

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Измайлов Андрей Александрович

ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНГИОГЕННЫХ
ФАКТОРОВ И НЕЙРОНАЛЬНОЙ МОЛЕКУЛЫ АДГЕЗИИ НА
ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ
ИЗМЕНЕНИЙ В СПИННОМ МОЗГЕ КРЫСЫ ПОСЛЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ
КОНТУЗИОННОЙ ТРАВМЫ

3.3.3. – Патологическая физиология.

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
профессор Исламов Р.Р.

Саратов – 2021

Оглавление

Оглавление	2
ВВЕДЕНИЕ.....	6
Актуальность исследования.....	6
Цель и задачи исследования	9
Научная новизна.....	10
Научно-практическая значимость работы.....	12
Степень достоверности и апробация работы	13
Личный вклад автора	13
Структура и объем диссертационной работы	14
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1. Позвоночно-спинномозговая травма	15
1.2. Патоморфологические и патофизиологические аспекты травмы спинного мозга.....	18
1.2.1. Центральное ядро поражения.....	18
1.2.2. Астроцитарный рубец	18
1.2.3. Сохранная реактивная нервная ткань	19
1.2.4. Посттравматическая нейропластичность.....	20
1.3. Моделирование травмы спинного мозга	23
1.3.1. Модельные организмы	24
1.3.2. Модели травмы спинного мозга.....	25
1.3.3. Уровни поражения	26
1.4. Факторы нейропластичности.....	27
1.4.1. Нейтрофины	28
1.4.2. Ростовые факторы.....	29
1.4.3. Сосудистые факторы	30
1.4.4. Молекулы межклеточной адгезии.....	32
1.5. Генная терапия	33
1.5.1. Аденовирусы	33
1.5.2. Адено-ассоциированные вирусы	34
1.5.3. Лентивирусы	35

1.5.4. Вирусы простого герпеса.....	35
1.5.5. Невирусные векторные системы.....	36
1.6. Клеточная терапия	37
1.6.1. Эмбриональные стволовые клетки человека	37
1.6.2. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.....	38
1.6.3. Нейральные стволовые клетки.....	38
1.6.4. Мезенхимальные стволовые клетки	39
1.6.5. Обонятельные нейроэпителиальные клетки.....	40
1.6.6. Шванновские клетки	40
1.7. Доклинические исследования влияния клеток крови пуповины на восстановление спинного мозга у животных с ТСМ.....	41
1.8. Клинические испытания клеток крови пуповины для терапии ТСМ	44
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	49
2.1. Моделирование контузионной травмы спинного мозга.....	49
2.1.1. Предоперационный период и анестезия.....	49
2.1.3. Контузионная травма.....	50
2.1.3. Послеоперационный период.....	50
2.2. Поведенческие тесты.....	51
2.2.1. Тест «ВВВ».....	51
2.2.2. Тест «Ротарод»	53
2.3. Кинематика суставов	53
2.4. Электрофизиологические методы исследования.....	54
2.4.1. Электрическая стимуляция седалищного нерва.....	55
2.4.2. Магнитная стимуляция шейно-грудного отдела спинного мозга	55
2.5. Гистологические методы исследования спинного мозга	56
2.5.1. Приготовление криостатных срезов	57
2.5.2. Морфометрический анализ сохранности серого вещества ...	57
2.5.3. Морфометрический анализ сохранности белого вещества...	58
2.5.4. Иммунофлуоресцентное исследование спинного мозга.....	58
2.6. Получение генного препарата	60
2.7. Получение генно-клеточного препарата.....	61

2.7.1. Забор крови пуповины человека	62
2.7.2. Выделение моноклеарных клеток из крови пуповины.....	62
2.7.3. Трансдукция моноклеарных клеток крови пуповины	63
2.7.4. Анализ эффективности трансдукции моноклеарных клеток крови пуповины <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	64
2.8. Доставка рекомбинантных генов в спинной мозг крысы после моделирования контузионной травмы	66
2.9. Статистический анализ	66
ГЛАВА 3. ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СПИННОМ МОЗГЕ КРЫС ПОСЛЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ КОНТУЗИОННОЙ ТРАВМЫ.....	
3.1. Поведенческие тесты.....	68
3.2. Кинематика суставов	69
3.3. Электромиография скелетной мышцы	70
3.3.1. Игольчатая миография икроножной мышцы в ответ на электрическую стимуляцию седалищного нерва.....	72
3.3.2. Игольчатая миография икроножной мышцы в ответ на магнитную стимуляцию шейно-грудного отдела спинного мозга	74
3.4. Сохранность серого вещества	75
3.5. Сохранность белого вещества	76
3.6. Анализ иммунофлуоресцентного окрашивания спинного мозга.....	77
3.6.1. Белок теплового шока Hsp27	77
3.6.2. Синаптические белки	78
3.6.3. Клетки нейроглии	80
ГЛАВА 4. ДОСТАВКА РЕКОМБИНАНТНЫХ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ VEGF, ANG И NSAM В СПИННОЙ МОЗГ КРЫСЫ ПОСЛЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ КОНТУЗИОННОЙ ТРАВМЫ.....	
4.1. Анализ экспрессии рекомбинантных генов	84
4.1.1. Экспрессия репортерного гена зеленого флуоресцирующего белка в МККП <i>in vitro</i>	84

4.1.2. Экспрессия рекомбинантных генов <i>vegfl65</i> , <i>ang</i> и <i>ncam1</i> в МККП <i>in vitro</i>	85
4.1.3. Экспрессия репортерного гена зеленого флуоресцирующего белка (GFP) в спинном мозге крысы	86
4.1.3. Экспрессия рекомбинантных генов <i>vegfl65</i> , <i>ang</i> и <i>ncam1</i> в спинном мозге крысы с КТСМ	87
4.1.4. Экспрессия рекомбинантных генов <i>vegfl65</i> , <i>ang</i> и <i>ncam1</i> генетически модифицированными МККП в спинном мозге крысы с КТСМ	89
4.2. Оценка эффективности доставки рекомбинантных генов <i>vegfl65</i> , <i>ang</i> и <i>ncam1</i> на морфо-функциональное восстановление спинного мозга крыс с КТСМ.....	91
4.2.1. Поведенческие тесты	92
4.2.2. Кинематика суставов	93
4.2.3. Электромиография скелетной мышцы	94
4.2.4. Сохранность серого вещества	100
4.2.5. Сохранность белого вещества	102
4.2.6. Анализ иммунофлуоресцентного окрашивания спинного мозга	103
ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	119
ВЫВОДЫ.....	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	125
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	166

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Позвоночно-спинномозговая травма – тяжёлое, прогностически неблагоприятное повреждение костных структур позвоночника и спинного мозга, которое влечет за собой двигательные, чувствительные, вегетативно-трофические и психические расстройства [260]. Такого рода повреждение спинного мозга приводит к инвалидности, что становится причиной возникновения серьезных медико-социальных и экономических проблем. Сегодня медицинская наука предлагает базовые паллиативные и поддерживающие реабилитационные методы лечения, которые сочетаются с длительной по времени и дорогой по стоимости реабилитацией. К сожалению, такой подход не приводит к удовлетворительным клиническим исходам. Очевидно, что для повышения качества жизни пациентов с повреждением/травмой спинного мозга (ТСМ) необходима разработка новых технологий лечения ТСМ [258; 262; 263].

Большинство позвоночно-спинномозговых травм человека возникают при механических тягово-компрессионных усилиях, вторичных по отношению к острой проникающей травме или длительной компрессии, вызванной смещением фрагментов кости или материала межпозвоночного диска. Характерными особенностями являются: кровоизлияние, ишемическое повреждение и компрессия пораженного участка. Поражения можно сгруппировать по основным подтипам: (1) ушибы с мультифокальными зонами кровоизлияний и некроза, которые преобразуются в соединительно-тканые рубцы, (2) проникающие раны в результате попадания костных осколков или инородных тел, (3) травма и компрессионные повреждения с большими площадями рубца из глиальных клеток, и (4) заполненные жидкостью кисты, которые заменяют утраченные ткани [258; 260]. Каждый морфологический подтип характеризуется, как общими, так и специфическими патогенетическими механизмами развития. Это значит, что для правильного

выбора тактики лечения, необходимо исследовать патофизиологические механизмы и патоморфологические аспекты при различных формах ТСМ.

Среди активно разрабатываемых стратегий сдерживания дегенерации и стимулирования нейрорегенерации при ТСМ, наиболее перспективной представляется терапия с использованием генных конструкций, которая предполагает доставку в область эпицентра рекомбинантных генов, кодирующих нейротрофические факторы, например: нейтрофины (BDNF, NT-3, NT-4/5), ростовые факторы (FGF, GDNF, NGF), сосудистые факторы (VEGF, ангиогенин), молекулы межклеточной адгезии (NCAM) [45]. Нейротрофические факторы - это группа эндогенных и рекомбинантных экзогенных полипептидов, которые регулируют рост, выживание, дифференцировку и функционирование нейронов [129]. Эти факторы повышают выживаемость нейронов, активируют клетки нейроглии, чем сдерживают развитие патофизиологических и патоморфологических процессов и стимулируют процессы нейрорегенерации в спинном мозге после травматического повреждения. Известно, что нейротрофические факторы и их комбинации уменьшают выраженность воспалительной реакции и препятствуют развитию астроглиоза, способствуют ремиелинизации нервных волокон, росту аксонов и синаптогенезу [30; 58; 111; 181]. Представление о чувствительности и реактивности клеток ЦНС к различным нейротрофическим факторам имеет решающее значение при разработке терапии на основе рекомбинантных биологически активных белковых молекул [111]. Тогда очевидна необходимость выбора нейротрофических рекомбинантных молекул, таргентно воздействующих на конкретные патогенетические механизмы ТСМ.

Многообещающими факторами, поддерживающими жизни нейронов и клеток глии, считаются сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), ангиогенин (ANG) и нейрональная молекулы клеточной адгезии (NCAM). Молекулы VEGF, и ANG служат нейропротекторами с хорошо изученными механизмами сдерживания вступления клеток в апоптоз. Кроме того, VEGF и ANG играют важную роль в восстановлении микроциркуляции и

гематоэнцефалического барьера 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 аксонов и установление межклеточных контактов.

Еще одной важным вопросом стимулирования нейрорегенерации с помощью рекомбинантных биологически активных белковых молекул способ доставки этих молекул в область нейротравмы. Известно, что гематоэнцефалический барьер препятствует проникновению в ЦНС экзогенных пептидов. Поэтому доставка синтетических нейротрофических факторов, например, при внутривенном введении, не эффективна. Применение рекомбинантных нейротрофических молекул в нервную систему, даже при интратекальной доставке ограничено коротким периодом полураспада[261]. Поэтому сегодня для этих целей широко применяется технология генной терапии — доставка в нервную ткань рекомбинантной кДНК, кодирующей нейротрофический фактор, с помощью плазмидного или вирусного вектора. Такие генетические конструкции непосредственно вводят в организм (прямая генная терапия) или доставляют на клеточных носителях (клеточно-опосредованная генная терапия), например, с помощью стволовых или зрелых дифференцированных клеток. Генные или генно-клеточные конструкции могут быть доставлены в центральную нервную систему (ЦНС) разными способами: внутривенно, внутриартериально, интратекально, в желудочки головного мозга или в нервную ткань в области повреждения [58]. Но из всего многообразия способов доставки нейротрофических факторов в ЦНС, нельзя выбрать метод однозначный и рекомендованный.

Одним из многообещающих способов доставки рекомбинантных генов, кодирующих нейротрофические факторы в ЦНС, являются мононуклеарные клетки крови пуповины человека (МККП), так как они пригодны для алло- и ауто трансплантации у человека, характеризуются низкой иммуногенностью, доступностью, простотой получения и хранения. Сегодня МККП уже

используются в некоторых клинических испытаниях, в частности для лечения травмы спинного мозга [141; 172]. Очевидно, что трансплантация генетически модифицированных МККП, сверхэкспрессирующих рекомбинантные нейротрофические факторы, будет наиболее эффективным средством для сдерживания патофизиологических и патоморфологических процессов и стимулирования нейрорегенерации.

Таким образом, для решения поставленных фундаментальных и прикладных задач необходимо комплексное изучение патофизиологических механизмов ТСМ, а также обоснованный выбор генных и генно-клеточных конструкций, продуцирующих определенные нейротрофические факторы, и способ их доставки с целью восстановления спинного мозга после травматического повреждения.

Цель и задачи исследования

Цель исследования — установление механизмов морфо-функциональных нарушений у крысы с контузионной травмой спинного мозга и оценка эффективности интратекальной доставки в ЦНС рекомбинантных генов сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), ангиогенина (ANG) и нейрональной молекулы клеточной адгезии (NCAM) с помощью аденовирусных векторов и мононуклеарных клеток крови пуповины человека на посттравматическую регенерацию спинного мозга.

Исходя из цели были поставлены следующие конкретные задачи исследования:

1. Изучить морфо-функциональные нарушения у крысы с контузионной травмой спинного мозга с помощью
 - поведенческих тестов ВВВ, Ротарод и Тредмил;
 - электрофизиологических методов (вызванные моторные потенциалы в ответ на электрическую стимуляцию периферического нерва и на магнитную стимуляцию спинного мозга);

- гистологических методов (сохранность белого и серого вещества роstralное и каудальное места травмы, экспрессия маркеров клеток нейроглии и мотонейронов).

2. Получить генные и генно-клеточные препараты для коррекции патофизиологических и патоморфологических сдвигов в спинном мозге после травматического повреждения:

- получить генный препарат, содержащий смесь рекомбинантных репликативно-дефектных аденовирусов человека 5 серотипа, несущих по отдельности гены *vegfl65*, *ang* и *ncam1*;

- получить генетически модифицированные мононуклеарные клетки крови пуповины человека, сверхэкспрессирующие VEGF165, ANG и NCAM1;

- провести анализ экспрессии полученных препаратов *in vitro* и *in vivo*.

3. Оценить эффективность интратекальной доставки в ЦНС рекомбинантных генов, кодирующих VEGF, ANG и NCAM с помощью аденовирусных векторов на морфо-функциональное восстановление спинного мозга у крысы после моделирования контузионной травмы.

4. Оценить эффективности интратекальной доставки в ЦНС рекомбинантных генов, кодирующих VEGF, ANG и NCAM с помощью мононуклеарных клеток крови пуповины человека на морфо-функциональное восстановление спинного мозга у крысы после моделирования контузионной травмы.

Научная новизна

В настоящем исследовании были получены новые комплексные данные о патогенезе ТСМ у крысы через 30 суток после моделирования контузионной травмы спинного мозга. Впервые показано снижение двигательной активности (произвольная и вынужденная активность, объем движения в суставах) у животных в сочетании с патологическими изменениями М- и Н-ответов *m. gastrocnemius* при стимуляции седалищного нерва, образованием полостей в

сером веществе мозга и снижением площади миелина в белом веществе, снижением экспрессии синаптических белков (синаптофизин и PSD95) в нейронах, повышением экспрессии молекул клеточного стресса (белка теплового шока Hsp27), астроглиозом (увеличение количества GFAP-позитивных астроцитов и клеток микроглии), снижением миелинизации нервных отростков. Для коррекции этих изменений нами была осуществлена доставка в область нейротравмы трех рекомбинантных генов, кодирующих сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), ангиогенин (ANG) и нейрональная молекула клеточной адгезии (NCAM).

Впервые установлено, что интратекральное введение аденовирусных векторов, несущие кДНК генов *vegf*, *ang* и *ncam* или генетически-модифицированных моноклеарных клеток крови пуповины человека, экспрессирующие данные факторы, улучшает двигательную активность у крыс (высокие значения объема движения голеностопного сустава, высокие значения баллов в тесте «BBB», увеличение времени на ротароде), восстанавливает электрофизиологические характеристики вызванных потенциалов скелетных мышц задних конечностей в ответ на магнитную стимуляцию спинного мозга и электрическую стимуляцию *n. ischiadicus*. Данные генный (1/3Ad5-VEGF+1/3Ad5-ANG+1/3Ad5-NCAM) и генно-клеточный (МККП+1/3Ad5-VEGF+1/3Ad5-ANG+1/3Ad5-NCAM) препараты оказывают позитивное влияние на ремоделирование спинного мозга, характеризующееся более выраженной сохранностью серого и белого вещества, повышением экспрессии синаптических белков в нейронах, снижением иммуноэкспрессии молекул клеточного стресса, снижением астроглиоза и поддержанием миелинизации нервных отростков.

Впервые были получены данные об адресной миграции генетически-модифицированных моноклеарных клеток крови пуповины в область нейротравмы после ксенотрансплантации, а также количественной оценки выживаемости трансплантированных клеток и их способности к экспрессии рекомбинантных генов *vegf*, *ang* и *ncam* в спинном мозге крысы с ТСМ.

Научно-практическая значимость работы

Фундаментальное значение несут данные о патофизиологических и патоморфологических изменениях спинного мозга при контузионной травме. Анализ кинематики суставов, электрофизиологических данных игольчатой миографии и магнитной стимуляции на 30 сутки после контузионной травмы у крыс представляет интерес для понимания патогенеза нейродегенеративных процессов в спинном мозге. Выявленные гистологические изменения в объемах патологических полостей серого вещества, сохранности белого вещества, экспрессии синаптических белков (синаптофизин и PSD95) в нейронах, экспрессии молекул клеточного стресса (белка теплового шока Hsp27), астроглиоз (увеличение количества GFAP–позитивных астроцитов и клеток микроглии) и миелинизации нервных отростков дополняют существующие представления о механизмах нейродегенерации в спинном мозге.

Результаты о влиянии полученных генных (1/3Ad5-VEGF+1/3Ad5-ANG+1/3Ad5-NCAM) и генно-клеточных (МККП+1/3Ad5-VEGF+1/3Ad5-ANG+1/3Ad5-NCAM) препаратов на патогенез травмы спинного мозга у крыс могут быть использованы в качестве основы для создания клинического протокола эффективного способа нейрореабилитации пациентов с травмой спинного мозга. Также полученные результаты могут послужить базой для разработки лечения ряда социально-значимых заболеваний человека, к которым относятся нейродегенеративные заболевания и ишемические инсульты мозга.

Положение, выносимое на защиту:

Доставка комбинации рекомбинантных генов, кодирующих VEGF, ANG и NCAM, в равном соотношении с помощью аденовирусных векторов или моноклеарных клеток крови пуповины человека оказывает положительное влияние на морфо-функциональное восстановление спинного мозга после контузионной травмы.

Степень достоверности и апробация работы

Методы, выбранные для исследования, а также технические способы их решения современны, они соответствуют мировому уровню и помогают выполнить поставленные задачи. Используемые в работе молекулярно-генетические, иммунофлуоресцентные, морфометрические, гистологические и статистические методы исследования подтверждают достоверность полученных данных. Результаты диссертационного исследования были доложены на 82-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2017), IX Международном конгрессе «БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ» (Москва, 2017), III Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2017), 42nd FEBS Congress «From Molecules to Cells and Back» (Jerusalem, 2017), X Международной научной конференции «Бабухинские чтения» (Орел, 2017), IV Всероссийском научном медицинском форуме студентов и молодых ученых с международным участием «Белые цветы» (Казань, 2017), на 76-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2018), 26th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) (Lausanne, Switzerland, 2018), VI Всероссийском медицинском форуме студентов и молодых учёных с международным участием «Белые цветы» (Казань, 2019), 53rd Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation «The Clocks of Metabolism and Disease» (Portugal, 2019), IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019), VII Всероссийском медицинском форуме «Белые цветы», (Казань, 2021).

Личный вклад автора

Диссертант принимал личное участие в планировании и проведении экспериментальной работы. Все имеющиеся результаты, выводы и положения, выносимые на защиту, выполнены при личном участии автора. Соискатель

лично подготавливал к печати тезисы и статьи по теме диссертации, текст работы написан автором самостоятельно.

По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных библиографических базах Scopus и WoS. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 16-15-00010).

Структура и объем диссертационной работы

Диссертационная работа содержит 168 страницы печатного текста, состоит из 5 глав, а именно введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы, список литературы и список сокращений. Диссертация включает в себя 12 таблиц, 36 рисунков. Список литературы содержит 263 источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Позвоночно-спинномозговая травма

Позвоночно-спинномозговая травма (ПТСМ) — это повреждение позвоночника, сопровождающееся травмой спинного мозга, его образований и структур позвоночного канала, влекущее неврологические проявления соответственно уровню поражения [260]. Травматические повреждения спинного мозга сопровождаются не только соматическими и психическими расстройствами, но также влекут за собой социальные последствия, как для пациентов, так и для лиц, ухаживающих за ними. Данная патология выступает одной из ведущих причин инвалидизации взрослого населения вследствие отсутствия эффективных методов терапии неврологических осложнений. В мировой практике ежегодно регистрируются до 500 тыс. случаев ПТСМ. В частности, в крупных российских городах частота она составляет в среднем 0,6 на 10 000 населения. По России ежегодно регистрируется до 8 000 пострадавших [257].

При оценке глобальной заболеваемости ПТСМ, начиная с 1995 года, можно предположить, что она составляет от 10,4 до 83 случаев на миллион человек в год. В целом, между различными регионами имеются большие различия. Это может быть связано не только с истинными показателями, но и расхождениями в отчетности. По имеющимся данным, показатели распространенности заболевания в мире составляют от 236 до 4187 на миллион, однако эти показатели в значительной степени ограничены отсутствием опубликованных данных из Африки и Южной Америки и недостаточными данными из стран Азии. Демографически ПТСМ встречается в 3-4 раза чаще у мужчин, чем у женщин [68]. Возрастное распределение является бимодальным, здесь наибольший пик наблюдается в возрастной группе 15-29 лет, а второй пик — в возрастной группе более 65 лет [68]. По мере изменения общей

демографической ситуации в развитых странах, вероятно, что второй пик будет расти [252].

Согласно международной классификации AO/ASIF (по Denis F., 1976) ПТСМ делятся на типы: тип А — компрессионный перелом; тип В — перелом в результате distraction; тип С — ротационный механизм травмы. Важно, что общий элемент, объединяющий все типы переломов — контузия спинного мозга. В структуре заболеваемости ПТСМ тип А встречается от 54% до 70 %, это основной тип травмы у лиц, страдающих остеопорозом. Типы В и С встречаются в 16% и 19% случаях, соответственно. Они связаны, в основном, с дорожно-транспортными происшествиями и падениями [262].

В России наиболее частой причиной возникновения травм спинного мозга являются падения с высоты — 43,7%. На втором месте находятся ДТП — 29,5%. В остальном причинами могут быть ныряние на мелководье (17,5%), спортивная травма, прямого удара. В мировой статистике картина несколько другая: на первом месте — случаи ДТП, на втором — падения с высоты [262].

Структура распространённости ПТСМ различается по уровню полученной травмы. В шейном отделе самым частым является перелом C_2 — 24,1% всех переломов позвоночника, из них 13,8 % перелом зубовидного отростка и 10,3% перелом корней дуг (так называемый перелом палача) [80]. В грудном отделе наиболее часто ПТСМ встречается на уровне Th_{11} и Th_{12} — 17%), Th_7 - Th_8 — 5% [80]. Но самым частым отделом позвоночника, подвергающимся переломам, является поясничный отдел и поясничные позвонки. Это, к примеру, переломы на уровне L_1 , которые встречаются у 34,4% пострадавших [262].

Травма спинного мозга наблюдается у каждого второго пострадавшего с ПТСМ. По стандартной классификации ASIA, полная моторная и сенсорная недостаточность встречается у 15% всех случаев ПТСМ (тип А по шкале ASIA). Сохранение дистальной чувствительности с отсутствием движений наблюдается у 3% (тип В по шкале ASIA). Тип С встречается у 6%, здесь наблюдается сохранение чувствительности со слабыми неэффективными

сокращениями скелетных мышц. Неврологический дефицит с сохранением полезной двигательной функции встречается у 8% (тип D по шкале ASIA). Тип E констатируется при отсутствии какого-либо неврологического дефицита [258; 262].

В Российской Федерации лечение ПТСМ регламентируется приказом от 7 ноября 2012 года № 639н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при травме позвоночника, спинного мозга и нервов спинного мозга». В перечень лечебных подходов входит декомпрессия спинного мозга, использование антибиотиков, глюкокортикоидов, блокаторов гистаминовых рецепторов, анальгетики, пара-симпатомиметики и адреномиметики. После острого периода таким пациентам показана реабилитация, которая включает в себя лечебную физкультуру, различные тренировки с обратной связью, механотерапию с использованием чрескожной электростимуляции, гидрокинезиотерапию. Для эффективного лечения ПТСМ необходимо применять не только практические навыки, но и активно разрабатываемые новые методы лечения ПТСМ, будь то оказание квалифицированной неотложной помощи, а также инновационные подходы улучшения функционального восстановления пациентов [234]. Однако, показатели летальности и инвалидизации у пациентов с ПТСМ остаются высокими. Так, летальность при ПТСМ составляет 20,6% у мужчин и 10,5% у женщин и имеет два пика — первый пик в острый период (до 3 мес) и второй пик — через 24 месяца. Как следствие, высокая летальность и инвалидизация пациентов с ПТСМ приводит к большим экономическим потерям [262; 263].

Таким образом, можно констатировать, что ПТСМ чаще всего встречается у лиц мужского пола, трудоспособного возраста. Самыми частыми причинами являются падения с высоты и ДТП. Общим механизмом для всех типов переломов является контузия спинного мозга. По уровню возникновения переломов, чаще страдают нижние грудные и верхние поясничные позвонки. Недостаточная эффективность лечения и реабилитации таких пациентов требует разработки новых методов и подходов терапии ПТСМ.

1.2. Патоморфологические и патофизиологические аспекты травмы спинного мозга

Независимо от причин или величины повреждения спинного мозга, сформированную область поражения можно разделить на три зоны, которые имеют уникальную патоморфологическую картину: (1) центральное ядро поражения, часто является фиброзным рубцом; (2) астроглиальный рубец, который непосредственно окружает ядро поражения; и (3) зона жизнеспособной реактивной нервной ткани [169].

1.2.1. Центральное ядро поражения

Повреждение клеток после травмы спинного мозга (ТСМ) происходит в результате воздействия физических сил (размозжение, разрывы, отек), ишемии и активации воспалительной реакции [34]. Значительное повреждающее действие также оказывают токсичные продукты распада клеток. Множественные адаптивные механизмы включаются с целью сохранения неповрежденной нервной ткани. Клетки микроглии и астроциты первыми активируются в ответ на травму и с помощью секретируемых факторов роста, цитокинов и хемокинов мобилизуют другие клеточные типы для участия в репаративном процессе [105]. Периваскулярные стромальные клетки, менингеальные фибробласты и перициты активно пролиферируют и секретируют компоненты внеклеточного матрикса [107; 171], формируя центральное ядро поражения. Кроме соединительнотканых клеток в ядре присутствуют многочисленные макрофаги, нейтрофилы, лимфоциты и другие лейкоциты, качественный состав которых изменяется со временем.

1.2.2. Астроцитарный рубец

Начиная с 1-2 дня после ТСМ и примерно до 7-10 дня, астроциты активно пролиферируют и мигрируют к границам формирующегося центрального ядра

[79]. Новообразованные астроциты тесно переплетаются и организуют пограничную зону вокруг воспаленного ядра поражения. Образование астроцитарного рубца вокруг центрального ядра завершается через 2-3 недели после ТСМ [97]. Границы астроцитарного рубца имеют структурное и функциональное сходство с пограничной глиальной мембраной (*glia limitans*), образованной астроцитами вдоль всех менингеальных оболочек и кровеносных сосудов ЦНС [201]. Функционально, астроцитарный рубец отграничивает воспалительные клетки внутри зоны поврежденной ткани и защищает смежную жизнеспособную нервную ткань, поэтому его потеря или дисфункция приводит к увеличенному распространению воспаления, приводящему, в свою очередь, к большему поражению нервной ткани и неблагоприятному функциональному исходу [97; 201]. Как и границы пограничной глиальной мембраны вдоль мозговых оболочек, границы астроцитарного рубца тонкие, их толщина составляет всего несколько клеточных слоев [169]. Поэтому доля астроцитарного рубца небольшая, по сравнению со всем объемом поражения. На внешней границе глиального рубца астроциты контактируют с реактивными прогениторными олигодендроглиальными клетками (NG2-ОПК), экспрессирующими хондроитинсульфат протеогликан 4 (также известный как нейронный глиальный антиген 2 [NG2]).

1.2.3. Сохранная реактивная нервная ткань

Снаружи непрерывная граница астроцитарного рубца окружена зоной сохраненной реактивной нервной ткани, содержащей все структурные элементы нормально функционирующей нервной ткани. Она распространяется от границы астроцитарного рубца во все направления, а также может достигать значительных размеров. Такая ткань характеризуется наличием реактивной глии, включая астроциты, микроглию и предшественников олигодендроцитов (NG2-ОПК), содержание которых постепенно снижается в дистальном от ядра направлении. Гипертрофированные реактивные астроциты в сохранной ткани

активно взаимодействуют с функционирующими нейронами, повышая их жизнеспособность [169].

Пятьдесят лет назад Raustman и др. впервые показал, что после вызванной травмы в области переднего мозга у крыс, при потере одних синаптических входов, начинают спонтанно формироваться новые синаптические связи [178]. Сегодня известно, что этот тип реорганизации межнейронных контактов происходит спонтанно после всех форм повреждения ЦНС, в том числе после ТСМ, и что он может быть связан с адаптивными или неадаптивными функциональными изменениями. После анатомически полной или неполной ТСМ была установлена потеря синаптических связей в сохранный реактивной ткани. Такая потеря приводит к образованию новых связей, они образуются непосредственно за счет локальных сохранившихся нервных терминалей или прорастающих в эту зону аксонов [86]. Иногда такая реорганизация межнейронных связей может привести к дезадаптивным последствиям, таким как: мышечная спастичность [188], вегетативная дисрефлексия [115] или нейропатическая боль [163]. В других случаях спонтанная реорганизация может быть адаптивной и способствовать восстановлению функции после неполной ТСМ, как в случае спонтанного двустороннего восстановления опорно-двигательного аппарата, например, после односторонней гемисекции спинного мозга (Brown-Séguard syndrome), несмотря на потерю нисходящих супраспинальных связей на стороне поражения [155]. Таким образом, научные сведения о посттравматических клеточных и молекулярных механизмах, лежащих в основе нейродегенеративных процессов, приближают нас к возможности разрабатывать принципы патогенетической терапии ТСМ.

1.2.4. Посттравматическая нейропластичность

ТСМ сопровождается разрывами нервных проводников с последующей различной реакцией поврежденных аксонов: (а) дегенерация и ретракция аксонов, (б) прорастание аксонов через центральное ядро поражения, (в)

проращение аксонов через сохранную реактивную нервную ткань, (г) установление синаптических контактов [237]. Поэтому стратегии лечения, направленные на стимулирование нейрорегенерации, должны основываться на понимании того, как различные формы роста аксонов регулируются различными специфическими молекулярными механизмами [183]. При этом механизмы ингибирования роста аксонов в области травмы также обращают на себя особое внимание [106; 185].

После ТСМ на рост аксонов оказывают активное влияние микроглия, астроциты, NG2-ОПК, фибробласты, макрофаги и другие клетки иммунной системы. Различные типы клеток присутствуют в разных отделах поражения. Астроциты присутствуют в двух отделах поражения при ТСМ, в астроцитарном рубце и в сохранной реактивной ткани. Фенотип и функция астроцитов принципиально различаются в этих двух зонах [134]. Астроциты, формирующие рубец, ограничивают воспаление и отделяют центральное ядро поражения от соседней функционирующей нервной ткани [202]. Рубцовые астроциты долгое время считались основной причиной неспособности аксонов ЦНС регенерировать [199], но этот аспект в настоящее время оспаривается исследованиями, показывающими возможность роста аксонов через астроцитарный рубец в спинном мозге [22]. Ни предотвращение образования астроцитарных рубцов, ни удаление хронических рубцов не приводит к спонтанной регенерации аксонов нисходящих моторных, восходящих сенсорных аксонов [22]. Рубцовые астроциты экспрессируют поддерживающий рост аксонов матричный белок ламинин, а блокада антител ламинин-интегринового связывания ослабляет стимулированную регенерацию аксонов после ТСМ [22]. Также зрелые поврежденные аксоны ЦНС прорастают вдоль астроцитов после повреждения ЦНС при стимуляции соответствующими факторами роста [162] или активации специфических генов [51]. Целенаправленное нарушение образования рубцов астроцитами ослабляет стимулированную регенерацию аксонов после ТСМ [53]. Таким образом, астроцитарные рубцы могут способствовать, а не препятствовать регенерации

аксонов. Реактивные астроциты в сохранной реактивной ткани при ТСМ также участвуют в индуцировании локального роста аксонов и синаптогенеза [134].

Предшественниками олигодендроцитов NG2-ОПК, как и астроциты, присутствуют в астроцитарном рубце и сохранной реактивной нервной ткани [70; 165]. На границе глиального рубца гипертрофированные NG2-ОПК ограничивают дегенерацию и поддерживают рост аксонов [102]. В других работах было также показано положительное влияние NG2-ОПК на рост аксонов [16; 110; 196].

Центральное ядро ТСМ состоит главным образом из перицитов и клеток фибробластного происхождения [5; 171]. Произведенные этими клетками молекулы имеют аксон-ингибирующие свойства *in vitro*, включая некоторые коллагены и протеогликаны хондроитина сульфата (CSPGs) [177]. Тем не менее, недостаточная способность роста аксонов через очаг поражения может зависеть не только от наличия предполагаемых ингибиторов роста, но и от отсутствия необходимых молекул, стимулирующих рост аксонов. Рост аксонов регулируется четырьмя основными типами молекулярных сигналов: диффузные хемоаттрактанты, контактные хемоаттрактанты, диффузные хеморепелленты и контактные хеморепелленты [215]. Рецепторно-опосредованные эффекты в конусах роста на присутствие, или отсутствие молекулярных сигналов вместе влияют на потенциальный рост аксона [37; 145].

Диффузные хемоаттрактанты впервые были отмечены в регуляции регенерации аксона в ЦНС Cajal и Tello, которые показали, что (а) рассеченные аксоны ЦНС прорастают в периферические нервные трансплантаты, (б) удаление клеток хлороформом в трансплантатах предотвращает регенерацию аксонов в них, и (в) химические экстракты, полученные из периферических нервов и загруженные в целлюлозную матрицу, стимулируют рост аксонов ЦНС *in vivo* [65]. К контактными хемоаттрактантами относятся ламинины, синдеканы и сульфат гепариновые протеогликаны [152; 236]. Здесь рост аксонов детерминирован не только привлекающими факторами, но и отталкивающими. При этом диффузные хеморепелленты, например, семафорины и нетрины [112]

могут быть отталкивающими для одних аксонов, но привлекающими для других [152]. Контактное ингибирование роста аксонов активно изучается и в отношении миелин-ассоциированных молекул и CSPGs [177; 179; 206]. Возможность этих молекул ингибировать или полностью останавливать рост аксонов доказано *in vitro* [207]. Тем не менее, их роль *in vivo* в травмированной ЦНС находится в процессе установления. Также NG2 (продукт *Cspg4*) – может ингибировать рост аксонов *in vitro*, но в исследованиях *in vivo* показано, что отрастание аксонов осуществляется при наличии NG2 и, что блокирование *Cspg4* не вызывает спонтанной регенерации аксонов [70; 102; 110; 165]. Ферментативное удаление или блокада CSPGs не обеспечивает спонтанного прорастания аксонов через центральное ядро при анатомически полных ТСМ [16].

Потеря синаптических связей в результате травмы в сохранной реактивной ткани ЦНС спонтанно ведет к формированию новых синапсов, формирующихся из локальных сохранившихся терминалей и из прорастающих аксонов. Эта спонтанная синаптическая пластичность может быть связана с адаптивными и с дизадаптивными эффектами, которые могут представлять важные цели для терапии. Важную роль в синаптогенезе после ТСМ играют клетки микроглии и астроциты [160]. Микроглия, с помощью нескольких компонентов системы комплемента и через рецептор CX3CR1 участвует в формировании синаптических связей в условиях травмы [114]. Астроциты положительно влияют на процессы синаптогенеза [103], они секретируют тромбоспондины, гликаны, и хевин для активации формирования и активности синапсов [46; 55]; освобождают фактор диффузного роста аксонов семафорин-3а – для координации их направления аксонов [21]; секретируют молекулы внеклеточного матрикса, такие как тенасцины и сульфат протеогликанов, формирующих перинейрональную сеть и поддерживающих нейропластичность [21].

1.3. Моделирование травмы спинного мозга

Первые описания причин и симптомов повреждения спинного мозга можно встретить в древнеегипетском папирусе Эдвина Смита, который датируется XVII веком до н.э. [153]. Тем не менее, способы борьбы с последствиями повреждения спинного мозга были подвергнуты систематическим исследованиям на подопытных животных только во второй половине прошлого века [18]. Непрерывно развивающееся понимание процессов нейродегенерации и нейрорегенерации, а также сложных иммунологических, воспалительных и рубцобразующих реакций, которые происходят в ответ на повреждение ЦНС, привело к разработке потенциальных фармакологических методов лечения этих повреждений [200]. Эти подходы, самостоятельно или в сочетании с другими стратегиями, например, биотехнологическими (клеточная и генная терапия), дают надежду на то, что травма спинного мозга станет излечимой патологией [42; 61; 205]. Для апробации и оценки эффективности разрабатываемых подходов лечения существует множество моделей ТСМ, отличающихся тяжестью и уровнем травмы, и видами используемых лабораторных животных.

1.3.1. Модельные организмы

Первоначально ТСМ моделировали на кошках, собаках и обезьянах. Результаты этих исследований имели противоречивый характер [200; 216; 228], а клинические испытания, основанные на этих наблюдениях, были неудовлетворительными. В этой связи исследователи стали искать более стандартизированные и менее дорогостоящие модельные организмы, поэтому начали активно использовать в этих целях грызунов [36; 101]. Однако развитие патологических процессов в спинном мозге после травмы отличаются у мышей и крыс. Так у мыши при ТСМ не образуются кисты и даже после полного пересечения спинного мозга может происходить его умеренная регенерация [128], что не встречается у крыс [243]. У крыс с ТСМ, как и у человека, формируются патологические кисты ростральнее и каудальнее места повреждения [8], а при разрывах спинного мозга двигательная и чувствительная

функции никогда не восстанавливается [137]. Приведенные сравнения показывают, что крысы предпочтительнее для моделирования повреждения спинного мозга, чем другие животные. Однако, трансгенные мыши остаются важным объектом для изучения роли специфических генов в патогенезе ТСМ [137].

1.3.2. Модели травмы спинного мозга

Большинство типов повреждений спинного мозга, наблюдаемых у людей, могут быть воспроизведены у взрослых крыс. К ним относятся полные и неполные повреждения спинного мозга на разных уровнях. По результатам мета-анализа, проведенным Sharif-Alhoseini и др. среди 2087 работ за последние 70 лет, наиболее часто в работах встречалась контузионная модель (43,4%), трансекция (34,4%), компрессия (20,5%). Более редкими были дислокационная (1,2%) и аспирационная (0,5%) модели [18].

Трансекционная модель предполагает полную перерезку спинного мозга [18; 52; 203]. Такие повреждения могут быть получены с помощью скальпеля или ножниц и могут моделировать определенные формы травм у человека, например, ножевые ранения [52]. Модель перерезки спинного мозга применяют для изучения регенерации аксонов и разработки методов использования биodeградируемых материалов для заполнения полости между проксимальным и дистальным концами спинного мозга [195]. Благодаря полному отключению от двигательных центров головного мозга, эта модель также подходит для изучения роли проприоспинальных и сенсорных систем в восстановлении локомоции после ТСМ [195]. Гемисекция, или частичная перерезка спинного мозга, является одним из вариантов трансекции [13; 137]. Эта модель характеризуется меньшей тяжестью и сохранением потенциала спонтанного восстановления, что позволяет ее применять для оценки эффективности новых способов терапии ТСМ [137].

Компрессионные травмы обычно моделируют с помощью зажима, щипцов, или баллона, который вставляют в спинномозговой канал [7; 84]. Длительная компрессия усугубляет исход травмы, поэтому было показано, что декомпрессия уменьшает вторичную патологию и способствует восстановлению [60; 187]. Исследования у пациентов с ТСМ доказали положительный эффект декомпрессионных мер при соответствующих формах повреждения спинного мозга [224].

Важное клиническое значение имеет модель контузионной травмы спинного мозга, которую вызывают кратковременным физическим воздействием, в виде удара по открытому спинному мозгу. Существует три типа устройств, которые могут вызвать контузию спинного мозга у животных: импактор для сброса определенного веса, электромагнитный ударник и пневматический пистолет [13]. Контузионная модель вызванная импактором, впервые была представлена Gruner и др. в Нью-Йоркском университете в 1992 году [100]. Первоначально ударный элемент включал в себя металлический стержень весом 10 грамм, который сбрасывался на открытый спинной мозг с определенной высоты [13]. Эта модель позволяла дозировать тяжесть ТСМ, регулируя высоту, по которой стержень падал на спинной мозг [100]. Другими словами, такие параметры, как вес металлического стержня, площадь его сечения и высота падения, хорошо стандартизируются для моделирования контузионной ТСМ. Вместе с тем, известны и ограничения в отношении различных импакторов, они связаны с невозможностью контролировать «отскок» стержня, что может привести к многократным ударам [203].

1.3.3. Уровни поражения

Одним из наиболее часто травмируемых участков позвоночника у человека является шейный отдел. Однако этические и медицинские доводы не позволяют моделировать двусторонние травмы на уровне шейных позвонков у крыс, поскольку они парализуют передние и задние конечности. При этом,

определенные односторонние повреждения на уровне шейных позвонков могут быть изучены. С другой стороны, цервикальные модели ТСМ достаточно интересны в изучении, так как дают явные клинические проявления, напоминающие таковые у человека [18].

Согласно данным Sharif-Alhoseini и др., наиболее часто ТСМ моделируют в грудном отделе животных (81%) [18]. Литературные данные также свидетельствуют о возможности стандартизации и воспроизводимости ТСМ в грудном отделе [13; 137]. На уровне нижних грудных позвонков ТСМ вызывает полный паралич задних конечностей и соответствующие нарушения функций вегетативной системы. При условии, что будет оказываться уход, к примеру, помощь в опорожнении мочевого пузыря, лечение мочевых инфекций и язв, на таких животных можно проводить эксперимент в течение нескольких месяцев [137].

Повреждения также могут быть смоделированы в поясничном, или даже крестцовом отделах спинного мозга крысы. Повреждения крестца у крысы, как правило, вызывают симптомы, которые ограничены нарушениями движения хвоста. Поскольку положение хвоста и типы его движений характерно связаны с различными формами локомоции у крыс, то такие повреждения могут использоваться для оценки эффективности посттравматического восстановления на фоне лечения [76].

В заключение следует отметить, что, хотя существующие модели животных не обобщают все клинические аспекты ТСМ у человека, наиболее актуальной и часто используемой моделью для понимания механизмов нейродегенерации и нейрорегенерации считается контузионная модель спинного мозга на уровне нижних грудных позвонков.

1.4. Факторы нейропластичности

Существует широкий спектр нейротрофических факторов и молекул с нейропротекторным действием, обеспечивающий нейропластичность спинного мозга после травмы [58]. Данные факторы повышают выживаемость нейронов,

способствуют росту аксонов и синаптогенезу. Разные типы нервных клеток с их специфической протяженностью аксонов и дендритов экспрессируют разные типы рецепторов к нейротрофическим факторам, и поэтому они могут быть преимущественно чувствительными к конкретному фактору или комбинации факторов [234]. Например, особый интерес представляют нейроны спинного мозга, участвующие в сегментарных или ближних межсегментарных связях и которые способны создать нейронную сеть через центральное ядро повреждения [32]. Кроме того, нейротрофические факторы модифицируют также фенотипические характеристики клеток нейроглии, которые способствуют сдерживанию развития негативных посттравматических последствий [30; 58; 111; 181]. Знание специфической чувствительности и реактивности клеток ЦНС к различным видам молекул с нейропротекторным действием имеет решающее значение при разработке терапии на основе нейротрофических факторов [111].

1.4.1. Нейтрофины

Семейство четырех структурно связанных белков-нейротрофинов состоит из нейротрофического фактора мозга (BDNF), нейротрофина-3 (NT-3), фактора роста нервов (NGF) и нейротрофина-4/5 (NT-4/5). Все они играют важную роль в развитии периферической и центральной нервной системы, выживании клеток, дифференцировке, росте аксонов, миелинизации, синаптической пластичности в течение всей жизни [32; 67; 113; 133].

BDNF широко используется в экспериментальной модели TCM, как нейропротекторный фактор [139; 148]. Данные также указывают на то, что BDNF обладает мощным антиоксидантным действием и может участвовать в регуляции иммунного ответа после TCM [148]. Не все типы нейронов чувствительны к BDNF [198], поэтому некоторые исследователи сообщают об отсутствии эффектов BDNF на травмированный спинной мозг [29; 147].

Положительное действие NT-3 было установлено после его введения в область повреждения сразу или вскоре после TCM [66; 75; 168]. Наименее

протестированные в моделях TCM, NGF и NT-4/5, почти всегда доставлялись сразу после моделирования травмы [25; 77; 210]. Эффективность NGF доказана в отношении усиления роста чувствительных нервных отростков [77].

1.4.2. Ростовые факторы

Факторы роста фибробластов (FGF) – это большое семейство гепарин-связывающих белков, которые участвуют в эмбриональном развитии, ангиогенезе и заживлении ран. FGF взаимодействуют с мембраносвязанными протеогликанами и активируют различные подтипы своих рецепторов. FGF1 (кислый, aFGF) и FGF2 (основной, bFGF) были активно изучены на предмет их потенциального применения для терапии TCM [111]. FGF1 или FGF2 вводили вблизи очага поражения после контузионной травмы или гемисекции, обычно в грудном отделе [49; 50; 64; 182]. Как правило, интратекальное введение включает использование осмотических насосов для непрерывной доставки FGF в эпицентр (или в область около него) в течение нескольких дней или недель [73]. FGF также доставлялся в сочетании с трансплантацией шванновских клеток или фрагментов периферического нерва, или в составе геля, желатина и фибринового клея [49; 64; 182].

GDNF – глиальный нейротрофический фактор, который способствует выживанию многих типов нейронов и, в частности, спинного мозга [249]. В большинстве экспериментальных исследований GDNF доставляли в область места повреждения (грудного отдела) спинного мозга немедленно, сразу после моделирования TCM с помощью осмотической помпы [91], в составе скаффолда из коллагена [3], или из геля [221], наночастиц [44], путем инъекции вирусного вектора [96], или генетически модифицированных клеток [126]. Положительные эффекты GDNF на восстановление спинного мозга включали: уменьшение объема повреждения, снижение реактивности астроцитов и воспалительной реакции, активный рост аксонов [3; 91; 221; 249].

1.4.3. Сосудистые факторы

VEGF (также известный как VEGF-A или сосудистый эндотелиальный фактор роста) является основным членом семейства факторов роста VEGF [244]. У млекопитающих семейство VEGF включает VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E и плацентарный фактор роста (PlGF). Члены семейства VEGF связываются с рецепторными тирозинкиназами VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) и VEGFR-3 (Flt-4). VEGF также могут взаимодействовать с рецепторами семейства нейропилинов (NRP) – NRP1 и NRP2, которые функционируют в качестве ко-рецепторов для VEGFR. VEGF связывается с VEGFR-1, VEGFR-2, NRP-1 и NRP-2; VEGF-B связывается с VEGFR-1 и NRP-1; PlGF связывается с VEGFR-1, NRP-2 и NRP-1; и VEGF-C и VEGF-D взаимодействуют с VEGFR-3, VEGFR-2, NRP-1 и NRP-2 [244].

VEGF наиболее известен своей ролью в ангиогенезе, стимулировании пролиферации и миграции эндотелиальных клеток и повышении проницаемости сосудов [186]. Члены семейства VEGF также вовлечены в лимфангиогенез (образование лимфатических сосудов), гемопоз и пролиферацию, выживание клеток, экспрессирующих VEGFR или NRP, включая нервные клетки. Так, в ЦНС VEGF не только влияет на состояние сосудистой сети, но и является нейротрофическим фактором для различных типов нервных клеток [38; 186; 244].

VEGF также оказывает митогенное воздействие на астроциты [170], экспрессирующих рецептор Flt1 [245]. Введение VEGF в органотипические культуры фетального и постнатального кортикального эксплантата вызывает значительное увеличение астроглиальной пролиферации [223; 244]. Через Flt1 VEGF индуцирует пролиферацию и клеток микроглии [246]. Шванновские клетки экспрессируют Flt1, Flk1 и Nrp1, но влияние VEGF на миграцию шванновских клеток, по-видимому, опосредовано Flk1, так как добавление нейтрализующего антитела против Flk1 полностью блокирует VEGF-индуцированную миграцию [170].

В различных моделях ТСМ показано, что VEGF сдерживает апоптоз мотонейронов, увеличивает плотность кровеносных сосудов и приводит к значительному улучшению неврологического исхода [82; 204; 235; 254]. Стимулирующее влияние VEGF на ангиогенез представляется важным для устранения эффекта посттравматической ишемии ткани [246].

Другим мощным эндотелиальным митогеном, который, как и VEGF обладает нейропротекторным действием, является ангиогенин. Ангиогенин принадлежит к суперсемейству РНКазы А [17; 56]. Он представляет собой белок с молекулярной массой 14 кДа, состоящий из 123 аминокислот, который индуцирует ангиогенез и неоваскуляризацию. Это был первый зарегистрированный ангиогенный белок, охарактеризованный Fetz и др. в 1985 г. [131]. Ангиогенин продуцируют эндотелиальные клетки, гладкомышечные клетки, фибробласты, опухолевые клетки [164]. В клетках-мишенях ангиогенин транслоцируется в ядро, где он регулирует экспрессию генов, контролирующих пролиферацию эндотелиальных клеток, путем активации путей ERK, Akt и SAPK/JNK.

Повреждения сосудов, ишемия и нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) способствуют вторичному повреждению после ТСМ [58]. Очевидно, что ангиогенин, как и VEGF, является потенциальным терапевтическим агентом при ТСМ. Действительно, в экспериментах было показано, что ангиогенин способствует сохранению сосудистой сети в эпицентре повреждения [164]. В другом исследовании применение комбинации ангиогенина и VEGF после ТСМ продемонстрировало снижение отека и проницаемости ГЭБ, что привело к улучшению двигательной функции [140]. Важно отметить, что комбинация разных ангиогенных факторов вызывает синергетический эффект. Одновременное введение двух аденовирусных векторов, кодирующих VEGF и ангиогенин, в скелетные мышцы спины и задних конечностей мыши с моделью бокового амиотрофического склероза сдерживало развитие симптомов заболевания, поддерживало двигательную активность и продлевало жизнь животных [1].

Аналогичная комбинация терапевтических генов в клиническом испытании на пациентах с боковым амиотрофическим склерозом способствовала увеличению продолжительности их жизни [93].

1.4.4. Молекулы межклеточной адгезии

В головном мозге позвоночных животных главные трансмембранные молекулы межклеточной адгезии Ig-суперсемейства включают нейрональную молекулу клеточной адгезии (NCAM) и семейство молекул межклеточной адгезии, связанных с L1, таких как NgCAM (молекула адгезии нейрон-глиальных клеток) и NrCAM (связанная с NgCAM)/BRAVO). NCAM был открыт в 1978 году двумя различными научными группами Yorgensen и др. и Mukoyama и др. [247]. Альтернативный сплайсинг гена NCAM позволяет получить 27 различных мРНК. Три основные изоформы NCAM, а именно: NCAM 180, NCAM 140 и NCAM 120 кДа являются результатом модификации трансмембранной и цитоплазматической области С-конца белка [39; 250].

Субстраты, покрытые NCAM, позволяют удлинять нейриты, рост которых происходит через гомофильное связывание NCAM и гетерофильное связывание NCAM с другими молекулами адгезии, такими как молекулы адгезии-L1 или молекулы внеклеточного матрикса [251]. Межклеточные взаимодействия, опосредуемые NCAM, в нейроонтогенезе и посттравматической регенерации обеспечивают выживание и миграцию нейронов, направленный рост нейритов, синаптогенез. Кинетика взаимодействия молекул NCAM зависит от количества молекул и степени их гликозилирования (связывания с полисиаловой кислотой). Полисиалированная форма NCAM выступает в роли нейропротектора и способствует нейрорегенерации [247; 250]. Через цитозольный домен NCAM участвует в разных внутриклеточных сигнальных каскадах (протеинкиназа А, протенинкиназа С, кальций/кальмодулин зависимая киназа, спектрин, GAP43, PI3, цГМФ каскады) [58; 250]. Мутации гена *ncam* приводят к неврологическим расстройствам, связанным с аномалиями развития и нарушением функции синапсов [247].

1.5. Генная терапия

Вирусные векторы в настоящее время – наиболее широко используемая система доставки в ЦНС рекомбинантных генов, экспрессирующих необходимые для коррекции определённой патологии биологически активные белковые молекулы [94]. Вирусные векторы через специфические мембранные рецепторы проникают в клетки-мишени, где происходят синтез мРНК трансгена с последующей трансляцией белка. Чаще всего, для доставки рекомбинантных генов в ЦНС применяют векторы на основе аденовируса, аденоассоциированного вируса, лентивируса и вируса простого герпеса [94].

1.5.1. Аденовирусы

Аденовирусы (Ad) – это двухцепочечные ДНК-вирусы, имеющие высокую эффективность трансдукции большинства клеточных типов и не способные к интеграции в ядерный геном клетки-хозяина [59]. По этой причине, эти векторы не могут повлиять на экспрессию онкогенов или генов-супрессоров опухолей, что подтверждает его биобезопасность. При этом активная экспрессия трансгена, в составе аденовирусного вектора, продолжается до 3 недель. Вирусные векторы, полученные из аденовируса 5 серотипа, наиболее часто используются сегодня в клинических испытаниях (~26%) благодаря своей способности трансдуцировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки [57; 78]. Основным недостатком аденовирусных векторов считается их способность вызывать иммунный ответ хозяина, описанный различными научными группами [57; 59; 124; 154]. Первая в мире комбинированная векторная вакцина «Гам-КОВИД-Вак» (Спутник V) для профилактики коронавирусной инфекции COVID-19, разработанная Национальным исследовательским центром эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи создана на основе аденовирусных векторов – 1 компонент на основе аденовируса 26 серотипа (Ad26), а 2-ой компонент – 5 серотипа

(Ad5). Оба аденовирусных вектора несут ген S-белка коронавируса SARS-CoV-2 [149; 190; 191].

После моделирования TCM, аденовирусные векторы активно применяют для доставки трансгенов, кодирующих нейротрофические факторы, как путем прямой инъекции вирусных векторов в ткань мозга или цереброспинальную жидкость, так и с помощью клеточных носителей [83]. Следует отметить, что введение аденовирусов в область повреждения может привести к дополнительной травме [214]. Ретроградный способ доставки вирусных векторов в ЦНС предполагает, например, их внутримышечную инъекцию [213; 218].

1.5.2. Адено-ассоциированные вирусы

Отсутствие или наличие специфических мембранных рецепторов определяет способность различных вирусов проникать в определенные типы клеток. Высокая эффективность трансдукции нервных клеток была установлена для векторов на основе аденоассоциированного вируса (AAV). AAV (одноцепочечные ДНК-вирусы) способны к более продолжительной, чем Ad экспрессии трансгенов в медленно делящихся или неделящихся клетках с умеренной активацией иммунного ответа хозяина [11]. Эти характеристики расширили возможность использования аденоассоциированных векторов в качестве систем прямой доставки трансгенов, кодирующих нейротрофические факторы, в ЦНС [10]. Сегодня AAV серотипа 2 (AAV-2) является наиболее широко используемым AAV благодаря его непатогенности для человека, способности инфицировать широкий спектр клеток и простоте применения. Потенциал AAV-2 в качестве генного вектора находится под пристальным клиническим вниманием, и уже используется в испытаниях I/II фазы исследователями для различных патологий [57]. Недавно было разработано новое поколение химерных векторов после открытия других серотипов, отличных от AAV-2; эти векторы имеют геном AAV-2, но вирусную оболочку

других серотипов [35], что изменяет их тропизм. Подбирая различные серотипы AAV, появляется возможность повысить эффективность ретроградной доставки вектора из мышечной ткани в нервную ткань в чувствительные и/или двигательные нейроны спинного мозга [156]. Однако, способность AAV к интеграции в геном клеток-мишеней является важным лимитирующим фактором использования AAV для генной терапии.

1.5.3. Lentiviruses

Lentiviral vectors (LV) represent a subclass of retroviruses (single-stranded RNA viruses), capable of long-term and stable expression of transgenes, due to their ability to transduce both dividing and non-dividing cells, integrating into the host cell genome [127; 193]. The risk of insertional activation of cellular oncogenes by LV, compared to classical retroviruses, can be reduced due to integration of LV at the end of genes, rather than in their promoter regions [159]. LVs are of great interest because of their obvious lack of activation of an immune response and the possibility of long-term expression [142]. The use of LVs, encoding neurotrophins and other proteins in TSM, has revealed various positive effects, including enhanced axon growth and myelination [143; 158]. LVs have also been successfully used for the delivery of neuroglobin (Ngb) to stromal cells of the bone marrow (SKCM) as a therapeutic approach to reduce secondary damage in TSM models [74].

1.5.4. Herpes Simplex Viruses

Vectors based on the herpes simplex virus (HSV), containing a double-stranded DNA genome, demonstrated an excellent ability to transduce target cells and maintain long-term expression of transgenes [98]. The neurotrophic nature of the virus allowed it to be used for

ретроградной доставки трансгенов в ЦНС. После введения ВГП в скелетную мышцу, вирусные частицы были обнаружены в телах нейронов задних рогов спинного мозга [98]. В недавних исследованиях доставка гена, кодирующего глиальный нейротрофический фактор (GDNF) с помощью ВГП, улучшило восстановление двигательной активности у крыс на 5 неделе после моделирования ТСМ [226]. ВГП также использовали для доставки генов, кодирующих эритропоэтин [248] и IL-10 [123]. Тропность ВГП к нервной ткани делают их особенно перспективными кандидатами для генной терапии нейропатической боли [109], а также диссинергии детрузорно-сфинктерного аппарата после ТСМ [208].

1.5.5. Невирусные векторные системы

Кроме вирусных способов доставки трансгенов в клетку, существует ряд других носителей генетического материала. Невирусные генные вектора при доставке в клетку остаются в эписоме внутри цитоплазмы, но при этом способны транслировать белки [166]. Другими преимуществами невирусных векторов являются их способность переносить большее количество ДНК, чем вирусные векторы [253]. Среди хорошо изученных невирусных векторных систем являются плазмиды. Плазмиды применялись в качестве носителей трансгенов в ~14% одобренных клинических испытаниях [174]. Для доставки плазмид применяется метод липофекции, когда используются катионные липиды (так называемые липосомы) для облегчения проникновения плазмиды в клетку-мишень; этот метод использовался в ~9% одобренных клинических испытаний. Кроме плазмид липосомы могут нести готовые мРНК.

Для доставки генов в клетку также могут применяться различные наноносители. Они были недавно разработаны для повышения эффективности трансфекции генов, при меньшей цитотоксичности. К наиболее изученным наноразмерным носителям генов относятся: катионные липиды с эффективностью трансфекции до 60%; полиэтиленимин (PEI) с

эффективностью трансфекции 14%; гиперразветвленные полиамидаминовые полимеры (дендримеры) с эффективностью трансфекции 40%, например, для нейронов и клеток нейроглии [166].

При ТСМ невирусные носители трансгенов стали сочетать с искусственными ориентированными структурами, служащими мостиками для растущих аксонов [40]. Таким образом, для лечения ТСМ было разработано множество различных типов скаффолдов [146], например, природные полимеры, синтетические биоразлагаемые полимеры или синтетические неразлагаемые полимеры, с интегрированными в них клеткам и невирусным носителям трансгенов. Однако следует учитывать, что такие методы могут иметь и серьезные недостатки, например, недоступность клеточного материала для трансфекции, или пониженная выживаемость клеток в составе имплантов [94; 175].

В заключение следует отметить, что среди описанных методов доставки рекомбинантных генов в ЦНС, аденовирусные векторы являются наиболее перспективными благодаря их доступности и биобезопасности.

1.6. Клеточная терапия

В настоящее время трансплантация различных типов стволовых клеток исследуется в качестве потенциального подхода для лечения ТСМ. Однако мало что известно о механизмах, с помощью которых эти отдельные типы клеток способствуют восстановлению и функциональному улучшению. Пять наиболее часто предлагаемых механизмов включают нейропротекцию, иммуномодуляцию, регенерацию аксонов, формирование нейронных связей и ремиелинизацию [43; 136; 157; 205].

1.6.1. Эмбриональные стволовые клетки человека

Эмбриональные стволовые клетки человека (ЭСКЧ) получают из внутренней клеточной массы предимплантационных бластоцист, путем

удаления клеток трофоэктодермы с помощью иммунохирургии. Для клеточной терапии используют не сами ЭСКЧ, а дифференцированные из них необходимые зрелые клетки. Так, ЭСКЧ, дифференцированные в олигодендроциты, были трансплантированы после моделирования ТСМ крысам [23; 231] и приматам [15]. В 2010 году корпорация «Geron» предложила в клинических условиях провести исследование эффективности полученных из ЭСКЧ олигодендроцитов у пациентов с ТСМ. К сожалению, компания прекратила испытание через 1 год вследствие нехватки средств, но эти работы возобновила «Asterias Biotherapeutics» [88].

1.6.2. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

В 2006 году Takahashi и др. показали, что фибробласты мышцы после генетической модификации факторами транскрипции Oct4, Sox2, cMyc и Klf4 приобретают свойства эмбриональных стволовых клеток [211]. Такие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) способны бесконечно самообновляться и дифференцироваться в большинство, если не во все типы клеток [41; 205]. В последнее время все большее исследовательских групп применяют ИПСК для лечения ТСМ. Совсем недавно в нескольких исследованиях были установлены потенциальные механизмы, лежащие в основе улучшения исхода ТСМ после трансплантации производных ИПСК [41]. Однако существует и ряд сообщений о негативном опыте применении ИПСК для восстановления двигательной функции после ТСМ [150; 233].

1.6.3. Нейральные стволовые клетки

В 1992 году Reynolds и др. первыми сообщили о получении нейральных стволовых клеток (НСК) из мозга взрослой мыши [184]. НСК обладают потенциалом мигрировать, пролиферировать и дифференцироваться в нейроны и глиальные клетки [61]. Последние клинические испытания показали, что

трансплантация НСК в место эпицентра ТСМ может быть безопасной, но эффективность терапии окончательно не установлена [199].

Эндогенные НСК взрослого человека представляют собой популяцию стволовых клеток, которые присутствуют в эпендимном слое [61]. Они экспрессируют нестин и характеризуются крайне редкими митозами. При повреждении спинного мозга резко возрастает уровень пролиферации НСК с последующим образованием в области повреждения мигрирующих астроцитов [72; 234]. Эпидермальный фактор роста (EGF) и FGF 2 служат митогенами для нейральной стволовой клетки. Восстановление двигательной функции было показано у крыс с параплегией после трансплантации клеток-предшественников, выделенных из спинного мозга [189]. В другом исследовании клетки-предшественники способствовали восстановлению миелина в моделях ТСМ у крыс [9].

1.6.4. Мезенхимальные стволовые клетки

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) в настоящее время активно используют в доклинических и клинических исследованиях [63], благодаря их относительной простоте выделения и культивирования *in vitro* [132]. МСК получают из разных источников, таких как костный мозг, пуповинная кровь, амниотическая жидкость и жировая ткань.

МСК костного мозга (МСК-КМ) широко используют в клеточной терапии [54]. Большинство МСК-КМ, используемых в доклинических экспериментах, преимущественно получают из тканей человека или грызунов, хотя они также могут быть получены от приматов [125] или свиней [90]. Улучшение двигательной активности было установлено у грызунов с ТСМ после трансплантации в спинной мозг МСК-КМ [31; 89]. Генетически-модифицированные МСК-КМ, сверхэкспрессирующие BDNF, имели более выраженный эффект на морфо-функциональное восстановление спинного мозга у крысы с ТСМ [28].

Амниотические фетальные МСК (АФ-МСК) выделяют из амниотической жидкости [135]. Ряд исследований обнаружил, что эти стволовые клетки могут способствовать функциональному восстановлению грызунов с ТСМ [19; 194; 222]. Например, внутривенная инъекция АФ-МСК крысам с контузионной ТСМ сдерживает демиелинизацию в поврежденном спинном мозге, стимулирует ангиогенез и уменьшает миграцию лейкоцитов в область поражения, ускоряя восстановление двигательной функции [222].

МСК жировой ткани (МСК-ЖТ) могут быть получены минимально инвазивным способом из жировой ткани в больших количествах. Различные доклинические и клинические исследования обнаружили потенциал МСК-ЖТ для лечения ТСМ [62; 138; 219]. МСК-ЖТ после трансплантации в ткань спинного мозга крыс сразу после компрессионной травмы, способствует сохранности серого вещества, росту аксонов, что в итоге приводит к восстановлению двигательной функции [116]. При внутривенном введении МСК-ЖТ собакам в острую фазу ТСМ также был установлен их положительный эффект на регенерацию спинного мозга [230].

1.6.5. Обонятельные нейроэпителиальные клетки

Обонятельные нейроэпителиальные клетки (ОНК) являются уникальными клетками, которые отвечают за экспрессию различных нейротрофических факторов, они, в свою очередь, важны для выживания нейронов и направленного роста аксонов [117; 220]. В последнее десятилетие исследования на животных показали, что трансплантация ОНК, культивированных из обонятельной луковицы, обеспечивает активный рост аксонов при повреждениях спинного мозга [144; 217]. Предварительные клинические испытания эффективности трансплантации обонятельных нейроэпителиальных клеток остаются противоречивыми [220].

1.6.6. Шванновские клетки

Шванновские клетки в периферических нервах поддерживают регенерацию аксонов после повреждения, и это предполагает их возможное применение при спинномозговой травме [33]. Их потенциальная эффективность была продемонстрирована на различных моделях ТСМ у крыс, демонстрируя увеличение количества миелинизированных аксонов в поврежденных участках, уменьшение кистозных полостей, сохранение белого вещества и регенерацию аксонов [48; 71]. Шванновские клетки, сверхэкспрессирующие GDNF или SAML1, продемонстрировали более выраженный положительный эффект на восстановление двигательной функции у крыс с ТСМ [197]. Клинические испытания с использованием шванновских клеток показали их безопасность и подтвердили их эффективность для лечения ТСМ [48].

1.7. Доклинические исследования влияния клеток крови пуповины на восстановление спинного мозга у животных с ТСМ

Результаты последних 30 лет опыта трансплантации пуповинной крови (ПК) показали, что пуповинная кровь эффективна для лечения целого ряда заболеваний, включая гематологические злокачественные опухоли, анемия Фанкони, гемоглобинопатии и врожденные метаболические энзимопатии [12; 14; 232; 240].

Кроме эритроцитов с фетальным гемоглобином, лейкоцитов и тромбоцитов ПК является источником различных стволовых клеток. Например, в ПК выявлены гемопоэтические стволовые клетки, предшественники эндотелиальных клеток, SP (side population)-клетки, мезенхимальные стромальные клетки, мультипотентных/плюрипотентные стволовые клетки [69; 81]. Среди мононуклеарных клеток крови пуповины (МККП), представленных преимущественно лимфоцитами и моноцитами [108], различают две субпопуляции: связанные с эндотелием и свободные [120]. В состав свободной субпопуляции входят прогениторные и стволовые клетки. Дифференцированные же МККП считаются незрелыми, в сравнении с клетками мононуклеарной фракцией взрослого организма [238]. Значительное количество

незрелых Т-лимфоцитов, меньшее содержание зрелых Т-лимфоцитов памяти [173] и цитотоксических Т-лимфоцитов в составе МСКП также отражают незрелость иммунной системы. Кроме того, лимфоциты крови пуповины в меньшей степени продуцируют провоспалительные цитокины, такие как, интерлейкин (IL)-2, IL-6 и IL-7, фактор некроза опухоли (TNF)- α и интерферон (IFN)- γ [85; 99] и в большей мере секретируют противовоспалительный цитокин IL-10 [20; 99].

Существует множество исследований *in vitro* и *in vivo*, свидетельствующих о способности МСКП дифференцироваться в различные клеточные типы, в том числе и в нервные клетки, что послужило причиной их использования для клеточной терапии ТСМ [104; 122; 229]. Ранее считалось, что трансплантированные МСКП могут дифференцироваться и замещать различные клетки спинного мозга. Однако в настоящее время считается, что МСКП оказывают противовоспалительное действие, стимулируют ангиогенез и способствуют росту аксонов за счет секреции противовоспалительных, ангиогенных и нейротрофических факторов в области травмы спинного мозга. Целесообразность использования МСКП для клеточной терапии основана на доступности, простоте выделения и возможности применения МСКП, как для ауто-, так и для аллотрансплантации [95; 104; 119; 192; 241].

На сегодняшний день существует ряд работ, посвященных эффективности использования стволовых клеток крови пуповины для лечения ТСМ в моделях на животных. Так, Zhao и др. показали, что интраспинальная трансплантация CD34+клеток из крови пуповины положительно влияет на восстановление двигательной активности у крыс на фоне гемисекции спинного мозга [130]. Dasari и др. получили данные о ремиелинизации аксонов после трансплантации стволовых клеток в зону повреждения через 1 неделю после моделирования КТСМ у крысы [24]. При этом иммуногистохимические данные подтверждают способность трансплантированных МСКП секретировать нейротрофические факторы *in vivo*. Cho и др. исследовали влияние на регенерацию спинного мозга трансплантацию индуцированных в нейральном направлении прогениторных

клеток крови пуповины [161]. У крыс с ТСМ, которым были трансплантированы в область повреждения спинного мозга данные клетки, наблюдалось улучшение восстановления двигательной функции. Као и др. у крыс с ТСМ изучили влияние трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (CD 34+), выделенных из крови пуповины, на посттравматическую регенерацию [118]. В этом исследовании они отметили, что системное введение CD34+ клеток значительно улучшило восстановление движений задних конечностей, а в спинном мозге увеличивалось содержание GDNF и VEGF. Эти результаты свидетельствуют о положительном влиянии CD34+ клеток на нейрорегенерацию путем секреции и/или стимулирования выработки VEGF и GDNF в спинном мозге.

Следующим шагом в изучении влияния МККП на течение ТСМ является использование генетически модифицированных МККП, сверхэкспрессирующих нейротрофические и ангиогенные факторы. Ранее в наших исследованиях было показано, что внутривенная инъекция МККП человека, трансдуцированная одновременно тремя аденовирусными векторами, кодирующими VEGF, GDNF и NCAM, приводила к заметному увеличению продолжительности жизни и улучшению поведенческих тестов у трансгенных мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза [209; 256]. У экспериментальных животных генетически-модифицированные МККП были обнаружены через месяц после трансплантации в сером и белом веществе поясничного отдела спинного мозга [212; 254]. Таким образом, это исследование подтверждает повышенную адресную миграцию и выживаемость МККП, сверхэкспрессирующих одновременно VEGF, GDNF и NCAM, в поясничном отделе спинного мозга, что приводит к значительному увеличению их терапевтического потенциала.

Далее нами на модели ишемического поражения головного мозга у крыс путем окклюзии средней мозговой артерии было исследовано влияние МККП, одновременно сверхэкспрессирующих рекомбинантные VEGF, GDNF и NCAM на нейропластичность головного мозга в области ишемического поражения. На фоне продукции МККП рекомбинантных VEGF, GDNF и NCAM установлено:

(1) сдерживание гибели нейронов и, как следствие, уменьшение объема инфаркта мозга, (2) снижение иммуноэкспрессии проапатозного белка Caspase3 и активированного стрессом белка Hsp70, (3) уменьшение количества GFAP-положительных астроцитов и Iba1-положительных клеток микроглии, ответственных за астроглиоз, (4) увеличение количества Olig2-положительных олигодендроглиальных клеток, поддерживающих миелинизацию нервных отростков, (5) повышение иммуноэкспрессии пресинаптического белка синаптофизина и постсинаптического белка PSD95 [235]. Генетически модифицированные МККП, продуцирующие рекомбинантные VEGF, GDNF и NCAM, также показали свою эффективность в моделях КТСМ на вьетнамских вислобрюхих свиньях и крысах [6].

Таким образом, основываясь на данных литературы и полученных нами ранее результатах об эффективности трансплантации МККП человека, одновременно сверхэкспрессирующих рекомбинантные VEGF, GDNF и NCAM, можно предположить, что МККП обладают значительными преимуществами, по сравнению с другими клеточными типами для лечения нейродегенеративных заболеваний мозга.

1.8. Клинические испытания клеток крови пуповины для терапии ТСМ

Перспективы использования пуповинной крови для стимулирования ангиогенеза привели к многочисленным ранним клиническим испытаниям, которые носят доказательный характер, для лечения ряда ишемических состояний и сосудистых заболеваний, включая травматическое повреждение головного мозга, ТСМ, церебральный паралич, деменцию, инсульт, цирроз, диабетические осложнения, сердечную ишемию и другие заболевания [227].

Несколько научных групп трансплантировали МККП и МККП-МСК пациентам с ТСМ. В 2005 году Kang и др. сообщили о восстановлении движения в тазобедренном суставе после трансплантации подобранных по HLA

мультипотентных стволовых клеток, выделенных из крови пуповины в спинной мозг 37-летней женщины с хронической ТСМ [2]. В 2010 году Ichim и др. трансплантировали МККП-МСК в спинной мозг пациента с хронической ТСМ [87]. В 2013 году Yao и др. сообщили об улучшении вегетативной функции и восстановлении вызванных потенциалов через 12 месяцев после интратекального и внутривенного введения МККП-МСК 25 пациентам с хронической ТСМ (>6 месяцев) [121]. Также интратекально МККП-МСК трансплантировали пациентам с ТСМ и другие научные группы [47; 239].

Zhu и др. провели I и II фазы нескольких клинических испытаний в Гонконге (NCT01046786, табл. 1) и Куньмине (NCT01354483 и NCT01471613, табл. 1) для оценки безопасности и эффективности трансплантации МККП-МСК в спинной мозг людей с хронической (1-19 лет после) полной ТСМ. В ходе первой фазы испытаний в Гонконге восемь пациентов получили в общей сложности 1,6 или 3,2 млн. МККП-МСК, трансплантированных в спинной мозг. В исследовании II фазы в Куньмине 20 пациентов с хронической (в среднем через 7 лет после травмы) полной травмой С5-Т11 получали в зависимости от группы от 1,6 до 6,4 миллиона МККП-МСК. Испытания показали, что МККП-МСК можно безопасно вводить в спинной мозг выше и ниже места травмы. МРТ спинного мозга обнаружила, что разрывы белого вещества в месте повреждения уменьшились, а у двух пациентов через 18 месяцев наблюдались пучки волокон, прорастающие через место повреждения. Более половины пациентов восстановили ходьбу с минимальной помощью или без нее к 6-12 месяцам после трансплантации МККП-МСК [172].

Одно из клинических исследований проводилось также в нашей стране в Научно-исследовательском институте скорой помощи им. Н.В. Склифосовского (NCT04331405, табл. 1). В исследование были включены 20 пациентов с тяжелой травмой спинного мозга (шейный, грудной и поясничный отдела). Пациенты были разделены на 2 группы: опытная группа (n = 10), получавшая стандартную консервативную терапию и 4 внутривенные инфузии человеческих аллогенных МККП (300 млн в 100 мл), и контрольная группа (n =

10), получавшая только стандартную консервативную терапию. Клеточная терапия была начата у пациентов на 3 день после проведения первичной хирургической декомпрессии и/или стабилизации ТСМ. Все четыре инфузии проводились во время стационарного лечения. Все включенные в исследование пациенты проходили ежедневный осмотр во время стационарного лечения и затем 4 раза в течение периода наблюдения (1 год). Результаты исследования к настоящему времени не опубликованы.

Одно из будущих клинических исследований на 27 пациентах (II фаза, NCT03979742, табл. 1) будет проводиться StemCyte, Inc. в нескольких медицинских центрах Нью-Джерси, (США). В рамках исследования МККП будут трансплантировать в задние корешки спинного мозга выше и ниже эпикентра ТСМ в сочетании с 6-недельным курсом принятия карбоната лития *per os* или плацебо с последующей тренировкой опорно-двигательного аппарата.

Проведенный анализ клинических испытаний клеток крови пуповины для терапии ТСМ (табл. 1), обнаружил, что в первых зарегистрированных клинических исследованиях были использованы МККП-МСК, и только в последних испытаниях стали применять МККП, что свидетельствует о большем терапевтический потенциале МККП, в составе которых большее количество разных стволовых клеток.

Таблица 1. Клинические испытания клеток крови пуповины человека для лечения ТСМ.*

Статус исследования	Фаза	Способ инъекции	Лекарственное вещество и доза	Место проведения
NCST013 54483 завершено	1, 2	Инъекция в спинной мозг	МККП-МСК 4 инъекции по 4-8 мкл (1,6-3,2 млн клеток) в дорсальные рога спинного мозга выше и ниже эпидурального пространства	Лечебный центр травмы спинного мозга, Главный госпиталь китайской армии НОАК Чэнду Куньмин, Юньнань, Китай,
NCST010 46786 завершено	1,2	Инъекция в спинной мозг	МККП-МСК 1 инъекция 1,6 млн.-3,2 млн.-6,4 млн. клеток	Больница королевы Марии, Гонконг
NCST014 71613 завершено	1,2	Инъекция в спинной мозг	МККП-МСК 1 инъекция 6,4 млн. клеток	Лечебный центр травмы спинного мозга, Главный госпиталь китайской армии НОАК Чэнду Куньмин, Юньнань, Китай,
NCST013 93977 неизвестно	2	Интраатласно	МККП-МСК	Главный госпиталь вооруженных полицейских сил Китая, Пекин, Китай
NCST018 73547 завершено	3	Интраатласно	МККП-МСК	Главный госпиталь вооруженных полицейских сил Китая, Пекин, Китай
NCST042 13131 в наборе	-	Внутривенно, интраатласно,	МККП-МСК	Первый филиал больницы Даляньского медицинского университета, Ляонин, Китай

		инъекция в спинной мозг		
NCT043 31405 в наборе	1,2	Внутривенно	МККП	Институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского, Москва, Российская Федерация,
NCT039 79742 В ожидан ии набора	2	Инъекция в спинной мозг	МККП 4 инъекции по 16 мкл (100 000 клеток/мкл)	Медицинский центр университета Хакенсак, Медицинский центр Маунтинсайд, Медицинский центр университета Джерси Шор, Нью-Джерси, США

*-данные получены с сайта [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov)

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Моделирование контузионной травмы спинного мозга

Половозрелые крысы линии Wistar (n=34, вес 250–300 г) были получены из питомника Пушино (Пушино, Россия). Крыс содержали по одной в клетке в стандартных лабораторных условиях с 12 часовым 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 заседания №5 от 27.05.2014, протокол заседания №2 от 20.02.2018).

2.1.1. Предоперационный период и анестезия

Оперативные вмешательства на животных выполнены в операционной, соответствующей надлежащим санитарным правилам и нормам. Крыс наркотизировали внутривенно раствором Золетила 100 (VirbacSanteAnimale, Франция) 3мг/кг и Ксилы (Interchemiewerken «DeAdelaar» B.V., Нидерланды) 4,8 мг/кг. Для подготовки операционного поля с поверхности спины удаляли волосяной покров и далее обрабатывали 0,5% спиртовым раствором хлоргексидина. Температуру тела крысы во время операции поддерживали в пределах 37–38 °С при помощи терморегулирующей панели (Harvard apparatus; PanLab, Cornella, Spain).

2.1.2. Оперативный доступ

Доступ к спинному мозгу для моделирования контузионной травмы получали в ходе последовательных хирургических манипуляций:

- (1) продольного разреза кожи и подкожно-жировой клетчатки по задней срединной линии над остистыми отростками Th₇–Th₁₂ позвонков;
- (2) препарирования скелетных мышц от остистых отростков и дужек позвонков;

(3) рассечения межостистых и надостистых связок на уровне Th₈–Th₉ позвонков;

(4) скусывания остистых отростков Th₈ и Th₉ позвонков и удаления дужек Th₈–Th₉ позвонков (рис. 1).

2.1.3. Контузионная травма

Контузионную травму спинного мозга моделировали после ламинэктомии с помощью импактора на уровне Th₈–Th₉. Животное фиксировали к операционному столу с вытянутым прямым позвоночником. Металлический стержень импактора устанавливали на расстоянии 1 мм от открытой поверхности спинного мозга. Однократный удар металлическим стержнем (масса 10 г, диаметр 2 мм) по спинному мозгу наносили с высоты 25 мм (рис. 1). После нанесения контузионной травмы операционную рану ушивали послойно [6].

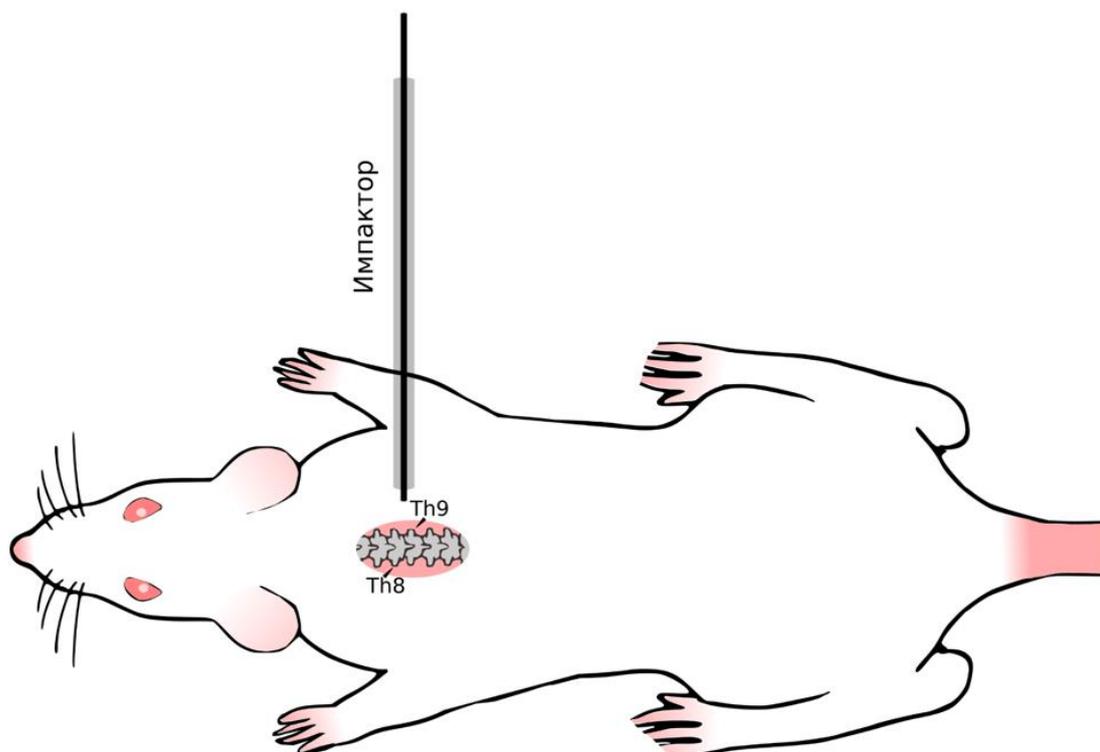


Рисунок 1. Моделирование контузионной травмы спинного мозга с помощью импактора.

2.1.3. Послеоперационный период

В послеоперационном периоде все животные получали антибактериальную терапию — цефтриаксон 0,0075 г, объемом 0,01 мл (внутримышечно, 1 раз в день, в течение 5 дней); обезболивающую терапию — кеторол 0,25 г, объемом 0,08 мл (внутримышечно, 1 раз в день, в течение 5 дней). На протяжении всего эксперимента у крыс ежедневно контролировали диурез и дефекацию.

2.2. Поведенческие тесты

Восстановление двигательной активности у животных после контузионной травмы спинного мозга оценивали с помощью поведенческих тестов «ВВВ» и «Ротарод». За неделю до операции с животными проводили тренировочные тесты. Ежедневно крыс тестировали на лабораторной установке Rotarod (Tredmill 7700, d=8см, r=12об/мин) и приучали к специальной арене для проведения теста «ВВВ». В послеоперационном периоде тест «ВВВ» проводили начиная с 7 суток и далее через день до 30 суток. Тест «Rotarod» начинали на 20 сутки и далее через день до 30 суток.

2.2.1. Тест «ВВВ»

Животное на 4 минуты помещали в открытую арену диаметром 1,5 метра и высотой стенки 30 см. За это время два исследователя по шкале теста «ВВВ» определяли степень двигательной активности животного по движениям задних конечностей в баллах от 0 до 21 (уровень активности здорового животного) (табл. 2). При несовпадении данных, зарегистрированных двумя исследователями, брали результат с большим локомоторным дефицитом [26].

Таблица 2. 21-балльная шкала оценки теста «ВВВ» [26].

Шкала	Описание
0	Отсутствие заметных движений задней конечности (ЗК)
1	Незначительное движение одного или двух суставов, обычно тазобедренного и/или коленного
2	Экстенсивное движение одного сустава*

	или Экстенсивное движение одного сустава и незначительное движение одного другого сустава
3	Экстенсивное движение двух суставов
4	Незначительное движение всех трех суставов ЗК
5	Незначительное движение двух суставов и экстенсивное движение третьего сустава
6	Экстенсивное движение двух суставов и незначительное движение третьего сустава
7	Экстенсивное движение всех трех суставов ЗК
8	Локомоция без поддержки веса или плантарная постановка лапы без поддержки веса
9	Плантарная постановка лапы с поддержкой веса только в стойке (т.е. в неподвижном состоянии) или эпизодические, частые или постоянные шаги с поддержкой веса и без плантарных шагов
10	Случайные плантарные шаги с поддержкой веса, без координации передней конечности (ПЕРК)-ЗК
11	Частые или постоянные плантарные шаги с поддержкой веса и отсутствие координации ПЕРК-ЗК
12	Частые или постоянные плантарные шаги с поддержкой веса и эпизодическая координация ПЕРК-ЗК
13	Частые или постоянные плантарные шаги с поддержкой веса и частая координация ПЕРК-ЗК
14	Постоянные шаги с опорой на подошву, постоянная координация ПЕРК-ЗК; и преобладающее положение лапы во время локомоции - вращение (внутреннее или внешнее) при первоначальном контакте с поверхностью, а также непосредственно перед отрывом в конце стойки. или частый плантарный шаг, последовательная координация ПЕРК-ЗК и случайный дорсальный шаг
15	Постоянный плантарный шаг и последовательная координация ПЕРК-ЗК; и отсутствие расстояния между пальцами ног и поверхностью во время продвижения конечности вперед; преобладающее положение лап параллельно телу при начальном контакте с поверхностью стопы.
16	Постоянный плантарный шаг и постоянная координация ПЕРК-ЗК во время походки; и расстояние между пальцами ног и поверхностью появляется во время продвижения конечности вперед; преобладающее положение лап параллельно при начальном контакте с поверхностью и повернуто при подъеме.

17	Постоянный плантарный шаг и последовательная координация ПЕРК-ЗК во время походки; и расстояние между пальцами ног и поверхностью появляется во время продвижения конечности вперед; преобладающее положение лапы параллельно при начальном контакте с поверхностью и при подъеме.
18	Постоянный плантарный шаг и последовательная координация ПЕРК-ЗК во время походки; и расстояние между пальцами ног и поверхностью постоянно во время продвижения конечности вперед; преобладающее положение лапы параллельно при начальном контакте с поверхностью и повернуто при подъеме.
19	Постоянный плантарный шаг и последовательная координация ПЕРК-ЗК во время походки; и расстояние между пальцами ног и поверхностью постоянно во время продвижения конечности вперед; преобладающее положение лапы параллельно при начальном контакте с поверхностью и при подъеме; и хвост опущен частично или постоянно
20	Постоянный плантарный шаг и скоординированная походка; расстояние между пальцами ног и поверхностью постоянно во время продвижения конечности вперед; преобладающее положение лап параллельно при начальном контакте с поверхностью и подъеме; хвост постоянно поднят; и наблюдается неустойчивость туловища
21	Постоянный плантарный шаг и скоординированная походка, расстояние между пальцами ног и поверхностью постоянно во время продвижения конечности вперед, преобладающее положение лап параллельно на протяжении всей стойки, туловище устойчиво, хвост постоянно поднят вверх

* - движение более чем в половине объема движения сустава [26].

2.2.2. Тест «Ротарод»

Тест «Ротарод» выполняли на приборе Rotarod, который представляет собой установку с вращающейся осью. Подопытное животное помещали на ось аппарата, включали установку и засекали время от момента включения аппарата до падения крысы с вращающейся оси. В ходе одного исследования животное тестировали 3 раза. Для анализа данных по результатам 3 попыток высчитывали среднее значение [4].

2.3. Кинематика суставов

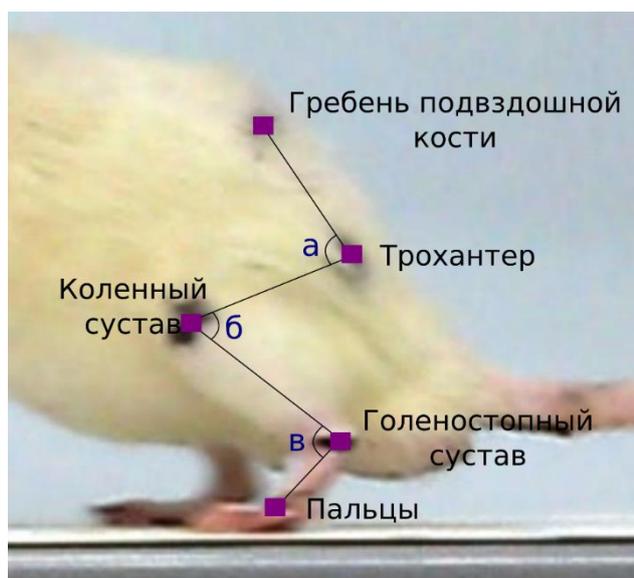


Рисунок 2. Схема расположения контрольных меток на левой задней конечности крысы для анализа кинематики в тазобедренном (а), коленном (б) и голеностопном (в) суставах.

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 сутки 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. 2). 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 [27; 180].

2.4. Электрофизиологические методы исследования

Электрофизиологические исследования выполнены на 30 сутки после моделирования нейротравмы перед выведением животных из эксперимента.

Крыс наркотизировали раствором хлоралгидрата (80 мг/мл, 0,4 мл внутривенно) и с помощью игольчатой миографии регистрировали вызванные моторные потенциалы симметричных икроножных мышц правой и левой конечности в ответ на электрическую стимуляцию седалищного нерва или магнитную стимуляцию шейно-грудного отдела спинного мозга.

2.4.1. Электрическая стимуляция седалищного нерва

Электромиографию икроножных мышц правой и левой конечностей проводили с помощью оригинальной исследовательской установки на базе электромиографа MG-42 (Медикор), процессора Pentium и программного обеспечения «Miograph». Электрическую стимуляцию седалищного нерва осуществляли одиночными прямоугольными импульсами длительностью 0,5 мс с частотой 0,5 имп/мин. Интенсивность стимулов варьировала от 0,3 до 30,0 В. В ответ на стимуляцию регистрировали моторный (М) ответ, являющийся электрическим потенциалом мышцы, возникающим при раздражении эфферентов. Методом моносинаптического тестирования рефлекторного (Н) ответа, представляющего собой реакцию двигательного центра на афферентную стимуляцию, оценивали рефлекторную возбудимость спинальных мотонейронов. При анализе электромиограммы определяли порог возникновения, латентный период, максимальную амплитуду и длительность вызванных потенциалов.

2.4.2. Магнитная стимуляция шейно-грудного отдела спинного мозга

Исследование моторных вызванных потенциалов (МВП) икроножной мышцы правой и левой конечностей в ответ на магнитную стимуляцию спинного мозга рострально к эпицентру повреждения рассматривали как функциональный метод оценки кортикоспинальной возбудимости после контузионной травмы спинного мозга [176]. Стимуляцию шейного отдела

спинного мозга проводили с перекрытием ствола мозга и верхнегрудного отдела позвоночника с помощью системы "Нейро -МВП-4" (Нейрософт, Россия) [255]. Порог и латентный период моторных потенциалов определяли после магнитной стимуляции интенсивностью до 4 Тл с длительностью 0,5 мс и частотой 0,5 импульса/мин. Перед оценкой параметров МВП определяли оптимальное положение катушки и угол, при котором регистрируемые потенциалы имели максимальную амплитуду и минимальный латентный период. Пороговое значение потенциала определялось как минимальная интенсивность магнитного стимула, при которой возникали определенные ответы в 3–5 последовательных стимуляциях.

2.5. Гистологические методы исследования спинного мозга

На 30 сут после операции подопытных животных наркотизировали с помощью хлоралгидрата (в/б 80 мг/мл; 0,4 мл на 100 г массы животного), транскардиально перфузировали 4% забуференном раствором параформальдегида (4С°, рН=7,4) и забирали грудно-поясничный участок позвоночного столба, который далее постфиксировали в 4% параформальдегиде. Через сутки спинной мозг выделяли из позвоночного столба и делили на три фрагмента: роstralный (10 мм), эпицентр травмы (10 мм), каудальный (10 мм).

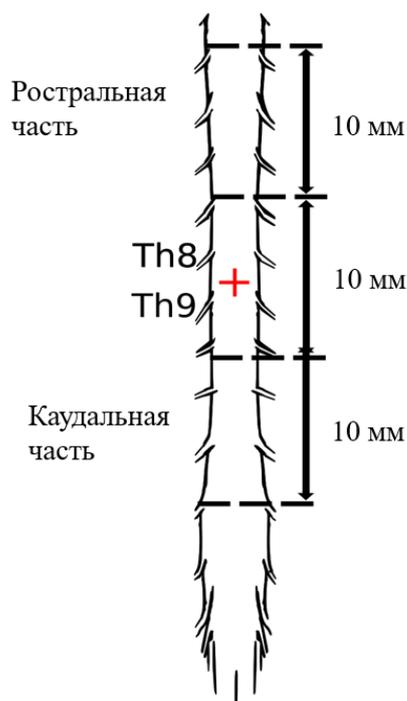


Рисунок 3. Фрагменты спинного мозга для гистологического исследования. Спинной мозг был разделен на эпицентр травмы, ростральную и каудальную части. Эпицентр травмы выделен красным цветом.

2.5.1. Приготовление криостатных срезов

В целях криопротекции фиксированную ткань насыщали 30% раствором сахарозы на фосфатно-солевом буфере (pH=7,4). Для приготовления криостатных срезов фрагмент 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 и каудального (относительно эпицентра травмы) фрагментов спинного мозга.

2.5.2. Морфометрический анализ сохранности серого вещества

Криостатные поперечные срезы спинного мозга из рострального и каудального фрагментов окрашивали гематоксилином и эозином. На оцифрованных микропрепаратах при 10-кратном увеличении микроскопа в

программе ImageJ (NIH) [151] оценивали площадь патологических полостей и сохранность серого вещества относительно всей площади серого вещества спинного мозга с помощью формулы:

$$S_{\text{сохран-сть СВ}} = (S_{\text{СВ}} - S_{\text{пат. пол-ей}}) / S_{\text{СВ}}$$

$S_{\text{сохран-сть СВ}}$ – Сохранность серого вещества

$S_{\text{СВ}}$ – абсолютная площадь серого вещества

$S_{\text{пат. пол-ей}}$ – абсолютная площадь патологических полостей.

2.5.3. Морфометрический анализ сохранности белого вещества

Фрагмент эпицентра травмы фиксировали в 2,5 % растворе глутарового альдегида, а затем в 1%-м растворе четырехокси осмия и после дегидратации заливали в смесь эпона и аралдита (Fisher Chemical, США). Полутонкие поперечные срезы спинного мозга готовили на ультрамикротоме LKB-3 («LKB», Швеция) и окрашивали метиленовым синим. Оцифровку микропрепаратов проводили с помощью микроскопа Olympus BX51WI (Olympus, Япония), оснащенного камерой AxioCam MRm (Carl Zeiss, Германия). Морфометрический анализ оцифрованных препаратов выполняли в программе ImageJ (NIH). На поперечных срезах оцифрованных микропрепаратах при 20-ти кратном увеличении микроскопа в программе AxioVision Rel. 4.8. подсчитывали относительную площадь миелиновых оболочек нервных волокон в квадрате площадью 0,08 мм² в передних, боковых и задних канатиках белого вещества на обеих сторонах спинного мозга.

2.5.4. Иммунофлуоресцентное исследование спинного мозга

Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили на поперечных свободно плавающих срезах каудального фрагмента спинного мозга. После нарезки срезы промывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с 1% Triton X-100 в течение 5 минут 3 раза, далее блокировали неспецифические места связывания в ФСБ, содержащим 1% Тритон X-100 и 5% сыворотку крови

лошади, в течение 1 часа при комнатной температуре. Экспрессию белков-мишеней в нервных клетках и клетках нейроглии выявляли с помощью специфических антител. Астроциты окрашивали при помощи антител против глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) (Santa Cruz, 1:200), клетки олигодендроглии – антителами к NG2 (Santa Cruz, 1:100), клетки микроглии – при помощи антител к Iba1 (Abcam, 1:200). Для анализа экспрессии молекул клеточного стресса использовали антитела против белка теплового шока с молекулярной массой 27 кДа (Hsp27) (Abcam, 1:200). Экспрессию синаптических белков оценивали с помощью антител против синаптофизина (Abcam, 1:100) и белка постсинаптической плотности с молекулярной массой 95 кДа (PSD95) (Abcam, 1:200) (табл. 3). Первый этап иммуофлуоресцентного окрашивания проводили при температуре 4 °C в течение 12 ч. После промывки в ФСБ срезы инкубировали со вторичными антителами, в качестве которых применяли ослиные Ig, конъюгированные с флуорохромом Alexa 488 (Invitrogen, 1:200), Alexa 555 (Invitrogen, 1:200) или Alexa 647 (Invitrogen, 1:200). Для визуализации ядер клеток срезы дополнительно окрашивали в течение 10 минут при комнатной температуре раствором DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол, Abcam, 1:5000). Анализ окрашенных срезов проводили с помощью конфокального сканирующего микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany). Для оценки экспрессии белков-мишеней в спинном мозге были выбраны вентральные рога серого вещества. Иммунопозитивные клетки подсчитывали в квадрате площадью 0,05 мм² с изображения z-стека, состоящего из 6 срезов с интервалом 0,5 мкм. Цифровые изображения срезов спинного мозга анализировали с помощью программы ImageJ (NIH). При подсчете количества иммунопозитивных клеток учитывали присутствие в клетках ядер, окрашенных DAPI. Плотность специфической флуоресценции в процентах вычисляли как отношение суммы ненулевых пикселей в снимке данного канала флуоресценции к площади изображения в пикселях. Изображения получали при стандартизированных значениях пинхола, мощности лазеров и скорости сканирования.

Таблица 3. Список первичных и вторичных антител, использованных для иммунофлуоресцентного окрашивания

Антитела	Происхождение	Разведение	Производитель
GFAP*	Мышь	1:200	Santa Cruz
HSP27*	Кролик	1:200	Abcam
NG2*	Кролик	1:100	Santa Cruz
Iba1*	Кролик	1:200	Abcam
PSD95*	Кролик	1:200	Abcam
Synaptophysin*	Кролик	1:100	Abcam
HNA*	Мышь	1:150	Millipore
VEGF*	Кролик	1:200	Abcam
Angiogenin*	Кролик	1:200	Abcam
NCAM*	Кролик	1:200	Abcam
Anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 488**	Осел	1:200	Invitrogen
Anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 555**	Осел	1:200	Invitrogen
Anti-mouse IgG conjugated with Alexa 647**	Осел	1:200	Invitrogen

*— первичные антитела; **— вторичные антитела

2.6. Получение генного препарата

Рекомбинантные репликативно-дефектные вирусные векторы были созданы на основе аденовируса человека 5 серотипа (Ad5) с использованием клеточной культуры НЕК 293 (Human Embryonic Kidney 293) в ФГБУ "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Минздрава РФ (Москва) по методу, описанному ранее [212]. В настоящем исследовании были использованы Ad5, несущие ген зеленого флуоресцирующего белка *gfp* (Ad5-GFP), ген ангиогенина

ANG (Ad5-ANG), ген нейрональной молекулы клеточной адгезии *ncam1* (Ad5-NCAM) и сосудистого эндотелиального фактора роста *vegfl65* (Ad5-VEGF).

Для доставки в ЦНС трех рекомбинантных генов (*vegfl65*, *ANG* и *ncam1*) готовили генный препарат, содержащий три аденовирусных вектора в равном соотношении: Ad5-VEGF (1/3), Ad5-ANG (1/3) и Ad5-NCAM (1/3) [82]. Для интратекальной инфузии генный препарат содержал 2×10^7 вирусных частиц (Ad5-VEGF + Ad5-ANG + Ad5-NCAM или Ad5-GFP) в 20 мкл физиологического раствора (рис. 4).

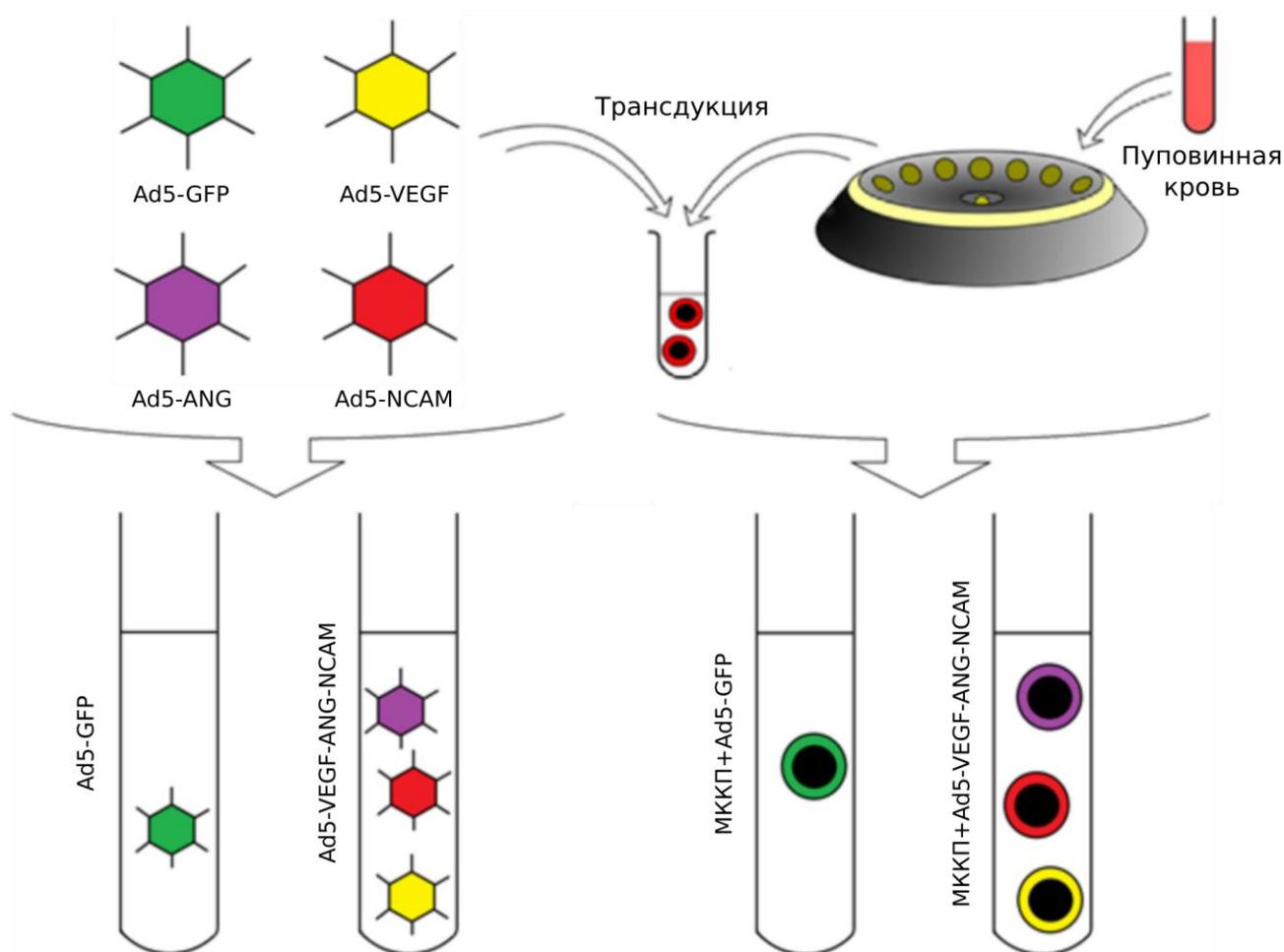


Рисунок 4. Схема получения генного и генно-клеточного препарата.

2.7. Получение генно-клеточного препарата

При создании генно-клеточного препарата для доставки в спинной мозг рекомбинантных генов (*vegfl65*, *ANG* и *ncam1*) в качестве клеточного носителя были использованы мононуклеарные клетки крови пуповины человека (МККП) (рис. 4).

2.7.1. Забор крови пуповины человека

Забор крови пуповины проводили после получения подтвержденного согласия рожениц и отсутствия противопоказаний к донорству (тяжелые соматические заболевания, отягощенный семейный анамнез, акушерская патология). После рождения ребенка через естественные родовые пути и отсечения пуповины специально обученные сотрудники роддома забирали пуповинную кровь по инструкции Банка стволовых клеток Казанского государственного медицинского университета (КГМУ). Кровь собирали в стерильные закрытые контейнеры (гемакон) объемом 250 мл с антикоагулянтом CPDA-1 (Green Cross, Корея) с соблюдением правил асептики и антисептики.

Гемакон с пуповиной кровью помещали в транспортный контейнер (металлический бокс), который хранили при комнатной температуре (21–24 °С), либо в холодильнике при температуре 4–8 °С. Доставку контейнера с сопроводительными документами в Банк стволовых клеток КГМУ осуществляли не позднее 12 часов с момента забора крови.

Использование компонентов пуповинной крови человека в эксперименте одобрено решением Локального этического комитета КГМУ (протокол №5 от 27.05.2014).

2.7.2. Выделение мононуклеарных клеток из крови пуповины

Все работы с препаратами крови и эукариотическими клетками проводили в асептических условиях ламинарного шкафа второго класса защиты Faster Safe FAST Elite (Италия) с соблюдением общепринятых правил работы с биоматериалом. МККП выделяли по стандартной методике из свежей крови пуповины в градиенте плотности фикола. В полипропиленовую пробирку вносили 25 мл раствора фикола плотностью 1,077 г/мл (ПанЭко), на который аккуратно при помощи автоматического дозатора наслаивали равный объем пуповинной крови с антикоагулянтом (соотношение крови и антикоагулянта колебалось в пределах 1:1-3:1). После центрифугирования при 720×g в течение

20 мин получали четкое разделение крови на 4 фракции: эритроциты, фиколл, лейкоциты и плазму. Лейкоцитарную фракцию собирали в отдельную пробирку, ресуспендировали в растворе фосфатно-солевого буфера, модифицированного Дульбекко (DPBS, ПанЭко) в соотношении 1:2 и центрифугировали при $305 \times g$ в течение 15 мин. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в 10 мл раствора DPBS и повторно центрифугировали при $305 \times g$ в течение 15 мин. Для удаления эритроцитов клетки ресуспендировали в гипотоническом лизирующем буфере (0,168 М NH_4Cl , 0,1 М KHCO_3 , 1,27 мМ EDTA, pH 7,3). На заключительном этапе МККП отмывали раствором DPBS и помещали в среду RPMI-1640 (Sigma) с добавлением 1мМ L-глутамина, 10% сыворотки крови плодов коровы (Sigma) и 1% смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (100 ЕД/мл; 100 мкг/мл) (Sigma).

Определение жизнеспособности выделенных МККП проводили с использованием гемоцитометра путем окрашивания клеток 0,4% раствором трипанового синего. Выделенные клетки смешивали в соотношении 1:1 с красителем (100 мкл : 100 мкл). Подсчет и верификацию клеток осуществляли с помощью светового микроскопа.

2.7.3. Трансдукция мононуклеарных клеток крови пуповины

Полученные МККП высевали на 6 см культуральный планшет из расчета 2 млн. клеток/лунка и одновременно трансдуцировали тремя аденовирусами, несущими рекомбинантные гены в равном соотношении: Ad5-VEGF (1/3), Ad5-ANG (1/3) и Ad5-NCAM (1/3), или аденовирусным вектором, несущим репортерный ген (Ad5-GFP). При трансдукции МККП общий показатель MOI (multiplicity of infection — множественность инфицирования) был равен 10. В ходе трансдукции МККП культивировали в инкубаторе при 37 °С, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 . Для ксенотрансплантации трансдуцированные МККП собирали через 16 часов культивирования путем центрифугирования при $500 \times g$ в течение 5 мин. Клеточный осадок трижды промывали в растворе

DPBS, растворяли в стерильном растворе 0,9% хлорида натрия из расчета 2×10^6 клеток в 20 мкл физиологического раствора.

2.7.4. Анализ эффективности трансдукции мононуклеарных клеток крови пуповины *in vitro* и *in vivo*

Уровень мРНК генов *vegfl65*, *ANG*, *ncam1* в трансдуцированных МККП определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Общую РНК выделяли из генетически модифицированных МККП, собранных через 72 часа после инкубации *in vitro* с использованием набора ExtractRNA (Евроген) в соответствии с инструкциями производителя. Синтез кДНК проводили с использованием шестинуклеотидных рандомных праймеров и набора MMLV RT (Евроген). Количественный анализ уровня экспрессии проводили с помощью термоциклера CFX96 (BioRad). В состав реакционной смеси включали qPCRmix-HS SYBR (Евроген), образцы кДНК, праймеры, специфичные для *vegfl65*, *ANG*, *ncam1*. Количество мРНК было нормализовано по референсному гену *gapdh*. Каждую реакцию проводили с использованием двух технических повторностей. Анализ полученных данных выполнен в среде для статистических вычислений R 3.4.4 (R Core Team (2018)). Для расчета относительной экспрессии с учетом значений, полученных для референсного гена *gapdh*, применяли метод $\Delta\Delta C_t$ (Livak). Последовательности праймеров, использованных в работе, представлены в таблице 4.

Таблица 4. Нуклеотидная последовательность праймеров и зондов, использованных в ПЦР-РВ

Название	Последовательность праймеров и зондов
hVEGF-TM49-Forward	TACCTCCACCATGCCAAGTG
hVEGF-TM110-Reverse	TGATTCTGCCCTCCTCCTTCT
Angiogenin-TM-Forward	GATAACTCCAGGTACACACA

Angiogenin Reverse	-TM-	GACGACGGAAAATTGACTGA
NCAM1-TM-Forward		AGATGAGGGCACTTATCGCT
NCAM1-TM-Reverse		GATGGTAGGTGGCACATTCA
Gapdh-TM-Forward		GCCGCTAGAGGTGAAATTCTTG
Gapdh-TM-Reverse		CATTCTTGGCAAATGCTTTCG

*TaqMan пробы, содержащие 5' FAM (HEX) флюоресцентную метку и 3' BH1 (BH2) гаситель

Эффективность продукции рекомбинантного белка в генетически модифицированных МККП оценивали в клетках после трансдукции аденовирусом Ad5-GFP. Через 72 часа культивирования МККП + Ad5-GFP *in vitro* культуру клеток изучали с помощью инвертированного люминесцентного микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Производство рекомбинантных молекул VEGF, GDNF и NCAM *in vivo* изучали в ростральном фрагменте спинного мозга через 30 суток после интратекальной инфузии генного препарата или трансплантации генетически модифицированных МККП методом иммунофлуоресцентного окрашивания с помощью специфических антител к белкам-мишеням. Ростральный фрагмент был выбран с целью подтверждения способности аденовирусных векторов и МККП проникать от места инъекции (поясничный отдел) через эпицентр в ростральную часть спинного мозга. Экспрессию рекомбинантных молекул в МККП выявляли путем двойного иммунофлуоресцентного окрашивания антителами против VEGF (Abcam, 1:200), ангиогенина (Abcam, 1:200), NCAM (Abcam, 1:200) и человеческого ядерного антигена HNA (Millipore, 1:150) (табл. 3). Для визуализации ядер клеток срезы дополнительно окрашивали раствором пропидия иодида (PI, Invitrogen, 1:1000) или DAPI (Abcam, 1:5000). При подсчете количества иммунопозитивных клеток учитывали наличие в клетках ядер, окрашенных DAPI.

2.8. Доставка рекомбинантных генов в спинной мозг крысы после моделирования контузионной травмы

В течение 4 ч. после нанесения контузионной травмы спинного мозга животным выполняли ламинэктомию на уровне L₄-L₅, после чего интратекально вводили генные или генно-клеточные препараты. Согласно дизайну эксперимента, животные были разделены на 5 экспериментальных групп (табл. 5).

Таблица 5. Экспериментальные группы животных

Группа	Интратекальная инъекция препарата в 20 мкл физиологического раствора
КТСМ (контроль, n=4)	20 мкл физиологического раствора (NaCl 0,9%)
КТСМ/Ad5-GFP (контроль, n=8)	2×10^7 вирусных частиц Ad5-GFP
КТСМ/МККП+Ad5-GFP (n=6)	2×10^6 МККП, трансдуцированных Ad5-GFP,
КТСМ/Ad5-VEGF-ANG-NCAM (n=4)	2×10^7 вирусных частиц, несущих Ad5-VEGF (1/3), Ad5-ANG (1/3) и Ad5-NCAM (1/3)
КТСМ/МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM (n=7)	2×10^6 МККП, трансдуцированных Ad5-VEGF (1/3), Ad5-ANG (1/3) и Ad5-NCAM (1/3)

2.9. Статистический анализ

Выявление различий между группами проводили с помощью теста Краскела-Уоллиса (нулевая гипотеза: все группы принадлежат одной совокупности, при $p < 0,05$, нулевая гипотеза отвергалась). В качестве апостериорного критерия для теста Краскела-Уоллиса использовали U-тест Манна-Уитни, с помощью которого выявляли различия между каждой экспериментальной и контрольной группами, поправку на множественность не вводили.

Данные поведенческих тестов, объемов кинематики суставов, моторных вызванных потенциалов, сохранности серого вещества и относительной

площади миелина, подсчета генно-модифицированных МККП в спинном мозге представлены в виде Медианы [1 квартиль; 3 квартиль]. Результаты иммунофлуоресцентного анализа клеточный маркеров, ПЦР-РВ, представлен в виде Средней \pm С.О. 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. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СПИННОМ МОЗГЕ КРЫС ПОСЛЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ КОНТУЗИОННОЙ ТРАВМЫ

3.1. Поведенческие тесты

На 30 сутки после моделирования контузионной травмы спинного мозга у подопытных животных анализ поведенческих тестов «ВВВ» и «Ротарод» обнаружил снижение двигательной активности. Максимальное количество баллов, которое может получить животное за тест «ВВВ» составляет 21 балл (табл. 2). Крысы с контузионной травмой спинного мозга значение теста составило 8,5 [7,75, 9] баллов ($p < 0,05$; рис. 5). Тест «Ротарод» интактные животные выполняют в течение 2–3 минут (120–180 сек). У крысы с контузионной травмой время тестирования на ротароде снизилось до 9,2 [8,4; 9,6] сек ($p < 0,05$; рис. 5).

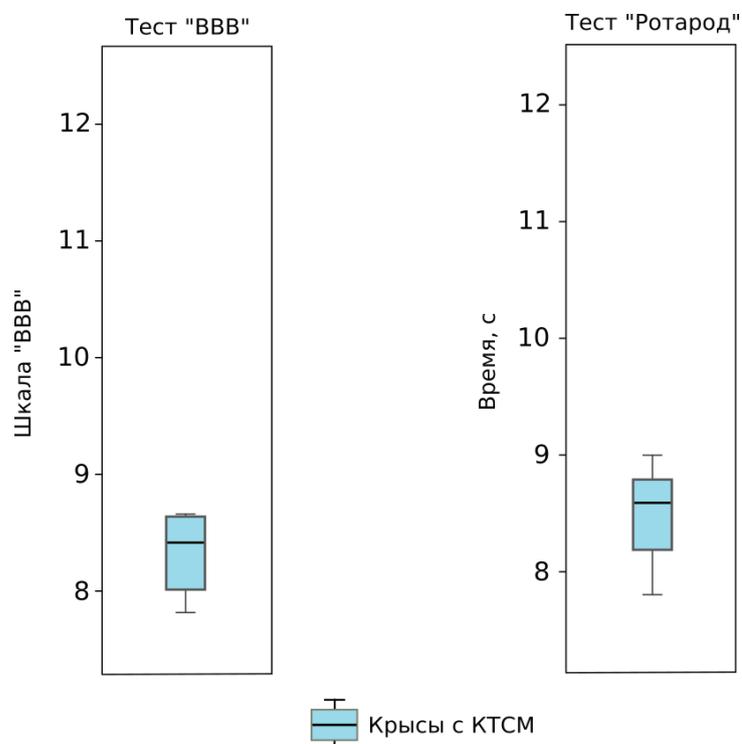


Рисунок 5. Показатели тестов «ВВВ» и «Ротарод» у крыс с КТСМ на 30 сутки эксперимента.

3.2. Кинематика суставов

Ходьба является автоматизированным двигательным актом тазобедренного, коленного и голеностопного суставов, состоящим из двух фаз – «фазы опоры» и «фазы переноса» (рис. 6) [225]. Мышцы, приводящие в движение тазобедренный и коленный суставы, иннервируются поясничным сплетением (L_I-L_{IV}), а приводящие в движение голеностопный сустав – крестцовым сплетением ($L_{IV}-L_{VI}$) [259]. Оба сплетения находятся ниже места травмы, поэтому оценка кинематики суставов является одним из эффективных методов анализа функционального восстановления проводящих путей спинного мозга после травмы.

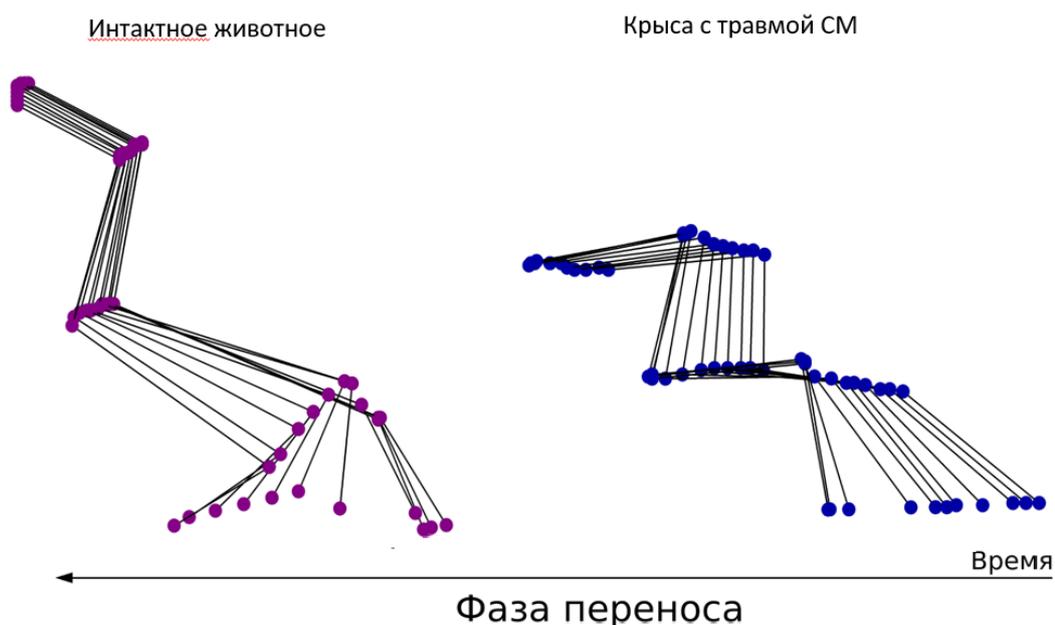


Рисунок 6. Диаграммы движений левой задней конечности у интактного животного и у крысы с КТСМ во время ходьбы на тредмиле.

Кинематику тазобедренного, коленного и голеностопного суставов задней левой конечности оценивали по величине угловых значений (рис. 2). Объем движения у интактных животных в тазобедренном суставе составил 22° [9; 24], в коленном – 71° [69; 71] и в голеностопном 88° [87; 102]. У крыс с контузионной травмой наблюдалось незначительное снижение величины угла в

тазобедренном суставе (19° [19; 21]), и резкое выраженное уменьшение объема движений в коленном и голеностопном суставах – 11° [11; 26] и 69° [57; 72] соответственно ($p < 0,05$; рис. 7).

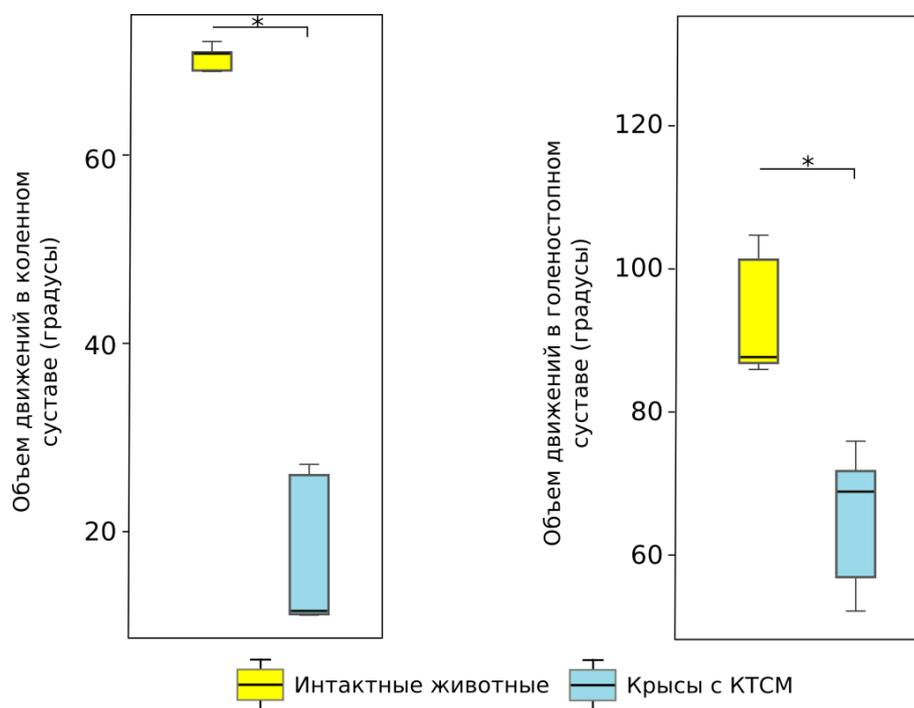


Рисунок 7. Анализ объема движений в коленном и голеностопном суставах у интактных животных и у крыс с КТСМ на 30 сутки эксперимента. *— статистически значимые различия, $p < 0,05$.

3.3. Электромиография скелетной мышцы

Электрофизиологические методы исследования включали игольчатую миографию икроножной мышцы в ответ на электрическую стимуляцию седалищного нерва (рис. 8А) и игольчатую миографию в ответ на магнитную стимуляцию шейно-грудного отдела спинного мозга (рис. 8Б).

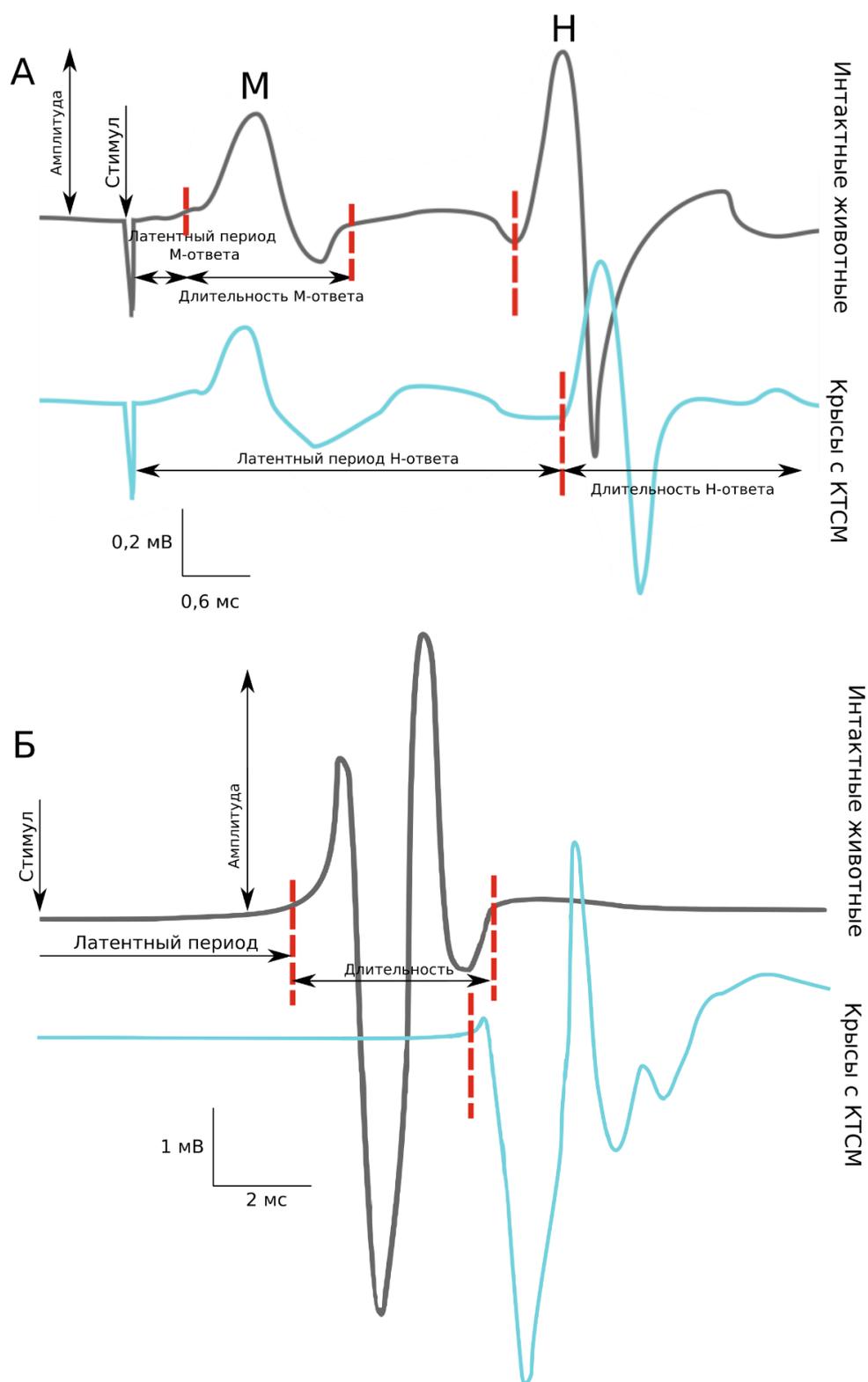


Рисунок 8. Игольчатая миография скелетной мышцы задней конечности интактного животного и крысы с КТСМ на 30 сутки эксперимента. А – Электромиограмма икроножной мышцы в ответ на электрическую стимуляцию седалищного нерва; Б – Электромиограмма икроножной мышцы в ответ на магнитную стимуляцию шейно-грудного отдела спинного мозга.

3.3.1. Игольчатая миография икроножной мышцы в ответ на электрическую стимуляцию седалищного нерва

На 30 сутки после моделирования нейротравмы анализ электромиограммы икроножной мышцы не выявил статистически значимых отличий в значениях порога, амплитуды, латентного периода и длительности М-ответа у крыс с КТСМ при сравнении с интактными животными ($p > 0,05$, табл. 6, рис. 9).

Таблица 6. Значения порога, амплитуды, латентного периода и длительности М-ответа икроножной мышцы в ответ на электрическую стимуляцию седалищного нерва.

Группы	М-ответ			
	Порог, мВ	Амплитуда, мВ	Латентный период, мс	Длительность, мс
Интактные животные	0,6 [0,6; 0,65]	7,97 [7,29; 8,22]	0,6 [0,6; 0,72]	2,2 [2,2; 2,28]
Крысы с КТСМ	0,425 [0,36; 0,58]	6,74 [6,13; 7,73]	0,6 [0,57; 0,62]	2,4 [2,4; 2,55]

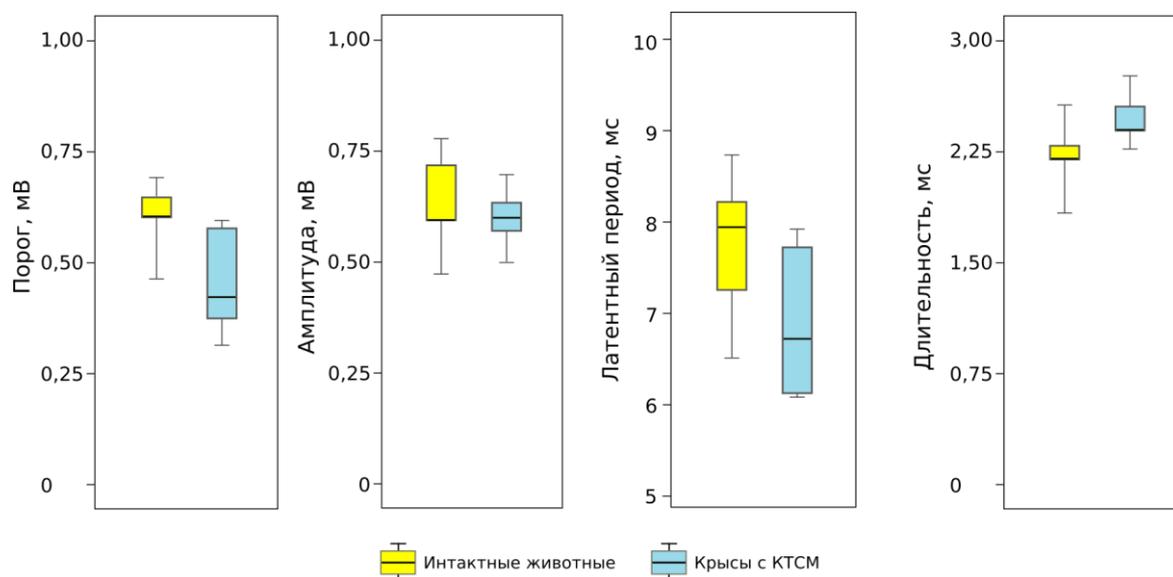


Рисунок 9. Показатели М-ответа икроножной мышцы крысы с КТСМ при электрической стимуляции седалищного нерва. *— статистически значимые различия, $p < 0,05$.

При исследовании Н-ответа икроножной мышцы, было обнаружено статистически значимое увеличение порога, снижение амплитуды и сокращение латентного периода у крыс с КТСМ при сравнении с интактными животными ($p > 0,05$, табл. 7, рис. 10). При этом длительность Н-ответа у этих не отличалась ($p < 0,05$, табл. 7, рис. 10).

Таблица 7. Значения порога, амплитуды, латентного периода и длительности Н-ответа икроножной мышцы в ответ на электрическую стимуляцию седалищного нерва.

Группы	Н-ответ			
	Порог, мВ	Амплитуда, мВ	Латентный период, мс	Длительность, мс
Интактные животные	1,0 [0,8; 1,1]	2,13 [2,05; 2,30]	3,10 [3,05; 3,15]	2,2 [2,2; 2,35]
Крысы с КТСМ	2,15 [2,05; 2,30]	0,67 [0,65; 0,85]	3,50 [3,45; 3,65]	2,3 [2,03; 2,35]

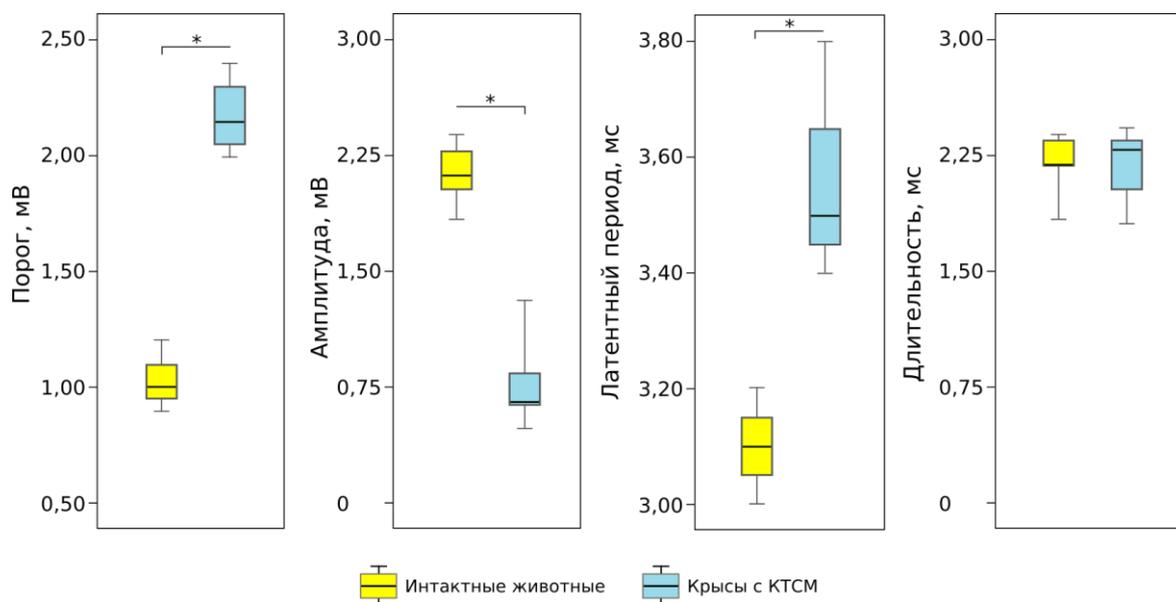


Рисунок 10. Показатели Н-ответа икроножной мышцы крысы с КТСМ при электрической стимуляции седалищного нерва. *— статистически значимые различия, $p < 0,05$.

3.3.2. Игольчатая миография икроножной мышцы в ответ на магнитную стимуляцию шейно-грудного отдела спинного мозга

При исследовании электромиограммы икроножной мышцы в ответ на магнитную стимуляцию шейно-грудного отдела спинного мозга было обнаружено увеличение порога, снижение амплитуды, удлинение латентного периода и длительности вызванных моторных потенциалов у крыс с КТСМ ($p < 0,05$, табл. 8, рис. 11).

Таблица 8. Игольчатая миография икроножной мышцы в ответ на магнитную стимуляцию шейно-грудного отдела спинного мозга.

Группы	Порог, %	Амплитуда, мВ	Латентный период, мс	Длительность, мс
Интактные животные	22,5 [20,0; 25,0]	10,34 [9,83; 10,5]	7,26 [7,25; 7,50]	4,05 [3,51; 4,7]
Крысы с КТСМ	80,0 [75,0; 90]	3,96 [1,915; 10,6]	15,25 [14,0; 15,78]	9,79 [8,84; 10,5]

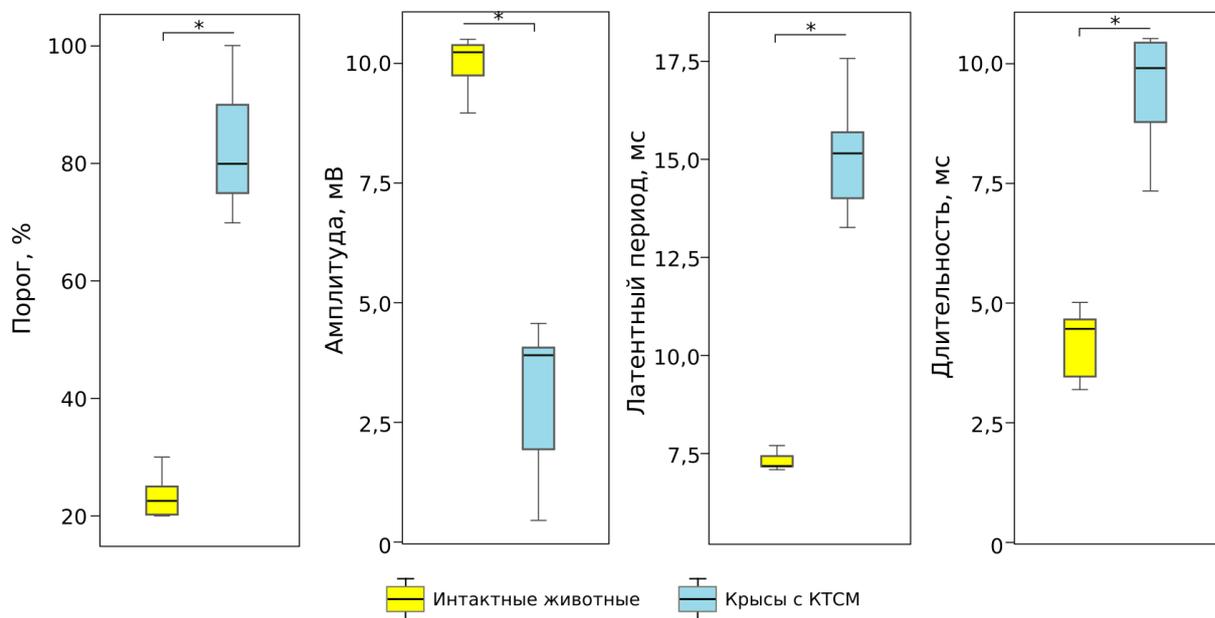


Рисунок 11. Вызванные моторные потенциалы икроножной мышцы крысы с КТСМ в ответ на магнитную стимуляцию спинного мозга. *— статистически значимые различия, $p < 0,05$.

3.4. Сохранность серого вещества

Гистологическое исследование спинного мозга крыс через 30 суток после контузионной травмы выявила выраженные морфологические изменения в сером веществе. У интактных животных относительная площадь серого вещества на уровне нижних грудных сегментов составляет 98% [97,1; 98,8]. У крыс с КТСМ роstralнее эпикентра травмы площадь серого вещества снизилась до 81,2% [74,8; 87,6], а каудальнее – до 89% [87,2; 90,7] ($p < 0,05$; рис. 12).

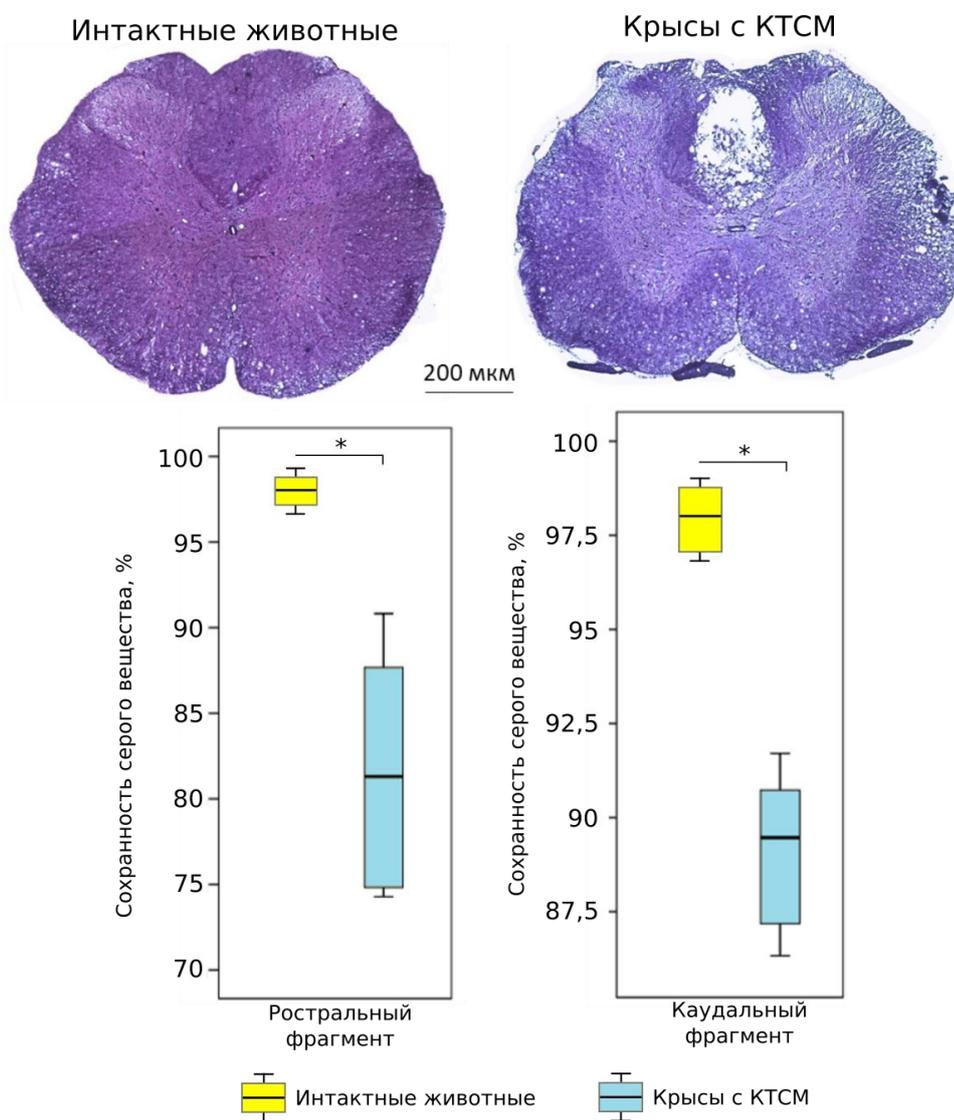


Рисунок 12. Сохранность серого вещества спинного мозга у крысы с КТСМ в роstralном и каудальном фрагментах относительно эпикентра травмы на 30 суток эксперимента. Верхняя панель – Поперечный срез грудного отдела спинного мозга. Нижняя панель – Морфометрический анализ относительной площади серого вещества спинного мозга. *— статистически значимые различия, $p < 0,05$.

3.5. Сохранность белого вещества

На 30 сутки после контузионной травмы спинного мозга было обнаружено незначительное снижение относительной площади миелина в переднем канатике (68,9% [66; 72,2]) при сравнении с интактными животными (71,8% [70,5; 73]) ($p > 0,05$). При этом статистически значимое снижение относительной площади миелина документировано в боковом (58,2% [57; 64,3]) и заднем (59,5% [53; 63,4]) канатиках относительно значений у интактных животных – 72,9% [72,6; 74,1] и 80,2% [79; 80,8], соответственно ($p < 0,05$; рис. 13).

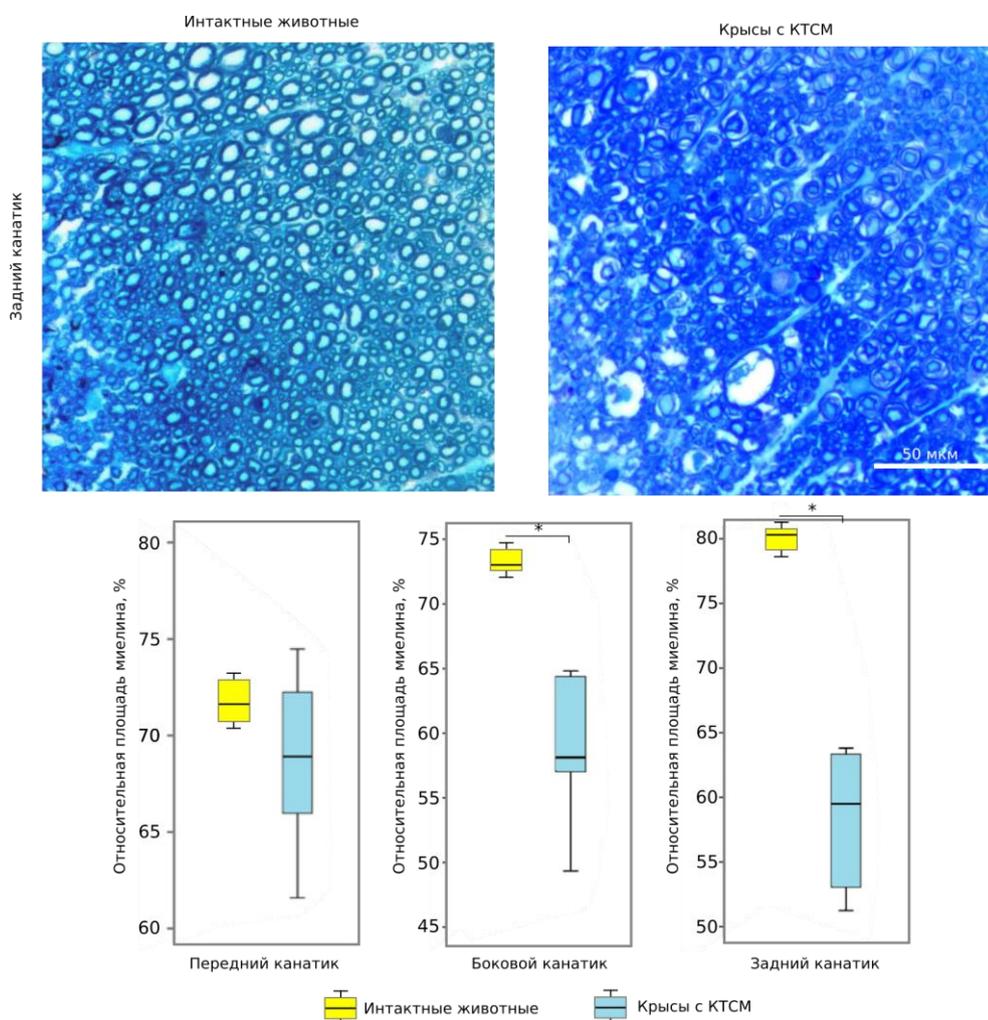


Рисунок 13. Сохранность белого вещества спинного мозга в эпицентре травмы у крыс с КТСМ на 30 сутки эксперимента. Верхняя панель – Поперечный срез заднего канатика белого вещества спинного мозга. Нижняя панель – Морфометрический анализ относительной площади миелина. *— статистически значимые различия, $p < 0,05$.

3.6. Анализ иммунофлуоресцентного окрашивания спинного мозга

Жизнеспособность клеток серого вещества оценивали с помощью антител против белка теплового шока с молекулярной массой 27 кДа (Hsp27), функциональное состояние нейронов – антителами против пресинаптического белка синапрекомбинантофизина и белка постсинаптической плотности с молекулярной массой 95 кДа (PSD95). Реакцию глиальных клеток изучали с помощью антител к GFAP (маркер астроцитов), NG2 (маркер предшественников олигодендроцитов) и Iba1 (маркер микроглии).

3.6.1. Белок теплового шока Hsp27

В передних рогах спинного мозга интактных животных количество Hsp27-позитивных клеток составило $9,3 \pm 2,5$. На 30 сутки после контузионной травмы спинного мозга количество Hsp27-позитивных клеток в каудальном фрагменте спинного мозга статистически значимо увеличивалось до $29,5 \pm 3,8$ ($p < 0,05$; рис. 14).

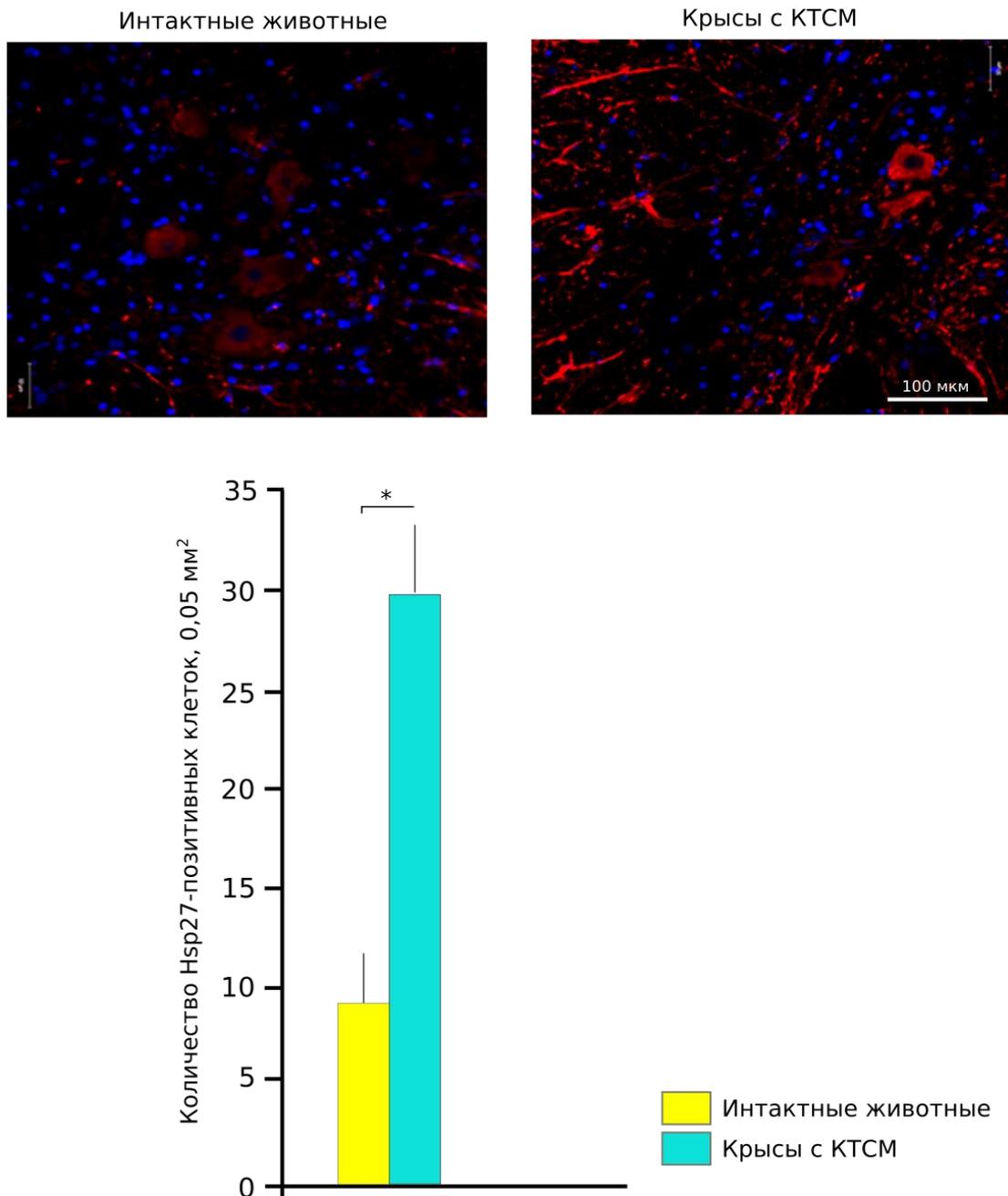


Рисунок 14. Анализ экспрессии Hsp27 в передних рогах спинного мозга крысы с КТСМ каудальнее места травмы на 30 сутки эксперимента. Верхняя панель – поперечный срез спинного мозга, окрашенный антителами к Hsp27 (красное свечение). Ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение). Нижняя панель – морфометрический анализ количества Hsp27-позитивных. *— статистически значимые различия, $p < 0,05$

3.6.2. Синаптические белки

При исследовании экспрессии синаптических белков у интактных крыс было обнаружено, что средняя интенсивность флуоресценции синаптофизина

составила $37,0 \pm 2,5$, а PSD95 – $33,8 \pm 2,7$. У крыс с КТСМ наблюдалось значительное снижение экспрессии синаптических белков, где интенсивность флуоресценции составила $16,8 \pm 1,3$ и $14,3 \pm 2,8$, соответственно ($p < 0,05$; рис. 15).

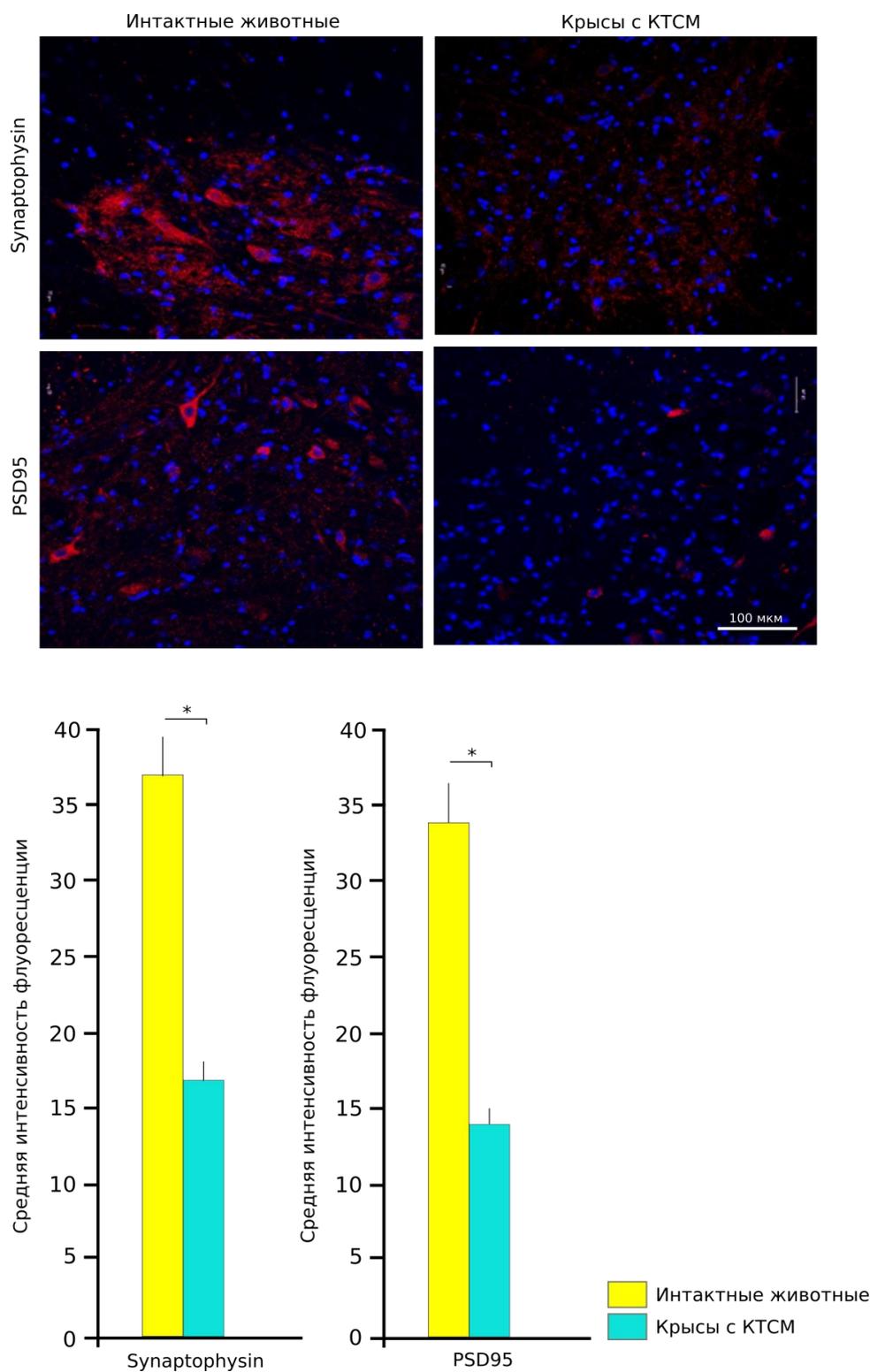


Рисунок 15. Анализ экспрессии синаптических белков в передних рогах спинного мозга крысы с КТСМ каудальнее места травмы на 30 сутки эксперимента. Верхняя панель – поперечный срез спинного мозга, окрашенный антителами к синаптофизину (красное

свечение) и PSD95 (красное свечение). Ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение). Нижняя панель – морфометрический анализ значений средней интенсивности флуоресценции синаптофизина (*Synaptophysin*) и PSD95. *— статистически значимые различия, $p < 0,05$.

3.6.3. Клетки нейроглии

Количество GFAP-позитивных астроцитов у интактных животных в передних рогах спинного мозга составило $8,5 \pm 2,8$. На 30 сутки после контузионной травмы количество астроцитов увеличивается более чем в 2 раза – $19,2 \pm 3,0$ ($p < 0,05$; рис. 16).

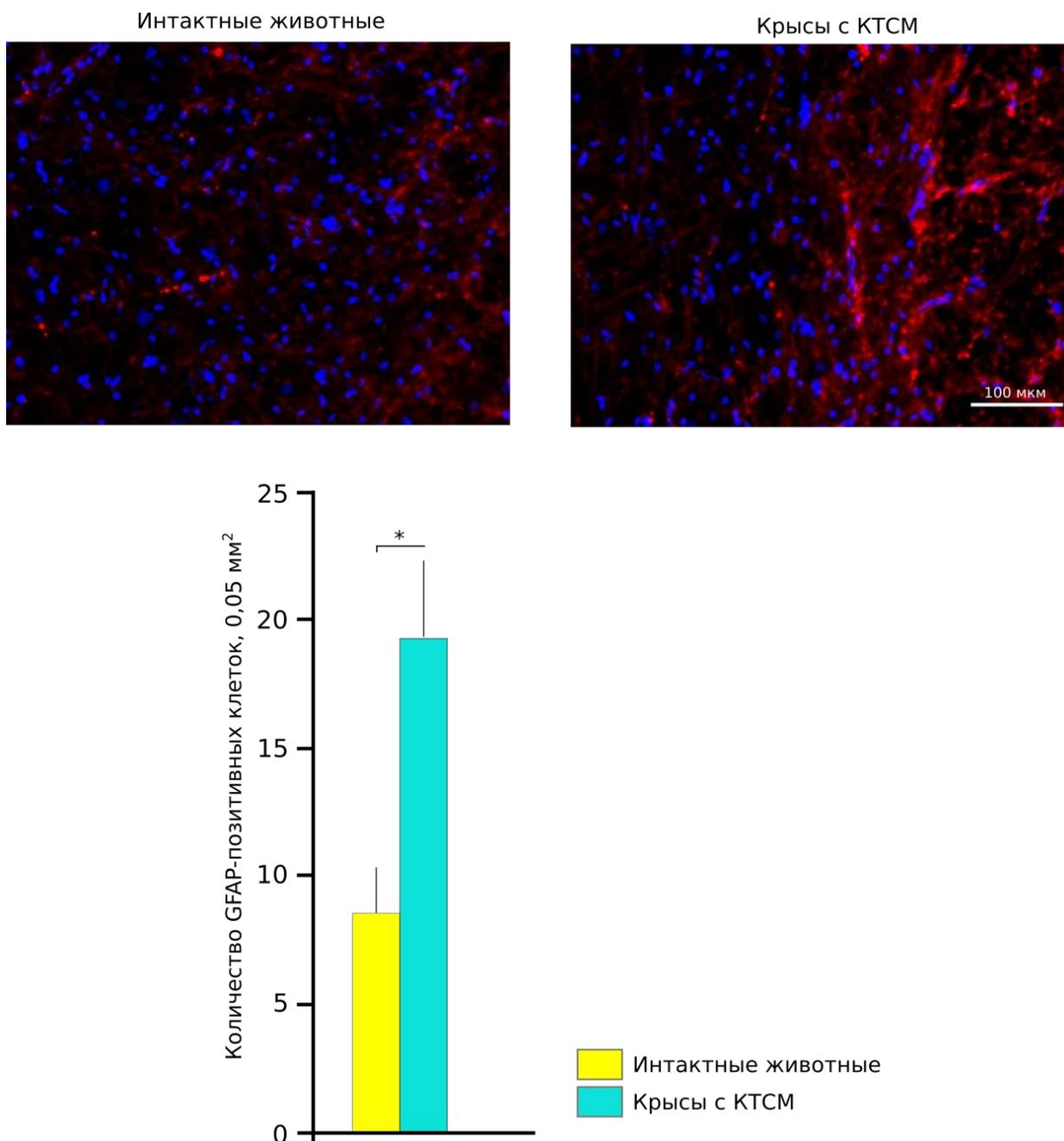


Рисунок 16. Анализ экспрессии GFAP в передних рогах спинного мозга крысы с КТСМ каудальнее места травмы на 30 сутки эксперимента. Верхняя панель – поперечный срез спинного мозга, окрашенный антителами к GFAP (красное свечение). Ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение). Нижняя панель – морфометрический анализ количества GFAP-позитивных клеток. *— статистически значимые различия, $p < 0,05$.

Количество NG2-позитивных олигодендроглиальных клеток у интактных животных составляло $26,2 \pm 4,4$. При этом количество предшественников олигодендроцитов на фоне нейротравмы на 30 сутки незначительно уменьшалось до $21,1 \pm 4,1$ ($p > 0,05$; рис. 17).

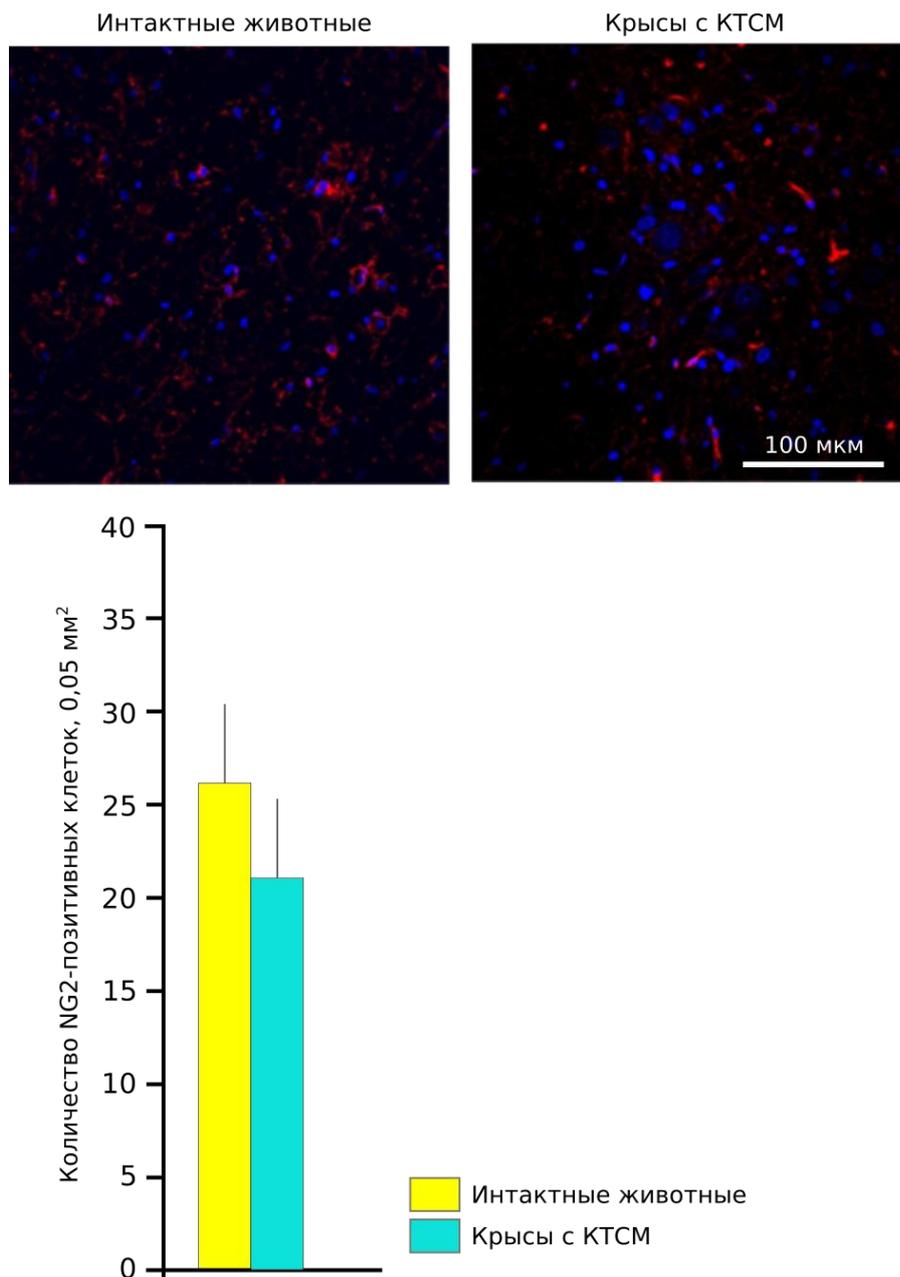


Рисунок 17. Анализ экспрессии NG2 в передних рогах спинного мозга крысы с КТСМ каудальнее места травмы на 30 сутки эксперимента. Верхняя панель – поперечный срез спинного мозга, окрашенный антителами к NG2 (красное свечение). Ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение). Нижняя панель – морфометрический анализ количества NG2-позитивных клеток. *— статистически значимые различия, $p < 0,05$.

Количество клеток микроглии у здоровых животных в передних рогах составляет $6,3 \pm 0,8$. Через 30 суток после моделирования КТСМ количество Iba1-позитивных клеток увеличивается до $17 \pm 0,8$ ($p < 0,05$; рис. 18).

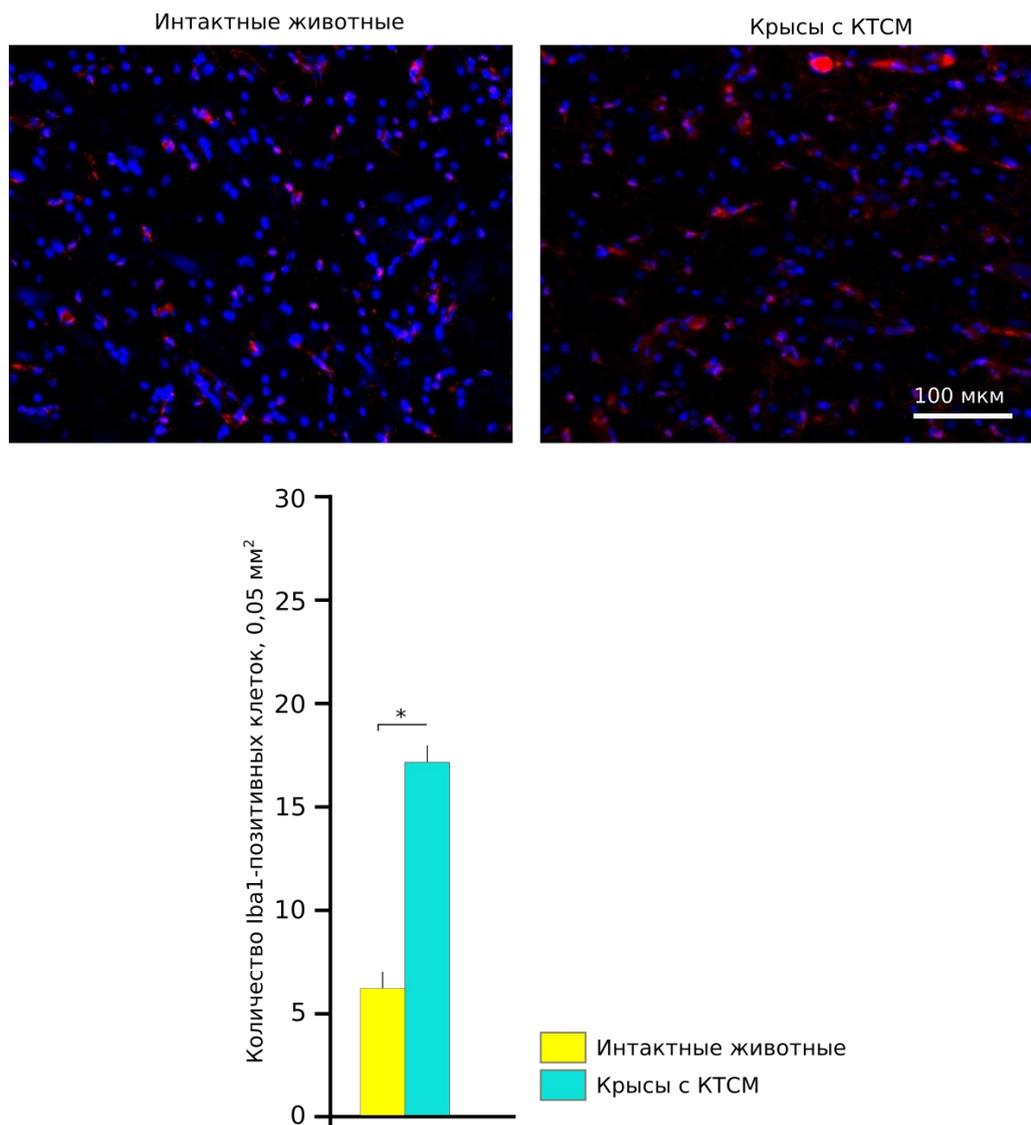


Рисунок 18. Анализ экспрессии *Iba1* в передних рогах спинного мозга крысы с КТСМ каудальнее места травмы на 30 сутки эксперимента. Верхняя панель – поперечный срез спинного мозга, окрашенный антителами к *Iba1* (красное свечение). Ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение). Нижняя панель – морфометрический анализ количества *Iba1*-позитивных клеток. *— статистически значимые различия, $p < 0,05$.

ГЛАВА 4. ДОСТАВКА РЕКОМБИНАНТНЫХ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ VEGF, ANG И NCAM В СПИННОЙ МОЗГ КРЫСЫ ПОСЛЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ КОНТУЗИОННОЙ ТРАВМЫ

4.1. Анализ экспрессии рекомбинантных генов

4.1.1. Экспрессия репортерного гена зеленого флуоресцирующего белка в МККП *in vitro*

Экспрессию рекомбинантных генов в генетически модифицированных МККП изучали через 48 часов после трансдукции МККП аденовирусным вектором, несущим ген репортерного зеленого флуоресцирующего белка (МККП+Ad5-GFP) и после трансдукции МККП одновременно тремя аденовирусными векторами, несущими гены *veg*, *gdnf* и *ncam* (МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM).

Эффективность трансдукции МККП аденовирусным вектором Ad5-GFP доказана с помощью флуоресцентной микроскопии. В цитоплазме генетически модифицированных МККП выявлено специфическое зеленое свечение (рис. 19).

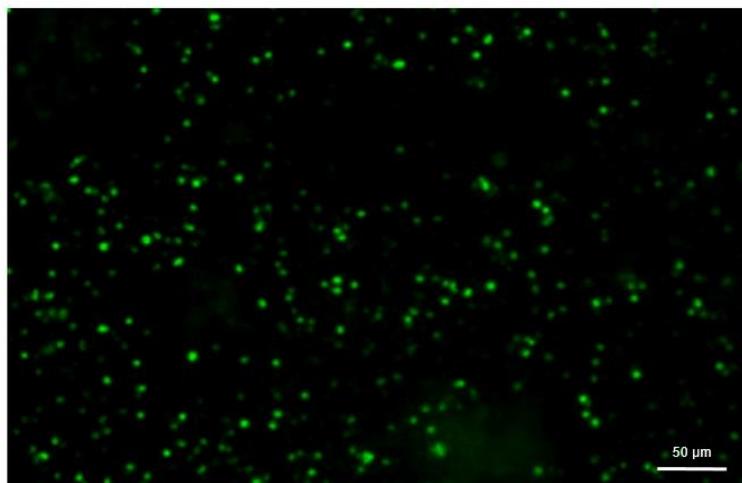


Рисунок 19. Флуоресцентная микроскопия МККП, трансдуцированных Ad5-GFP, через 48 часов культивирования. Специфическое зеленое свечение свидетельствует о продукции генетически модифицированными МККП зеленого флуоресцирующего белка (GFP).

4.1.2. Экспрессия рекомбинантных генов *vegfl65*, *ang* и *ncam1* в МККП *in vitro*

Эффективность одновременной трансдукции МККП аденовирусными векторами, несущими гены *vegfl65*, *ang* и *ncam1*, оценивали методом ПЦР-РВ с помощью специфических праймеров к трансгенам. Показано, что уровень мРНК генов-мишеней в генетически модифицированных мононуклеарных клетках крови пуповины человека (МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM) был выше для VEGF в $105,6 \pm 0,9$ раз, для ANG в $89,78 \pm 1,21$ раз и для NCAM в $102,8 \pm 0,7$ раз по сравнению с уровнем мРНК генов-мишеней в нативных МККП ($p < 0,05$; рис. 20).

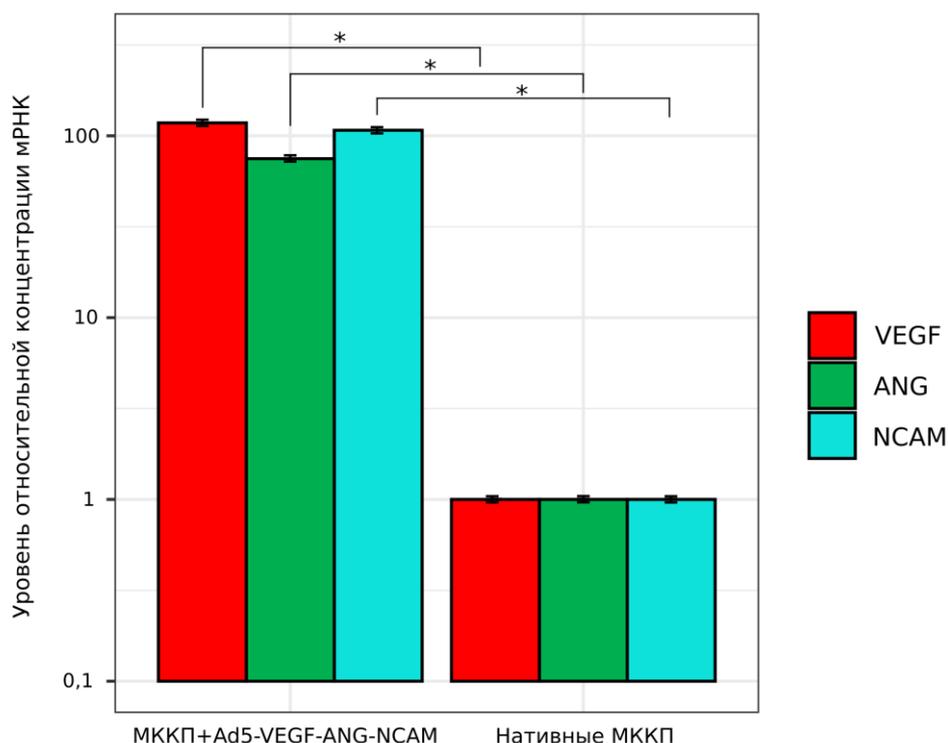


Рисунок 20. Количественный анализ уровня мРНК трансгенов *vegfl65*, *ang* и *ncam1* в генетически модифицированных мононуклеарных клетках крови пуповины человека (МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM) и нативных (нетрансдуцированных) МККП. Данные двух независимых экспериментов представлены как среднее значение \pm С.О., $p < 0,05$.

4.1.3. Экспрессия репортерного гена зеленого флуоресцирующего белка (GFP) в спинном мозге крысы

Экспрессия гена, кодирующего зелёный флуоресцирующий белок GFP, документирована в спинном мозге роstralнее эпицентра травмы на 2, 4, 7, 14, 21 и 30 сутки после интратекальной инъекции аденовируса Ad5-GFP. Специфическое свечение установлено начиная со 2-х суток после введения аденовирусного вектора. При этом интенсивность флуоресценции GFP усиливалась к 4 суткам и достигала максимума на 7 сутки. На 14 сутки было отмечено снижение интенсивности специфического свечения. Уровень флуоресценции постепенно продолжал уменьшаться к 21-м суткам и значительно снижался на 30-е сутки исследования (рис. 21).

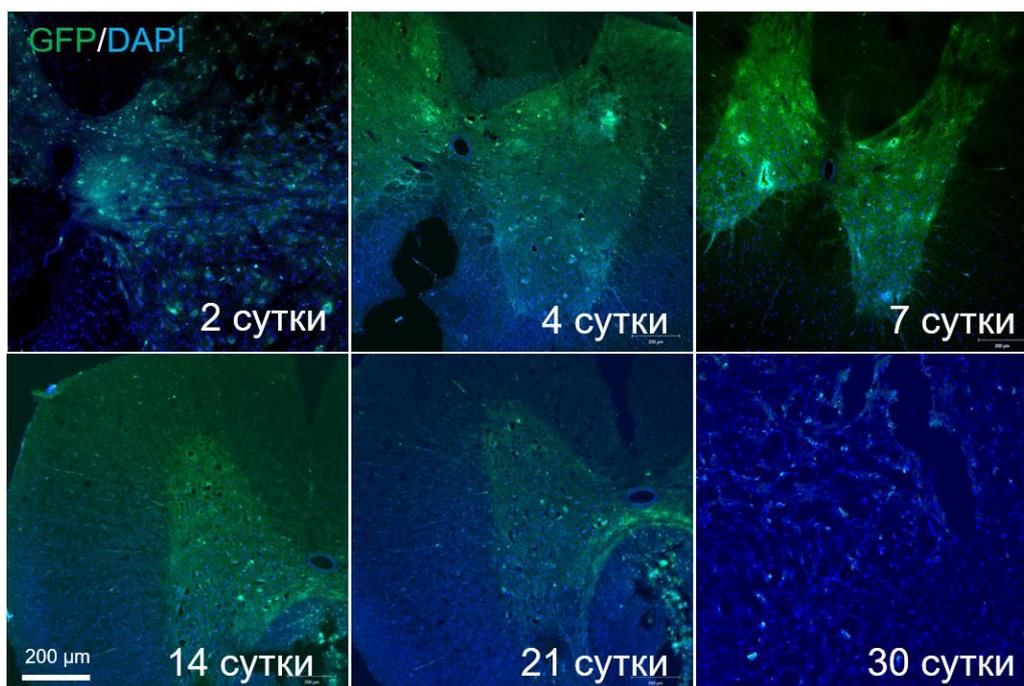


Рисунок 21. Экспрессия репортерного гена зеленого флуоресцирующего белка в спинном мозге крысы с КТСМ. Верхняя панель – специфическое зеленое свечение белка GFP в

клетках спинного мозга крыс с КТСМ ростральнее эпицентра травмы на 2, 4, 7, 14, 21 и 30 сутки после интратекальной инъекции аденовируса Ad5-GFP. Нижняя панель – значения плотности флуоресценции на 2, 4, 7, 14, 21 и 30 сутки после моделирования КТСМ.

4.1.3. Экспрессия рекомбинантных генов *veg165*, *ang* и *ncam1* в спинном мозге крысы с КТСМ

Иммунофлуоресцентный анализ подтвердил продукцию в клетках спинного мозга ростральнее эпицентра травмы рекомбинантных молекул (VEGF, ANG, NCAM) при интратекальной доставке генов *veg165*, *ang* и *ncam1* на аденовирусных векторах (рис. 22). Уровень экспрессии трансгенов на этом сроке эксперимента соответствовал свечению GFP на 30 сутки после интратекальной инъекции Ad5-GFP.

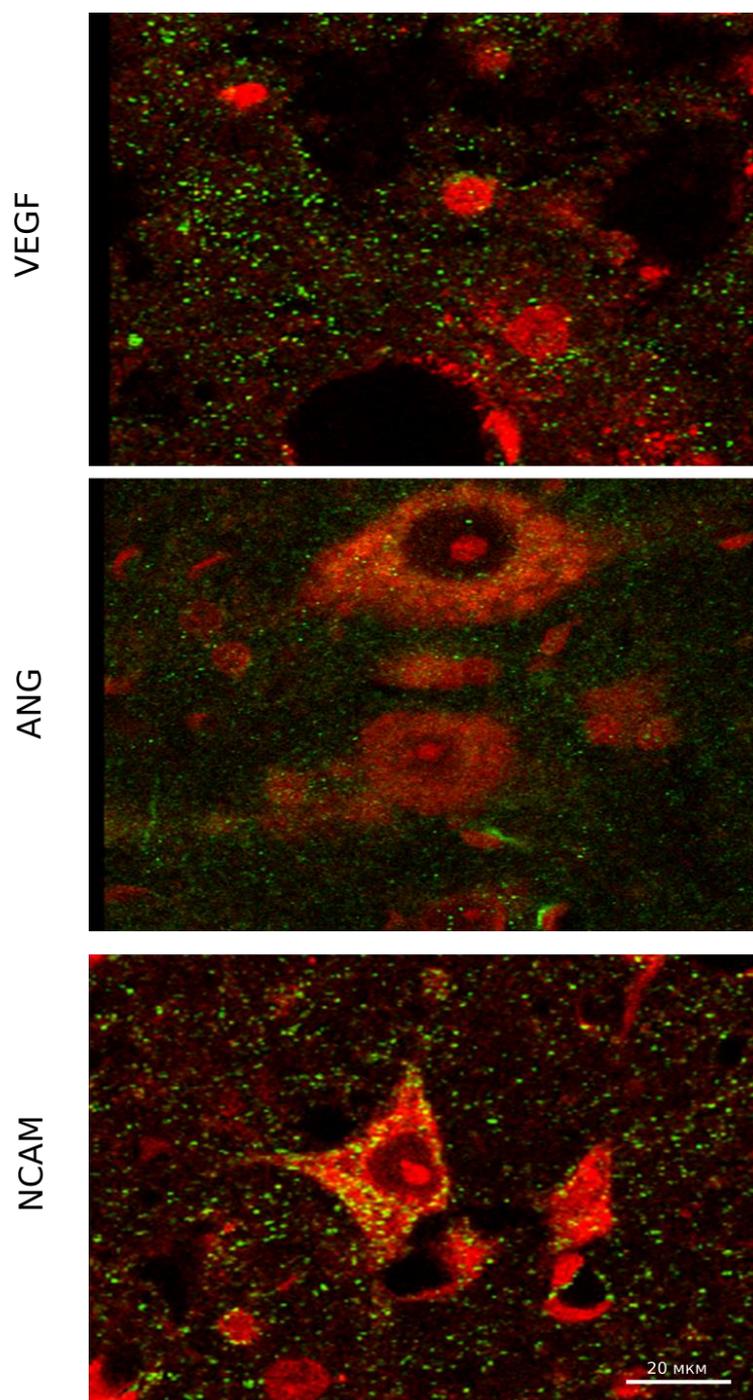


Рисунок 22. Иммунофлуоресцентное окрашивание рострального отдела спинного мозга крысы с КТСМ специфическими антителами против рекомбинантных молекул VEGF, ANG, NCAM на 30 сутки после интратекальной инъекции генного препарата Ad5-VEGF-ANG-NCAM. Зеленое свечение – визуализация рекомбинантных VEGF, ANG, NCAM. Оранжевое свечение – ядра клеток и рибосомы, окрашенные раствором пропидия иодида.

4.1.4. Экспрессия рекомбинантных генов *vegfl65*, *ang* и *ncam1* генетически модифицированными МККП в спинном мозге крысы с КТСМ

Производство рекомбинантных факторов (VEGF, GDNF и NCAM) генетически модифицированными МККП *in vivo* исследовали с помощью двойного иммунофлуоресцентного окрашивания антителами против человеческого ядерного антигена и одной из рекомбинантных молекул (VEGF, GDNF, NCAM) (рис. 23). На 30-е сутки после интратекальной инъекции генно-клеточного препарата (МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM или МККП+Ad5-GFP) HNA-позитивные клетки были выявлены в сером и белом веществе спинного мозга роstralнее эпицентра травмы. Количество МККП в группе МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM (86 [74; 90]) было статистически значимо выше, чем в контрольной группе МККП+Ad5-GFP (47 [43; 55]) (рис. 24).

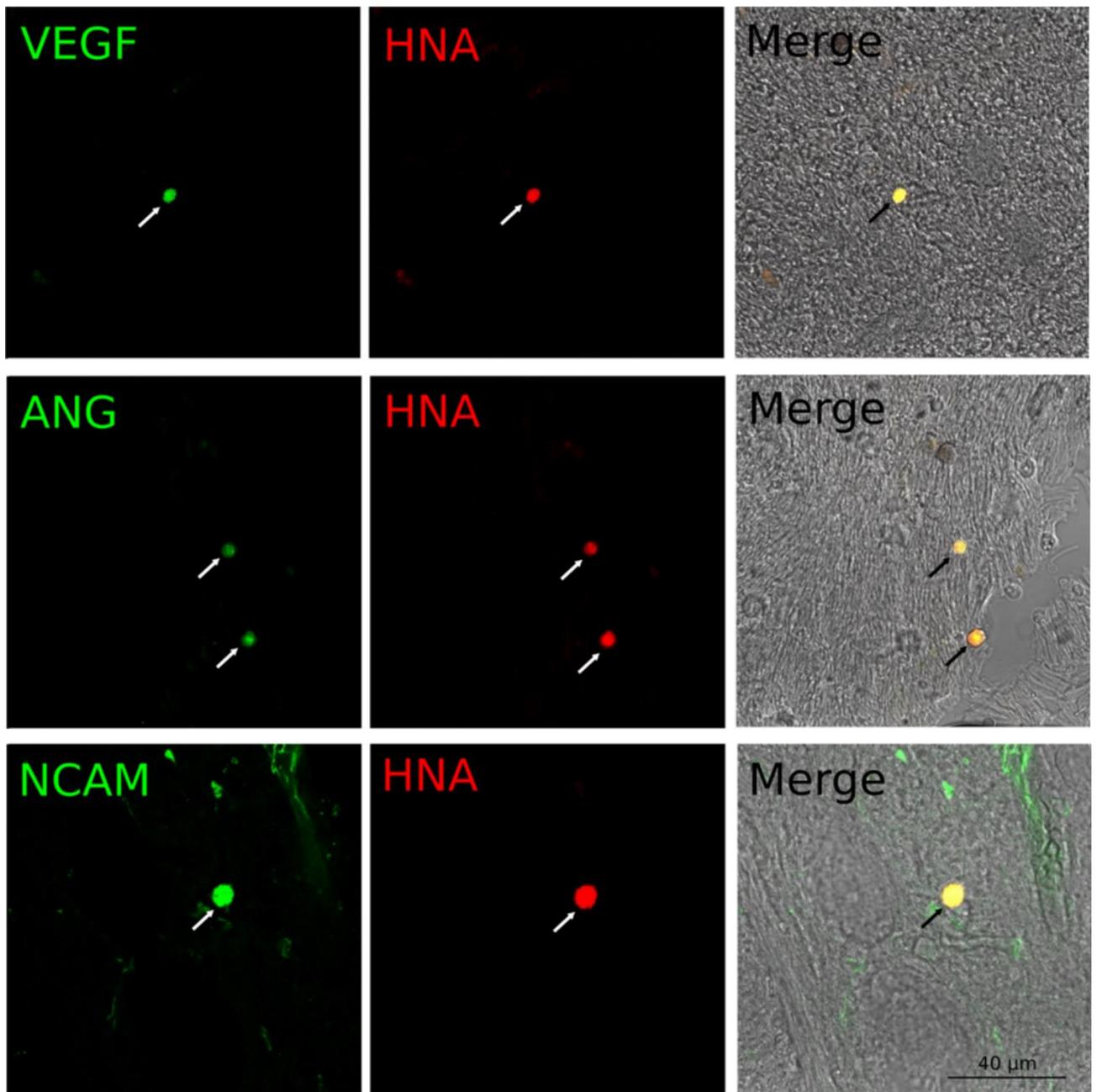


Рисунок 23. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии рекомбинантных молекул VEGF, GDNF, NCAM генетически модифицированными МККП в спинном мозге роstralнее эпицентра травмы у крыс с КТСМ на 30 сутки после интратекальной инъекции генно-клеточного препарата. Зеленое свечение – визуализация иммунной реакции с антителами против VEGF, GDNF и NCAM. Зеленое свечение – визуализация иммунной реакции с антителами против HNA.

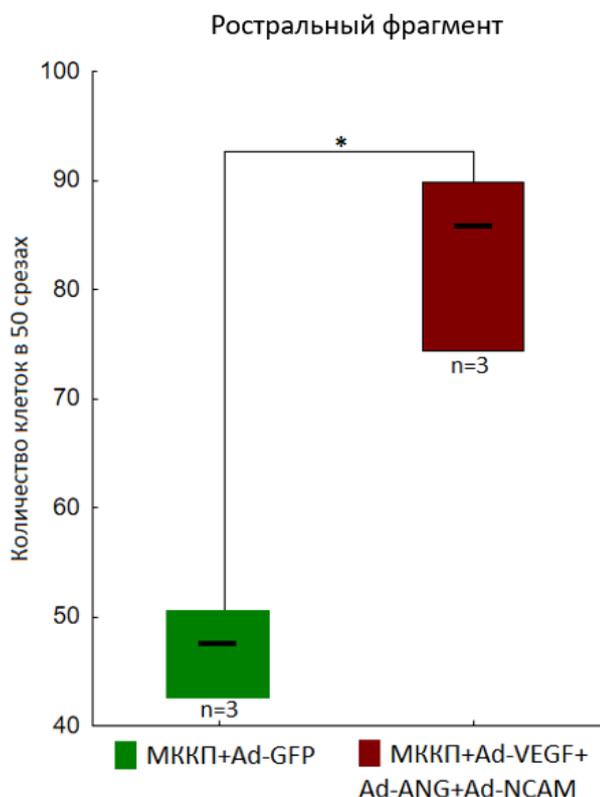


Рисунок 24. Количественный анализ генетически модифицированных МККП в спинном мозге крыс с КТСМ ростральное эпицентра травмы на 30 сутки после интратекальной инъекции МККП+Ad5-GFP и МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM. *— статистически значимые различия, $p < 0,05$.

Таким образом, экспрессия в генетически модифицированных МККП нейрональной молекулы адгезии NCAM повышает миграционный потенциал МККП в область нейродегенерации и жизнеспособность трансплантированных МККП в спинном мозге экспериментальных крыс. Важно отметить, что МККП были документированы в ростральном отделе (выше эпицентра травмы) после интратекальной инъекции в поясничном отделе ниже уровня нанесения контузионной травмы на уровне L4-L5.

4.2. Оценка эффективности доставки рекомбинантных генов *vegfl65*, *ang* и *pcam1* на морфо-функциональное восстановление спинного мозга крыс с КТСМ

Согласно дизайну эксперимента, крысам через 4 часа после моделирования КТСМ интратекально вводили генный препарат (Ad5-GFP или Ad5-VEGF-ANG-NCAM) или генно-клеточный препарат (МККП+Ad5-GFP или МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM). Анализ эффективности генных и генно-клеточных препаратов на морфо-функциональное восстановление спинного мозга проводили в сравнении с результатами, полученными в исследованиях на крысах с КТСМ и представленных в разделе 4.1.

4.2.1. Поведенческие тесты

Сравнительный анализ в тестах «BBB» и «Ротарод» проводили относительно интактных животных и крыс с КТСМ.

Показатели теста «BBB» в группах МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM (14.5 [14, 15]) и Ad5-VEGF-ANG-NCAM (15.5 [14.75, 16.5]) не различались между собой, но были статистически значимо выше, чем в группах Ad5-GFP (8 [6.5, 8]) и у крыс с КТСМ. Различий между МККП+Ad5-GFP (10 [9, 11.25]) и МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM не обнаружено, но значения в группе МККП+Ad5-GFP были статистически значимо ниже при сравнении с группой Ad5-VEGF-ANG-NCAM (рис. 25).

На 30 сутки после травмы спинного мозга значения восстановления двигательной активности в тесте «Ротарод» в группах МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM (14 [13,2; 14,4]) и Ad5-VEGF-ANG-NCAM (14 [13,6; 14,4]) статистически значимо выше при сравнении с результатами группы крысы с КТСМ, Ad5-GFP (9,2[8,4; 9,2]) и МККП+Ad5-GFP (9,2 [8,4; 10,8]). При этом различий как между группами МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM и Ad5-VEGF-ANG-NCAM, так и между группами крысы с КТСМ, Ad5-GFP и МККП+Ad5-GFP не установлено (рис. 25).

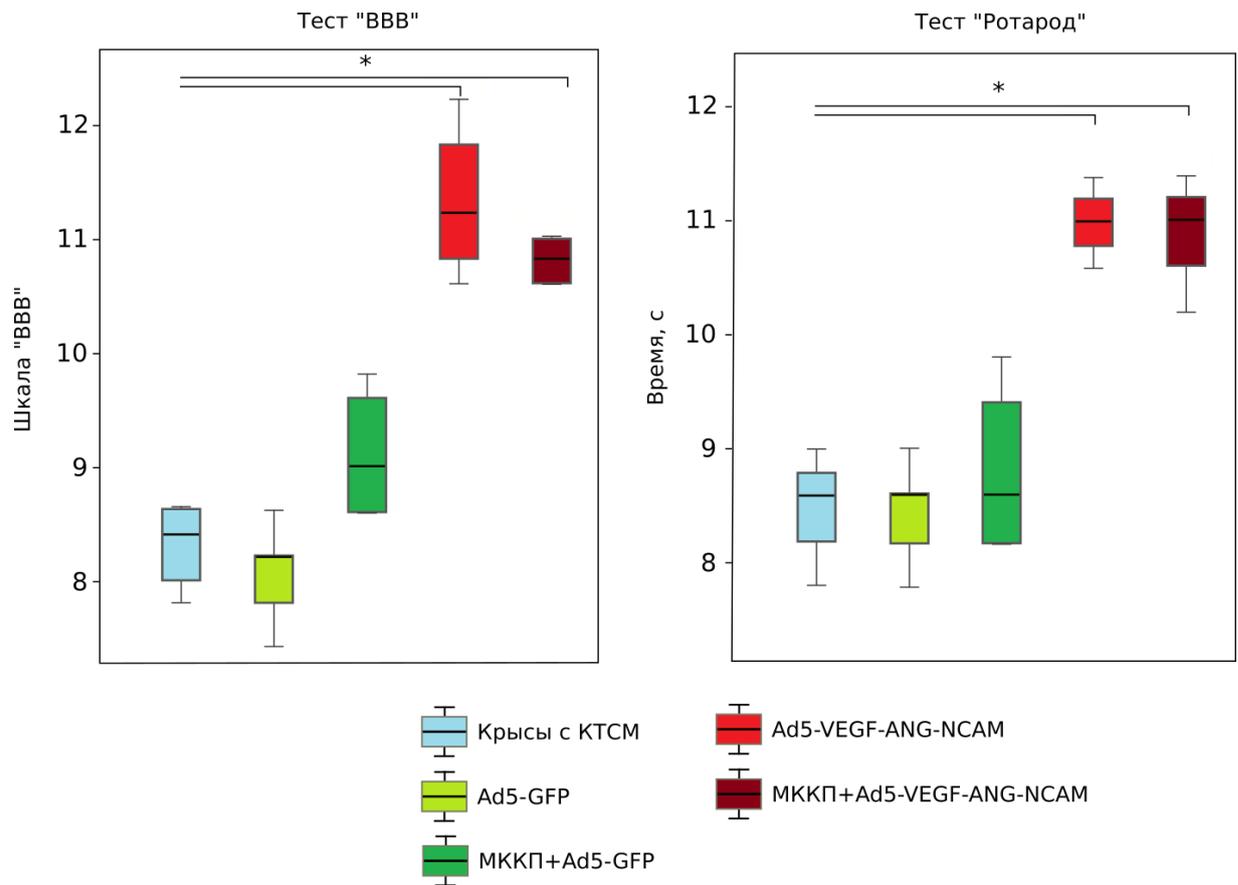


Рисунок 25. Сравнительный анализ данных поведенческих тестов «ВВВ» и «Ротарод» у экспериментальных животных через 30 суток после моделирования КТСМ. * — статистически значимые различия, $p < 0,05$.

4.2.2. Кинематика суставов

При исследовании объемов движений в тазобедренном и коленном суставах статистически значимых различий между крысами с КТСМ и группами, которые получили генные и генно-клеточные препараты выявлено не было. Величина объема движений в голеностопном суставе в группах МККП+Ad5-GFP, МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM и Ad5-VEGF-ANG-NCAM была статистически выше, при сравнении с крысами с КТСМ и Ad5-GFP группой (табл. 9, рис. 26).

Таблица 9. Объемы движений в тазобедренном, коленном и голеностопном суставах.

Группа	Тазобедренный сустав, град.	Коленный сустав, град.	Голеностопный сустава, град.
Интактные животные	22 [9; 24]	71 [69; 71]	88 [87; 102]
Крысы с травмой СМ (контроль, n=4)	19 [19; 21]	11 [11; 26]	69 [57; 102]
Ad5-GFP (контроль, n=8)	22 [19; 23]	17 [11; 23]	63 [63; 68]
МККП+Ad5-GFP (n=6)	14 [9; 17,5]	35 [24,8 42,2]	108,5 [105; 117,2]
Ad5-VEGF-ANG-NCAM (n=4)	18,5 [13,5; 24,2]	25 [20,7; 36]	98,5 [93,5; 106,2]
МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM (n=7)	26 [19; 32,5]	43 [36,5; 51,5]	93 [80,5; 105]

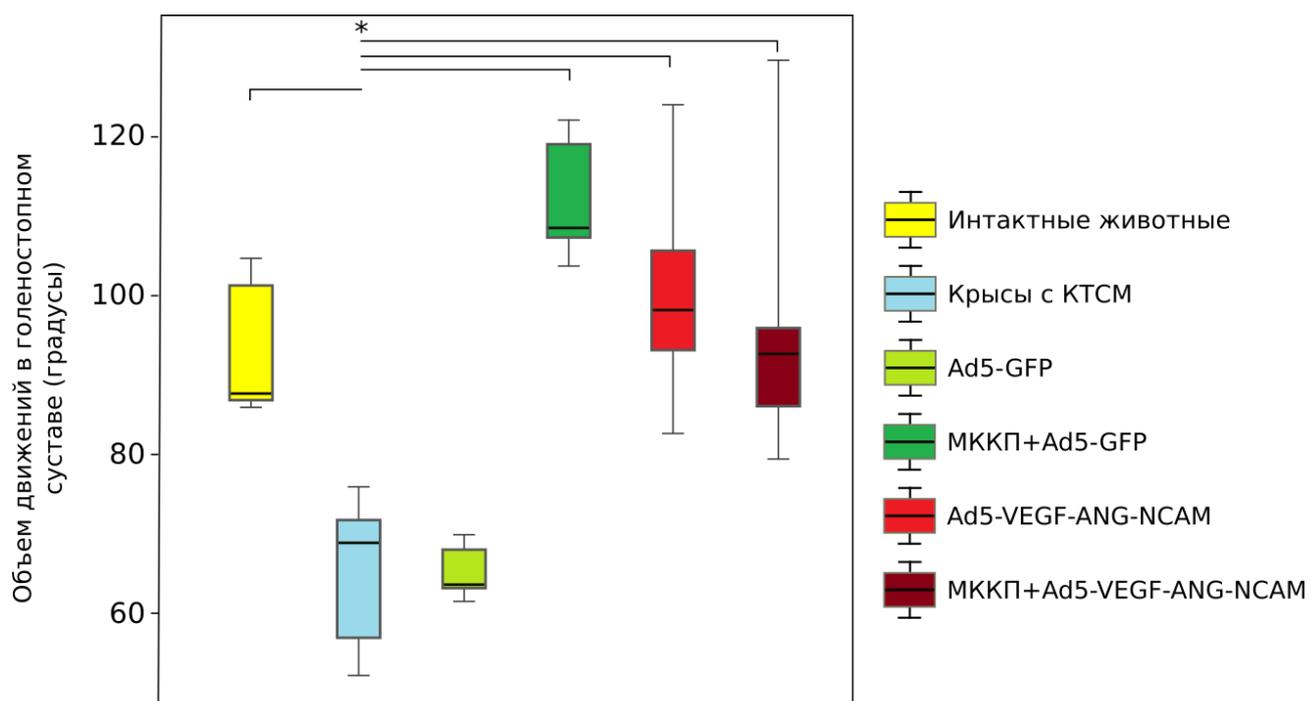


Рисунок 26. Анализ объемов движений в суставах у крыс с КТСМ на 30 сутки эксперимента. *— статистически значимые различия, $p < 0,05$.

4.2.3. Электромиография скелетной мышцы

4.2.3.1. Игольчатая миография икроножной мышцы в ответ на электрическую стимуляцию седалищного нерва

При исследовании порога, амплитуды, латентного периода и длительности М-ответа у групп Ad5-GFP, МККП+Ad5-GFP, Ad5-VEGF-ANG-NCAM и МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM при сравнении с интактными животными и крысами с КТСМ статистически значимые отличия не выявлены ($p>0,05$, табл. 10, рис. 27).

Таблица 10. Значения порога, амплитуды, латентного периода и длительности М-ответа икроножной мышцы в ответ на электрическую стимуляцию седалищного нерва.

Группы	М-ответ			
	Порог, мВ	Амплитуда, мВ	Латентный период, мс	Длительность, мс
Интактные животные	0,6 [0,6; 0,65]	7,97 [7,29; 8,22]	0,6 [0,6; 0,72]	2,2 [2,2; 2,28]
Крысы с КТСМ	0,425 [0,36; 0,58]	6,74 [6,13; 7,73]	0,6 [0,57; 0,62]	2,4 [2,4; 2,55]
Ad5-GFP	0,41 [0,33; 0,67]	7,51 [7,67; 8,58]	0,6 [0,6; 0,8]	2,7 [2,67; 2,85]
МККП+Ad5-GFP	0,38 [0,25; 0,58]	7,59 [6,65; 8,54]	0,7 [0,62; 0,77]	2,2 [2,05; 2,275]
Ad5-VEGF-ANG-NCAM	0,47 [0,4; 0,49]	9,16 [7,38; 10,38]	0,7 [0,6; 0,7]	2,7 [2,4; 2,825]
МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM	0,25 [0,25; 0,43]	8,94 [7,98; 9,15]	0,5 [0,5; 0,6]	2,2 [2,2; 2,23]

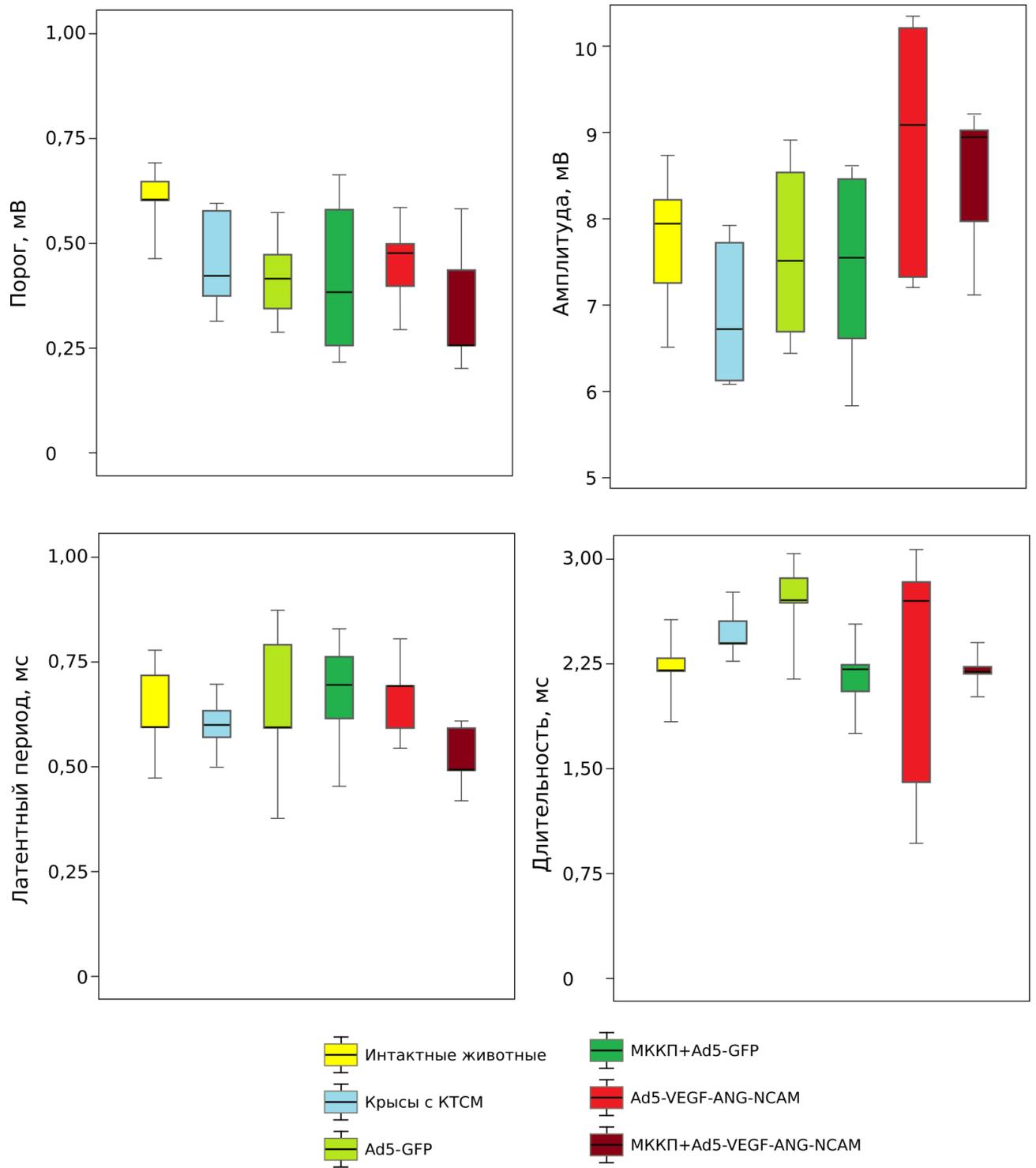


Рисунок 27. Показатели М-ответа икроножной мышцы при электрической стимуляции седалищного нерва. *— статистически значимые различия, $p < 0,05$.

Порог и латентный период Н-ответа икроножной мышцы у группы МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM статистически значимо отличался от таковых у крыс с КТСМ и приближался к значениям интактных животных ($p < 0,05$, табл.

11, рис. 28). Значения амплитуды у крыс в группах, получивших генные и генно-клеточные препараты не отличались друг от друга и значимо были ниже при сравнении с интактными животными. Длительность Н-ответа не отличалась у крыс во всех группах.

Таблица 11. Значения порога, амплитуды, латентного периода и длительности Н-ответа икроножной мышцы в ответ на электрическую стимуляцию седалищного нерва.

Группы	Н-ответ			
	Порог, мВ	Амплитуда, мВ	Латентный период, мс	Длительность, мс
Интактные животные	1,0 [0,8; 1,1]	2,13 [2,05; 2,30]	3,10 [3,05; 3,15]	2,2 [2,2; 2,35]
Крысы с КТСМ	2,15 [2,05; 2,30]	0,67 [0,65; 0,85]	3,50 [3,45; 3,65]	2,3 [2,03; 2,35]
Ad5-GFP	1,95 [1,875; 2,05]	0,81 [0,56; 0,87]	3,45 [3,50; 3,60]	2,45 [2,3; 2,55]
МККП+Ad5-GFP	1,65 [1,55; 1,80]	0,91 [0,61; 1,10]	3,30 [3,20; 3,30]	2,35 [2,2; 2,5]
Ad5-VEGF-ANG-NCAM	1,92 [1,85; 2,0]	1,02 [0,87; 1,20]	3,35 [3,35; 3,50]	2,5 [2,4; 2,5]
МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM	1,62 [1,40; 1,63]	1,72 [1,46; 2,13]	3,20 [3,20; 3,30]	2,2 [2,0; 2,35]

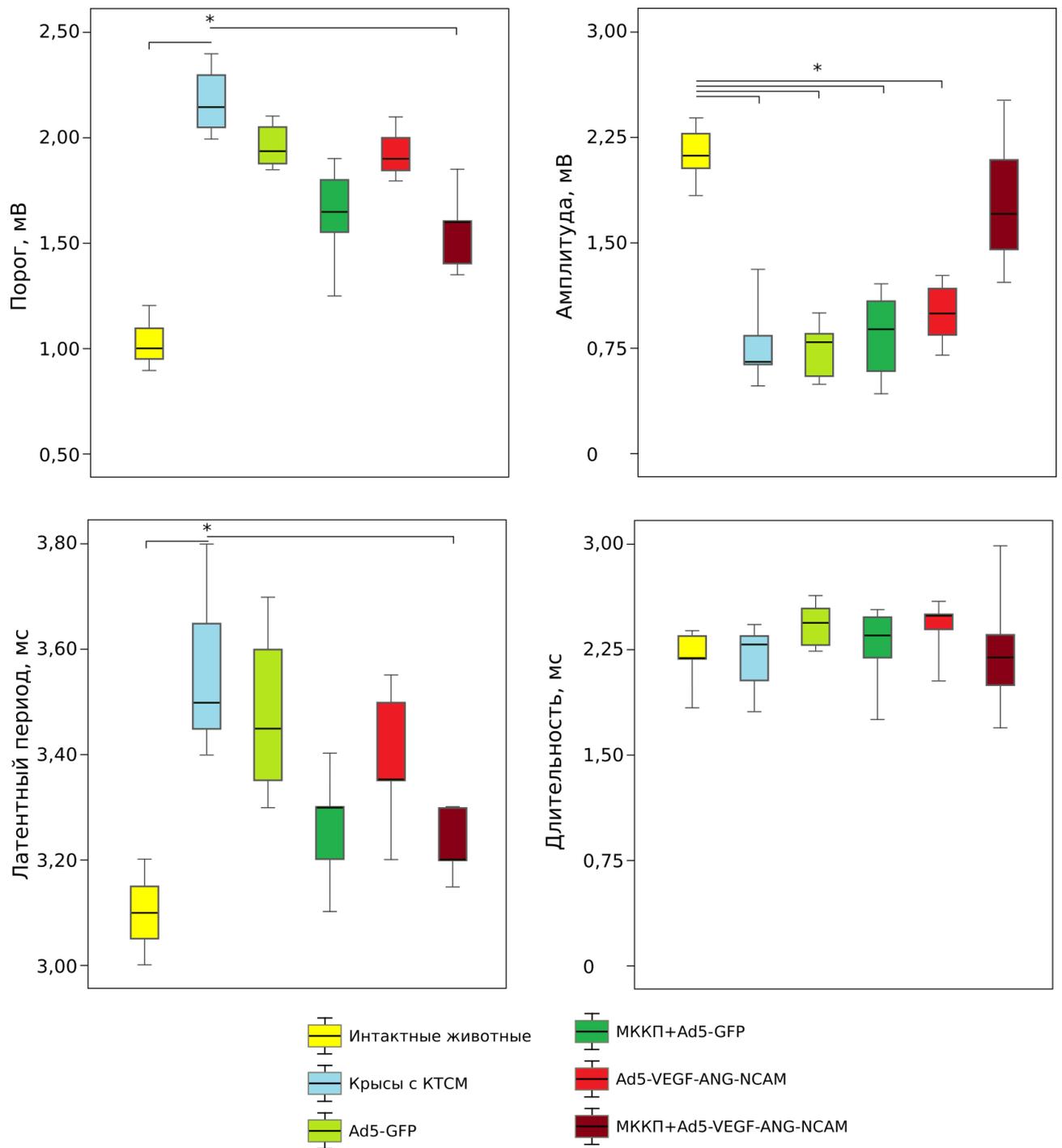


Рисунок 28. Показатели Н-ответа икроножной мышцы при электрической стимуляции седалищного нерва. *— статистически значимые различия, $p < 0,05$.

4.2.3.2. Игольчатая миография икроножной мышцы в ответ на магнитную стимуляцию шейно-грудного отдела спинного мозга

На 30 сутки после травмы спинного мозга значение порога вызванного моторного потенциала в группе МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM статистически

значимо было ниже, чем у крыс с КТСМ и приближалось к параметрам интактных животных ($p < 0,05$, табл. 12, рис. 29). Латентный период ответа у крыс в группах Ad5-VEGF-ANG-NCAM и МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM был короче при сравнении с крысами с КТСМ ($p < 0,05$, табл. 12, рис. 29). Значения амплитуды и длительности вызванного моторного потенциала у крыс, после введения генных или генно-клеточных препаратов не отличались от крыс с КТСМ ($p > 0,05$, табл. 12, рис. 29).

Таблица 12. Игольчатая миография икроножной мышцы в ответ на магнитную стимуляцию шейно-грудного отдела спинного мозга.

Группы	Порог, %	Амплитуда, мВ	Латентный период, мс	Длительность, мс
Интактные животные	22,5 [20,0; 25,0]	10,34 [9,83; 10,5]	7,26 [7,25; 7,50]	4,05 [3,51; 4,7]
Крысы с КТСМ	80,0 [75,0; 90]	3,96 [1,915; 4,1]	15,25 [14,0; 15,78]	9,79 [8,84; 10,5]
Ad5-GFP	80,0 [75,0; 82,5]	0,41 [0,29; 0,51]	15,0 [13,75; 15,43]	8,57 [8,00; 9,03]
МККП+Ad5-GFP	75,0 [67,5; 82,5]	0,53 [0,28; 0,711]	14,37 [13,79; 14,85]	8,50 [7,89; 9,06]
Ad5-VEGF-ANG-NCAM	70,0 [67,5; 72,5]	1,02 [0,77; 1,13]	11,25 [10,74; 11,88]	9,13 [8,73; 9,75]
МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM	45 [37,5; 52,5]	0,96 [0,18; 1,49]	10,72 [9,8; 11,77]	6,53 [5,99; 7,37]

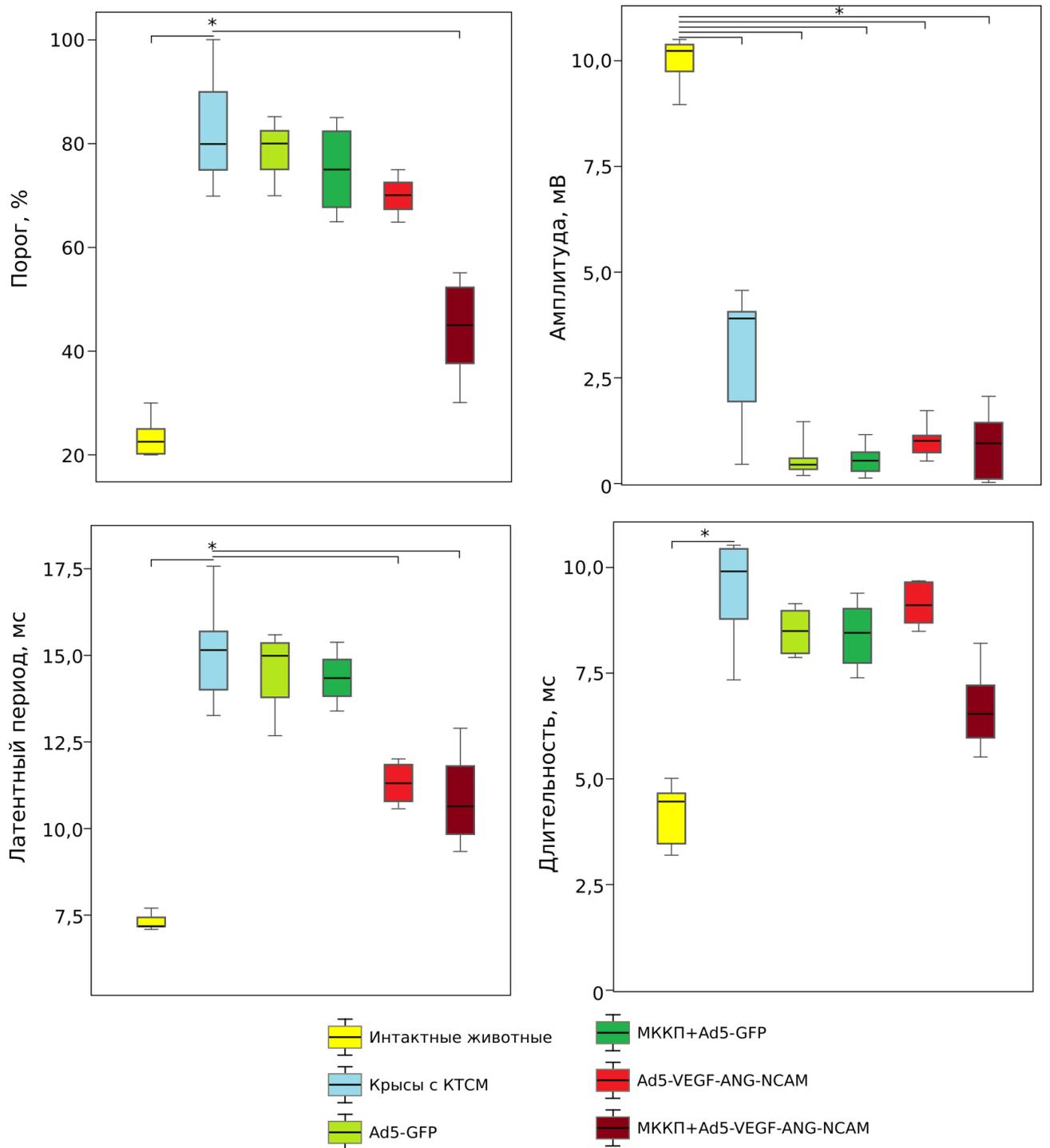


Рисунок 29. Сравнительный анализ вызванных моторных потенциалов икроножной мышцы в ответ на магнитную стимуляцию спинного мозга. *— статистически значимые различия, $p < 0,05$.

4.2.4. Сохранность серого вещества

На 30 сутки после моделирования КТСМ, роstralнее эпикентра травмы относительная площадь серого вещества в группах МККП+Ad5-GFP (96,6 [96,2;

97,5]), Ad5-VEGF-ANG-NCAM (98,3 [98,1; 98,4]) и МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM (97,5 [97,8; 98,1]) между собой статистически значимо не отличалась и приближалась к таковым значениям серого вещества интактных животных. При этом сохранность серого вещества в группах МККП+Ad5-GFP, Ad5-VEGF-ANG-NCAM и МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM была значительно выше чем у крыс с КТСМ и в группе Ad5-GFP (86,5 [85,4; 89,1]) ($p < 0,05$). Значения между крысами в группе Ad5-GFP и крысами с КТСМ значимо не отличалась (рис. 30).

При исследовании сохранности серого вещества каудальнее эпицентра травмы обнаружена схожая картина. Сохранность серого вещества в группах МККП+Ad5-GFP, Ad5-VEGF-ANG-NCAM и МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM составляла 97,1 [96,3; 98,2], 95,7 [93; 96,3] и 96,8 [95,7; 96,9], соответственно, что было статистически значимо выше значений у крыс с КТСМ и в группе Ad5-GFP (90,3 [87,8; 90,5]) ($p < 0,05$) (рис. 30).

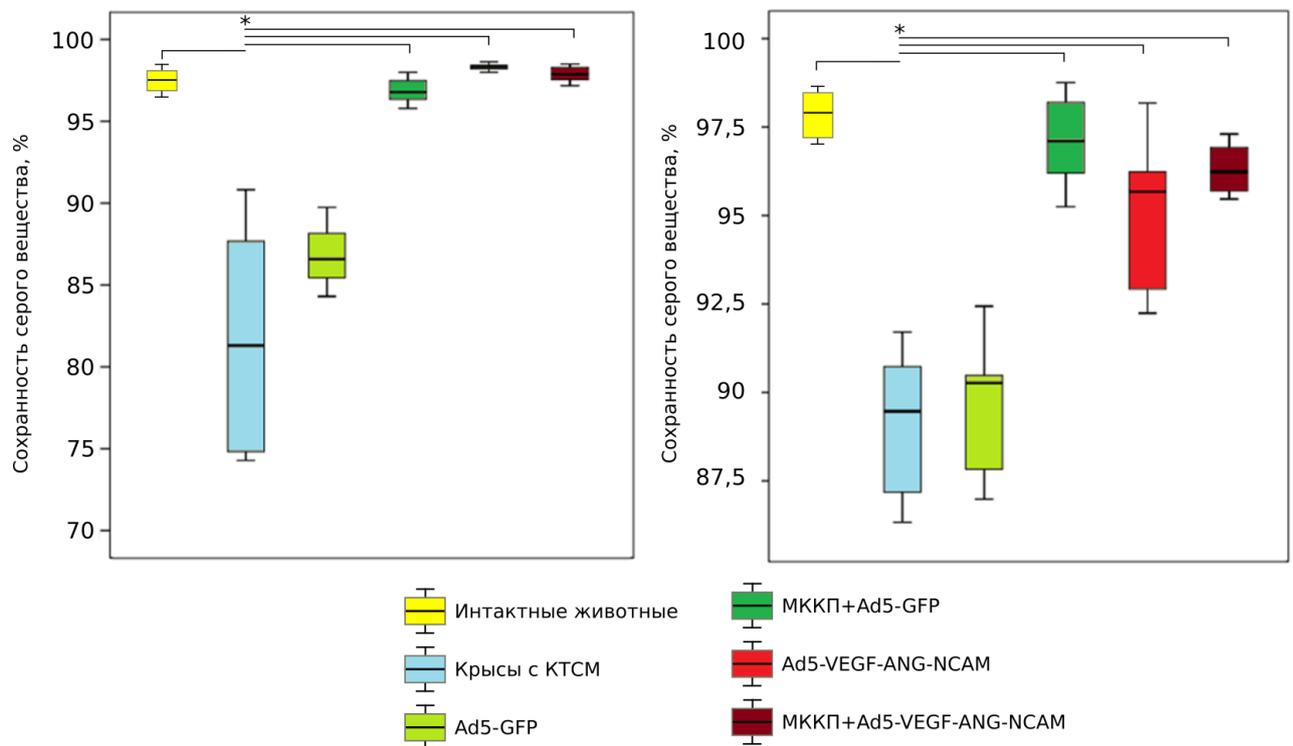


Рисунок 30. Морфометрический анализ сохранности серого вещества спинного мозга в ростральном и каудальном фрагментах относительно эпицентра травмы у крыс через 30 суток после моделирования КТСМ. *— статистически значимые различия, $p < 0,05$.

4.2.5. Сохранность белого вещества

При морфологическом анализе относительной площади миелина в переднем канатике статистически значимых изменений во всех экспериментальных группах при сравнении с интактными животными не обнаружены. Относительная площадь миелина у крыс в группе Ad5-GFP составила 67,8 [65,5; 68,5], в группе МККП+Ad5-GFP – 70,1 [67,5; 72], в группе Ad5-VEGF-ANG-NCAM – 69,1 [67,8; 70,3], в группе МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM – 70,2 [68,2; 72,5] (рис. 31).

В боковом канатике снижение относительной площади миелина установлено у крыс с КТСМ и у животных из группы Ad5-GFP (58,1 [53,2; 61]) при сравнении с группами МККП+Ad5-GFP (67,6 [65,8; 71]), Ad5-VEGF-ANG-NCAM (72,2 [71,3; 73]) и МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM (70,3 [69,2; 70,9]). При этом значения в группах Ad5-VEGF-ANG-NCAM, МККП+Ad5-GFP и МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM приближались к значениям интактных животных и были значимо больше чем у крыс с КТСМ. В заднем канатике изменения относительной площади миелина напоминали таковые в боковом канатике. Так, в группах Ad5-VEGF-ANG-NCAM (71,7 [68,9; 73,2]), МККП+Ad5-GFP (72,1 [71,8; 72,9]) и МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM (71,5 [70,3; 72,8]) исследуемые параметры были близки к значениям интактных животных и были статистически значимо выше, чем в группе крыс с КТСМ. Значения относительной площади миелина между крысами из группы Ad5-GFP (58,1 [57; 66]) и крысами с КТСМ не отличались (рис. 31).

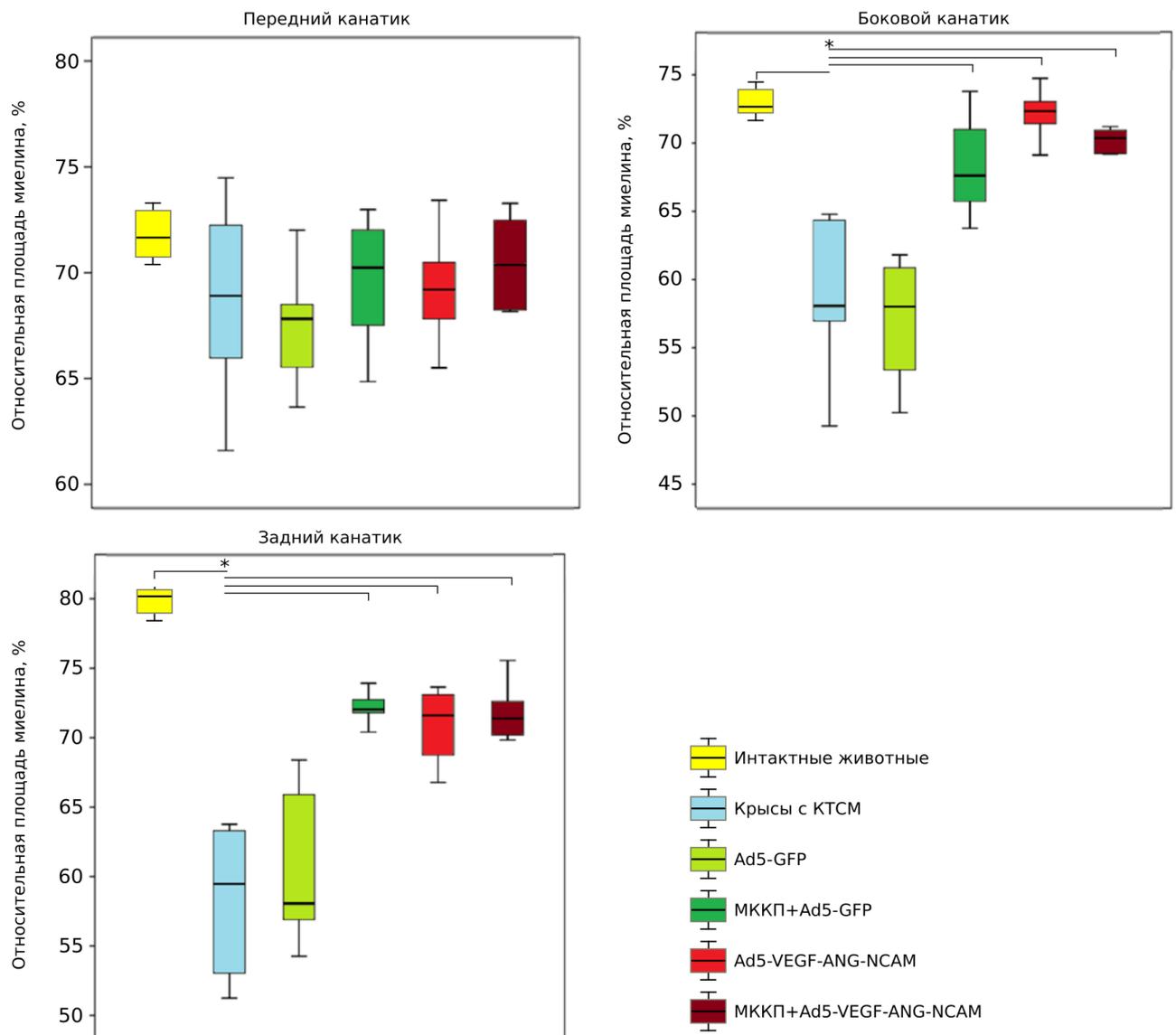


Рисунок 31. Морфометрический анализ относительной площади миелина в белом веществе в эпицентре травмы у крыс через 30 суток после моделирования КТСМ. *— статистически значимые различия, $p < 0,05$.

4.2.6. Анализ иммунофлуоресцентного окрашивания спинного мозга

4.2.6.1. Белок теплового шока Hsp27

В передних рогах спинного мозга обнаружено статистически значимое снижение количества клеток, экспрессирующих белок теплового шока Hsp27 – до $15,5 \pm 2,0$ в группе Ad5-VEGF-ANG-NCAM и до $20,0 \pm 0,7$ в группе МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM при сравнении с крысами с КТСМ (рис. 32). При этом

значения в группах Ad5-GFP и МККП+Ad5-GFP оставались на уровне значений у крыс с КТСМ – $30,5 \pm 1,8$ и $8,6 \pm 1,1$, соответственно.

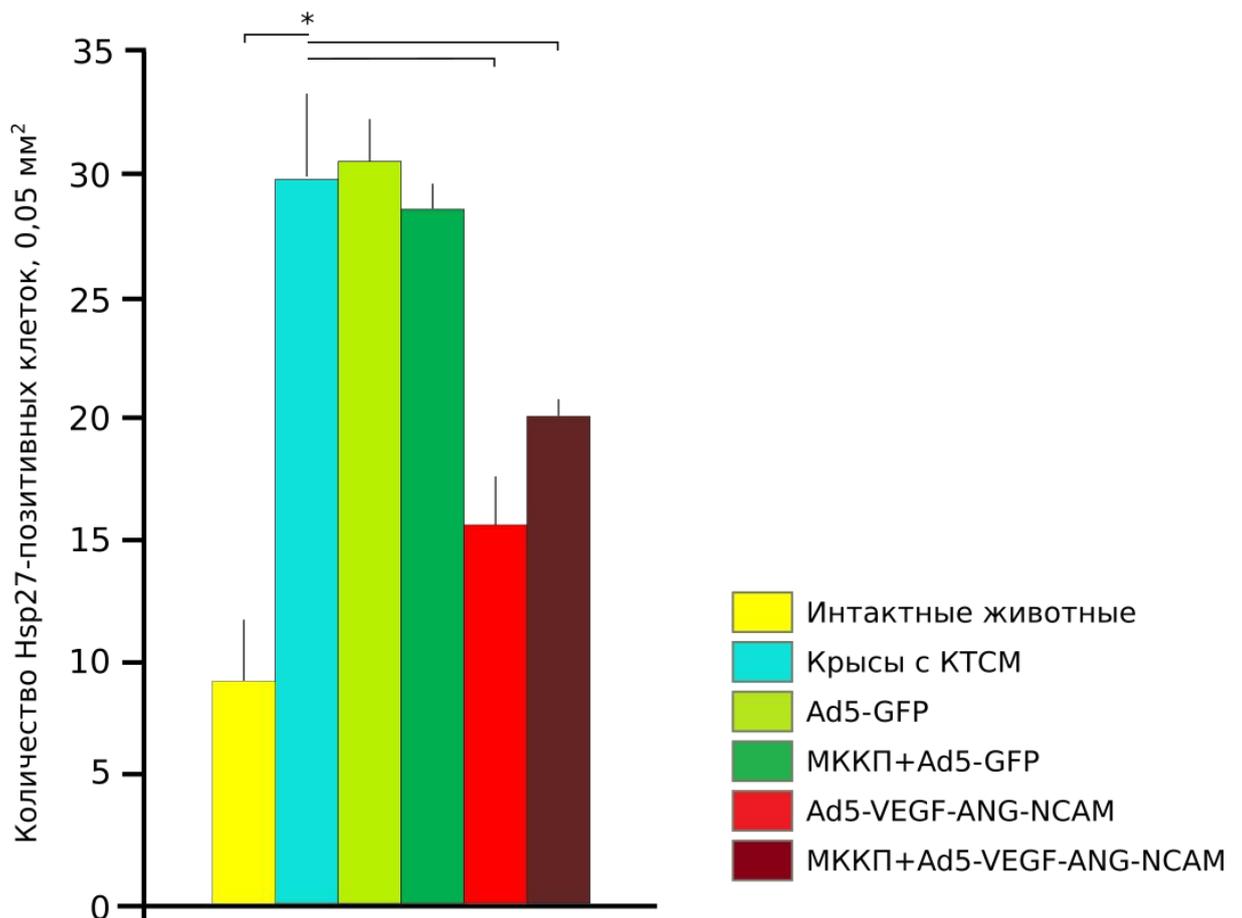
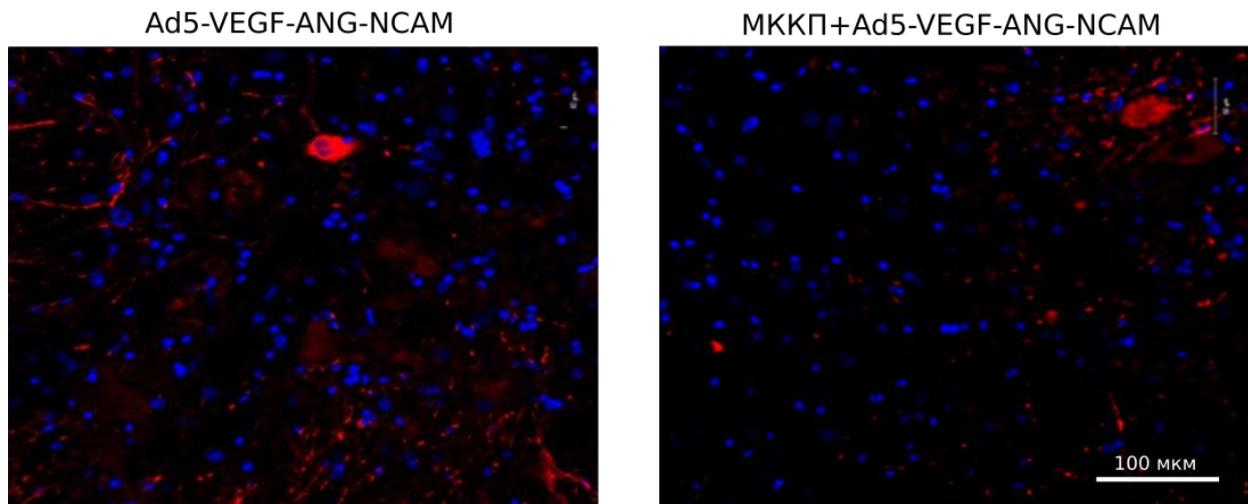


Рисунок 32. Анализ экспрессии белка теплового шока Hsp27 в передних рогах спинного мозга крысы с КТСМ каудальнее места травмы на 30 сутки эксперимента. Верхняя панель – поперечный срез спинного мозга, окрашенный антителами к Hsp27 (красное свечение). Ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение). Нижняя панель – морфометрический анализ количества Hsp27-позитивных. * – статистически значимые различия, $p < 0,05$

4.2.6.2. Синаптические белки

На фоне введения генного препарата Ad5-VEGF-ANG-NCAM и генно-клеточного препарата МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM уровень средней интенсивности флуоресценции при окрашивании антителами к синаптофизину повысился до $26,1 \pm 2,0$ и $32,8 \pm 1,3$, соответственно, и не отличался от интактных значений (рис. 33). Стоит отметить, что уровень экспрессии синаптофизина в группах Ad5-VEGF-ANG-NCAM и МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM был статистически значимо выше, чем у крыс с КТСМ и в группах Ad5-GFP ($15,3 \pm 1,1$) и МККП+Ad5-GFP ($16,0 \pm 2,2$), значения в которых не отличались между собой (рис. 33).

Анализ экспрессии PSD95 выявил во всех экспериментальных группах статистически значимо меньшие значения уровня средней интенсивности флуоресценции при сравнении с интактной группой. Незначительное увеличение уровня экспрессии PSD95 обнаружено в группах Ad5-VEGF-ANG-NCAM ($21,2 \pm 1,0$) и МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM ($20,1 \pm 2,9$) относительно значений в группе крыс с КТСМ. Средняя интенсивность флуоресценции в группах Ad5-GFP и МККП+Ad5-GFP составила $15,5 \pm 1,1$ и $17,1 \pm 3,5$, соответственно (рис. 33).

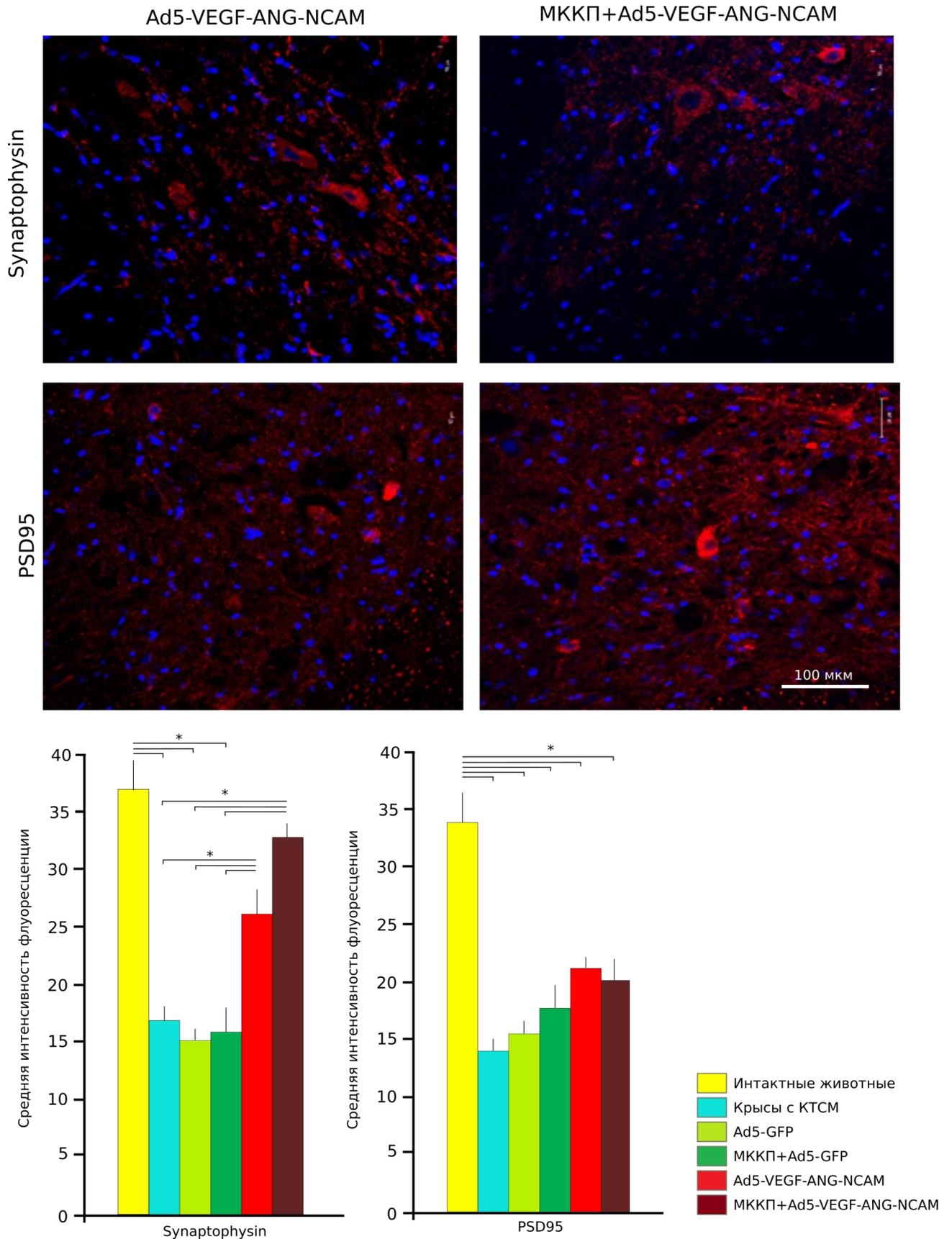


Рисунок 33. Анализ экспрессии синаптических белков в передних рогах спинного мозга крысы с КТСМ каудальнее места травмы на 30 сутки эксперимента. Верхняя панель – поперечный срез спинного мозга, окрашенный антителами к синаптофизину (красное

свечение) и PSD95 (красное свечение). Ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение). Нижняя панель – морфометрический анализ значений средней интенсивности флуоресценции синаптофизина (*Synaptophysin*) и PSD95. * – статистически значимые различия, $p < 0,05$.

4.2.6.3. Клетки нейроглии

После интратекального введения крысам Ad5-GFP и МККП+Ad5-GFP на 30 сутки после моделирования контузионной травмы, количество GFAP-позитивных астроцитов в передних рогах осталось на уровне животных с КТСМ – 22,31,3 и 21,51,4, соответственно (рис.). Но при введении Ad5-VEGF-ANG-NCAM и МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM наблюдается снижение количества GFAP-позитивных астроцитов почти в два раза и приближается к значениям интактных животных – 11,32,1 и 9,91,5, соответственно. При этом количество астроцитов у крыс с КТСМ было статистически значимо больше, чем в группах Ad5-VEGF-ANG-NCAM и МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM (рис. 34).

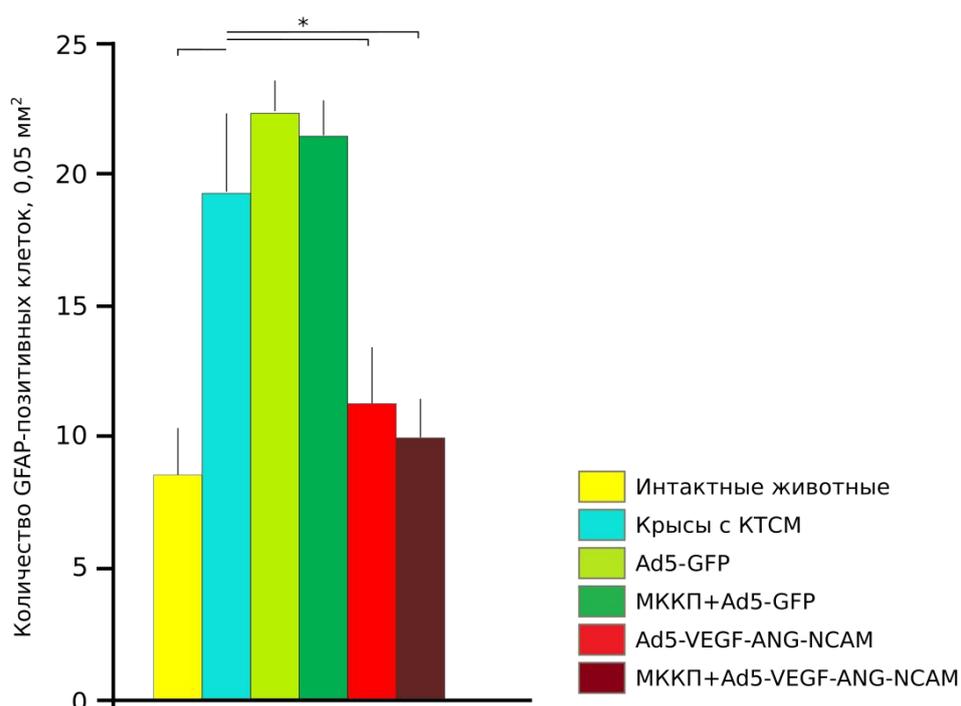
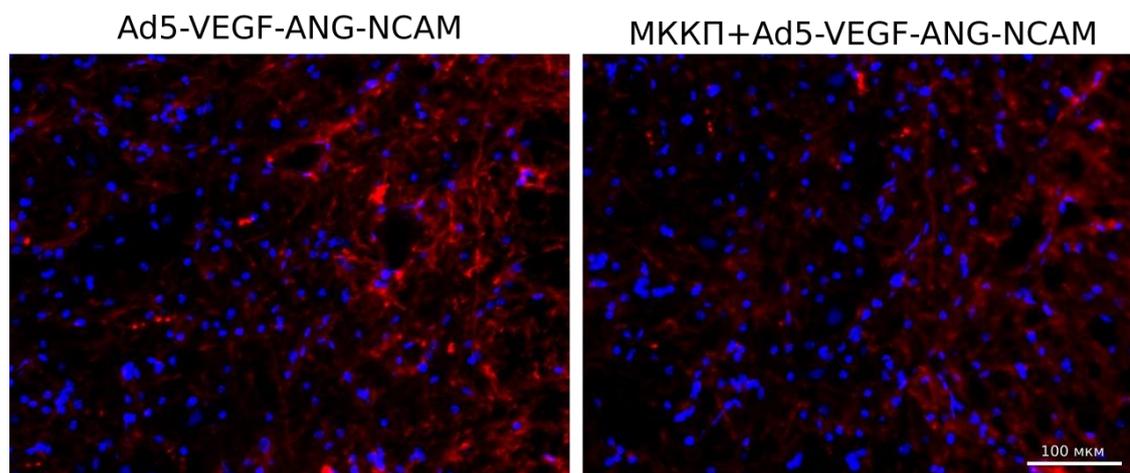


Рисунок 34. Анализ экспрессии GFAP в передних рогах спинного мозга крысы с КТСМ каудальнее места травмы на 30 сутки эксперимента. Верхняя панель – поперечный срез спинного мозга, окрашенный антителами к GFAP (красное свечение). Ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение). Нижняя панель – морфометрический анализ количества GFAP-позитивных клеток. * – статистически значимые различия, $p < 0,05$.

Анализ количества NG2-позитивных клеток не выявил различий между интактной и экспериментальными группами. Однако, на фоне интратекального введения генного препарата Ad5-VEGF-ANG-NCAM установлено увеличение количества NG2-позитивных клеток ($28,8 \pm 4,3$), что было статистически

значимо выше, по сравнению с группами Ad5-GFP ($22,3 \pm 2,5$), МККП+Ad5-GFP ($20,1 \pm 1,5$) и МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM ($19,7 \pm 3,3$) ($p < 0,05$) (рис. 35).

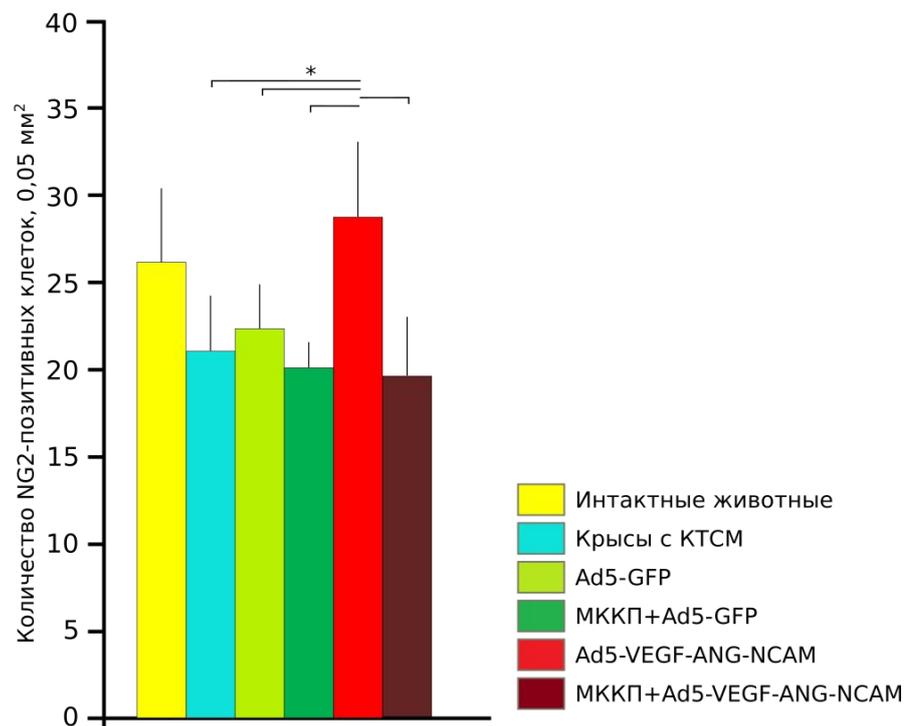
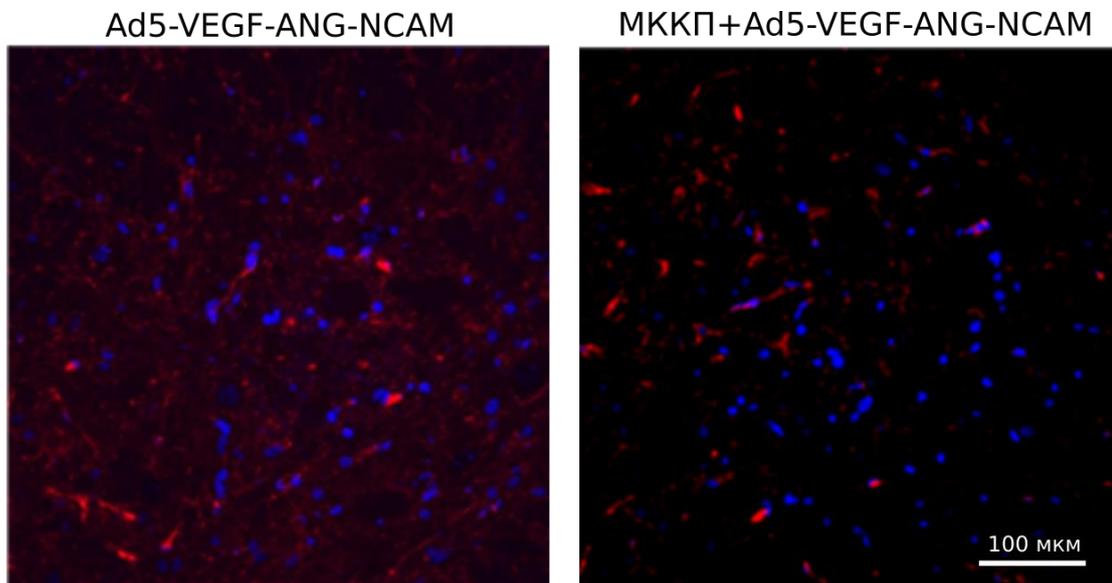


Рисунок 35. Анализ экспрессии NG2 в передних рогах спинного мозга крысы с КТСМ каудальнее места травмы на 30 сутки эксперимента. Верхняя панель – поперечный срез спинного мозга, окрашенный антителами к NG2 (красное свечение). Ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение). Нижняя панель – морфометрический анализ количества NG2-позитивных клеток. * – статистически значимые различия, $p < 0,05$.

На 30 сутки после моделирования контузионной травмы спинного мозга обнаружилось увеличение количества Iba1-позитивных клеток во всех экспериментальных группах, при сравнении с интактной группой. Так в группе Ad5-GFP было выявлено $18,2 \pm 2,3$ клеток, в группе МККП+Ad5-GFP – $19,1 \pm 2,1$, в группе Ad5-VEGF-ANG-NCAM – $14,8 \pm 2,6$ клеток и в группе МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM – $18,5 \pm 3,1$ клеток. При этом значения в этих группах статистически значимо не отличались, но в группе Ad5-VEGF-ANG-NCAM количество Iba1-позитивных клеток было наиболее близкое к значениям интактных животных (рис. 36).

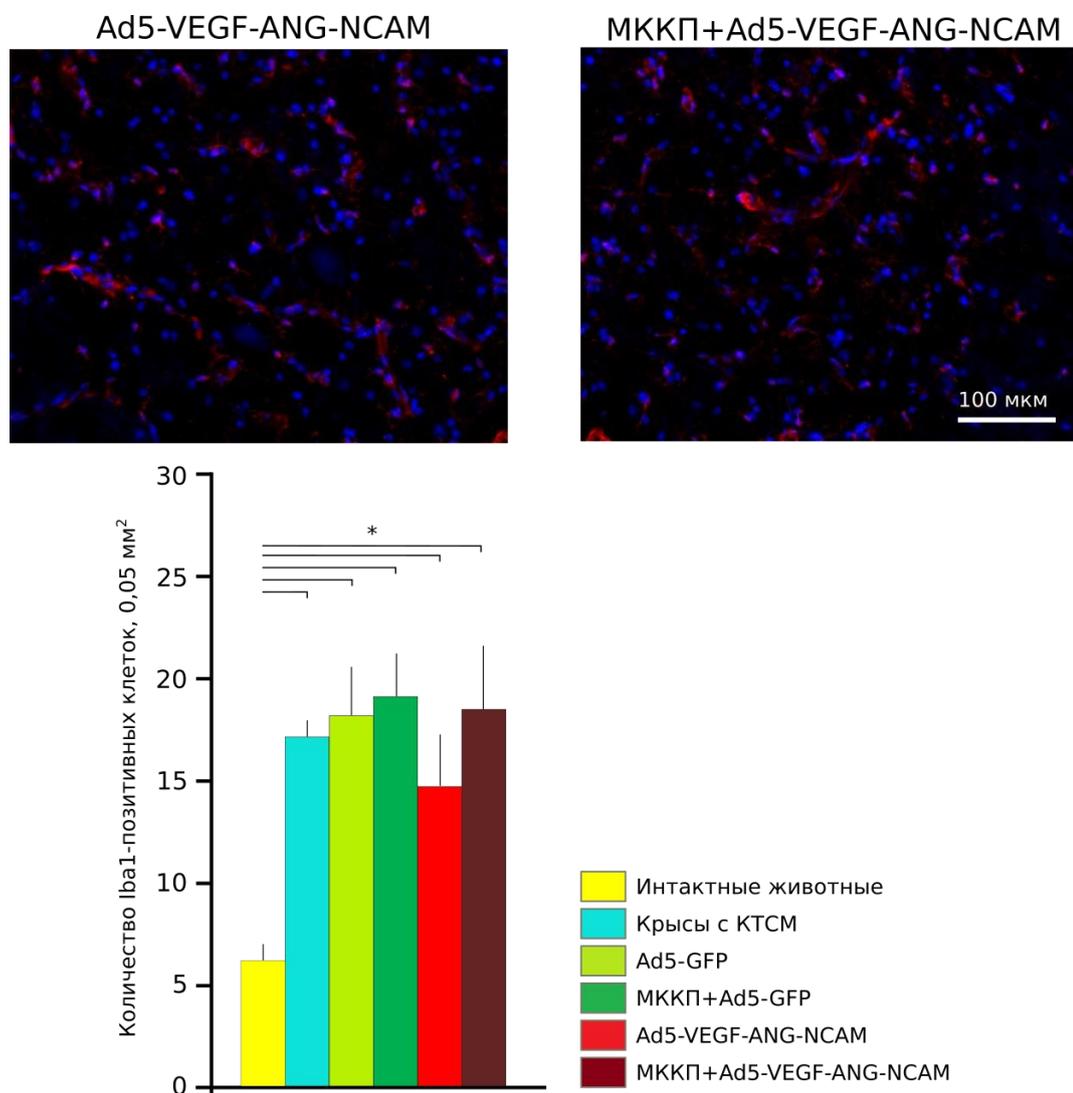


Рисунок 36. Анализ экспрессии Iba1 в передних рогах спинного мозга крысы с КТСМ каудальнее места травмы на 30 сутки эксперимента. Верхняя панель – поперечный срез спинного мозга, окрашенный антителами к Iba1 (красное свечение). Ядра клеток докрашены

*DAPI (синее свечение). Нижняя панель – морфометрический анализ количества Iba1-позитивных клеток. *– статистически значимые различия, $p < 0,05$.*

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение патоморфологических изменений и патофизиологических механизмов развития негативных последствий позвоночно-спинномозговой травмы сохраняет свою актуальность, как в фундаментальном, так и практическом аспектах. Приобретение новых знаний необходимо для поиска и разработки патогенетических подходов коррекции нарушений у пациентов с травмой спинного мозга. Многочисленные работы, посвященные патогенезу позвоночно-спинномозговой травмы, зачастую рассматривают только отдельные патогенетические и патоморфологические аспекты. Таким образом, важен всесторонний и комплексный подход в изучении позвоночно-спинномозговой травмы.

В настоящем исследовании для анализа морфо-функциональных изменений в спинном мозге крысы с КТСМ на 30 сутки были использованы физиологические (поведенческие тесты, кинематика суставов, электромиография) и гистологические (морфометрия структур мозга, иммунофлуоресцентное окрашивание) методы исследования. Так, у подопытных животных с КТСМ было документировано снижение двигательной активности в поведенческих тестах «ВВВ» и «Ротарод». При изучении кинематики суставов также было выявлено снижение показателей объемов движения в коленном и голеностопном суставах. Анализ игольчатой миографии икроножной мышцы в ответ на электрическую стимуляцию седалищного нерва обнаружил увеличение порога, снижение амплитуды и сокращение латентного периода Н-ответа. В ходе игольчатой миографии икроножной мышцы, в ответ на магнитную стимуляцию шейно-грудного отдела спинного мозга, также было установлено увеличение порога, снижение амплитуды, удлинение латентного периода и длительности вызванных моторных потенциалов, что согласуется с изменениями параметров электромиограммы икроножной мышцы при ответе на стимуляцию седалищного нерва.

При гистологическом исследовании спинного мозга на 30 сутки после КТСМ, анализ полученных данных свидетельствует об уменьшении относительной площади серого вещества выше и ниже эпицентра травмы, а также об уменьшении относительной площади миелина в боковых и задних канатиках белого вещества спинного мозга. Анализ результатов иммунофлуоресцентного окрашивания выявил признаки клеточного стресса в сером веществе (увеличение количества Hsp27-позитивных клеток), снижение функции нейронов (уменьшение средней интенсивности флуоресценции синаптофизина и PSD95 в нервных клетках), астроглиоз (увеличение количества GFAP-позитивных астроцитов и Iba1-позитивных клеток микроглии), уменьшение количества NG2-позитивных олигодендроглиальных клеток, что может указывать на нарушение миелинизации нервных отростков. Все эти данные свидетельствуют о продолжающихся в спинном мозге крыс процессах нейродегенерации на 30 сутки после моделирования КТСМ. Таким образом, сдерживание нейродегенерации при КТСМ является одной из первостепенных задач в терапии спинномозговой травмы.

К сожалению, до настоящего времени в практической медицине не существует эффективного клинически одобренного подхода для сдерживания патогенетических механизмов, приводящих к деструктивным изменениям в спинном мозге после ТСМ. Различные варианты клеточной, генной и генно-клеточной терапии широко используются в экспериментах для коррекции патоморфологических изменений и стимулирования нейрорегенерации [30; 45; 57; 58; 167]. Однако, не смотря на полученные отдельные положительные результаты в опытах на животных, а также продолжающиеся клинические испытания генных и клеточных препаратов [92; 136; 172], ни один метод не доведен до применения в медицинской практике.

В целом, современная стратегия терапии пациентов с травмой спинного мозга направлена на стимулирование экспрессии в спинном мозге факторов роста и нейротрофических факторов. Активизация выработки этих факторов может повысить выживаемость пораженных нейронов спинного мозга,

поддерживать рост и миелинизацию аксонов, стимулировать ангиогенез и активность матриксных металлопротеиназ, уменьшить глиоз и подавить секрецию воспалительных цитокинов и тканевых активаторов плазминогена. На основании вышеизложенных фактов, в настоящем исследовании для сдерживания нейродегенерации и стимулирования нейрорегенерации нами было предложено использовать генный препарат, содержащий три рекомбинантных гена (*vegf165*, *ang*, *ncam1*). Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) обладает как нейротрофическим, так и ангиогенным действием. Ангиогенин (ANG) характеризуется, кроме ангиогенного действия, способностью повышать жизнеспособность клеток при ответе на стресс. Межклеточные взаимодействия, опосредуемые нейрональной молекулы клеточной адгезии (NCAM) в посттравматической регенерации обеспечивают выживание нейронов, направленный рост аксонов и синаптогенез.

В клеточной трансплантологии пуповинную кровь рассматривают как важный источник стволовых клеток, не только для лечения гематологических, но и соматических заболеваний, в том числе и нейротравм. В последние несколько лет использование мононуклеарных клеток крови пуповины (МККП) человека для лечения дегенеративных и ишемических состояний было одобрено для клинических исследований [12; 14; 172]. *A priori* при всех аллогенных трансплантациях врачи должны проводить HLA-типирование на совместимость донора и реципиента. При трансплантации МККП гистосовместимость обязательна, только когда клеточный препарат используется для лечения заболеваний кроветворной системы, чтобы избежать состояния «трансплантат против хозяина». Однако для лечения негемопоетических заболеваний, включая заболевания ЦНС, МККП могут быть использованы без HLA-типирования и последующей иммуносупрессивной терапии, так как терапия с помощью МККП нацелена не на приживание МККП, а на временную продукцию этими клетками ростовых факторов, стимулирующих нейрорегенерацию. Кроме того, МККП обладают низкой иммуногенностью; популяция Т-лимфоцитов пуповинной крови в основном состоит из незрелых Т-клеток с более высоким

соотношением CD4+/ CD8+ Т-клеток [108; 173; 242]. На сегодняшний день существует несколько клинических трансплантаций МККП или специфических клеточных популяций, выделенных из пуповинной крови, пациентам с хронической травмой спинного мозга с предполагаемой терапевтической эффективностью [87; 121; 172]. Рациональность использования МККП в регенеративной медицине также подтверждается организацией банков стволовых клеток для хранения МККП [12].

Гипотеза о том, что генетически модифицированные МККП человека, одновременно продуцирующие рекомбинантные молекулы VEGF, GDNF и NCAM, могут быть эффективным лекарственным средством для сдерживания гибели нейронов при нейродегенеративных заболеваниях, подтверждена на трансгенных мышях SOD1-G93A с моделью бокового амиотрофического склероза [212]. Установлено, что после внутривенной инфузии генетически модифицированные МККП способны проникать через гематоэнцефалический барьер, мигрировать в область дегенерации нервной ткани, сохранять жизнеспособность и продуцировать рекомбинантные терапевтические молекулы. Существенное улучшение показателей поведенческих тестов, а также увеличение продолжительности жизни было зарегистрировано у мышей после внутривенной инфузии генетически модифицированных МККП, продуцирующих рекомбинантные молекулы VEGF, GDNF и NCAM [212].

В настоящем исследовании для доставки рекомбинантных генов *vegfl65*, *ang*, *ncam1* в спинной мозг крысы с КТСМ были испытаны два способа: прямая доставка с помощью аденовирусных векторов, или на клеточных носителях, а именно – с помощью МККП. Для доставки генного и генно-клеточного препаратов нами был выбран способ интратекальной инъекции. Этот метод более эффективен, чем внутривенное введение, и менее травматичен, чем интраспинальная инъекция, а также спинномозговая жидкость может эффективно доставлять аденовирусные векторы или МККП в любые участки спинного мозга.

Эффективность экспрессии трансгенов в составе Ad5-GFP, МККП+Ad5-GFP, Ad5-VEGF-ANG-NCAM и МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM была подтверждена *in vitro* и *in vivo*. Методом ПЦР-РВ в МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM было установлено значительное повышение содержания мРНК генов *vegfl65*, *ang* и *ncam1*. Иммуофлуоресцентным анализом была подтверждена продукция рекомбинантных молекул VEGF, ANG и NCAM в клетках серого и белого вещества роstralнее эпицентра травмы в спинном мозге крысы с КТСМ после интратекальной доставки генного препарата Ad5-VEGF-ANG-NCAM. Также выше эпицентра травмы были обнаружены МККП, продуцирующие VEGF, ANG и NCAM, после интратекальной инъекции крысам с КТСМ генно-клеточного препарата МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM. Важно отметить, что количество МККП в группе МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM было статистически значимо выше, чем в группе МККП+Ad5-GFP, что подтверждает нашу гипотезу о роли молекул NCAM в адресной миграции и выживании МККП. Другими словами, экспрессия в генетически модифицированных МККП нейрональной молекулы адгезии NCAM повышает миграционный потенциал МККП в область нейродегенерации и жизнеспособность трансплантированных МККП в спинном мозге подопытных животных.

Тот факт, что в спинном мозге крыс с КТСМ после введения генного или генно-клеточного препарата локально синтезируются рекомбинантные молекулы VEGF, ANG и NCAM, является свидетельством положительного действия генного (Ad5-VEGF-ANG-NCAM) и генно-клеточного (МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM) препаратов на обнаруженные нами улучшения морфо-функциональных характеристик спинного мозга после контузионной травмы. Так, в поведенческих тестах «ВВВ» и «Ротарод» наблюдалось улучшение показателей у групп, получившие Ad5-VEGF-ANG-NCAM и МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM. Также эти группы и группа МККП+Ad5-GFP показали положительный эффект на кинематику голеностопного сустава. Эти результаты согласуются с электрофизиологическими данными, полученными

при исследовании икроножной мышцы. Во-первых, порог, амплитуда, латентный период и длительность Н-ответа при электрической стимуляции седалищного нерва у группы МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM приближались к значениям интактных животных. Во-вторых, значения порога, латентного периода и длительности вызванного моторного потенциала на магнитную стимуляцию шейно-грудного отдела спинного мозга у группы МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM, также были близки к параметрам интактных животных. Эффект интратекальной доставки генного препарата Ad5-VEGF-ANG-NCAM на электрофизиологические характеристики икроножной мышцы крысы с КТСМ был менее выражен.

Гистологическое исследование доставки в спинной мозг крысы с КТСМ рекомбинантных генов *vegfl65*, *ang* и *ncam1* обнаружило позитивное влияние VEGF, ANG и NCAM на посттравматическое ремоделирование спинного мозга. В группах МККП+Ad5-GFP, Ad5-VEGF-ANG-NCAM и МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM установлена лучшая сохранность серого и белого вещества, которая сочеталась со снижением экспрессии молекулы клеточного стресса (белка теплового шока Hsp27), повышением экспрессии синаптического белка синаптофизина в нейронах, снижением астроглиоза (уменьшение количества GFAP-позитивных астроцитов). Однако, ответ конкретных маркеров на различные генные (Ad5-GFP и Ad5-VEGF-ANG-NCAM) и генно-клеточные (МККП+Ad5-GFP, МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM) препараты был неодинаков, что, возможно, связано, как с эффектом МККП на посттравматическую регенерацию, так и способом продукции рекомбинантных молекул (трансдуцированными *in vivo* клетками мозга или генетически модифицированными МККП). Вместе с тем, генно-клеточный препарат МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM в целом продемонстрировал более выраженный позитивный эффект на морфо-функциональное восстановление спинного мозга крысы после контузионной травмы.

Таким образом, данные настоящего исследования подтверждают нашу гипотезу о том, что МККП могут быть эффективным клеточным типом для

доставки рекомбинантных генов в спинной мозг для сдерживания процессов нейродегенерации и стимулирования посттравматической регенерации. Также важно отметить, что доставка рекомбинантных генов, опосредованная МККП, является более безопасным методом с точки зрения иммуногенности в ответ на аденовирусный вектор и неуправляемую трансдукцию различных клеточных типов в ЦНС. Таким образом, мы считаем, что для коррекции установленных нами патогенетических и патоморфологических изменений в спинном мозге крысы с КТСМ, а также с точки зрения биобезопасности, опосредованная доставка рекомбинантных генов *vegfl65*, *ang* и *ncam1* с помощью МККП является предпочтительной при сравнении с доставкой трансгенов с помощью аденовирусных векторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Травма спинного мозга является одной из ведущих причин инвалидизации взрослого населения из-за отсутствия эффективных методов терапии неврологических осложнений [258; 263]. Спинальная травма влечет за собой двигательные, чувствительные, вегетативно-трофические и психические расстройства [260]. В мировой практике ежегодно регистрируются до 500 тыс. случаев позвоночно-спинномозговой травмы. По России ежегодно фиксируются до 8 тыс. пострадавших. В частности, в крупных российских городах частота данной патологии составляет в среднем 0,6 на 10 тыс. человек [257]. К сожалению, современная медицинская наука предлагает базовые паллиативные и поддерживающие реабилитационные методы лечения, которые не приводят к удовлетворительным клиническим исходам. Очевидно, что для повышения качества жизни пациентов с травмой спинного мозга требуются как фундаментальные патофизиологические и патоморфологические исследования последствий нейротравмы, так и разработка на их основе новых технологий лечения.

Настоящее исследование включало в себя установление механизмов морфо-функциональных нарушений у крысы с контузионной травмой спинного мозга и оценку эффективности интратекальной доставки в ЦНС рекомбинантных генов сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), ангиогенина (ANG) и нейрональной молекулы клеточной адгезии (NCAM) с помощью аденовирусных векторов и мононуклеарных клеток крови пуповины (МККП) человека на посттравматическую регенерацию спинного мозга.

В ходе проведенного исследования были получены новые комплексные данные о патогенезе нейродегенеративных процессов в спинном мозге у крысы через 30 суток после моделирования нейротравмы. Впервые с помощью поведенческих тестов «ВВВ» и «Ротарод» и анализа кинематики суставов задних конечностей показано снижение двигательной активности у животных, в сочетании с патологическими изменениями электрофизиологических

характеристик *m. gastrocnemius*, при стимуляции седалищного нерва и магнитной стимуляции шейно-грудного отдела, образованием полостей в сером веществе и снижением площади в белом веществе спинного мозга, снижением экспрессии синаптических белков (синаптофизина и PSD95) в нейронах, повышением экспрессии молекул клеточного стресса (белка теплового шока Hsp27), астроглиозом (увеличение количества GFAP-позитивных астроцитов и Iba1-позитивных клеток микроглии), снижением миелинизации нервных отростков (уменьшение количества NG2-позитивных олигодендроглиальных клеток).

Для коррекции этих изменений нами была осуществлена интратекальная доставка в область нейротравмы трех рекомбинантных генов, кодирующий сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), ангиогенин (ANG) и нейрональную молекулу клеточной адгезии (NCAM) с помощью аденовирусных векторов или мононуклеарных клеток крови пуповины (МККП) человека. Комплексный анализ морфо-функционального исследования спинного мозга после моделирования контузионной травмы позволил установить корреляцию между восстановлением двигательных функций и посттравматическим ремоделированием спинного мозга крыс после интратекальной доставки генных и генно-клеточных препаратов.

При сравнении с контрольными животными интратекальная доставка рекомбинантных генов, кодирующих VEGF, ANG и NCAM, с помощью аденовирусных векторов оказывает следующие положительные изменения: (1) способствует восстановлению двигательных функций (улучшение параметров поведенческих тестов и увеличение объема движений в голеностопном суставе); (2) снижает амплитуду и латентный период вызванных моторных потенциалов икроножной мышцы в ответ на магнитную стимуляцию спинного мозга, (3) увеличивает сохранность серого вещества и относительную площадь миелина в боковых и задних канатиках белого вещества; (4) снижает экспрессию молекулы клеточного стресса (белка теплового шока Hsp27) и повышает экспрессию синаптического белка синаптофизина; (5) сдерживает

развитие астроглиоза (снижение количества GFAP-позитивных астроцитов и Iba1-позитивных клеток микроглии) и способствует миелинизации нервных отростков (увеличение количества NG2-позитивных олигодендроглиальных клеток).

На фоне интратекальной доставки *vegfl65*, *ang* и *ncam1* с помощью МККП, также при сравнении с контрольными крысами, было установлено улучшение параметров поведенческих тестов и кинематики голеностопного сустава. Данные электрофизиологических исследований икроножной мышцы обнаружили восстановление порога, амплитуды и латентного периода Н-ответа при электрической стимуляции седалищного нерва и значения латентного периода вызванного моторного потенциала в ответ на магнитную стимуляцию шейно-грудного отдела спинного мозга. При гистологическом изучении спинного мозга было документировано положительное влияние генно-клеточного препарата на сохранность серого и белого вещества, которое сочеталась со снижением астроглиоза, снижением экспрессии белка теплового шока *Hsp27* в клетках серого вещества и повышением экспрессии синаптического белка синаптофизина в нейронах.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что рекомбинантные гены, кодирующие ангиогенные факторы (VEGF и ANG) и нейрональную молекулу клеточной адгезии (NCAM) способствуют восстановлению двигательных функций (улучшение параметров поведенческих тестов и кинематики суставов) через улучшение электрофизиологических характеристик скелетных мышц задних конечностей (восстановление параметров вызванных моторных ответов), а также за счет положительного ремоделирования спинного мозга (сдерживание развития астроглиоза и усиление миелинизации) и функционального восстановления нейронов (снижение экспрессии белков клеточного стресса и увеличение экспрессии синаптических белков).

При сравнительном анализе прямой и клеточно-опосредованной доставки *vegfl65*, *ang* и *ncam1* установлено, что эффекты генного (Ad5-VEGF-ANG-

NCAM) и генно-клеточного (МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM) препаратов в целом оказывают аналогичное положительное действие на морфофункциональное восстановление спинного мозга после нейротравмы. При этом следует учитывать, что при прямой доставке рекомбинантных генов происходит бесконтрольная трансдукция аденовирусными векторами различных клеточных типов в ЦНС и эффективность действия генного препарата обусловлена продукцией рекомбинантных молекул VEGF, ANG и NCAM клетками мозга. Нейротрансплантация генетически модифицированных МККП *ex vivo* предполагает продукцию рекомбинантных молекул VEGF, ANG и NCAM только трансплантированными клетками. Такой подход исключает прямое воздействие вирусного вектора на организм реципиента и позволяет контролировать уровень трансдукции клеток. Кроме того, положительное действие генно-клеточного препарата на посттравматическую регенерацию спинного мозга может быть также обусловлено непосредственным влиянием МККП, о чем свидетельствуют более выраженные положительные изменения некоторых изученных параметров после интратекального введения МККП+Ad5-VEGF-ANG-NCAM.

Результаты, полученные в данном исследовании, позволяют предположить, что интратекальная доставка в ЦНС одновременно трех рекомбинантных генов *vegfl65*, *ang* и *ncam1* является эффективным способом сдерживания нейродегенерации и стимулирования нейрорегенерации в ЦНС. Доставка комбинации генов *vegfl65*, *ang* и *ncam1* с помощью МККП представляет собой новый потенциально успешный подход к лечению пациентов со спинномозговой травмой.

ВЫВОДЫ

1. На 30 сутки после моделирования контузионной травмы спинного мозга у крысы установлено: (1) снижение двигательной активности; (2) уменьшение объема движений в суставах задних конечностей; (3) патологические изменения вызванных моторных потенциалов икроножной мышцы; (4) уменьшение относительной площади серого вещества и относительной площади миелина в белом веществе спинного мозга; (5) повышение экспрессии молекулы клеточного стресса (белка теплового шока Hsp27); (6) снижение экспрессии синаптических белков (синаптофизина и PSD95) в нейронах; развитие астроглиоза (увеличение количества GFAP-позитивных астроцитов и Iba1-позитивных клеток микроглии).
2. Интратекальная доставка в ЦНС рекомбинантных генов *vegfl65*, *ang*, *ncam1* с помощью аденовирусных векторов (Ad5) обеспечивает трансдукцию клеток мозга и продукцию в них рекомбинантных молекул в течение 30 суток.
3. Комбинация из трех репликативно-дефектных аденовирусов человека 5 серотипа (Ad5), несущих гены *vegfl65*, *ang* и *ncam1* эффективно трансдуцируют мононуклеарные клетки крови человека *ex vivo*, обеспечивают в них синтез мРНК трансгенов и продукцию рекомбинантных молекул VEGF, GDNF и NCAM. После интратекальной инъекции генетически модифицированные МППК мигрируют в ткань мозга в область повреждения, где они сохраняют способность продуцировать рекомбинантные молекулы в течение 30 суток.
4. Интратекальная доставка сочетания рекомбинантных генов *vegfl65*, *ang* и *ncam1* в спинной мозг крысы после контузионной травмы с помощью аденовирусных векторов или мононуклеарных клеток крови пуповины человека имеет выраженный позитивный эффект на: (1) восстановление

двигательной активности у животных; (2) увеличение объема движений в суставах задних конечностей; (3) улучшение электрофизиологических показателей икроножной мышцы; (4) сохранность серого и белого вещества спинного мозга; (5) увеличение экспрессии синаптических белков (синаптофизина) в нейронах; (6) снижение иммуноэкспрессии молекул клеточного стресса (уменьшение количества Hsp27-позитивных клеток); (7) сдерживание развития астроглиоза (уменьшение количества GFAP-позитивных астроцитов); (8) поддержание миелинизации нервных отростков (увеличение количества NG2-позитивных олигодендроглиальных клеток).

5. Интратекальная доставка сочетания рекомбинантных генов *vegfl65*, *ang* и *ncam1* в спинной мозг крысы после контузионной травмы с помощью моноклеарных клеток крови пуповины человека в целом имеет более выраженный положительный эффект на морфо-функциональное восстановление спинного мозга при сравнении с доставкой трансгенов с помощью аденовирусных векторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. [Experimental approach to the gene therapy of motor neuron disease with the use of genes hypoxia-inducible factors] / S. M. Ismailov, I. A. Barykova, M. M. Shmarov [et al.]. – Текст : электронный // *Genetika*. – 2014. – Vol. 50, No. 5. – P. 591-601. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25715475> (дата обращения: 01.05.2017).
2. A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study / K. S. Kang, S. W. Kim, Y. H. Oh [et al.]. – Текст : электронный // *Cytherapy*. – 2005. – Vol. 7, No. 4. – P. 368-373. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16162459/> (дата обращения: 21.08.2021).
3. A combination of GDNF and hUCMSC transplantation loaded on SF/AGs composite scaffolds for spinal cord injury repair / G. Jiao, G. Lou, Y. Mo [et al.]. – Текст : электронный // *Materials Science and Engineering C*. – 2017. – Vol. 74. – P. 230-237. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28254289/> (дата обращения: 18.01.2021).
4. A comparative study of three different types of stem cells for treatment of rat spinal cord injury. / J. Ruzicka, L. Machova-Urdzikova, J. Gillick [et al.]. – Текст : электронный // *Cell transplantation*. – 2017. – Vol. 26, No. 4. – P. 585-603. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27938489> (дата обращения: 22.08.2019).
5. A pericyte origin of spinal cord scar tissue / C. Göritz, D. O. Dias, N. Tomilin [et al.]. – Текст : электронный // *Science*. – 2011. – Vol. 333, No. 6039. – P. 238-242. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21737741/> (дата обращения: 13.01.2021).
6. A pilot study of cell-mediated gene therapy for spinal cord injury in mini pigs / R. R. Islamov, M. E. Sokolov, F. V. Bashirov [et al.]. – Текст : электронный // *Neuroscience Letters*. – 2017. – Vol. 644. – P. 67-75. – URL:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394017301404> (дата обращения: 01.05.2017).

7. A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat / I. Vanický, L. Urdžíková, K. Saganová [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Neurotrauma*. – 2001. – Vol. 18, No. 12. – P. 1399-1407. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11780869/> (дата обращения: 13.01.2021).

8. A spinal thecal sac constriction model supports the theory that induced pressure gradients in the cord cause edema and cyst formation / A. Josephson, D. Greitz, T. Klason [et al.]. – Текст : электронный // *Neurosurgery*. – 2001. – Vol. 48, No. 3. – P. 636-646. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11270555/> (дата обращения: 13.01.2021).

9. Activated spinal cord ependymal stem cells rescue neurological function / V. Moreno-Manzano, F. J. Rodríguez-Jiménez, M. García-Roselló [et al.]. – Текст : электронный // *STEM CELLS*. – 2009. – Vol. 27, No. 3. – P. 733-743. – URL: <https://stemcellsjournalsonlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/stem.24> (дата обращения: 20.08.2021).

10. Adeno-associated viral vector-mediated neurotrophin gene transfer in the injured adult rat spinal cord improves hind-limb function / B. Blits, M. Oudega, G. J. Boer [et al.]. – Текст : электронный // *Neuroscience*. – 2003. – Vol. 118, No. 1. – P. 271-281. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12676157/> (дата обращения: 19.08.2021).

11. Adeno-associated viral vectors as agents for gene delivery: application in disorders and trauma of the central nervous system / M. J. Ruitenberg, R. Eggers, G. J. Boer, J. Verhaagen. – Текст : электронный // *Methods (San Diego, Calif.)*. – 2002. – Vol. 28, No. 2. – P. 182-194. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12413416/> (дата обращения: 19.08.2021).

12. Advances in umbilical cord blood cell therapy: the present and the future / S. Berglund, I. Magalhaes, A. Gaballa [et al.]. – Текст : непосредственный // *Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2017. – Vol. 17, No. 6. – P. 691-699.

13. Alizadeh, A. Traumatic spinal cord injury: An overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms / A. Alizadeh, S. M. Dyck, S. Karimi-Abdolrezaee. – Текст : электронный // *Frontiers in Neurology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 282. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30967837/> (дата обращения: 13.01.2021).
14. Allan, D. S. Using umbilical cord blood for regenerative therapy: Proof or promise? / D. S. Allan // *Stem Cells*. – 2020. – Vol. 38, No. 5. – P. 590-595.
15. Allogeneic Neural Stem/Progenitor Cells Derived From Embryonic Stem Cells Promote Functional Recovery After Transplantation Into Injured Spinal Cord of Nonhuman Primates / H. Iwai, H. Shimada, S. Nishimura [et al.]. – Текст : электронный // *STEM CELLS Translational Medicine*. – 2015. – Vol. 4, No. 7. – P. 708-719. – URL: <https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.5966/sctm.2014-0215> (дата обращения: 20.08.2021).
16. Analysis of axonal regeneration in the central and peripheral nervous systems of the NG2-deficient mouse / M. K. Hossain-Ibrahim, K. Rezajooi, W. B. Stallcup [et al.]. – Текст : электронный // *BMC neuroscience*. – 2007. – Vol. 8, No. 1. – P. 80. – URL: <http://bmcneurosci.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2202-8-80> (дата обращения: 26.08.2019).
17. Angiogenin protects motoneurons against hypoxic injury / J. Sebastià, D. Kieran, B. Breen [et al.]. – Текст : электронный // *Cell death and differentiation*. – 2009. – Vol. 16, No. 9. – P. 1238-1247. – URL: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/cdd.2009.52> (дата обращения: 06.06.2017).
18. Animal models of spinal cord injury: a systematic review / M. Sharif-Alhoseini, M. Khormali, M. Rezaei [et al.]. – Текст : электронный // *Spinal Cord*. – 2017. – Vol. 55, No. 8. – P. 714-721. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28117332> (дата обращения: 26.08.2019).
19. Anti-inflammatory and anti-apoptotic effect of combined treatment with methylprednisolone and amniotic membrane mesenchymal stem cells after spinal

cord injury in rats / S. Gao, J. Ding, H.-J. Xiao [et al.]. – Текст : электронный // *Neurochemical Research*. – 2014. – Vol. 39, No. 8. – P. 1544-1552. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11064-014-1344-9> (дата обращения: 20.08.2021).

20. Asseman, C. Interleukin 10 is a growth factor for a population of regulatory T cells / C. Asseman, F. Powrie. – Текст : электронный // *Gut*. – 1998. – Vol. 42, No. 2. – P. 157-158. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9536936/> (дата обращения: 21.08.2021).

21. Astrocyte-encoded positional cues maintain sensorimotor circuit integrity / A. V Molofsky, K. W. Kelley, H.-H. Tsai [et al.]. – Текст : электронный // *Nature*. – 2014. – Vol. 509, No. 7499. – P. 189-194. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24776795> (дата обращения: 26.08.2019).

22. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration / M. A. Anderson, J. E. Burda, Y. Ren [et al.]. – Текст : электронный // *Nature*. – 2016. – Vol. 532, No. 7598. – P. 195-200. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27027288> (дата обращения: 26.08.2019).

23. Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats / J. M. Harper, C. Krishnan, J. S. Darman [et al.]. – Текст : электронный // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – Vol. 101, No. 18. – P. 7123-7128. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15118094/> (дата обращения: 20.08.2021).

24. Axonal remyelination by cord blood stem cells after spinal cord injury / V. R. Dasari, D. G. Spomar, C. S. Gondi [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of neurotrauma*. – 2007. – Vol. 24, No. 2. – P. 391-410. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17376002> (дата обращения: 27.09.2017).

25. Axonal responses to cellularly delivered NT-4/5 after spinal cord injury / A. Blesch, H. Yang, N. Weidner [et al.]. – Текст : электронный // *Molecular and Cellular Neuroscience*. – 2004. – Vol. 27, No. 2. – P. 190-201. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15485774/> (дата обращения: 18.01.2021).

26. Basso, D. M. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats / D. M. Basso, M. S. Beattie, J. C. Bresnahan. – Текст : электронный // *Journal of Neurotrauma*. – 1995. – Vol. 12, No. 1. – P. 1-21. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7783230> (дата обращения: 02.02.2017).

27. Basso, D. M. Consideration of dose and timing when applying interventions after stroke and spinal cord injury / D. M. Basso, C. E. Lang. – Текст : электронный // *Journal of neurologic physical therapy : JNPT*. – 2017. – Vol. 41 Suppl 3, No. Suppl 3 IV STEP Spec Iss. – P. S24-S31. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28628593> (дата обращения: 22.08.2019).

28. BDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting, and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury / M. Sasaki, C. Radtke, A. M. Tan [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Neuroscience*. – 2009. – Vol. 29, No. 47. – P. 14932-14941. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19940189/> (дата обращения: 28.05.2021).

29. BDNF expression with functional improvement in transected spinal cord treated with neural stem cells in adult rats / B. L. He, Y. C. Ba, X. Y. Wang [et al.]. – Текст : непосредственный // *Neuropeptides*. – 2013. – Vol. 47, No. 1. – P. 1-7.

30. Blesch, A. Gene therapy, neurotrophic factors and spinal cord regeneration / A. Blesch, I. Fischer, M. H. Tuszynski. – Текст : непосредственный // *Handbook of Clinical Neurology*. – 2012. – Vol. 109. – P. 563-574.

31. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells expressing the Shh transgene promotes functional recovery after spinal cord injury in rats / Y. Jia, D. Wu, R. Zhang [et al.]. – Текст : электронный // *Neuroscience Letters*. – 2014. – Vol. 573. – P. 46-51. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24837681> (дата обращения: 27.09.2017).

32. Boyce, V. S. Neurotrophins and spinal circuit function / V. S. Boyce, L. M. Mendell. – Текст : непосредственный // *Frontiers in Neural Circuits*. – 2014. – Vol. 8. – P. 59.

33. Bunge, M. B. Realizing the maximum potential of Schwann cells to promote recovery from spinal cord injury / M. B. Bunge, P. M. Wood. – Текст :

непосредственный // Handbook of Clinical Neurology. – 2012. – Vol. 109. – P. 523-540.

34. Burda, J. E. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease / J. E. Burda, M. V Sofroniew. – Текст : электронный // Neuron. – 2014. – Vol. 81, No. 2. – P. 229-248. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24462092> (дата обращения: 22.08.2019).

35. Burger, C. Recombinant adeno-associated viral vectors in the nervous system / C. Burger, K. Nash, R. J. Mandel. – Текст : электронный // Human gene therapy. – 2005. – Vol. 16, No. 7. – P. 781-791. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16000060/> (дата обращения: 19.08.2021).

36. Byrnes, K. R. Neuropathological differences between rats and mice after spinal cord injury / K. R. Byrnes, S. T. Fricke, A. I. Faden. – Текст : электронный // Journal of magnetic resonance imaging : JMRI. – 2010. – Vol. 32, No. 4. – P. 836-846. – URL: </pmc/articles/PMC2949295/?report=abstract> (дата обращения: 13.01.2021).

37. cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1 / G. L. Ming, H. J. Song, B. Berninger [et al.]. – Текст : электронный // Neuron. – 1997. – Vol. 19, No. 6. – P. 1225-1235. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9427246> (дата обращения: 26.08.2019).

38. Carmeliet, P. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis / P. Carmeliet, R. K. Jain. – Текст : электронный // Nature. – 2011. – Vol. 473, No. 7347. – P. 298-307. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21593862/> (дата обращения: 01.02.2021).

39. Cell adhesion molecule 11-transfected embryonic stem cells with enhanced survival support regrowth of corticospinal tract axons in mice after spinal cord injury / J. Chen, C. Bernreuther, M. Dihné, M. Schachner. – Текст : электронный // Journal of neurotrauma. – 2005. – Vol. 22, No. 8. – P. 896-906. – URL: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/neu.2005.22.896> (дата обращения: 01.05.2017).

40. Cell and biomolecule delivery for tissue repair and regeneration in the central nervous system / I. E. Donaghue, R. Tam, M. V. Sefton, M. S. Shoichet. – Текст : электронный // Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society. – 2014. – Vol. 190. – P. 219-227. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24878181/> (дата обращения: 19.08.2021).

41. Cell therapy for spinal cord injury using induced pluripotent stem cells / N. Nagoshi, O. Tsuji, M. Nakamura, H. Okano. – Текст : электронный // Regenerative therapy. – 2019. – Vol. 11. – P. 75-80. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31245451> (дата обращения: 28.08.2019).

42. Cell transplantation for spinal cord injury: tumorigenicity of induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cells / J. Deng, Y. Zhang, Y. Xie [et al.]. – Текст : электронный // Stem cells international. – 2018. – Vol. 2018. – P. 5653787. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29535771> (дата обращения: 29.08.2019).

43. Cell transplantation therapy for spinal cord injury / P. Assinck, G. J. Duncan, B. J. Hilton [et al.]. – Текст : непосредственный // Nature Neuroscience. – 2017. – Vol. 20, No. 5. – P. 637-647.

44. Cerebrolysin, a mixture of neurotrophic factors induces marked neuroprotection in spinal cord injury following intoxication of engineered nanoparticles from metals / P. K. Menon, D. F. Muresanu, A. Sharma [et al.]. – Текст : непосредственный // CNS & Neurological Disorders – Drug Targets. – 2012. – Vol. 11, No. 1. – P. 40-49.

45. Choong, C.-J. Gene therapy for neurological disorders / C.-J. Choong, K. Baba, H. Mochizuki. – Текст : непосредственный // Expert Opinion on Biological Therapy. – 2016. – Vol. 16, No. 2. – P. 143-159.

46. Chung, W.-S. Astrocytes control synapse formation, function, and elimination / W.-S. Chung, N. J. Allen, C. Eroglu. – Текст : электронный // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. – 2015. – Vol. 7, No. 9. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4527946/> (дата обращения: 26.08.2019).

47. Clinical analysis of the treatment of spinal cord injury with umbilical cord mesenchymal stem cells / J. Liu, D. Han, Z. Wang [et al.]. – Текст : электронный // *Cytotherapy*. – 2013. – Vol. 15, No. 2. – P. 185-191. – URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S146532491200028X> (дата обращения: 01.05.2017).
48. Co-transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells and Schwann cells through cerebral spinal fluid for the treatment of patients with chronic spinal cord injury: safety and possible outcome / S. Oraee-Yazdani, M. Hafizi, A. Atashi [et al.]. – Текст : электронный // *Spinal Cord*. – 2016. – Vol. 54, No. 2. – P. 102-109. – URL: <https://www.nature.com/articles/sc2015142> (дата обращения: 20.08.2021).
49. Co-transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and nanospheres containing FGF-2 improve cell survival and neurological function in the injured rat spinal cord / D. A. Shin, W. A. Pennant, D. H. Yoon [et al.]. – Текст : непосредственный // *Acta Neurochirurgica*. – 2014. – Vol. 156, No. 2. – P. 297-303.
50. Combined treatment using peripheral nerve graft and FGF-1: Changes to the glial environment and differential macrophage reaction in a complete transected spinal cord / M. J. Lee, C. J. Chen, C. H. Cheng [et al.]. – Текст : непосредственный // *Neuroscience Letters*. – 2008. – Vol. 433, No. 3. – P. 163-169.
51. Combining constitutively active rhb expression and chondroitinase promotes functional axonal regeneration after cervical spinal cord injury / D. Wu, M. C. Klaw, T. Connors [et al.]. – Текст : электронный // *Molecular Therapy*. – 2017. – Vol. 25, No. 12. – P. 2715-2726. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28967557> (дата обращения: 26.08.2019).
52. Complete rat spinal cord transection as a faithful model of spinal cord injury for translational cell transplantation / D. Lukovic, V. Moreno-Manzano, E. Lopez-Mocholi [et al.]. – Текст : электронный // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 9640. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25860664/> (дата обращения: 13.01.2021).

53. Concise review: reactive astrocytes and stem cells in spinal cord injury: good guys or bad guys / D. Lukovic, M. Stojkovic, V. Moreno-Manzano [et al.]. – Текст : электронный // STEM CELLS. – 2015. – Vol. 33, No. 4. – P. 1036-1041. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25728093> (дата обращения: 27.09.2017).

54. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells / L. V. Feng-Juan, R. S. Tuan, K. M. C. Cheung, V. Y. L. Leung. – Текст : электронный // STEM CELLS. – 2014. – Vol. 32, No. 6. – P. 1408-1419. – URL: <https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/stem.1681> (дата обращения: 20.08.2021).

55. Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC / H. Kucukdereli, N. J. Allen, A. T. Lee [et al.]. – Текст : электронный // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2011. – Vol. 108, No. 32. – P. E440-449. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21788491> (дата обращения: 26.08.2019).

56. Control of motoneuron survival by angiogenin / D. Kieran, J. Sebastia, M. J. Greenway [et al.]. – Текст : электронный // Journal of Neuroscience. – 2008. – Vol. 28, No. 52. – P. 14056-14061. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19109488> (дата обращения: 04.04.2017).

57. Cotrim, A. P. Gene therapy: some history, applications, problems, and prospects / A. P. Cotrim, B. J. Baum. – Текст : электронный // Toxicologic pathology. – 2008. – Vol. 36, No. 1. – P. 97-103. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18337227/> (дата обращения: 19.08.2021).

58. Courtine, G. Spinal cord repair: advances in biology and technology / G. Courtine, M. V. Sofroniew. – Текст : электронный // Nature Medicine. – 2019. – Vol. 25, No. 6. – P. 898-908. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31160817> (дата обращения: 30.08.2019).

59. Crystal, R. G. Adenovirus: The first effective in vivo gene delivery vector / R. G. Crystal. – Текст : непосредственный // Hum Gene Ther. – 2014. – Vol. 25, No. 1. – P. 3-11.

60. Current approaches to the management of acute thoracolumbar disc extrusion in dogs / S. A. Moore, A. Tipold, N. J. Olby [et al.]. – Текст : электронный // Front Vet Sci. – 2020. – Vol. 7. – P. 610. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33117847/> (дата обращения: 13.01.2021).

61. Current options for cell therapy in spinal cord injury / I. Vismara, S. Para, F. Rossi [et al.]. – Текст : электронный // Trends in molecular medicine. – 2017. – Vol. 23, No. 9. – P. 831-849. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28811172> (дата обращения: 28.08.2019).

62. Cytoplasmic extracts from adipose tissue stromal cells alleviates secondary damage by modulating apoptosis and promotes functional recovery following spinal cord injury / S. K. Kang, J. E. Yeo, K. S. Kang, D. G. Phinney. – Текст : электронный // Brain pathology (Zurich, Switzerland). – 2007. – Vol. 17, No. 3. – P. 263-275. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17465991/> (дата обращения: 20.08.2021).

63. Dasari, V. R. Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injuries: A review / V. R. Dasari, K. K. Veeravalli, D. H. Dinh. – Текст : непосредственный // World journal of stem cells. – 2014. – Vol. 6, No. 2. – P. 120-33.

64. Delivery of alginate scaffold releasing two trophic factors for spinal cord injury repair / I. Grulova, L. Slovinska, J. Blaško [et al.]. – Текст : непосредственный // Scientific Reports. – 2015. – Vol. 5. – P. 13702.

65. DePhillipe, J. Cajal's degeneration and regeneration of the nervous system / J. DePhillipe, E. G. Jones. – New York : Oxford and New York: Oxford University Press, 1991. – 768 p. – Текст : непосредственный.

66. Descending motor circuitry required for NT-3 mediated locomotor recovery after spinal cord injury in mice / Q. Han, J. D. Ordaz, N. K. Liu [et al.]. –

Текст : электронный // Nature Communications. – 2019. – Vol. 10, No. 1. – P. 5815. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31862889/> (дата обращения: 18.01.2021).

67. Determining neurotrophin gradients in vitro to direct axonal outgrowth following spinal cord injury / A. Dravid, S. Parittotokkarn, Z. Aqrawe [et al.]. – Текст : электронный // ACS Chem Neurosci. – 2020. – Vol. 11, No. 2. – P. 121-132. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31825204/> (дата обращения: 18.01.2021).

68. Devivo, M. J. Epidemiology of traumatic spinal cord injury: Trends and future implications / M. J. Devivo. – Текст : электронный // Spinal Cord. – 2012. – Vol. 50, No. 5. – P. 365-372. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22270188/> (дата обращения: 13.01.2021).

69. Differentiation of umbilical cord blood-derived multilineage progenitor cells into respiratory epithelial cells / M. J. Berger, S. D. Adams, B. M. Tigges [et al.]. – Текст : электронный // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8, No. 5. – P. 480-487. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17050253/> (дата обращения: 21.08.2021).

70. Dimou, L. NG2-glia and their functions in the central nervous system / L. Dimou, V. Gallo. – Текст : электронный // Glia. – 2015. – Vol. 63, No. 8. – P. 1429-1451. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26010717> (дата обращения: 26.08.2019).

71. Does the preclinical evidence for functional remyelination following myelinating cell engraftment into the injured spinal cord support progression to clinical trials? / S. A. Myers, A. N. Bankston, D. A. Burke [et al.]. – Текст : непосредственный // Experimental Neurology. – 2016. – Vol. 283. – P. 560-572.

72. Eckert, M. J. Trauma: Spinal Cord Injury / M. J. Eckert, M. J. Martin. – Текст : электронный // Surgical Clinics of North America. – 2017. – Vol. 97, No. 5. – P. 1031-1045. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003961091730083X?via%3Dihub> (дата обращения: 30.08.2019).

73. Effect of human mesenchymal stem cell transplantation combined with growth factor infusion in the repair of injured spinal cord / K. N. Kim, S. H. Oh, K. H. Lee, D. H. Yoon. – Текст : электронный // Acta Neurochirurgica, Supplementum.

– 2006. – Vol. 99, No. 99. – P. 133-136. – URL: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-211-35205-2_25 (дата обращения: 18.01.2021).

74. Effect of neuroglobin genetically modified bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on spinal cord injury in rabbits / W.-P. Lin, X.-W. Chen, L.-Q. Zhang [et al.]. – Текст : электронный // PloS one. – 2013. – Vol. 8, No. 5. – P. e63444. – URL: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0063444> (дата обращения: 02.02.2017).

75. Effect of NT-3 on repair of spinal cord injury through the MAPK signaling pathway / J. Ye, R. Xue, Z. Y. Ji [et al.]. – Текст : электронный // European Review for Medical and Pharmacological Sciences. – 2020. – Vol. 24, No. 5. – P. 2165-2172. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32196567/> (дата обращения: 18.01.2021).

76. Effects of sacral neuromodulation on isolated urinary bladder function in a rat model of spinal cord injury / Ş. Kumsar, U. Keskin, A. Akay [et al.]. – Текст : электронный // Neuromodulation. – 2015. – Vol. 18, No. 1. – P. 67-75. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24917133/> (дата обращения: 13.01.2021).

77. Efficient delivery of nerve growth factors to the central nervous system for neural regeneration / D. Xu, D. Wu, M. Qin [et al.]. – Текст : электронный // Advanced Materials. – 2019. – Vol. 31, No. 33. – e1900727. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31125138/> (дата обращения: 18.01.2021).

78. Enhanced adenoviral gene delivery to motor and dorsal root ganglion neurons following injection into demyelinated peripheral nerves / Y. Zhang, Y. Zheng, Y. P. Zhang [et al.]. – Текст : электронный // Journal of neuroscience research. – 2010. – Vol. 88, No. 11. – P. 2374-2384. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20623527/> (дата обращения: 19.08.2021).

79. Ependymal cell contribution to scar formation after spinal cord injury is minimal, local and dependent on direct ependymal injury / Y. Ren, Y. Ao, T. M. O'Shea [et al.]. – Текст : электронный // Scientific reports. – 2017. – Vol. 7. – P.

41122. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28117356> (дата обращения: 22.08.2019).

80. Epidemiology of cervical spine fractures / M. Yadollahi, S. Paydar, H. Ghaem [et al.]. – Текст : электронный // Trauma Monthly. – 2016. – Vol. 21, No. 3. – e33608. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27921020/> (дата обращения: 13.01.2021).

81. Erices, A. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood / A. Erices, P. Conget, J. J. Minguell. – Текст : электронный // British journal of haematology. – 2000. – Vol. 109, No. 1. – P. 235-242. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10848804/> (дата обращения: 21.08.2021).

82. Evaluation of direct and cell-mediated triple-gene therapy in spinal cord injury in rats / R. R. Islamov, A. A. Izmailov, M. E. Sokolov [et al.]. – Текст : непосредственный // Brain Research Bulletin. – 2017. – Vol. 132. – P. 44-52.

83. Ex vivo adenoviral vector-mediated neurotrophin gene transfer to olfactory ensheathing glia: effects on rubrospinal tract regeneration, lesion size, and functional recovery after implantation in the injured rat spinal cord / M. J. Ruitenberg, G. W. Plant, F. P. Hamers [et al.]. – Текст : электронный // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. – 2003. – Vol. 23, No. 18. – P. 7045-7058. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12904465/> (дата обращения: 21.08.2021).

84. Experimental spinal cord trauma: A review of mechanically induced spinal cord injury in rat models / D. Abdullahi, A. A. Annuar, M. Mohamad [et al.]. – Текст : электронный // Rev Neurosci. – 2017. – Vol. 28, No. 1. – P. 15-20. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27845888/> (дата обращения: 13.01.2021).

85. Expression of cytokine receptors by human cord blood lymphocytes: comparison with adult blood lymphocytes / H. Zola, M. Fusco, P. J. Macardle [et al.]. – Текст : электронный // Pediatric research. – 1995. – Vol. 38, No. 3. – P. 397-403. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7494666/> (дата обращения: 21.08.2021).

86. Extensive spontaneous plasticity of corticospinal projections after primate spinal cord injury / E. S. Rosenzweig, G. Courtine, D. L. Jindrich [et al.]. –

Текст : электронный // Nature neuroscience. – 2010. – Vol. 13, No. 12. – P. 1505-1510. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21076427> (дата обращения: 26.08.2019).

87. Feasibility of combination allogeneic stem cell therapy for spinal cord injury: a case report / T. E. Ichim, F. Solano, F. Lara [et al.]. – Текст : электронный // International archives of medicine. – 2010. – Vol. 3, No. 1. – P. 30. – URL: <http://www.intarchmed.com/content/3/1/30> (дата обращения: 04.04.2017).

88. Frantz, S. Embryonic stem cell pioneer Geron exits field, cuts losses / S. Frantz. – Текст : непосредственный // Nature biotechnology. – 2012. – Vol. 30, No. 1. – P. 12-13.

89. Functional Recovery after the transplantation of neurally differentiated mesenchymal stem cells derived from bone marrow in a rat model of spinal cord injury / S.-R. Cho, Y. R. Kim, H.-S. Kang [et al.]. – Текст : электронный // Cell Transplantation. – 2016. – Vol. 25, No. 7. – P. 1423-1423. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28836830> (дата обращения: 27.09.2017).

90. Functional recovery of chronic paraplegic pigs after autologous transplantation of bone marrow stromal cells / M. Zurita, J. Vaquero, C. Bonilla [et al.]. – Текст : электронный // Transplantation. – 2008. – Vol. 86, No. 6. – P. 845-853. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18813110/> (дата обращения: 20.08.2021).

91. GDNF-enhanced axonal regeneration and myelination following spinal cord injury is mediated by primary effects on neurons / L. Zhang, Z. Ma, G. M. Smith [et al.]. – Текст : электронный // GLIA. – 2009. – Vol. 57, No. 11. – P. 1178-1191. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/glia.20840> (дата обращения: 18.01.2021).

92. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update / S. L. Ginn, A. K. Amaya, I. E. Alexander [et al.]. – Текст : электронный // J Gene Med. – 2018. – Vol. 20, No. 5. – P. e3015. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jgm.3015> (дата обращения: 11.12.2020).

93. Gene therapy of amyotrophic lateral sclerosis. / I. A. Zavalishin, N. P. Bochkov, Z. A. Suslina [et al.]. – Текст : электронный // Bulletin of experimental biology and medicine. – 2008. – Vol. 145, No. 4. – P. 483-486. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19110600> (дата обращения: 18.07.2017).

94. Gene therapy strategies for the treatment of spinal cord injury / K. Uchida, H. Nakajima, A. R. Guerrero [et al.]. – Текст : электронный // Therapeutic Delivery. – 2014. – Vol. 5, No. 5. – P. 591-607. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24998276> (дата обращения: 04.07.2018).

95. Genetically engineered umbilical cord blood mononuclear cells for therapy of spinal cord injury in combination with epidural stimulation / F. O. Fadeev, F. V. Bashirov, A. A. Izmailov [et al.]. – Текст : непосредственный // Human Gene Therapy. – 2018. – Vol. 29, No. 12. – P. 208.

96. Glial cell line-derived neurotrophic factor-overexpressing human neural stem/progenitor cells enhance therapeutic efficiency in rat with traumatic spinal cord injury / K. Hwang, K. Jung, I. S. Kim [et al.]. – Текст : электронный // Experimental Neurobiology. – 2019. – Vol. 28, No. 6. – P. 679-696. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31902156/> (дата обращения: 18.01.2021).

97. Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury / I. B. Wanner, M. A. Anderson, B. Song [et al.]. – Текст : электронный // The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. – 2013. – Vol. 33, No. 31. – P. 12870-12886. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23904622> (дата обращения: 22.08.2019).

98. Glorioso, J. C. Herpes vector-mediated gene transfer in treatment of diseases of the nervous system / J. C. Glorioso, D. J. Fink. – Текст : электронный // Annual review of microbiology. – 2004. – Vol. 58. – P. 253-271. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15487938/> (дата обращения: 19.08.2021).

99. Gluckman, E. History of the clinical use of umbilical cord blood hematopoietic cells / E. Gluckman, V. Rocha. – Текст : электронный // Cytotherapy.

– 2005. – Vol. 7, No. 3. – P. 219-227. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16081348/> (дата обращения: 21.08.2021).

100. Gruner, J. A. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat / J. A. Gruner. – Текст : электронный // *Journal of Neurotrauma*. – 1992. – Vol. 9, No. 2. – P. 123-128. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1404425/> (дата обращения: 13.01.2021).

101. Guth, L. The unique histopathological responses of the injured spinal cord. Implications for neuroprotective therapy / L. Guth, Z. Zhang, O. Steward. – Текст : электронный // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1999. – Vol. 890. – P. 366-384. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10668443/> (дата обращения: 13.01.2021).

102. Hackett, A. R. Understanding the NG2 Glial Scar after Spinal Cord Injury / A. R. Hackett, J. K. Lee. – Текст : электронный // *Frontiers in neurology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 199. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27895617> (дата обращения: 26.08.2019).

103. Haim, L. B. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation / L. B. Haim, D. H. Rowitch. – Текст : электронный // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2017. – Vol. 18, No. 1. – P. 31-41. – URL: <http://www.nature.com/articles/nrn.2016.159> (дата обращения: 26.08.2019).

104. Harris, D. T. Umbilical cord blood: a unique source of pluripotent stem cells for regenerative medicine / D. T. Harris, I. Rogers. – Текст : электронный // *Current stem cell research & therapy*. – 2007. – Vol. 2, No. 4. – P. 301-309. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18220914> (дата обращения: 23.01.2018).

105. Hawkins, L. A. Current understanding of the mechanisms for clearance of apoptotic cells—a fine balance / L. A. Hawkins, A. Devitt. – Текст : электронный // *Journal of cell death*. – 2013. – Vol. 6. – P. 57-68. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278779> (дата обращения: 22.08.2019).

106. He, Z. Intrinsic Control of Axon Regeneration / Z. He, Y. Jin. – Текст : электронный // *Neuron*. – 2016. – Vol. 90, No. 3. – P. 437-451. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27151637> (дата обращения: 26.08.2019).

107. Hematogenous macrophage depletion reduces the fibrotic scar and increases axonal growth after spinal cord injury / Y. Zhu, C. Soderblom, V. Krishnan [et al.]. – Текст : электронный // *Neurobiology of disease*. – 2015. – Vol. 74. – P. 114-125. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25461258> (дата обращения: 22.08.2019).

108. Hematologic and immunophenotypic characterization of human umbilical cord blood / P. Pranke, R. R. Failace, W. F. Allebrandt [et al.]. – Текст : электронный // *Acta haematologica*. – 2001. – Vol. 105, No. 2. – P. 71-76. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11408707/> (дата обращения: 21.08.2021).

109. Herpes simplex virus vector-mediated expression of interleukin-10 reduces below-level central neuropathic pain after spinal cord injury / D. Lau, S. E. Harte, T. J. Morrow [et al.]. – Текст : электронный // *Neurorehabilitation and neural repair*. – 2012. – Vol. 26, No. 7. – P. 889-897. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22593113/> (дата обращения: 19.08.2021).

110. Hidalgo, A. Go and stop signals for glial regeneration / A. Hidalgo, A. Logan. – Текст : электронный // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2017. – Vol. 47. – P. 182-187. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29126016> (дата обращения: 26.08.2019).

111. Hodgetts, S. I. Neurotrophic factors used to treat spinal cord injury / S. I. Hodgetts, A. R. Harvey. – Текст : электронный // *Vitamins and Hormones*. – 2017. – Vol. 104. – P. 405-457. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S008367291630067X?via%3Dihub> (дата обращения: 28.08.2019).

112. Hollis, E. R. Axon guidance molecules and neural circuit remodeling after spinal cord injury / E. R. Hollis. – Текст : электронный // *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. – 2016. – Vol. 13, No. 2. – P. 360-369. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26676670> (дата обращения: 26.08.2019).

113. Hollis, E. R. Neurotrophins: potential therapeutic tools for the treatment of spinal cord injury / E. R. Hollis, M. H. Tuszynski. – Текст : электронный //

Neurotherapeutics. – 2011. – Vol. 8, No. 4. – P. 694-703. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13311-011-0074-9> (дата обращения: 18.01.2021).

114. Hong, S. Microglia: phagocytosing to clear, sculpt, and eliminate / S. Hong, B. Stevens. – Текст : электронный // *Developmental Cell*. – 2016. – Vol. 38, No. 2. – P. 126-128. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27459063> (дата обращения: 26.08.2019).

115. Hou, S. Autonomic consequences of spinal cord injury / S. Hou, A. G. Rabchevsky. – Текст : электронный // *Comprehensive Physiology*. – 2014. – Vol. 4, No. 4. – P. 1419-1453. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25428850> (дата обращения: 26.08.2019).

116. Human mesenchymal cells from adipose tissue deposit laminin and promote regeneration of injured spinal cord in rats / K. Menezes, M. A. Nascimento, J. P. Gonçalves [et al.]. – Текст : электронный // *PLOS ONE*. – 2014. – Vol. 9, No. 5. – P. e96020. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0096020> (дата обращения: 20.08.2021).

117. Human olfactory mesenchymal stromal cell transplants promote remyelination and earlier improvement in gait co-ordination after spinal cord injury / S. L. Lindsay, A. Toft, J. Griffin [et al.]. – Текст : электронный // *Glia*. – 2017. – Vol. 65, No. 4. – P. 639-656. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28144983> (дата обращения: 03.02.2017).

118. Human umbilical cord blood-derived CD34+ cells may attenuate spinal cord injury by stimulating vascular endothelial and neurotrophic factors / C. Као, S. Chen, C. Chio, M. Lin. – Текст : электронный // *Shock (Augusta, Ga.)*. – 2008. – Vol. 29, No. 1. – P. 49-55. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17666954/> (дата обращения: 21.08.2021).

119. 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 neuro-genesis-a novel approach in stem cell

therapy / A. A. Rizvanov, A. P. Kiyasov, I. M. Gaziziov [et al.]. – Текст : электронный // *Neurochemistry international*. – 2008. – Vol. 53, No. 6-8. – P. 389-394. – URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018608001575> (дата обращения: 26.01.2018).

120. Human umbilical cord blood progenitors: the potential of these hematopoietic cells to become neural / N. Chen, J. E. Hudson, P. Walczak [et al.]. – Текст : электронный // *Stem cells (Dayton, Ohio)*. – 2005. – Vol. 23, No. 10. – P. 1560-1570. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16081669/> (дата обращения: 21.08.2021).

121. Human umbilical cord blood stem cell transplantation for the treatment of chronic spinal cord injury: Electrophysiological changes and long-term efficacy / L. Q. Yao, C. He, Y. Zhao [et al.]. – Текст : электронный // *Neural Regeneration Research*. – 2013. – Vol. 8, No. 5. – P. 397-403. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25206680/> (дата обращения: 31.07.2020).

122. Human umbilical cord blood stem cells: Rational for use as a neuroprotectant in ischemic brain disease / H. Arien-Zakay, S. Lecht, A. Nagler, P. Lazarovici. – Текст : электронный // *Int J Mol Sci*. – 2010. – Vol. 11, No. 9. – P. 3513-3528. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20957109/> (дата обращения: 19.08.2020).

123. IL-10 promotes neuronal survival following spinal cord injury / Z. Zhou, X. Peng, R. Insolera [et al.]. – Текст : электронный // *Experimental neurology*. – 2009. – Vol. 220, No. 1. – P. 183-190. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19716366/> (дата обращения: 19.08.2021).

124. Immune responses to viral gene therapy vectors / J. L. Shirley, Y. P. de Jong, C. Terhorst, R. W. Herzog. – Текст : электронный // *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. – 2020. – Vol. 28, No. 3. – P. 709-722. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31968213/> (дата обращения: 19.08.2021).

125. Implantation of BM mesenchymal stem cells into injured spinal cord elicits de novo neurogenesis and functional recovery: evidence from a study in rhesus

monkeys / Y. B. Deng, X. G. Liu, Z. G. Liu [et al.]. – Текст : непосредственный // *Cytherapy*. – 2006. – Vol. 8, No. 3. – P. 210-214.

126. Improved stem cell therapy of spinal cord injury using GDNF-overexpressed bone marrow stem cells in a rat model / M. Shahrezaie, R. N. Mansour, B. Nazari [et al.]. – Текст : электронный // *Biologicals*. – 2017. – Vol. 50. – P. 73-80. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28851622/> (дата обращения: 27.09.2017).

127. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector / L. Naldini, U. Blömer, P. Gally [et al.]. – Текст : электронный // *Science (New York, N.Y.)*. – 1996. – Vol. 272, No. 5259. – P. 263-267. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8602510/> (дата обращения: 19.08.2021).

128. Inman, D. M. Ascending sensory, but not other long-tract axons, regenerate into the connective tissue matrix that forms at the site of a spinal cord injury in mice / D. M. Inman, O. Steward. – Текст : электронный // *Journal of Comparative Neurology*. – 2003. – Vol. 462, No. 4. – P. 431-449. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12811811/> (дата обращения: 11.09.2020).

129. Intranasal administration: a potential solution for cross-BBB delivering neurotrophic factors / J. Zhu, Y. Jiang, G. Xu, X. Liu. – Текст : электронный // *Histology and histopathology*. – 2012. – Vol. 27, No. 5. – P. 537-548. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22419018/> (дата обращения: 18.07.2021).

130. Intraspinal transplantation of CD34+ human umbilical cord blood cells after spinal cord hemisection injury improves functional recovery in adult rats / Z. M. Zhao, H. J. Li, H. Y. Liu [et al.]. – Текст : электронный // *Cell transplantation*. – 2004. – Vol. 13, No. 2. – P. 113-122. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15129757/> (дата обращения: 21.08.2021).

131. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells / J. W. Fett, D. J. Strydom, R. R. Lobb [et al.]. – Текст : электронный // *Biochemistry*. – 1985. – Vol. 24, No. 20. – P. 5480-5486. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4074709/> (дата обращения: 21.08.2021).

132. Isolation and expansion of oligodendrocyte progenitor cells from cryopreserved human umbilical cord blood / E. T. Tracy, C. Y. Zhang, T. Gentry [et al.]. – Текст : электронный // *Cytherapy*. – 2011. – Vol. 13, No. 6. – P. 722-729. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21341973> (дата обращения: 26.01.2018).

133. Keefe, K. M. Targeting neurotrophins to specific populations of neurons: NGF, BDNF, and NT-3 and their relevance for treatment of spinal cord injury / K. M. Keefe, I. S. Sheikh, G. M. Smith. – Текст : электронный // *Int J Mol Sci*. – 2017. – Vol. 18, No. 3. – P. 548. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28273811/> (дата обращения: 26.02.2020).

134. Khakh, B. S. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits / B. S. Khakh, M. V Sofroniew. – Текст : электронный // *Nature neuroscience*. – 2015. – Vol. 18, No. 7. – P. 942-952. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26108722> (дата обращения: 26.08.2019).

135. Kim, E. Y. The potential of mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane and amniotic fluid for neuronal regenerative therapy / E. Y. Kim, K. B. Lee, M. K. Kim. – Текст : электронный // *BMB reports*. – 2014. – Vol. 47, No. 3. – P. 135-140. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24499672/> (дата обращения: 20.08.2021).

136. Kim, Y.-H. Spinal cord injury and related clinical trials / Y.-H. Kim, K.-Y. Ha, S.-I. Kim. – Текст : электронный // *Clinics in orthopedic surgery*. – 2017. – Vol. 9, No. 1. – P. 1-9. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28261421> (дата обращения: 26.09.2019).

137. Kjell, J. Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies / J. Kjell, L. Olson. – Текст : электронный // *Disease models & mechanisms*. – 2016. – Vol. 9, No. 10. – P. 1125-1137. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27736748> (дата обращения: 26.08.2019).

138. Kokai, L. E. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration / L. E. Kokai, K. Marra, J. P. Rubin. – Текст :

непосредственный // *Translational Research*. – 2014. – Vol. 163, No. 4. – P. 399-408.

139. Kovalchuk, Y. Neurotrophin action on a rapid timescale / Y. Kovalchuk, K. Holthoff, A. Konnerth. – Текст : непосредственный // *Curr Opin Neurobiol*. – 2004. – Vol. 14, No. 5. – P. 558-563.

140. Lambrechts, D. VEGF at the neurovascular interface: Therapeutic implications for motor neuron disease / D. Lambrechts, P. Carmeliet. – Текст : электронный // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. – 2006. – Vol. 1762, No. 11-12. – P. 1109-1121. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443906000792?via%3Dihub> (дата обращения: 28.08.2019).

141. Lancet Commission: Stem cells and regenerative medicine / G. Cossu, M. Birchall, T. Brown [et al.]. – Текст : непосредственный // *Lancet*. – 2018. – Vol. 391, No. 10123. – P. 883-910.

142. Lentiviral vector-mediated transduction of neural progenitor cells before implantation into injured spinal cord and brain to detect their migration, deliver neurotrophic factors and repair tissue / B. Blits, B. M. Kitay, A. Farahvar [et al.]. – Текст : непосредственный // *Restorative Neurology and Neuroscience*. – 2005. – Vol. 23, No. 5-6. – P. 313-324.

143. Lentiviral vectors express chondroitinase ABC in cortical projections and promote sprouting of injured corticospinal axons / R. R. Zhao, E. M. Muir, J. N. Alves [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of neuroscience methods*. – 2011. – Vol. 201, No. 1. – P. 228-238. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21855577/> (дата обращения: 19.08.2021).

144. Li, Y. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells / Y. Li, P. M. Field, G. Raisman. – Текст : электронный // *Science*. – 1997. – Vol. 277, No. 5334. – P. 2000-2002. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9302296/> (дата обращения: 28.05.2021).

145. Lin, A. C. Local translation and directional steering in axons. / A. C. Lin, C. E. Holt. – Текст : электронный // *The EMBO journal*. – 2007. – Vol. 26, No. 16. –

P. 3729-3736. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17660744> (дата обращения: 26.08.2019).

146. Liu, S. Role and prospects of regenerative biomaterials in the repair of spinal cord injury / S. Liu, Y. Y. Xie, B. Wang. – Текст : электронный // *Neural regeneration research*. – 2019. – Vol. 14, No. 8. – P. 1352-1363. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30964053/> (дата обращения: 19.08.2021).

147. Local and remote growth factor effects after primate spinal cord injury / J. H. Brock, E. S. Rosenzweig, A. Blesch [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Neuroscience*. – 2010. – Vol. 30, No. 29. – P. 9728-9737. – URL: <https://www.jneurosci.org/content/30/29/9728> (дата обращения: 18.01.2021).

148. Local Injection of Lenti-BDNF at the Lesion Site Promotes M2 Macrophage Polarization and Inhibits Inflammatory Response After Spinal Cord Injury in Mice / X. C. Ji, Y. Y. Dang, H. Y. Gao [et al.]. – Текст : электронный // *Cellular and Molecular Neurobiology*. – 2015. – Vol. 35, No. 6. – P. 881-890. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10571-015-0182-x> (дата обращения: 18.01.2021).

149. Logunov, D. Y. Data discrepancies and substandard reporting of interim data of Sputnik V phase 3 trial - Authors' reply / D. Y. Logunov, I. V. Dolzhikova, D. V. Shcheblyakov. – Текст : электронный // *Lancet (London, England)*. – 2021. – Vol. 397, No. 10288. – P. 1883-1884. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33991474/> (дата обращения: 19.08.2021).

150. Long-distance axonal growth from human induced pluripotent stem cells after spinal cord injury / P. Lu, G. Woodruff, Y. Wang [et al.]. – Текст : электронный // *Neuron*. – 2014. – Vol. 83, No. 4. – P. 789-796. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25123310> (дата обращения: 27.09.2017).

151. Madabhushi, A. Image analysis and machine learning in digital pathology: Challenges and opportunities / A. Madabhushi, G. Lee. – Текст : электронный // *Medical image analysis*. – 2016. – Vol. 33. – P. 170. – URL: </pmc/articles/PMC5556681/> (дата обращения: 18.07.2021).

152. Masu, M. Proteoglycans and axon guidance: a new relationship between old partners / M. Masu. – Текст : электронный // *Journal of Neurochemistry*. – 2016. – Vol. 139. – P. 58-75. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26709493> (дата обращения: 26.08.2019).

153. Middendorp, J. J. The Edwin Smith papyrus: A clinical reappraisal of the oldest known document on spinal injuries / J. J. Van Middendorp, G. M. Sanchez, A. L. Burridge. – Текст : электронный // *Eur Spine J*. – 2010. – Vol. 19, No. 11. – P. 1815-1823. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20697750/> (дата обращения: 13.01.2021).

154. Mitani, K. Adenovirus as an integrating vector / K. Mitani, S. Kubo. – Текст : электронный // *Current gene therapy*. – 2002. – Vol. 2, No. 2. – P. 135-144. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12109211/> (дата обращения: 19.08.2021).

155. Motor deficits and recovery in rats with unilateral spinal cord hemisection mimic the Brown-Séquard syndrome / L. Filli, B. Zörner, O. Weinmann, M. E. Schwab. – Текст : электронный // *Brain*. – 2011. – Vol. 134, No. 8. – P. 2261-2273. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21752788> (дата обращения: 26.08.2019).

156. Meinberg, M. S. Adeno-associated virus (AAV) gene therapy for neurological disease / M. S. Weinberg, R. J. Samulski, T. J. McCown. – Текст : электронный // *Neuropharmacology*. – 2013. – Vol. 69. – P. 82-88. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22465202/> (дата обращения: 19.08.2021).

157. Muheremu, A. Stem cell based therapies for spinal cord injury / A. Muheremu, J. Peng, Q. Ao. – Текст : электронный // *Tissue Cell*. – 2016. – Vol. 48, No. 4. – P. 328-333. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27318871> (дата обращения: 08.04.2017).

158. Multifunctional, multichannel bridges that deliver neurotrophin encoding lentivirus for regeneration following spinal cord injury / H. M. Tuinstra, M. O. Aviles, S. Shin [et al.]. – Текст : электронный // *Biomaterials*. – 2012. – Vol. 33, No. 5. – P. 1618-1626. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22130565/> (дата обращения: 19.08.2021).

159. Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors / C. Baum, O. Kustikova, U. Modlich [et al.]. – Текст : электронный // Human gene therapy. – 2006. – Vol. 17, No. 3. – P. 253-263. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16544975/> (дата обращения: 19.08.2021).

160. Myelin status and oligodendrocyte lineage cells over time after spinal cord injury: What do we know and what still needs to be unwrapped / N. Pukos, M. T. Goodus, F. R. Sahinkaya, D. M. McTigue. – Текст : электронный // Glia. – 2019. – Vol. 67, No. 11. – P. 2178-2202. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31444938> (дата обращения: 26.08.2019).

161. Neurally induced umbilical cord blood cells modestly repair injured spinal cords / S. R. Cho, M. S. Yang, S. H. Yim [et al.]. – Текст : электронный // Neuroreport. – 2008. – Vol. 19, No. 13. – P. 1259-1263. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18695504/> (дата обращения: 21.08.2021).

162. Neuregulin-1 controls an endogenous repair mechanism after spinal cord injury / K. Bartus, J. Galino, N. D. James [et al.]. – Текст : электронный // Brain. – 2016. – Vol. 139, No. 5. – P. 1394-1416. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26993800> (дата обращения: 26.08.2019).

163. Neuropathic pain following traumatic spinal cord injury: Models, measurement, and mechanisms / J. L. K. Kramer, N. K. Minhas, C. R. Jutzeler [et al.]. – Текст : электронный // Journal of Neuroscience Research. – 2017. – Vol. 95, No. 6. – P. 1295-1306. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27617844> (дата обращения: 26.08.2019).

164. Ng, M. T. L. Vascular disruption and the role of angiogenic proteins after spinal cord injury / M. T. L. Ng, A. T. Stammers, B. K. Kwon. – Текст : электронный // Translational stroke research. – 2011. – Vol. 2, No. 4. – P. 474-491. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22448202> (дата обращения: 28.08.2019).

165. Nishiyama, A. NG2 cells (polydendrocytes) in brain physiology and repair / A. Nishiyama, R. Suzuki, X. Zhu. – Текст : электронный // Frontiers in

neuroscience. – 2014. – Vol. 8. – P. 133. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25018689> (дата обращения: 26.08.2019).

166. Non-viral gene therapy for spinal cord regeneration / L. Yao, S. Yao, W. Daly [et al.]. – Текст : электронный // Drug discovery today. – 2012. – Vol. 17, No. 17-18. – P. 998-1005. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22634187/> (дата обращения: 19.08.2021).

167. Novel innovations in cell and gene therapies for spinal cord injury / M. Fehlings, M. M. Zavvarian, A. Toossi [et al.]. – Текст : электронный // F1000 Research Ltd. – 2020. – Vol. 9. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32399196/> (дата обращения: 28.05.2021).

168. NT-3 promotes oligodendrocyte proliferation and nerve function recovery after spinal cord injury by inhibiting autophagy pathway / Y. Cong, C. Wang, J. Wang [et al.]. – Текст : электронный // Journal of Surgical Research. – 2020. – Vol. 247. – P. 128-135. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31776022/> (дата обращения: 18.01.2021).

169. O'Shea, T. M. Cell biology of spinal cord injury and repair / T. M. O'Shea, J. E. Burda, M. V Sofroniew. – Текст : электронный // The Journal of clinical investigation. – 2017. – Vol. 127, No. 9. – P. 3259-3270. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28737515> (дата обращения: 22.08.2019).

170. Patterns of brain angiogenesis after vascular endothelial growth factor administration in vitro and in vivo / J. M. Rosenstein, N. Mani, W. F. Silverman, J. M. Krum. – Текст : электронный // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1998. – Vol. 95, No. 12. – P. 7086-7091. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9618543> (дата обращения: 04.04.2017).

171. Perivascular fibroblasts form the fibrotic scar after contusive spinal cord injury / C. Soderblom, X. Luo, E. Blumenthal [et al.]. – Текст : электронный // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. – 2013. – Vol. 33, No. 34. – P. 13882-13887. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23966707> (дата обращения: 26.08.2019).

172. Phase I–II clinical trial assessing safety and efficacy of umbilical cord blood mononuclear cell transplant therapy of chronic complete spinal cord injury / H. Zhu, W. Poon, Y. Liu [et al.]. – Текст : электронный // Cell Transplantation. – 2016. – Vol. 25, No. 11. – P. 1925-1943. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27075659/> (дата обращения: 28.05.2021).

173. Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes / D. T. Harris, M. J. Schumacher, J. Locascio [et al.]. – Текст : электронный // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1992. – Vol. 89, No. 21. – P. 10006-10010. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1438190> (дата обращения: 04.04.2017).

174. Plasmid releasing multiple channel bridges for transgene expression after spinal cord injury / L. De Laporte, Y. Yang, M. L. Zelivyanskaya [et al.]. – Текст : электронный // Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. – 2009. – Vol. 17, No. 2. – P. 318-326. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19050701/> (дата обращения: 19.08.2021).

175. Polymer scaffolds facilitate spinal cord injury repair / Q. Zhang, B. Shi, J. Ding [et al.]. – Текст : электронный // Acta Biomaterialia. – 2019. – Vol. 88. – P. 57-77. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706119300789?via%3Dihub> (дата обращения: 30.08.2019).

176. Preserved corticospinal conduction without voluntary movement after spinal cord injury / D. J. Edwards, M. Cortes, G. W. Thickbroom [et al.]. – Текст : электронный // Spinal Cord. – 2013. – Vol. 51, No. 10. – P. 765-767. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23896664> (дата обращения: 04.04.2017).

177. Quraishie, S. The Extracellular environment of the CNS: influence on plasticity, sprouting, and axonal regeneration after spinal cord injury / S. Quraishie, L. H. Forbes, M. R. Andrews. – Текст : электронный // Neural plasticity. – 2018. – Vol. 2018. – P. 2952386. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29849554> (дата обращения: 26.08.2019).

178. Raisman, G. Neuronal plasticity in the septal nuclei of the adult rat / G. Raisman. – Текст : электронный // Brain Research. – 1969. – Vol. 14, No. 1. – P. 25-48. – URL:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006899369900298?via%3Dihub>

(дата обращения: 26.08.2019).

179. Recent advances in the therapeutic uses of chondroitinase ABC / E. Muir, F. De Winter, J. Verhaagen, J. Fawcett. – Текст : электронный // Experimental Neurology. – 2019. – Vol. 321. – P. 113032. – URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31398353> (дата обращения: 26.08.2019).

180. Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord / G. Courtine, B. Song, R. R. Roy [et al.] // Nature medicine. – 2008. – Vol. 14, No. 1. – P. 69-74.

181. Remyelination after spinal cord injury: Is it a target for repair / J. R. Plemel, M. B. Keough, G. J. Duncan [et al.]. – Текст : электронный // Prog Neurobiol. – 2014. – Vol. 117. – P. 54-72.

182. Repair of spinal cord injury by implantation of bFGF-incorporated HEMA-MOETACL hydrogel in rats / B. Chen, J. He, H. Yang [et al.]. – Текст : непосредственный // Scientific Reports. – 2015. – Vol. 5. – P. 9017.

183. Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signaling and electrical activity / J. L. Goldberg, J. S. Espinosa, Y. Xu [et al.]. – Текст : электронный // Neuron. – 2002. – Vol. 33, No. 5. – P. 689-702. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11879647> (дата обращения: 26.08.2019).

184. Reynolds, B. A. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system / B. A. Reynolds, S. Weiss. – Текст : электронный // Science (New York, N.Y.). – 1992. – Vol. 255, No. 5052. – P. 1707-1710. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1553558/> (дата обращения: 20.08.2021).

185. Richardson, P. M. Peripheral injury enhances central regeneration of primary sensory neurones / P. M. Richardson, V. M. K. Issa. – Текст : электронный

// Nature. – 1984. – Vol. 309, No. 5971. – P. 791-793. – URL: <http://www.nature.com/articles/309791a0> (дата обращения: 26.08.2019).

186. Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system / C. R. De Almodovar, D. Lambrechts, M. Mazzone, P. Carmeliet. – Текст : электронный // *Physiol Rev.* – 2009. – Vol. 89, No. 2. – P. 607-648. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19342615/> (дата обращения: 01.02.2021).

187. Role of early surgical decompression of the intradural space after cervical spinal cord injury in an animal model / J. S. Smith, R. Anderson, T. Pham [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Bone and Joint Surgery – Series A.* – 2010. – Vol. 92, No. 5. – P. 1206-1214. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20439667/> (дата обращения: 13.01.2021).

188. Roy, R. R. Neurobiological perspective of spasticity as occurs after a spinal cord injury / R. R. Roy, V. R. Edgerton. – Текст : электронный // *Experimental Neurology.* – 2012. – Vol. 235, No. 1. – P. 116-122. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488612000374?via%3Dihub> (дата обращения: 26.08.2019).

189. Sabelström, H. Neural stem cells in the adult spinal cord / H. Sabelström, M. Stenudd, J. Frisén. – Текст : электронный // *Experimental Neurology.* – 2014. – Vol. 260. – P. 44-49. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23376590> (дата обращения: 27.09.2017).

190. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia / D. Y. Logunov, I. V. Dolzhikova, D. V. Shcheblyakov [et al.]. – Текст : электронный // *Lancet (London, England).* – 2021. – Vol. 397, No. 10275. – P. 671-681. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33545094/> (дата обращения: 19.08.2021).

191. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia / D. Y. Logunov, I. V. Dolzhikova, O. V. Zubkova [et al.]. – Текст : электронный // *Lancet (London, England).* – 2020. – Vol.

396, No. 10255. – P. 887-897. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32896291/> (дата обращения: 19.08.2021).

192. Safety evaluation of allogeneic umbilical cord blood mononuclear cell therapy for degenerative conditions / W. Z. Yang, Y. Zhang, F. Wu [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Translational Medicine*. – 2010. – Vol. 8, No. 1. – P. 75. – URL: <http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-8-75> (дата обращения: 30.07.2020).

193. Sakuma, T. Lentiviral vectors: basic to translational / T. Sakuma, M. A. Barry, Y. Ikeda. – Текст : электронный // *The Biochemical journal*. – 2012. – Vol. 443, No. 3. – P. 603-618. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22507128/> (дата обращения: 19.08.2021).

194. Sankar, V. Role of human amniotic epithelial cell transplantation in spinal cord injury repair research / V. Sankar, R. Muthusamy. – Текст : непосредственный // *Neuroscience*. – 2003. – Vol. 118, No. 1. – P. 11-17.

195. Scaffold-facilitated locomotor improvement post complete spinal cord injury: Motor axon regeneration versus endogenous neuronal relay formation / X. Li, D. Liu, Z. Xiao [et al.]. – Текст : электронный // *Biomaterials*. – 2019. – Vol. 197. – P. 20-31 – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30639547/> (дата обращения: 13.01.2021).

196. Schäfer, M. K. E. NG2/CSPG4 and progranulin in the posttraumatic glial scar / M. K. E. Schäfer, I. Tegeder. – Текст : электронный // *Matrix Biology*. – 2018. – Vol. 68-69. – P. 571-588. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0945053X17302561?via%3Dihub> (дата обращения: 26.08.2019).

197. Schwann cells engineered to express the cell adhesion molecule L1 accelerate myelination and motor recovery after spinal cord injury / A. A. Lavdas, J. Chen, F. Papastefanaki [et al.]. – Текст : электронный // *Experimental neurology*. – 2010. – Vol. 221, No. 1. – P. 206-216. – URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488609004567> (дата обращения: 01.05.2017).

198. Schwann cells genetically modified to secrete human BDNF promote enhanced axonal regrowth across transected adult rat spinal cord / P. Menei, C. Montero-Menei, S. R. Whittmore [et al.]. – Текст : непосредственный // *European Journal of Neuroscience*. – 1998. – Vol. 10, No. 2. – P. 607-621.

199. Silver, J. Regeneration beyond the glial scar / J. Silver, J. H. Miller. – Текст : электронный // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2004. – Vol. 5, No. 2. – P. 146-156. – URL: <http://www.nature.com/articles/nrn1326> (дата обращения: 26.08.2019).

200. Silver, J. Central nervous system regenerative failure: Role of oligodendrocytes, astrocytes, and microglia / J. Silver, M. E. Schwab, P. G. Popovich. – Текст : электронный // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2015. – Vol. 7, No. 3. – a020602. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25475091/> (дата обращения: 13.01.2021).

201. Sofroniew, M. V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation / M. V. Sofroniew. – Текст : электронный // *Nature reviews. Neuroscience*. – 2015. – Vol. 16, No. 5. – P. 249-263. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25891508> (дата обращения: 22.08.2019).

202. Sofroniew, M. V. Astrocytes: biology and pathology / M. V. Sofroniew, H. V. Vinters. – Текст : электронный // *Acta neuropathologica*. – 2010. – Vol. 119, No. 1. – P. 7-35. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20012068> (дата обращения: 26.08.2019).

203. Spinal cord injury models: a review / T. Cheriyan, D. J. Ryan, J. H. Weinreb [et al.]. – Текст : электронный // *Spinal Cord*. – 2014. – Vol. 52, No. 8. – P. 588-595. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24912546/> (дата обращения: 13.01.2021).

204. Spinal cord molecular and cellular changes induced by adenoviral vector- and cell-mediated triple gene therapy after severe contusion / A. A. Izmailov, T. V. Povysheva, F. V. Bashirov [et al.]. – Текст : электронный // *Frontiers in pharmacology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 813. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29180963> (дата обращения: 30.12.2017).

205. Stem cells therapy for spinal cord injury / M. Gazdic, V. Volarevic, C. R. Harrell [et al.]. – Текст : электронный // International journal of molecular sciences. – 2018. – Vol. 19, No. 4. – P. 1039. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29601528> (дата обращения: 29.08.2019).

206. Stephenson, E. L. Pro-inflammatory roles of chondroitin sulfate proteoglycans in disorders of the central nervous system / E. L. Stephenson, V. W. Yong. – Текст : электронный // Matrix Biology. – 2018. – Vol. 71-72. – P. 432-442. – URL:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0945053X18301483?via%3Dihub> (дата обращения: 26.08.2019).

207. Studies on the development and behavior of the dystrophic growth cone, the hallmark of regeneration failure, in an in vitro model of the glial scar and after spinal cord injury / V. J. Tom, M. P. Steinmetz, J. H. Miller [et al.]. – Текст : электронный // Journal of Neuroscience. – 2004. – Vol. 24, No. 29. – P. 6531-6539. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15269264> (дата обращения: 26.08.2019).

208. Suppression of detrusor-sphincter dyssynergia by herpes simplex virus vector mediated gene delivery of glutamic acid decarboxylase in spinal cord injured rats / M. Miyazato, K. Sugaya, S. Saito [et al.]. – Текст : электронный // The Journal of urology. – 2010. – Vol. 184, No. 3. – P. 1204-1210. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20663524/> (дата обращения: 19.08.2021).

209. 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 / R. R. Islamov, A. A. Rizvanov, M. A. Mukhamedyarov [et al.]. – Текст : непосредственный // Current gene therapy. – 2015. – Vol. 15, No. 3. – P. 266-276.

210. Synergetic induction of NGF with diazoxide and erythropoietin attenuates spinal cord ischemic injury / K. Yamanaka, M. Eldeiry, M. Aftab [et al.]. – Текст : электронный // Journal of Surgical Research. – 2019. – Vol. 233. – P. 124-

131. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30502238/> (дата обращения: 18.01.2021).

211. Takahashi, K. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors / K. Takahashi, S. Yamanaka. – Текст : электронный // Cell. – 2006. – Vol. 126, No. 4. – P. 663-676. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16904174/> (дата обращения: 20.08.2021).

212. Tandem delivery of multiple therapeutic genes using umbilical cord blood cells improves symptomatic outcomes in ALS / R. R. Islamov, A. A. Rizvanov, V. Y. Fedotova [et al.]. – Текст : электронный // Molecular neurobiology. – 2017. – Vol. 54, No. 6. – P. 4756-4763. – URL: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-016-0017-x> (дата обращения: 12.08.2019).

213. Targeted retrograde gene delivery of brain-derived neurotrophic factor suppresses apoptosis of neurons and oligodendroglia after spinal cord injury in rats / H. Nakajima, K. Uchida, T. Yuyama [et al.]. – Текст : электронный // Spine. – 2010. – Vol. 35, No. 5. – P. 497-504. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20190624/> (дата обращения: 19.08.2021).

214. Technical aspects of spinal cord injections for cell transplantation. Clinical and translational considerations / J. Guest, F. Benavides, K. Padgett [et al.]. – Текст : электронный // Brain research bulletin. – 2011. – Vol. 84, No. 4-5. – P. 267-279. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21087657/> (дата обращения: 19.08.2021).

215. Tessier-Lavigne, M. The Molecular Biology of Axon Guidance / M. Tessier-Lavigne, C. S. Goodman. – Текст : электронный // Science. – 1996. – Vol. 274, No. 5290. – P. 1123-1133. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8895455> (дата обращения: 26.08.2019).

216. The effects of spinal cord injury induced by shortening on motor evoked potentials and spinal cord blood flow / H. N. Modi, S.-W. Suh, J.-Y. Hong, J.-H. Yang. – Текст : электронный // The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume. – 2011. – Vol. 93, No. 19. – P. 1781-1789. – URL: <http://journals.lww.com/00004623-201110050-00004> (дата обращения: 13.01.2021).

217. The repair of acute spinal cord injury in rats by olfactory ensheathing cells graft modified by glia cell line-derived neurotrophic factor gene in combination with the injection of monoclonal antibody IN-1 / H. Yan, Z. Zhang, D. Jin [et al.]. – Текст : электронный // *Zhonghua wai ke za zhi [Chinese journal of surgery]*. – 2009. – Vol. 47, No. 23. – P. 1817-1820. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20193555> (дата обращения: 02.02.2017).

218. The retrograde delivery of adenovirus vector carrying the gene for brain-derived neurotrophic factor protects neurons and oligodendrocytes from apoptosis in the chronically compressed spinal cord of twy/twy mice / K. Uchida, H. Nakajima, T. Hirai [et al.]. – Текст : электронный // *Spine*. – 2012. – Vol. 37, No. 26. – P. 2125-2135. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22648027/> (дата обращения: 19.08.2021).

219. The therapeutic effects of human adipose-derived stem cells in a rat cervical spinal cord injury model / M. K. Kolar, P. J. Kingham, L. N. Novikova [et al.]. – Текст : электронный // *Stem Cells and Development*. – 2014. – Vol. 23, No. 14. – P. 1659-1674. – URL: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2013.0416> (дата обращения: 20.08.2021).

220. Therapeutic potential of olfactory ensheathing cells and mesenchymal stem cells in spinal cord injuries / Z. Anna, J.-W. Katarzyna, C. Joanna [et al.]. – Текст : электронный // *Stem cells international*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 3978595. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28298927> (дата обращения: 29.08.2019).

221. Thermosensitive heparin-poloxamer hydrogels enhance the effects of GDNF on neuronal circuit remodeling and neuroprotection after spinal cord injury / Y. Z. Zhao, X. Jiang, Q. Lin [et al.]. – Текст : электронный // *Journal of Biomedical Materials Research – Part A*. – 2017. – Vol. 105, No. 10. – P. 2816-2829. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28593744/> (дата обращения: 18.01.2021).

222. Third trimester NG2-positive amniotic fluid cells are effective in improving repair in spinal cord injury / D. Bottai, G. Scesa, D. Cigognini [et al.]. – Текст : электронный // *Experimental Neurology*. – 2014. – Vol. 254. – P. 121-133.

223. Tillo, M. Emerging roles for semaphorins and VEGFs in synaptogenesis and synaptic plasticity / M. Tillo, C. Ruhrberg, F. Mackenzie. – Текст : электронный // *Cell Adh Migr*. – 2012. – Vol. 6, No. 6. – P. 541-546. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23076132/> (дата обращения: 06.11.2020).

224. Torregrossa, F. Emerging therapeutic strategies for traumatic spinal cord injury / F. Torregrossa, M. Sallì, G. Grasso. – Текст : электронный // *World Neurosurgery*. – 2020. – Vol. 140. – P. 591-601. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32797989/> (дата обращения: 13.01.2021).

225. Transformation of nonfunctional spinal circuits into functional states after the loss of brain input / G. Courtine, Y. Gerasimenko, R. Van Den Brand [et al.]. – Текст : электронный // *Nature Neuroscience*. – 2009. – Vol. 12, No. 10. – P. 1333-1342. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19767747/> (дата обращения: 28.05.2021).

226. Transgene-mediated GDNF expression enhances synaptic connectivity and GABA transmission to improve functional outcome after spinal cord contusion / A. Koelsch, Y. Feng, D. J. Fink, M. Mata. – Текст : электронный // *Journal of neurochemistry*. – 2010. – Vol. 113, No. 1. – P. 143-152. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20132484/> (дата обращения: 19.08.2021).

227. Translational regenerative therapies for chronic spinal cord injury / K. Dalamagkas, M. Tsintou, A. Seifalian, A. M. Seifalian. – Текст : электронный // *International journal of molecular sciences*. – 2018. – Vol. 19, No. 6. – P. 1776. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29914060> (дата обращения: 22.08.2018).

228. Translational spinal cord injury research: Preclinical guidelines and challenges / P. J. Reier, M. A. Lane, E. D. Hall [et al.]. – Текст : электронный // *Handbook of Clinical Neurology*. – 2012. – Vol. 109. – P. 411-433. – URL:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4288927/> (дата обращения: 13.01.2021).

229. Transplantation of a novel cell line population of umbilical cord blood stem cells ameliorates neurological deficits associated with ischemic brain injury / J. Xiao, Z. Nan, Y. Motooka, W. C. Low. – Текст : электронный // *Stem Cells and Development*. – 2005. – Vol. 14, No. 6. – P. 722-733. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16433627/> (дата обращения: 19.08.2020).

230. Transplantation of adipose derived mesenchymal stem cells for acute thoracolumbar disc disease with no deep pain perception in dogs / Y. Kim, S. H. Lee, W. H. Kim, O.-K. Kweon. – Текст : электронный // *Journal of Veterinary Science*. – 2016. – Vol. 17, No. 1. – P. 123-126. – URL: <https://doi.org/10.4142/jvs.2016.17.1.123> (дата обращения: 20.08.2021).

231. Transplantation of porcine embryonic stem cells and their derived neuronal progenitors in a spinal cord injury rat model / J. R. Yang, C. H. Liao, C. Y. Pang [et al.]. – Текст : непосредственный // *Cytherapy*. – 2013. – Vol. 15, No. 2. – P. 201-208.

232. Transplantation of umbilical cord blood stem cells for treating spinal cord injury / D.-H. Park, J.-H. Lee, C. V. Borlongan [et al.]. – Текст : электронный // *Stem Cell Reviews and Reports*. – 2011. – Vol. 7, No. 1. – P. 181-194. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20532836> (дата обращения: 03.02.2017).

233. Transplanted human induced pluripotent stem cell-derived neural progenitor cells do not promote functional recovery of pharmacologically immunosuppressed mice with contusion spinal cord injury / Y. Pomeshchik, K. A. Puttonen, I. Kidin [et al.]. – Текст : электронный // *Cell transplantation*. – 2015. – Vol. 24, No. 9. – P. 1799-1812. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25203632/> (дата обращения: 20.08.2021).

234. Traumatic spinal cord injury – Repair and regeneration / C. S. Ahuja, S. Nori, L. Tetreault [et al.]. – Текст : непосредственный // *Clinical Neurosurgery*. – 2017. – Vol. 80, No. 3. – P. S22-S90.

235. Triple-gene therapy for stroke: a proof-of-concept in vivo study in rats / M. E. Sokolov, F. V. Bashirov, V. A. Markosyan [et al.]. – Текст : непосредственный // *Frontiers in Pharmacology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 111.

236. Tselnicker, I. F. The role of neuronal versus astrocyte-derived heparan sulfate proteoglycans in brain development and injury: Table 1 / I. F. Tselnicker, M. M. Boisvert, N. J. Allen. – Текст : электронный // *Biochemical Society Transactions*. – 2014. – Vol. 42, No. 5. – P. 1263-1269. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25233401> (дата обращения: 26.08.2019).

237. Tuszynski, M. H. Concepts and methods for the study of axonal regeneration in the CNS / M. H. Tuszynski, O. Steward. – Текст : электронный // *Neuron*. – 2012. – Vol. 74, No. 5. – P. 777. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22681683> (дата обращения: 26.08.2019).

238. Ultrastructural and cytochemical characterization of human cord blood cells / T. Mikami, M. Eguchi, H. Kurosawa [et al.]. – Текст : электронный // *Medical electron microscopy : official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan*. – 2002. – Vol. 35, No. 2. – P. 96-101. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12181651/> (дата обращения: 21.08.2021).

239. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell therapy for neurological disorders via inhibition of mitogen-activated protein kinase pathway-mediated apoptosis / R. Zhang, H. Chen, Z. Zheng [et al.]. – Текст : электронный // *Molecular medicine reports*. – 2015. – Vol. 11, No. 3. – P. 1807-1812. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25412281/> (дата обращения: 21.08.2021).

240. Umbilical cord blood: Current uses for transfusion and regenerative medicine / N. Orlando, C. Pellegrino, C. G. Valentini [et al.]. – Текст : непосредственный // *Transfusion and Apheresis Science*. – 2020. – Vol. 59, No. 5. – P. 102952.

241. Umbilical cord blood stem cell mediated downregulation of Fas improves functional recovery of rats after spinal cord injury / V. R. Dasari, D. G. Spomar, L. Li [et al.]. – Текст : электронный // *Neurochemical Research*. – 2008. –

Vol. 33, No. 1. – P. 134-149. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17703359/> (дата обращения: 19.08.2020).

242. Use of human umbilical cord blood (HUCB) cells to repair the damaged brain / M. B. Newman, D. F. Emerich, C. V Borlongan [et al.]. – Текст : электронный // Current neurovascular research. – 2004. – Vol. 1, No. 3. – P. 269-81. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16181077> (дата обращения: 03.02.2017).

243. Validation of the weight-drop contusion model in rats: A comparative study of human spinal cord injury / G. A. S. Metz, A. Curt, H. Van De Meent [et al.]. – Текст : электронный // Journal of Neurotrauma. – 2000. – Vol. 17, No. 1. – P. 1-17. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10674754/> (дата обращения: 13.01.2021).

244. Vascular endothelial growth factor: A neurovascular target in neurological diseases / C. Lange, E. Storkebaum, C. R. De Almodóvar [et al.]. – Текст : электронный // Nature Reviews Neurology. – 2016. – Vol. 12, No. 8. – P. 439-454. – URL: <https://www.nature.com/articles/nrneurol.2016.88> (дата обращения: 01.02.2021).

245. Vascular endothelial growth factor and the nervous system / A. Brockington, C. Lewis, S. Wharton, P. J. Shaw. – Текст : электронный // Neuropathology and Applied Neurobiology. – 2004. – Vol. 30, No. 5. – P. 427-446. – URL: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2990.2004.00600.x> (дата обращения: 28.08.2019).

246. Vascular endothelial growth factor improves functional outcome and decreases secondary degeneration in experimental spinal cord contusion injury / J. Widenfalk, A. Lipson, M. Jubran [et al.]. – Текст : электронный // Neuroscience. – 2003. – Vol. 120, No. 4. – P. 951-960. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12927201> (дата обращения: 01.05.2017).

247. Vawter, M. P. Dysregulation of the neural cell adhesion molecule and neuropsychiatric disorders / M. P. Vawter. – Текст : электронный // European Journal of Pharmacology. – 2000. – Vol. 405, No. 1-3. – P. 385-395. – URL:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299900005689?via%3Dihub>
(дата обращения: 28.08.2019).

248. Vector-mediated expression of erythropoietin improves functional outcome after cervical spinal cord contusion injury / S. Wang, Z. Wu, P. Chiang [et al.]. – Текст : электронный // Gene therapy. – 2012. – Vol. 19, No. 9. – P. 907-914. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22052241/> (дата обращения: 19.08.2021).

249. Walker, M. J. History of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and its use for spinal cord injury repair / M. J. Walker, X. M. Xu. – Текст : электронный // Brain Sci. – 2018. – Vol. 8, No. 6. – P. 109. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29899247/> (дата обращения: 18.01.2021).

250. Walsh, F. S. Cell adhesion molecules and neuronal regeneration / F. S. Walsh, P. Doherty. – Текст : электронный // Current Opinion in Cell Biology. – 1996. – Vol. 8, No. 5. – P. 707-713. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095506749680113X?via%3Dihub>
(дата обращения: 28.08.2019).

251. Walthers, C. M. Gene delivery strategies to promote spinal cord repair / C. M. Walthers, S. K. Seidlits. – Текст : непосредственный // Biomarker Insights. – 2015. – Vol. 2015, No. Suppl 1. – P. 11-29.

252. Wenzel, L. R. Acute spinal cord injury / L. R. Wenzel, A. Vrooman, H. A. Hammill. – Текст : непосредственный // Critical Care Obstetrics. – 2018. – Vol. 28, No. 6. – P. 369-389.

253. Zeng, J. Self-assembled ternary complexes of plasmid DNA, low molecular weight polyethylenimine and targeting peptide for nonviral gene delivery into neurons / J. Zeng, X. Wang, S. Wang. – Текст : электронный // Biomaterials. – 2007. – Vol. 28, No. 7. – P. 1443-1451. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17156837/> (дата обращения: 19.08.2021).

254. Адресная миграция и выживание генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека после трансплантации G93A мышам с моделью бокового амиотрофического склероза / З. З. Сафиуллово, Е. Е.

Гаранина, А. А. Измайлов [и др.]. – Текст : непосредственный // Гены и клетки. – 2015. – Т. X, № 4. – С. 1-4.

255. Изменение функционального состояния клеточные структур спинного мозга при гравитационной разгрузке / А. А. Еремеев, Т. В. Балтина, М. А. Еремеев [и др.]. – Текст : непосредственный // Биофизика. – 2016. – Т. 61, № 5. – С. 950-953.

256. Исследование экспрессии рекомбинантных терапевтических генов в мононуклеарных клетках крови пуповины, трансдуцированных тремя аденовирусными векторами, кодирующими нейротрофические факторы GDNF и VEGF и молекулу нейрональной адгезии NCAM / Р. Р. Исламов, А. А. Ризванов, Е. Е. Черенкова [и др.]. – Текст : непосредственный // Гены и клетки. – 2014. – Т. IX, № 3. – С. 204-208.

257. Клеточная терапия осложнений инсульта и позвоночно-спинномозговой травмы / М. А. Конопляников, В. П. Баклаушев, В. А. Кальсин [и др.]. – Текст : непосредственный // Клиническая практика. – 2015. – Т. 3, № 4. – С. 48-58.

258. Новосёлова, И. Н. Этиология и клиническая эпидемиология позвоночно-спинномозговой травмы. литературный обзор / И. Н. Новосёлова. – Текст : непосредственный // Российский нейрохирургический журнал имени профессора А.Л. Поленова. – 2019. – Т. 11, № 4. – С. 84-92.

259. Ноздрачев, А. Д. Анатомия крысы / А. Д. Ноздрачев, Е. Л. Поляков. – Санкт-Петербург : Лань, 2001. – 464 с. – ISBN 5-8114-0435-2. – Текст : непосредственный.

260. Прудникова, О. Г. Позвоночно-спинномозговая травма грудного и поясничного отделов позвоночника осложненная : Клинические рекомендации / О. Г. Прудникова, С. О. Рябых. – 2016. – 45 с. – Текст : непосредственный.

261. Сломинский, П. А. Пептидные лекарственные средства: возможности, перспективы и ограничени / П. А. Сломинский, М. И. Шадрина. – Текст : непосредственный // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2018. – Т. 1, № 1. – С. 8-14.

262. Эпидемиология травм позвоночника и спинного мозга (Обзор) / В. С. Толкачев, С. П. Бажанов, В. Ю. Ульянов [и др.]. – Текст : непосредственный // Травматология, ортопедия и нейрохирургия. – 2018. – Т. 14, № 3. – С. 592-595.

263. Якушин, О. А. Анализ летальных исходов у пациентов с позвоночно-спинномозговой травмой в остром периоде / О. А. Якушин, В. В. Агаджанян, А. В. Новокшенов. – Текст : непосредственный // Клинические аспекты нейрохирургии. – 2019. – № 3. – С. 55-60.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AAV - адено-ассоциированные вирусы.

Ad – аденовирусы.

ANG – ангиогенин.

ASIA - Американская ассоциация травм спинного мозга (American Spinal Cord Injury Association).

BDNF - нейротрофического фактора мозга (brain-derived neurotrophic factor).

CAM – клеточные молекулы адгезии (Cell adhesion molecules).

ChABC - хондроитиназа ABC.

COVID-19 - коронавирусная инфекция 2019 года (COronaVirus Disease 2019).

CSPG4 - протеогликан хондроитина сульфата 4 (Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4).

CSPGs - протеогликаны хондроитина сульфата.

DPBS - натрий-фосфатный буферный раствор Дульбекко.

FGF - фактор роста фибробластов.

FGF1 - фактор роста фибробластов 1 (кислый, aFGF).

FGF2 - фактор роста фибробластов 2 (основной, bFGF).

GDNF – глиальный нейротрофический фактор.

GFAP - глиальный фибриллярный кислый белок (Glial fibrillary acidic protein).

HLA - человеческий лейкоцитарный антиген (Human Leukocyte Antigen).

Hsp – белки теплового шока.

Iba1 – ионизированная кальций-связывающая адаптерная молекула 1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1).

IFN- γ - интерферон- γ .

IL-10 – интерлейкин 10.

IL-2 – интерлейкин 2.

IL-6 – интерлейкин 6.

IL-7 – интерлейкин 7.

NCAM – нейрональная молекула клеточной адгезии.

NG2 – нейрональный глиальный антиген 2.

NG2-ОПК – олигодендроглиальные клетки предшественники.

PIGF - плацентарный фактор роста.

PSD95 – белок постсинаптической плотности 95 (postsynaptic density protein 95).

SARS-CoV-2 – тяжёлый острый респираторный синдром, вызванный коронавирусом 2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2).

TNF- α - фактор некроза опухоли- α .

VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста.

VEGFR-1 – тирозинкиназные рецепторы клеточной поверхности, кодируемые геном Flt-1.

VEGFR-2 – тирозинкиназные рецепторы клеточной поверхности, кодируемые геном KDR/Flk-1.

VEGFR-3 – тирозинкиназные рецепторы клеточной поверхности, кодируемые геном Flt-4.

AO/ASIF - универсальная классификация переломов Ассоциации остеосинтеза.

АФ-МСК - амниотические фетальные мезенхимальные стволовые клетки.

БАС - боковой амиотрофический склероз.

в/б – внутрибрюшинно.

в/в – внутривенно.

ВМП – вызванные моторные потенциалы.

ВПГ - вирус простого герпеса.

ГЭБ - гематоэнцефалический барьер.

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота.

ДТП - дорожно-транспортное происшествие.

- ЗК - задняя конечность.
- ИПСК - индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.
- КГМУ - Казанский государственный медицинский университет.
- кДа – килоДальтон.
- кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота.
- КТСМ – контузионная травма спинного мозга.
- ЛВ – лентивирусный вектор.
- МВП - моторные вызванные потенциалы.
- МККП - моноклеарные клетки крови пуповины человека.
- МККП-МСК - мезенхимальные стволовые клетки, полученные из моноклеарных клеток крови пуповины человека.
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота.
- МРТ - магнитно-резонансная томография.
- МСК - мезенхимальные стволовые клетки.
- МСК-ЖТ - мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани.
- МСК-КМ - мезенхимальные стволовые клетки костного мозга.
- НОАК - Народно-освободительная армия Китая.
- НСК - нейрональные стволовые клетки.
- ОНК - обонятельные нейроэпителиальные клетки.
- ПЕРК – передняя конечность.
- ПК - пуповинная кровь.
- ПТСМ - позвоночно-спинномозговая травма.
- ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в реальном времени.
- РНказы – рибонуклеазы.
- СККМ - стромальные клетки костного мозга.
- СМ – спинной мозг.
- ТСМ – травма спинного мозга.
- ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор.
- ЦНС – центральная нервная система.
- ЭСКЧ- эмбриональные стволовые клетки человека.