерживания вторичной нейродегенерации и стимулирования возможной нейрорегенерации в клинической практике неврологии и нейрохирургии не существует. Больные получают симптоматическое лечение, которое, однако, не повышает качество жизни и не продлевает ее продолжительность. Современный уровень развития генных и клеточных технологий позволяет производить лекарственные средства нового класса, содержащие генетический материал. Доставка терапевтических генов, кодирующих нейротрофические факторы в ЦНС после нейротравмы, ишемического инсульта, или при нейродегенеративных заболеваниях является многообещающей стратегией регенеративной медицины, направленной на сдерживание гибели и повышение жизнеспособности нейронов, стимулирование роста аксонов и восстановление межнейронных связей, а также на предотвращение развития воспалительной реакции и астроглиоза [1, 2].

Today we have an inadequate set of methods for treating spinal cord injuries. Gene therapy (direct or cell-mediated) is one of the most promising approaches for successfully solving this problem. The present study focused on evaluating the therapeutic efficacy of genes encoding vascular endothelial growth factor (VEGF), glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), angiogenin (ANG), and the neuronal cell adhesion molecule (NCAM) in the model of contusion injury in rats. The therapeutic genes in two combinations (VEGF + GDNF + NCAM and VEGF + ANG + NCAM) either were administered intrathecally, with the help of adenoviral vectors, or on cellular carriers — genetically modified mononuclear cells of human umbilical cord blood. On 30 day after a spinal cord injury, the safety of the myelin fibers of the white matter and the kinematics of the left hindlimb joints in experimental animals were analyzed. Both therapeutic combinations of genes have shown a positive effect on the conduction pathways and kinematics of the joints.

Keywords: spinal cord injury, adenoviral vector, human umbilical cord blood mononuclear cells, vascular endothelial growth factor (VEGF), glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), angiogenin (ANG), neural cell adhesion molecule (NCAM), kinematics of hind limbs joints.

В настоящее время для генной терапии активно исследуются два способа доставки рекомбинантных генов в нервную ткань: 1) с помощью плазмидного или вирусного векторов (прямая генная терапия), или 2) в клеточных носителях, с помощью генетически модифицированных клеток (клеточно-опосредованная генная терапия) [3]. Список генов для применения в генной терапии достаточно разнообразный [4–6]. Среди потенциальных терапевтических генов в первую очередь рассматриваются гены, кодирующие нейротрофические (BDNF, NGF, GDNF, IGF), ростовые (VEGF, Angiogenin, FGF), антиапоптозные (BCL-2, BCL-XL) и противовоспалительные (IL-10, IL-1RA) факторы, а также гены, кодирующие молекулы адгезии (NCAM, L1) и внеклеточного матрикса (MMPs). Для клеточно-опосредованной генной терапии применяются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, фибробласты, прогениторные нейрональные клетки [7–9] и др. Наиболее перспективными представляются мононуклеарные клетки крови пуповины (МККП), для которых характерны низкая иммуногенность, доступность, простота получения и хранения. Немаловажными преимуществами

этих клеток являются их пригодность как для алло-, так и для аутотрансплантации у человека, а также отсутствие законодательных, этических и религиозных запретов, связанных с трансплантацией эмбриональных стволовых клеток. В наших предыдущих исследованиях было показано, что трансплантация генетически модифицированных МККП, одновременно сверхэкспрессирующих VEGF (сосудистый эндотелиальный фактор роста), GDNF (глиальный нейротрофический фактор) и NCAM (нейрональная молекула клеточной адгезии) трансгенным G93A мышам с моделью бокового амиотрофического склероза (БАС) сдерживает развитие клинических признаков заболевания и продлевает жизнь животных [10, 11]. Известно, что другой ангиогенный фактор ангиогенин (ANG), как и VEGF, секретируется мотонейронами и обладает выраженным нейропротекторным действием, а мутантные формы белка имеют отношение к патогенезу БАС [12]. Одновременное введение двух аденовирусных векторов, кодирующих VEGF и ANG, в скелетные мышцы спины и задних конечностей мышам с моделью БАС поддерживало двигательную активность и продлевало жизнь трансгенных мышей [13]. Таким образом, активно продолжающиеся фундаментальные исследования в области генной и генно-клеточной терапии нейродегенеративных процессов приближают возможное внедрение новых генных и клеточных технологий в практическую медицину. В этой связи нами принято экспериментальное исследование эффективности препарата, содержащего генетический материал, для лечения нейротравмы.

Цель — определить терапевтическую эффективность прямой и МККП-опосредованной генной терапии тремя генами в двух комбинациях (VEGF + GDNF + NCAM и VEGF + ANG + NCAM) на модели травматического повреждения спинного мозга у крыс. Терапевтическую эффективность оценивали по сохранности проводящих путей белого вещества и восстановлению кинематики суставов задней левой конечности при ходьбе подопытных животных.

Материал и методы

Аденовирусные векторы и генетически модифицированные МККП. Для прямой генной терапии были созданы рекомбинантные репликативно-дефектные вирусные векторы на основе аденовируса человека 5 серотипа (Ad5) с использованием клеточной культуры HEK 293 (Human Embryonic Kidney 293) в НИИ им. Н.Ф. Гамалеи (Москва) по методу, описанному ранее

[14]. В настоящем исследовании были использованы вирусные векторы Ad5, несущие гены зеленого флуоресцирующего белка (Ad5-GFP), ангиогенина человека (Ad5-ANG), нейрональной молекулы клеточной адгезии (Ad5-NCAM), сосудистого эндотелиального фактора роста (Ad5-VEGF) и глиального нейротрофического фактора (Ad5-GDNF). При создании генно-клеточной конструкции в качестве клеточного носителя были использованы МККП. Пуповинную кровь забирали у беременных женщин (n = 3), которые проходили тщательный дородовой скрининг на наличие противопоказаний к донорству пуповинной крови по инструкции Банка стволовых клеток КГМУ, после подписания ими информированного согласия. МККП выделяли в градиенте плотности фиколла (ПанЭко, Россия) по стандартной методике [15], высеивали на 6-луночные культуральные планшеты из расчета 2×10⁶ кл./луночка и трансдуцировали одновременно тремя рекомбинантными аденовирусами в двух комбинациях: (1) Ad5-VEGF-GDNF-NCAM и (2) Ad5-VEGF-ANG-NCAM. При трансдукции МККП тремя аденовирусами общий показатель MOI (multiplicity of infection — множественность инфицирования) был равен 10. Для ксенотрансплантации трансдуцированные МККП через 12–16 ч. культивирования центрифугировали при 500 g в течение 5 мин., клеточный осадок трижды промывали в растворе DPBS и ресуспендировали в стерильном физиологическом растворе (0,9% хлорид натрия) из расчета 2×10⁶ клеток в 20 мкл физиологического раствора для одной инъекции.

Эксперименты на животных. Половозрелые самки крыс линии Wistar (n = 40, вес 250–300 г) были получены из питомника Пущино (Пущино, Россия). Крыс содержали по одной в клетке в стандартных лабораторных условиях с 12 ч. графиком день/ночь, со свободным доступом к пище и воде. Все манипуляции проводили в соответствии с приказом Минздравсоцразвития № 708н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики» и с разрешения Локального этического комитета Казанского государственного медицинского университета (протокол № 5 от 27.05.2014).

Контузионную травму спинного мозга моделировали после ламинэктомии с помощью импактора — металлического стержня (масса 10 г, диаметр 2 мм), падающего с высоты 25 мм на спинной мозг на уровне Th8-Th9, как описано в работе Y. Mukhamedshina с соавт. (2016) [16]. В течение 4 ч. после нанесения травмы животным интратекально на уровне L4-L5 вводили генные или генно-клеточные конструкции (табл.).

Таблица. Экспериментальные группы животных

Группа	Инtrateкальная инъекция препарата в 20 мкл физиологического раствора
NaCl (контроль, n = 4)	20 мкл физиологического раствора
Ad5-GFP (контроль, n = 8)	2×10 ⁷ вирусных частиц
МККП+Ad5-GFP (n = 6)	2×10 ⁶ МККП, трансдуцированных Ad5-GFP,
Ad5-VEGF-GDNF-NCAM (n = 5)	2×10 ⁷ вирусных частиц, несущих терапевтические гены VEGF, GDNF и NCAM
МККП+Ad5-VEGF-GDNF-NCAM (n = 6)	2×10 ⁶ МККП, трансдуцированных Ad5-VEGF-GDNF-NCAM
Ad5-VEGF-ANG-NCAM (n = 4)	2×10 ⁷ вирусных частиц, несущих VEGF, Angiogenin, NCAM
МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM (n = 7)	2×10 ⁶ МККП, трансдуцированных Ad5-VEGF-ANG-NCAM

Кинематика суставов. Для анализа кинематики суставов случайным образом была выбрана левая задняя конечность, так как при контузионной травме спинного мозга обе задние конечности имеют одинаковый локомоторный дефицит. На 30 сут. после операции у животного в проекциях гребня подвздошной кости, большого вертела бедренной кости, коленного, голеностопного суставов и пальцев левой задней конечности наносили цветные метки (рис. 1А) [17]. Затем крысу помещали на беговую дорожку (10 см/сек), а грудь и передние конечности фиксировали манжетой. Видеофиксацию цветных меток во время ходьбы подопытного животного осуществляли с помощью фотоаппарата Canon PowerShot S5 IS (Япония). Полученные видеоматериалы использовали для анализа объема движений в тазобедренном, коленном и голеностопном суставах. Видеоанализ кинематики суставов проводили с помощью программного обеспечения Kinovea 0.8.23 [18]. Для выявления групповых различий медианных значений использовали тест Краскела – Уоллиса. В качестве апостериорного критерия для попарных сравнений был применен критерий Неменьи с аппроксимацией к распределению Тьюки. Анализ полученных данных проводили с использованием базовых пакетов языка R.

Гистологические методы исследования. Через 30 сут. после операции подопытных животных наркотизировали с помощью хлоралгидрата (в/б 80 мг/мл; 0,4 мл на 100 г массы животного) и транскардinally перфузировали 4% раствором параформальдегида (4С°, pH = 7,4). Спинной мозг извлекали из позвоночного столба, постфиксировали в растворе параформальдегида в течение 4 ч. на ротационном столике. В целях криопротекции фиксированную

ткань насыщали 30% раствором сахарозы на фосфатно-солевом буфере (pH = 7,4). Для приготовления криостатных срезов поясничный отдел спинного мозга помещали в заливочную среду TBS (Triangle Biomedical Science, США) и замораживали в криостате Microm HM 560 (Thermo Scientific, США). Криостатные поперечные срезы толщиной 20 мкм получали из рострального (относительно эпицентра травмы) фрагмента спинного мозга и монтировали на предметные стекла. Для визуализации структуры нервной ткани срезы дополнительно окрашивали пропидием йодидом (PI) [19]. Эффективность экспрессии рекомбинантных генов оценивали по специфическому свечению репортерного зеленого флуоресцирующего белка на лазерном сканирующем микроскопе LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Германия).

Для морфометрического исследования сохранности белого вещества в зоне травмы спинного мозга готовили полутонкие поперечные срезы из фрагмента эпицентра травмы спинного мозга на ультрамикротоме LKB-III (Швеция) и окрашивали метиленовым синим. На оцифрованных микропрепаратах при 20-кратном увеличении микроскопа Primo Star (Carl Zeiss, Германия) в программе AxioVision Rel. 4.8. подсчитывали количество миелиновых волокон на участках препаратов площадью 0,09 мм² в передних, боковых и задних канатиках белого вещества на обеих сторонах спинного мозга. Статистическую обработку морфометрических данных проводили с помощью базовых пакетов языка R с использованием критерия Вилкоксона – Манна – Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Ходьба является автоматизированным двигательным актом тазобедренного, коленного и голеностопного суставов, состоящим из двух фаз – «фазы опоры» и «фазы переноса» (рис. 1Б) [20]. Мышцы, приводящие в движение тазобедренный и коленный суставы, иннервируются поясничным сплетением (L_1 – L_{IV}), а приводящие в движение голеностопный сустав – крестцовым сплетением (L_{IV} – L_{VI}) [21]. Оба сплетения находятся ниже места травмы, поэтому оценка кинематики суставов является одним из эффективных методов анализа функционального восстановления проводящих путей спинного мозга после травмы.

При исследовании объема движений тазобедренного сустава статистически значимых различий между контрольными и терапевтическими группами выявлено не было. Сравнительный анализ кинематики коленного сустава обнаружил, что восстановление в группе МККП + Ad5-VEGF-GDNF-NCAM было более эффективным в сравнении с контрольными группами (NaCl и Ad5-GFP), $p < 0,05$ (рис. 2А). Величина объема движений в голеностопном суставе во всех терапевтических группах (МККП + Ad5-GFP, Ad5-VEGF-GDNF-NCAM, МККП + Ad5-VEGF-GDNF-NCAM, Ad5-VEGF-ANG-NCAM и МККП + Ad5-VEGF-ANG-NCAM) была выше, чем в контрольных (NaCl и Ad5-GFP), $p < 0,05$ (рис. 2Б).

Морфометрическое исследование сохранности белого вещества в эпицентре травмы спинного мозга через 30 сут. после операции показало, что количество миелиновых волокон в исследуемых зонах отражает характер повреждения и отличается в контрольных и терапевтических группах (рис. 3А).

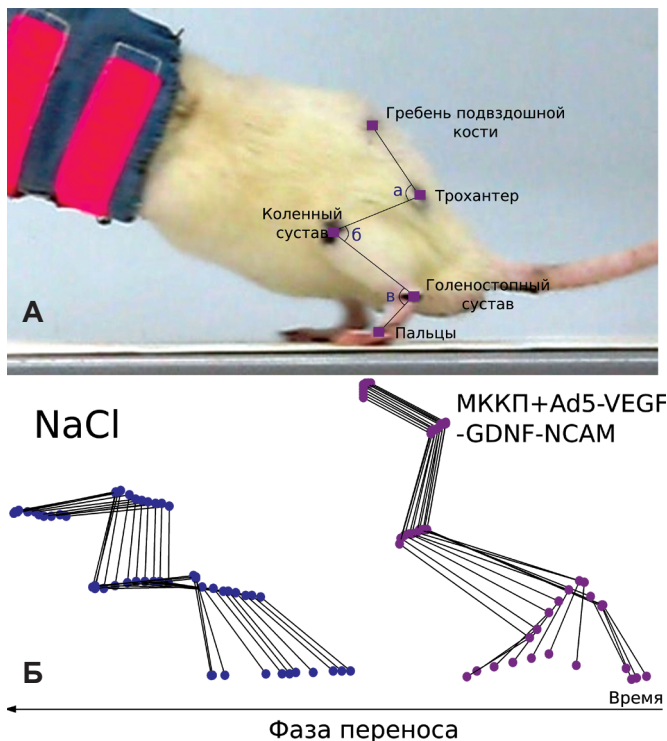


Рис. 1. Видеоанализ шага задней левой конечности крысы:

А – цветные метки на задней левой конечности крысы, где: а – тазобедренный сустав; б – коленный сустав; в – голеностопный сустав; Б – диаграммы движений левой задней конечности во время фазы переноса

Так, в передних канатиках (зона противоположная контузии) и боковых канатиках различий в количестве миелиновых волокон между терапевтическими и контрольными группами обнаружено не было. При этом в задних канатиках (локализация кортикоспи-

нального тракта) количество миелиновых волокон было больше в МККП+Ad5-GFP, МККП+Ad5-VEGF-GDNF-NCAM и МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM группах при сравнении с контрольной группой NaCl, $p<0,05$ (рис. 3Б).

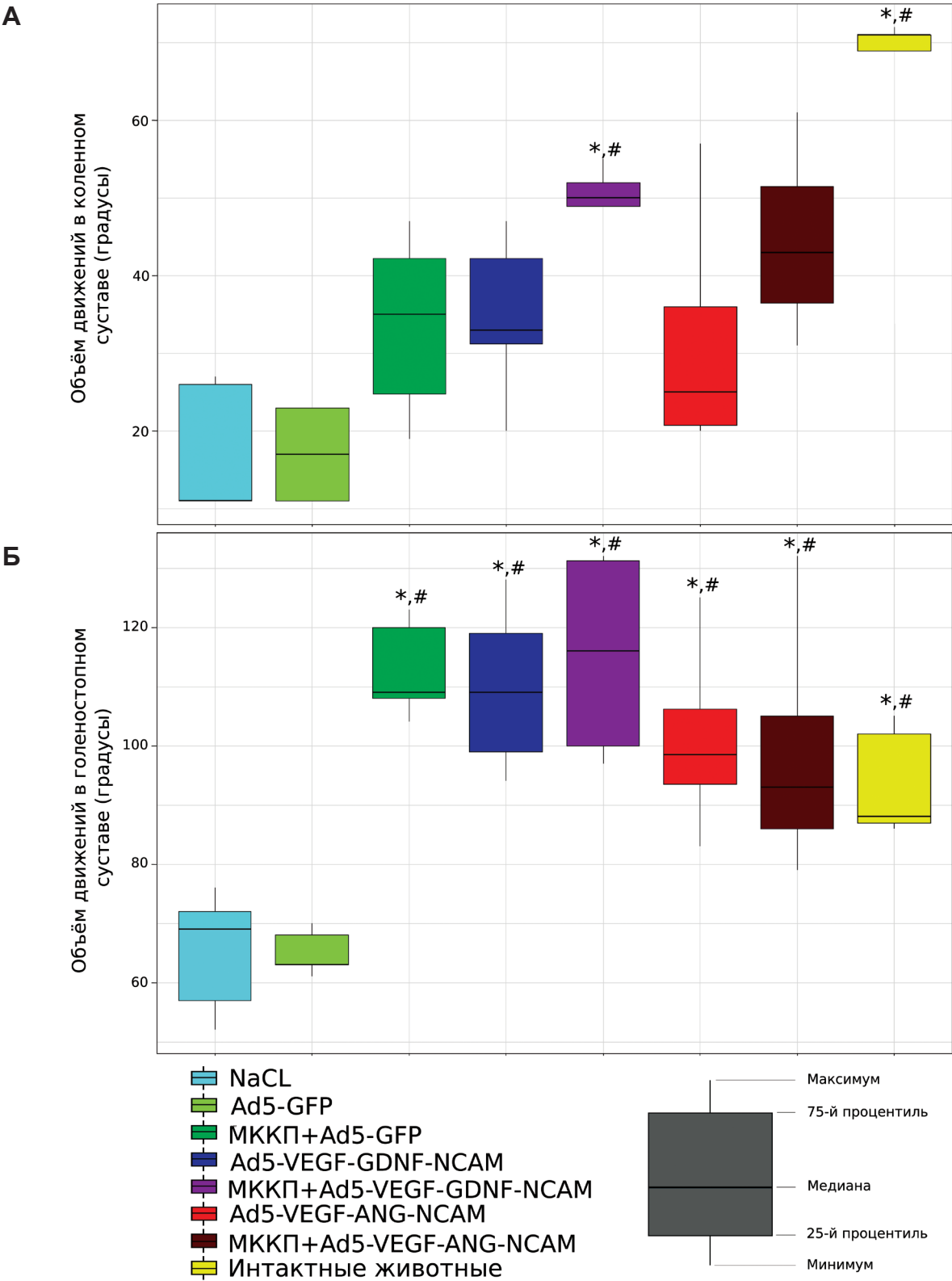


Рис. 2. Кинематика суставов задней левой конечности у крыс после контузионной травмы спинного мозга:
А — объёмы движений в коленном суставе;
Б — объёмы движений в голеностопном суставе (* — статистически значимые различия с NaCl группой; # — статистически значимые различия с Ad5-GFP группой)

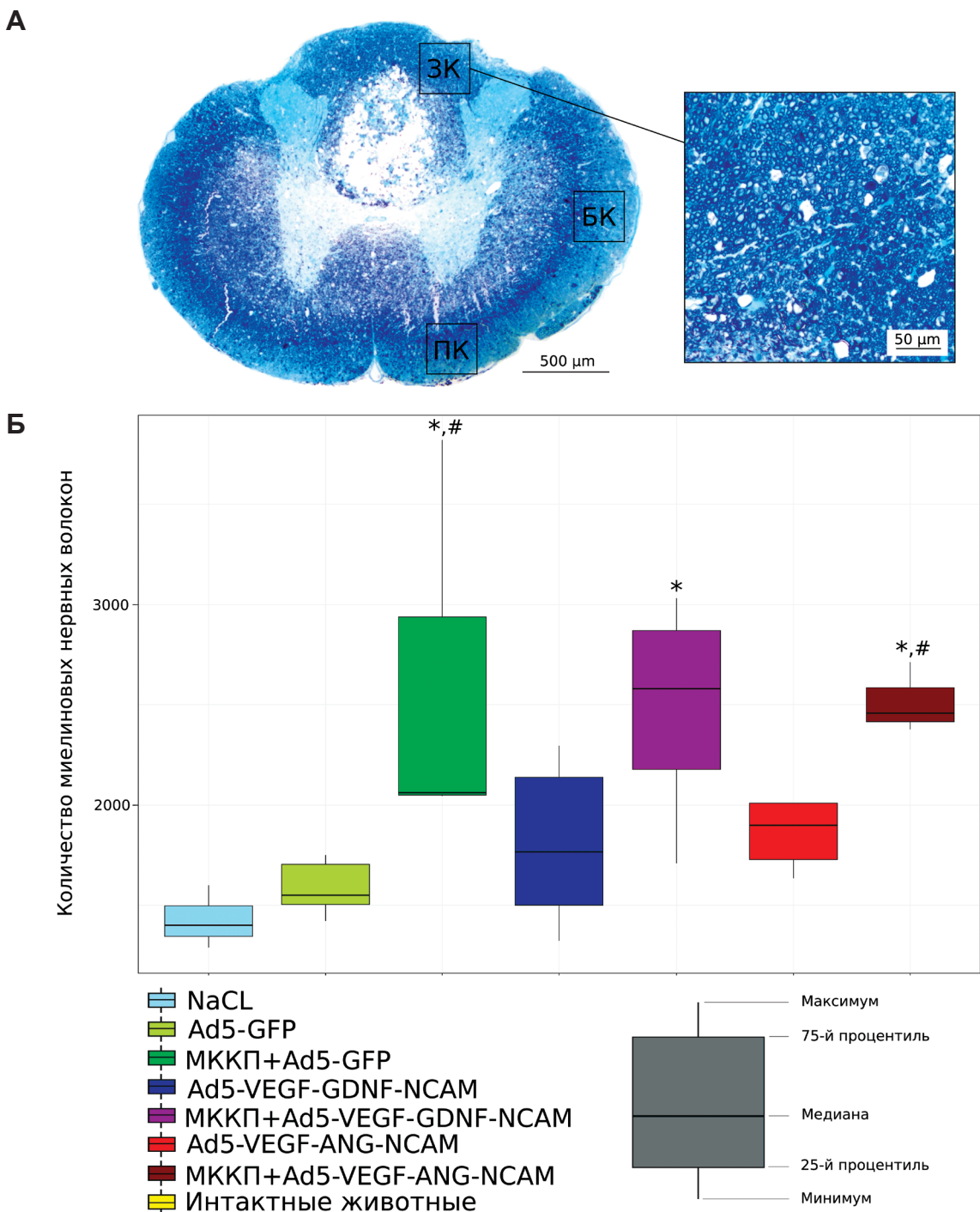


Рис. 3. Характеристика белого вещества спинного мозга:
А – полутонкий срез спинного мозга на уровне эпикентра травмы подопытного животного из группы МККП + Ad5-VEGF-GDNF-NCAM через 30 сут. после операции;
Б – график, иллюстрирующий количество аксонов в заднем канатике спинного мозга в 0,09 мм² (300×300 μm);
ЗК – задние канатики; БК – боковые канатики; ПК – передние канатики;
* – статистически значимые различия с NaCl группой

Способность рекомбинантных генов к экспрессии в спинном мозге после интратекального введения изучали по характеру экспрессии репортерного зеленого флуоресцирующего белка. При прямой генной терапии экспрессия GFP была выявлена в клет-

ках спинного мозга выше эпикентра травмы (рис. 4А). При клеточно-опосредованной генной терапии в ростральном отделе спинного мозга были также обнаружены МККП, экспрессирующие зеленый флуоресцирующий белок (рис. 4Б).

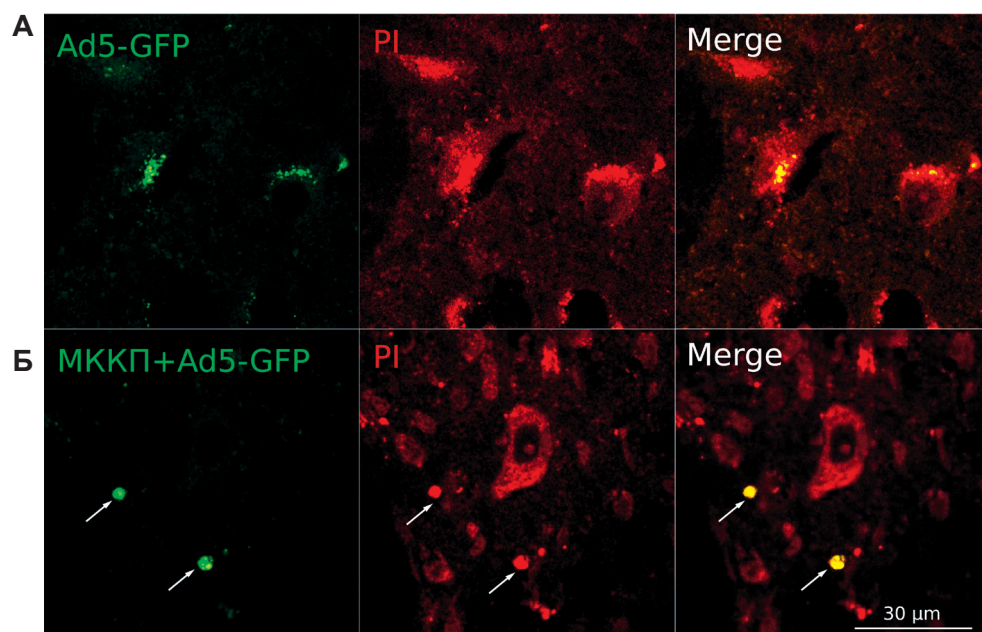


Рис. 4. Репортерный зеленый флуоресцирующий белок (GFP) в спинном мозге выше эпикентра травмы: А — специфическое свечение GFP в клетках спинного мозга при прямой доставке Ad5-GFP; Б — генетически модифицированные МККП (указаны стрелкой), экспрессирующие GFP; PI — пропидия йодид

Большинство работ с применением генной терапии для стимулирования нейрорегенерации выполнено с применением одного, реже двух генов, кодирующих нейротрофические факторы [22, 23]. Поставленная перед нами задача предполагает доставку в область нейротравмы трех терапевтических генов с разными функциональными свойствами в двух комбинациях, а именно: (1) *VEGF+GDNF+NCAM* и (2) *VEGF+ANG+NCAM*. Для доставки терапевтических генов были выбраны два способа: (1) в составе аденовирусного вектора (прямая генная терапия и (2) на клеточных носителях (клеточно-опосредованная генная терапия с помощью генетически модифицированных МККП). В экспериментах на животных отработываются различные способы введения генного или генно-клеточного препарата (внутривенно, внутримышечно, в структуры и желудочки мозга, интратекально). Важно подчеркнуть, что введение в ткань спинного мозга нативных МККП [24] или интратекальная инъекция различных стволовых клеток, полученных из крови пуповины [25, 26] применяются в клинических испытаниях терапии травмы спинного мозга. В настоящем исследовании терапевтические гены вводили в организм подопытных крыс путем интратекальной инъекции.

Влияние препарата, содержащего генетический материал, направлено на сдерживание посттравматической гибели нейронов и регенерации их отростков. Молекулы VEGF, GDNF и ANG являются нейропротекторами с хорошо изученными механизмами сдерживания вступления клеток в апоптоз. Кроме того, VEGF и ANG играют важную роль в восстановлении микроциркуляции в зоне ишемии после нейротравмы. Межклеточные взаимодействия, опосредуемые NCAM, в нейроонтогенезе и посттравматической регенерации обеспечивают не только выживание и миграцию нейронов, но и направленный рост нейритов и установление межклеточных контактов. Кроме того, как уже было показано нами ранее, recombinantная молекула адгезии NCAM при клеточно-опосредованной генной терапии БАС обеспечивает адресную миграцию и выживание генетически модифицированных трансплантируемых клеток, доставляющих в область нейродегене-

рации терапевтические гены. Так, в спинном мозге трансгенных G93A мышей после трансплантации МККП+Ad5-GDNF-NCAM количество МККП было больше, чем в серии МККП+Ad5-GDNF на сроке 9-10 недель, а на сроке 17 недель МККП были обнаружены только у мышей после трансплантации МККП+Ad5-GDNF-NCAM [27].

В настоящей работе возможность экспрессии терапевтических генов при прямой и клеточно-опосредованной генной терапии в спинном мозге после интратекального введения препарата установлена флуоресцентным методом, подтвердившим экспрессию репортерного зеленого флуоресцирующего белка, связанного с вектором Ad5. Гистологический анализ полутонких поперечных срезов препаратов спинного мозга обнаружил положительное действие терапевтических генов на сохранность белого вещества. Количество миелиновых волокон в составе проводящих путей кортикоспинального тракта было выше в терапевтических группах по сравнению с контрольными.

Анализ терапевтической эффективности генных и генно-клеточных конструкций по характеру восстановления кинематики суставов нижних конечностей у подопытных крыс установил, что во всех терапевтических группах (МККП+Ad5-GFP, Ad5-VEGF-GDNF-NCAM, МККП+Ad5-VEGF-GDNF-NCAM, Ad5-VEGF-ANG-NCAM и МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM) динамика восстановления движения в голеностопном суставе после контузионной травмы спинного мозга была положительная. При этом в группе МККП+Ad5-VEGF-GDNF-NCAM произошло значительное восстановление движения и в коленном суставе.

Для оценки клинической эффективности терапии травмы спинного мозга в моделях на животных широко применяется интегральный поведенческий тест BBB (Basso, Beattie and Bresnahan) [28]. В экспериментах на крысах восстановление двигательной активности по шкале BBB происходит в первые четыре недели после нанесения травмы, после чего значения выходят на плато [29, 30]. Результаты настоящего исследования сопоставимы с полученными нами ранее данными BBB теста при оценке эффек-

тивности генной терапии после контузионной травмы спинного мозга у крыс [14, 31]. При этом следует отметить, что тест на беговой дорожке, в отличие от BBB теста, характеризует вызванную двигательную активность и позволяет оценить степень восстановления движений в тазобедренном, коленном и голеностопном суставах задних конечностей.

Таким образом, получены доказательства, что как прямая, так и МККП-опосредованная генная терапия тремя терапевтическими генами в комбинациях *VEGF+GDNF+NCAM* и *VEGF+ANG+NCAM* оказывает положительное воздействие на сохранность проводящих путей и восстановление кинематики суставов. Исходя из наших предыдущих исследований

и учитывая результаты представленной работы, есть основания полагать, что генетически модифицированные моноклеарные клетки крови пуповины, одновременно сверхэкспрессирующие нейротрофические факторы и нейрональную молекулу адгезии, могут явиться прототипом генно-клеточного препарата для терапии травмы спинного мозга.

Благодарность

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда №. 16-15-00010. Авторы выражают благодарность Салафутдинову И.И. и Шаймардановой Г.Ф. за помощь в экспериментах.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bahmad H., Hadadeh O., Chamaa F. et al. Modeling Human Neurological and Neurodegenerative Diseases: From Induced Pluripotent Stem Cells to Neuronal Differentiation and Its Applications in Neurotrauma. *Front. Mol. Neurosci.* 2017; 10: 50; doi: 10.3389/fnmol.2017.00050.
2. Muheremu A., Peng J., Ao Q. Stem cell based therapies for spinal cord injury. *Tissue Cell* 2016; 48(4): 328-33.
3. Kabu S., Gao Y., Kwon B. et al. Drug delivery, cell-based therapies, and tissue engineering approaches for spinal cord injury. *J. Control. Release* 2015; 219: 141-54.
4. Venkatesh I., Blackmore M.G. Selecting optimal combinations of transcription factors to promote axon regeneration: Why mechanisms matter. *Neurosci. Lett.* 2016; 652: 64-73.
5. An N., Xu H., Gao W. et al. Direct Conversion of Somatic Cells into Induced Neurons. *Mol. Neurobiol.* 2016; DOI: 10.1007/s12035-016-0350-0.
6. Seidlits C.M., Walther C. Gene Delivery Strategies to Promote Spinal Cord Repair. *Biomark. Insights* 2015; 10: 11; DOI: 10.4137/BMI.S20063.
7. Momin E.N., Mohyeldin A., Zaidi H. et al. Mesenchymal stem cells: new approaches for the treatment of neurological diseases. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2010; 5(4): 326-44.
8. Wang Y., Lu X., Chen K. et al. Immunotherapy strategies for spinal cord injury. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2015; 16(6): 492-05.
9. Main B.S., Minter M.R. Microbial Immuno-Communication in Neurodegenerative Diseases. *Front. Neurosci.* 2017; 11: 151; DOI: 10.3389/fnins.2017.00151.
10. Исламов Р.Р., Ризванов А.А., Черенкова Е.Е. и др. Исследование экспрессии рекомбинантных терапевтических генов в моноклеарных клетках крови пуповины, трансдуцированных тремя аденовирусными векторами, кодирующими нейротрофические факторы GDNF и VEGF и молекулу нейрональной адгезии NCAM. *Гены и Клетки* 2014; 9(3): 204-8.
11. Islamov R.R., Rizvanov A.A., Fedotova V.Y. et al. Tandem delivery of multiple therapeutic genes using umbilical cord blood cells improves symptomatic outcomes in ALS. *Mol. Neurobiol.* 2017; 54(6): 4756-63.
12. Sebastia J., Kieran D., Breen B. et al. Angiogenin protects motoneurons against hypoxic injury. *Cell Death Differ.* 2009; 16(9): 1238-47.
13. Исмаилов Ш.М., Барыкова Ю.А., Шмаров М.М. и др. Экспериментальный подход к генной терапии болезни двигательного нейрона с использованием генов гипоксия-индуцибельных факторов. *Генетика* 2014; 50(5): 591-601.
14. Povyshva T.V., Shmarov M.M., Logunov D.Y. et al. A Post-spinal cord injury astrocyte-mediated functional recovery in rats after intraspinal injection of the recombinant adenoviral vectors Ad5-VEGF and Ad5-ANG. *J. Neurosurg.: Spine* 2017; 27(1): 105-15.
15. Islamov R.R., Rizvanov A.A., Mukhamedyarov M.A. et al. Symptomatic improvement, increased life-span and sustained cell homing in amyotrophic lateral sclerosis after transplantation of human umbilical cord blood cells genetically modified with adeno-viral vectors expressing a neuro-protective factor and a neural cell adhesion molecule. *Curr. Gene Ther.* 2015; 15(3): 266-76.
16. Mukhamedshina Y.O., Garanina E.E., Masgutova G.A. et al. Assessment of glial scar, tissue sparing, behavioral recovery and axonal regeneration following acute transplantation of genetically modified human umbilical cord blood cells in a rat model of spinal cord contusion. *PLoS One* 2016; 11(3): e0151745.
17. Courtine G., Song B., Roy R. et al. Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord. *Nat. Med.* 2008; 14(1): 69-74.
18. Harvie D.S., Smith R., Hunter E.V. et al. Using visuo-kinetic virtual reality to induce illusory spinal movement: the MoOVi Illusion. *Peer J.* 2017; 5: e3023.
19. Niu J., Li C., Wu H. et al. Propidium iodide (PI) stains Nissl bodies and may serve as a quick marker for total neuronal cell count. *Acta Histochem.* 2015; 117(2): 182-7.
20. Солопова И.А., Селионов В.А. Влияние вибрации на возбудимость спинальных α -мотонейронов в статических условиях и во время вызванного шагания у человека. *Физиология человека* 2012; 38(2): 57-65.
21. Ноздрачев А.Д., Поляков Е.Л. *Анатомия крысы*. Санкт-Петербург: Издательство "ЛАНЬ"; 2001.
22. Song Z., Wang Z., Shen J. et al. Nerve growth factor delivery by ultrasound-mediated nanobubble destruction as a treatment for acute spinal cord injury in rats. *Int. J. Nanomedicine* 2017; 12: 1717-29.
23. Jones L.L., Oudega M., Bunge M.B. et al. Neurotrophic factors, cellular bridges and gene therapy for spinal cord injury. *J. Physiol.* 2001; 533(1): 83-9.
24. Zhu H., Poon W., Liu Y. et al. Phase III Clinical Trial Assessing Safety and Efficacy of Umbilical Cord Blood Mononuclear Cell Transplant Therapy of Chronic Complete Spinal Cord Injury. *Cell Transplant.* 2016; 25(11): 1925-43.
25. Ichim T.E., Solano F., Lara F. et al. Feasibility of combination allogeneic stem cell therapy for spinal cord injury: a case report. *Int. Arch. Med.* 2010; 3(1): 30.
26. Liu J., Han D., Wang, Z. Clinical analysis of the treatment of spinal cord injury with umbilical cord mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 2013; 15(2): 185-91.
27. Сафиуллов З.З., Гаранина Е.Е., Измаилов А.А. и др. Адресная миграция и выживание генетически модифицированных моноклеарных клеток крови пуповины человека после трансплантации G93A мышам с моделью бокового амиотрофического склероза. *Гены и клетки* 2015; 10(4): 86-9.
28. 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; 12(1): 1-21.
29. Liu Y., Figley S., Spratt S.K. et al. An engineered transcription factor which activates VEGF-A enhances recovery after spinal cord injury. *Neurobiol. Dis.* 2010; 37(2): 384-93.
30. Figley S.A., Liu Y., Karadimas S.K. et al. Delayed administration of a bio-engineered zinc-finger VEGF-A gene therapy is neuroprotective and attenuates allodynia following traumatic spinal cord injury. *PLoS One* 2014; 9(5): e96137.
31. Mukhamedshina Y.O., Shaymardanova G.F., Garanina E.E. et al. Adenoviral vector carrying glial cell-derived neurotrophic factor for direct gene therapy in comparison with human umbilical cord blood cell-mediated therapy of spinal cord injury in rat. *Spinal Cord* 2016; 54(5): 347-59.

Поступила: 10.04.2017