ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИЙ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В ОБЛАСТИ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ ПРИ КЛЕТОЧНО–ОПОСРЕДОВАННОЙ И ПРЯМОЙ ДОСТАВКЕ ГЕНА *GDNF*

Я.О. Мухамедшина [1,2], Г.Ф. Шаймарданова [3], А.Р. Мухитов [3], Е.Е. Гаранина [2], А.А. Ризванов [2], Ю.А. Челышев [1,2]

[1] Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия
[2] Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия
[3] Казанский институт биохимии и биофизики РАН, Казань, Россия

Phenotypic modifications and quantitative analysis of glial cells in the area of spinal cord injury at the cell–mediated and direct gene delivery gdnf

Y.O. Mukhamedshina [1,2], G.F.Shaymardanova [3], A.R. Mukhitov [3], E.E. Garanina [2], A.A.Rizvanov [2], Yu.A. Chelyshev [1,2]

[1] Kazan State Medical University, Kazan, Russia
[2] Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia
[3] Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of RAS, Kazan, Russia

На модели контузионной травмы спинного мозга крысы на уровне Т8 изучено влияние клеточно-опосредованной и прямой доставки в область повреждения гена глиального нейротрофического фактора (GDNF). Для поддержания популяции Cx47$^+$-клеток в вентральных рогах (VH) наиболее эффективна однократная доставка в область повреждения аденовирусного вектора с геном GDNF (AdV-*gdnf*) при помощи мононуклеарных клеток пуповинной крови человека, а в области вхождения задних корешков (DREZ) — прямая доставка (AdV-*gdnf*). Клеточно-опосредованная доставка гена GDNF приводит к наиболее выраженным сдвигам в экспрессии маркерных белков астроцитов GFAP, S100B и AQP4 в вентральных канатиках (VF) белого вещества. При обоих способах доставки терапевтического гена показано наиболее выраженное поддержание популяции GFAP$^+$/S100B$^+$-астроцитов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что прямая и клеточно-опосредованная доставка гена GDNF в область травмы спинного мозга по-разному влияют на популяции глиальных клеток в конкретных областях мозга, что важно для выбора оптимального способа доставки терапевтических генов с целью стимулирования посттравматической нейрорегенерации.

Ключевые слова: травма спинного мозга, аденовирусный вектор, клетки крови пуповины, GDNF.

On the model of rat spinal cord dosed contusion at T8 level studied the effect of delivery into the area of damage of the cell-mediated and direct gene delivery GDNF on maintaining a population of glial cells. Delivery into the area of damage adenoviral vector with gene GDNF (AdV-*gdnf*) using human umbilical cord blood mononuclear cells has a greater influence the amount of Ch47$^+$-cells in the ventral horn (VH). Direct delivery of AdV-*gdnf* influences the amount of Ch47$^+$-cells in dorsal roots entry zone (DREZ). Cell-mediated gene delivery GDNF causes the most pronounced changes in the expression of marker proteins astrocyte GFAP, S100B, and AQP4 in the ventral funiculus (VF) of white matter. Cell-mediated and direct delivery of gene GDNF support population GFAP$^+$/S100B$^+$-cells. The results indicate that the direct and cell-mediated gene delivery GDNF into spinal cord injury have different effects on the populations of glial cells in specific areas of spinal cord, that is important for the optimal method of delivery of therapeutic genes to stimulate posttraumatic neuroregeneration.

Key words: spinal cord injury, adenoviral vector, umbilical cord blood cells, GDNF.

Травматическое повреждение спинного мозга приводит к гибели нейронов и глиальных клеток, изменению их структуры и функции, что проявляется демиелинизацией, дегенерацией нервных волокон и образованием глиального рубца [1, 2]. Несмотря на это, снижение числа сохранившихся нейронов при значительном повреждении серого вещества приводит к относительно небольшим функциональным нарушениям. Так, избирательное лиганд-опосредованное повреждение серого вещества крысы без затрагивания окружающих трактов существенно не влияет на подвижность конечностей [3]. Поэтому одной из главных задач генной терапии при травме спинного мозга считается поддержание и восстановление структуры и функции белого вещества. Решение этой задачи может быть осуществлено путём поддержания популяции олигодендроцитов, способных участвовать в ремиелинизации, и астроцитов, оказывающих нейротрофическое влияние и формирующих потенциальное пространство для роста аксонов [4].

Разрабатываемые терапевтические подходы с применением гена GDNF, как предполагается, смогут сдерживать развитие вышеуказанных патологических реакций вторичного повреждения. GDNF оказывает выраженное нейропротекторное действие, способствует миелинизации и росту аксонов [5, 6]. Однако данные о цитопротекторном влиянии этого фактора на состояние конкретных популяций глиальных клеток практически отсутствуют.

Способ доставки генов при помощи аденовирусных векторов считается одним из наиболее перспективных и безопасных [7]. Показано, что локальная доставка в область травмы спинного мозга аденовирусов с геном GDNF способствует восстановлению двигательной функции и предотвращает ретроградную атрофию кортикальных мотонейронов [8, 9]. Однако применение аналогичной конструкции при травматическом повреждении головного мозга не устраняет функциональный дефицит и не влияет на сохранность области повреждения [10]. Исследования с различными способами доставки гена GDNF в большей степени направлены на изучение функционального дефицита и сохранности серого вещества спинного мозга, оставляя без внимания изменения со стороны глиальных клеток. Поэтому в нашей

e-mail: Yanakazmedhist1@rambler.ru

работе поставлена задача изучить влияние прямой и клеточно-опосредованной доставки аденовирусов с геном GDNF на фенотипические характеристики и количественный состав популяций глиальных клеток при травме спинного мозга крысы.

Материал и методы

Эксперименты проведены на 42 белых лабораторных крысах, самках и самцах весом 200–250 г. Содержание и работу с лабораторными животными проводили в соответствии с требованиями приказа МЗ РФ от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики». Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом Казанского государственного медицинского университета. Животных содержали в отдельных клетках, со стандартным суточным режимом и свободным доступом к воде и корму. Крыс наркотизировали путём внутрибрюшинной инъекции хлоралгидрата (Sigma, США) (80 мг/мл, 0,4 мл на 100 г). Всем животным проводили ламинэктомию на уровне Т8, после чего наносили дозированную контузионную травму спинного мозга металлическим стержнем весом 10 г строго на центр визуализируемого участка с высоты 25 мм [11]. Получение мононуклеарной фракции клеток пуповинной крови человека (UCBMC) и рекомбинантного аденовируса с клонированным геном GDNF (AdV-*gdnf*) было описано нами ранее [12, 13]. Сразу после нанесения травмы в экспериментальной группе с клеточно-опосредованной доставкой гена (UCBMC+AdV-*gdnf*, n = 11) вводили UCBMC, трансдуцированные AdV-*gdnf* по 1 млн в 5 мкл DPBS (БиолоТ, Россия) в 2 точки на расстоянии 1 мм ростральнее и каудальнее эпицентра травмы и 0,5 мм латеральнее срединной линии при помощи гамильтоновского шприца (Sigma, США). В опытах с прямой доставкой гена (AdV-*gdnf*, n = 15) в аналогичных условиях эксперимента вводили по $3{,}2\times10^6$ pfu аденовируса AdV-*gdnf* в те же точки. Животным контрольной группы (AdV-*egfp*, n = 16) в том же количестве и в тех же условиях вводили аденовирус с геном усиленного зелёного флуоресцентного белка (EGFP). В течение 7 сут. после операции всем экспериментальным животным внутримышечно вводили гентамицин (5 мг/кг) один раз в сутки. Забор материала осуществляли через 30 сут. после операции по методике, описанной ранее [14].

Иммунофлуоресцентные реакции проводили на поперечных срезах спинного мозга толщиной 20 мкм, полученных на микротом-криостате HM560 CryoStar (Carl Zeiss). Для идентификации антигена срезы инкубировали с первичными антителами против белка S100B (Dako, 1:1200), глиального фибриллярного кислого белка (GFAP, Santa Cruze, 1:200), аквапорина 4 (AQP4, Santa Cruze, 1:150), коннексина 47 (Cx47, Invitrogen, 1:250) в течение ночи при 4°C, промывали в фосфатно-солевом буфере и затем инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями anti-mouse Alexa 647 (Invitrogen, 1:250), anti-rabbit Alexa 555 (Invitrogen, 1:250), anti-goat Alexa 488 (Invitrogen, 1:250) в течение 2 ч при комнатной температуре. Для визуализации ядер клеток срезы дополнительно окрашивали раствором 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI, 10 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, Sigma). Окрашенные срезы заключали в среду, поддерживающую флуоресценцию, изучение и оцифровку изображений проводили при помощи конфокального сканирующего микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss).

Количество $Cx47^+$-клеток подсчитывали на оцифрованных изображениях с помощью программы LSM Image Examiner в 3 фиксированных зонах серого и белого вещества площадью 0,04 $мм^2$: вентро-медиальная область вентральных канатиков (VF), вентральные рога (VH), область вхождения задних корешков (DREZ). Интенсивность свечения белков S100B, GFAP, AQP4 и коэффициент их колокализации анализировали при помощи программы ZEN 2012. Значение интенсивности выражали в условных единицах, которые рассчитывали как соотношение флюоресцирующих точек (пикселей) в пределах данного участка к несветящимся (шкала от 0 до 256). Коэффициенты колокализации рассчитывали как соотношение колокализованных пикселей к общему количеству детектируемых в данном канале пикселей и могли быть числами от 0 (нет колокализации) до 1. Результаты морфометрии обрабатывали с использованием дисперсионного анализа ANOVA.

Результаты

К 30 сут. после травмы в опытных и контрольной группах во всех исследуемых зонах спинного мозга выявлены клетки, экспрессирующие Cx47, характерный для олигодендроцитов и $S100B^+$-астроцитов [15]. Максимальное количество указанных клеток обнаружено в зоне VH на расстоянии 0,5 см от эпицентра травмы в ростральном направлении в группе UCBMC+AdV-*gdnf*, где количество $Cx47^+$-клеток более чем в 2 раза превышает этот показатель в группах AdV-*gdnf* и AdV-*egfp* (рис. 1 А, В–3). В зонах DREZ и VF на расстоянии 0,5 см от эпицентра травмы в ростральном направлении достоверная разница не прослеживается при сравнении обеих опытных групп. Однако численность популяции $Cx47^+$-клеток во всех исследуемых зонах в опытных группах UCBMC+AdV-*gdnf* и AdV-*gdnf* больше, чем в контрольной группе (AdV-*egfp*), где терапия не проводилась.

В группе UCBMC+AdV-*gdnf* в зоне DREZ при удалении от эпицентра травмы на расстояние 1 см в ростральном направлении количество $Cx47^+$-клеток уменьшается, в остальных областях достоверных изменений не выявлено (рис. 1 Б). В группе AdV-*gdnf* увеличение количества $Cx47^+$-клеток выявлено во всех исследованных зонах. В DREZ количество этих клеток возрастает более чем в 2 раза в группе AdV-*gdnf* по сравнению с животными из опытной группы (UCBMC+AdV-*gdnf*) и контрольной группы (AdV-*gdnf*) (рис. 2 И–О). В группе AdV-*egfp* в белом веществе на расстоянии 0,5 и 1 см в ростральном направлении от эпицентра травмы количество $Cx47^+$-клеток меньше, чем в сером веществе.

Таким образом, популяция $Cx47^+$-клеток достаточно сильно реагирует на повреждение и проводимую терапию как в области белого, так и серого вещества. Однако применение клеточно-опосредованной доставки гена GDNF (UCBMC+AdV-gdnf) в большей степени влияет на количество $Cx47^+$-клеток в VH, а прямая доставка AdV-*gdnf* в DREZ.

При проведении иммунофлуоресцентных реакций в исследуемых зонах экспериментальных групп выявлены клетки, экспрессируюшие белки GFAP, S100B и AQP4, характерные для различных популя-

ций астроцитов [16–18]. Наибольшая интенсивность свечения GFAP обнаружена в группе UCBMC+AdV-*gdnf* в зонах VH и VF, где имеется достоверная разница по сравнению с группами AdV-*gdnf* и AdV-*egfp* (рис. 2 А). В DREZ статистически значимых различий по экспрессии белка GFAP между исследуемыми группами не найдено.

В группе UCBMCs+AdV-*gdnf* в зоне VF обнаружена наибольшая интенсивность свечения белка S100B, где данный показатель больше аналогичного в группах AdV-*gdnf* и AdV-*egfp* на 87,6% и 81,4%, соответственно (рис. 2Б). В DREZ установлено достоверное отличие по экспрессии белка S100B между двумя опытными группами и контрольной, а в VH статистически значимых различий по данному показателю не найдено.

Как в группе с клеточно-опосредованной (UCBMC+AdV-*gdnf*), так и прямой доставкой гена GDNF (AdV-*gdnf*) в зоне VF обнаружена наибольшая интенсивность свечения белка AQP4, где данный показатель больше аналогичного в контрольной группе (AdV-*egfp*) на 51,1% и 54,4%, соответственно (рис. 2 В). В DREZ и VH достоверных различий по экспрессии AQP4 между исследуемыми группами не найдено. Становится очевидным, что содержание AQP4 в клетках астроцитарной глии наиболее стабильно и данный белок в меньшей степени реагирует на проводимую терапию.

Анализ колокализации белков GFAP, S100B и AQP4 в исследуемых зонах серого и белого вещества свидетельствует о наличии нескольких популяций астроцитов, в которых экспрессия исследуемых белков различна в зависимости от вида терапии или ее отсутствия (табл. 1). Наибольший коэффициент колокализации обнаружен между белками GFAP и S100B в зоне VF в обеих опытных группах. Также остается высоким данный показатель в группах с прямой (AdV-*gdnf*) и клеточно-опосредованной (UCBMC+AdV-*gdnf*) терапией в зонах DREZ и VH, тогда как в контрольной группе этот показатель достоверно ниже. Коэффициент колокализации для белков GFAP/AQP4 и S100B/AQP4 составляет менее 0,5 для всех исследуемых групп в зонах DREZ и VH (рис. 3). Достоверных различий в показателе колокализации для указанных пар белков внутри групп не найдено. В VH коэффициент колокализации указанных пар белков достоверно выше в контрольной группе (AdV-*egfp*) по сравнению с опытными группами. В связи с отсутствием достоверных различий в показателе колокализации между группами следует, что наиболее стабильной является популяция S100B$^+$/AQP4$^+$-клеток в VF.

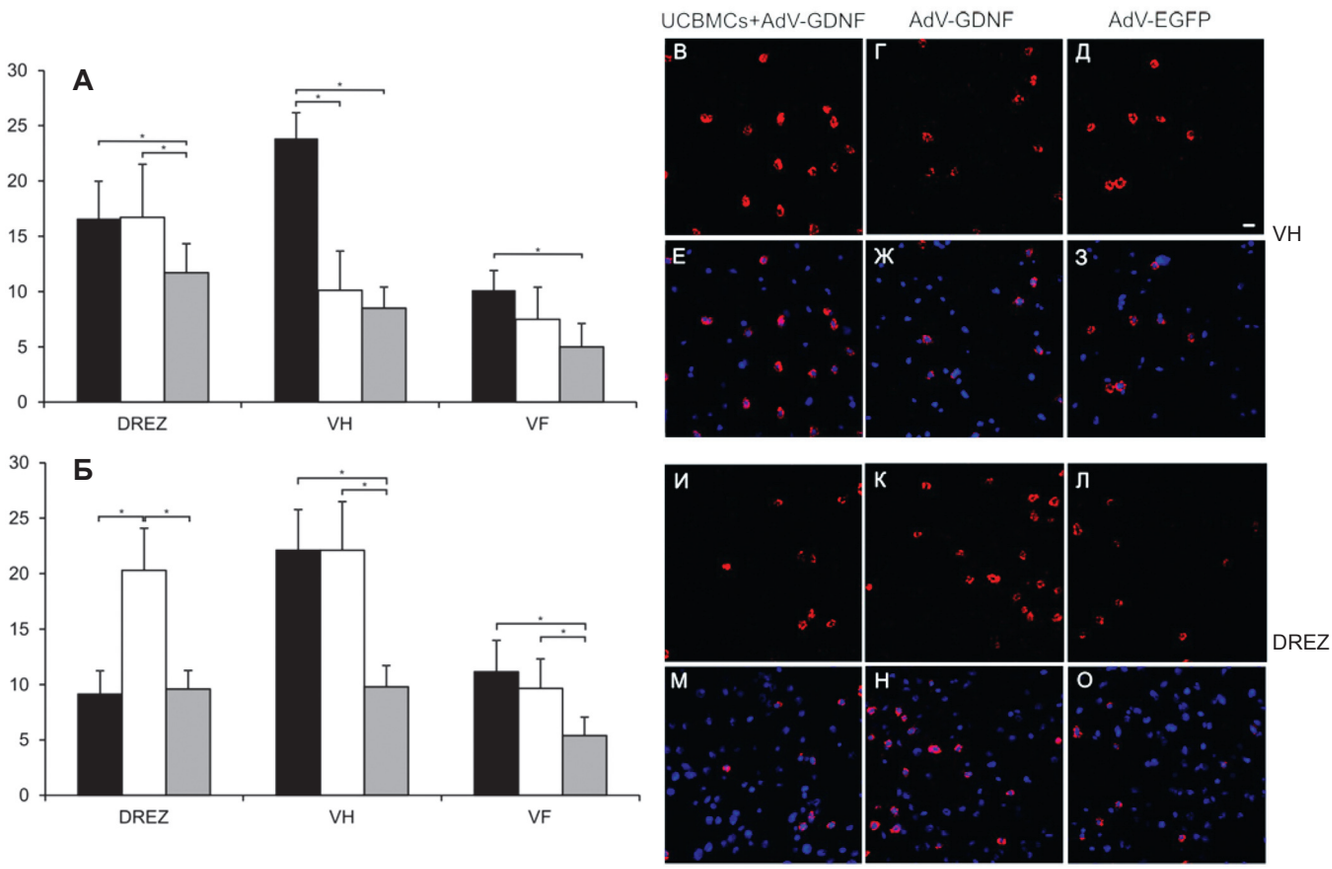

*Рис. 1. Количество Cx47$^+$-клеток (ось ординат) в фиксированных зонах серого и белого вещества на расстоянии 0,5 (А) и 1 (Б) см от эпицентра травмы в ростральном направлении (ось абсцисс), 30 сут. после операции. Черные столбцы – группа UCBMCs+AdV-gdnf, белые – группа AdV-gdnf, серые – группа AdV-egfp. Правая панель – экспрессия Cx47 (красный) в зоне VH (В-З) и DREZ (И-О) на расстоянии 0,5 и 1 см от эпицентра травмы в ростральном направлении, соответственно. В, Е, И, М – группа UCBMCs+AdV-gdnf; Г, Ж, К, Н – группа AdV-gdnf; Д, З, Л, О – группа AdV-egfp. Визуализация ядер – DAPI (синий). Конфокальная микроскопия. Бар: 10 мкм. *различия между группами статистически значимы при $p<0,05$*

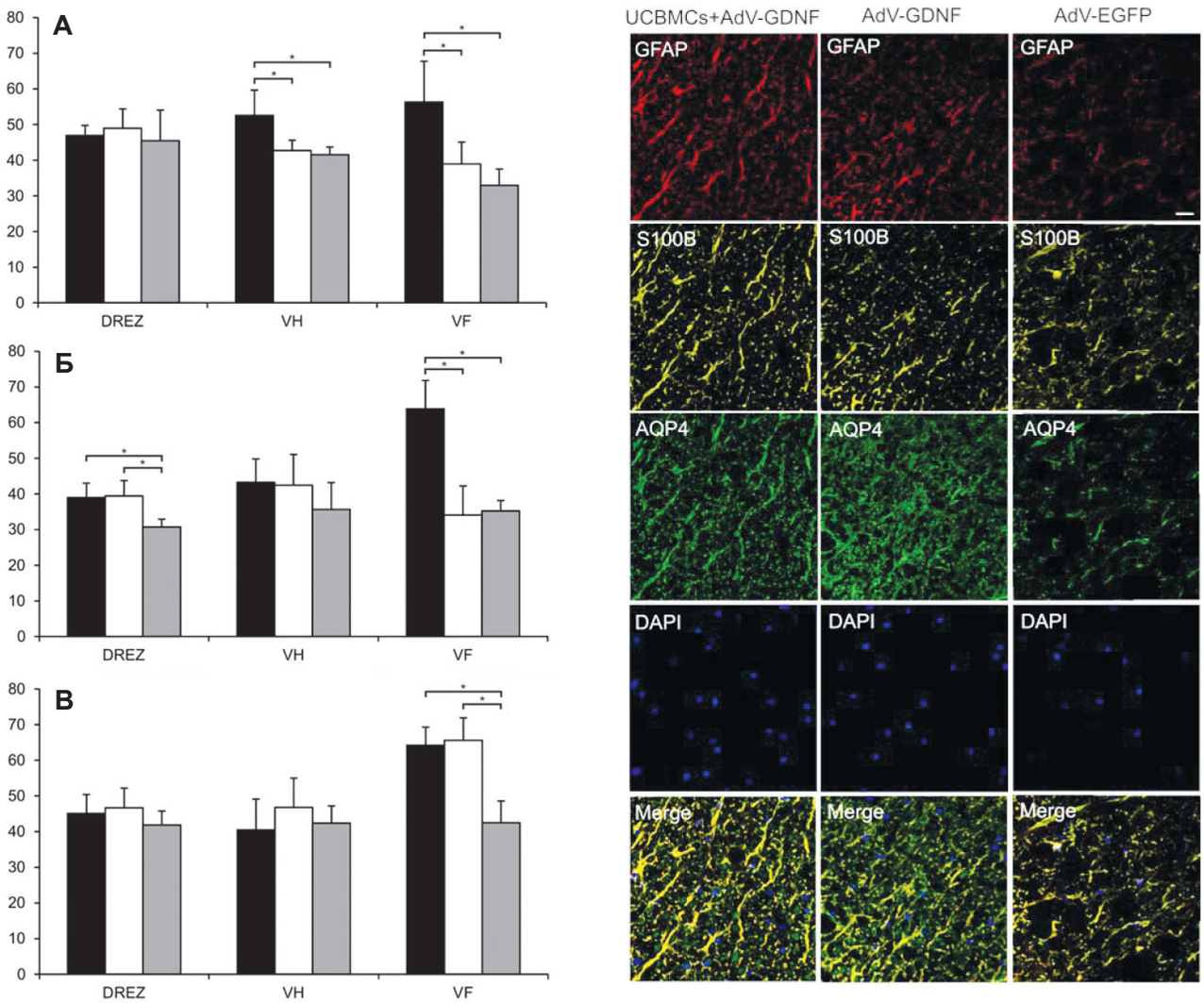

*Рис. 2. Интенсивность флуоресценции белков GFAP (А), S100B (Б) и AQP4 (В) в условных единицах (ось ординат) в фиксированных зонах серого и белого вещества на расстоянии 1 см от эпицентра травмы в ростральном направлении (ось абсцисс), 30 сут. после операции. Черные столбцы – группа UCBMCs+AdV-gdnf; белые – группа AdV-gdnf; серые – группа AdV-egfp. Правая панель: экспрессия GFAP, S100B и AQP4 в зоне VF на расстоянии 1 см от эпицентра травмы в ростральном направлении. Конфокальная микроскопия. Бар: 20 мкм. *различия между группами статистически значимы при $p<0,05$*

Коэффициенты ко–локализации белков GFAP, S100B и AQP4 на расстоянии 1 см от эпицентра травмы в ростральном направлении в зонах DREZ, VF и VH

Экспериментальные группы	GFAP/S100B	GFAP/AQP4	S100B/AQP4
DREZ			
UCBMC+AdV-gdnf	0,722±0,026*	0,471±0,047	0,48±0,051
AdV-gdnf	0,709±0,054*	0,351±0,054#	0,31±0,114#
AdV-egfp	0,472±0,058	0,44±0,044	0,45±0,05
VF			
UCBMC+AdV-gdnf	0,756±0,052*	0,567±0,109	0,576±0,110
AdV-gdnf	0,763±0,07*	0,517±0,148	0,537±0,142
AdV-egfp	0,615±0,066	0,655±0,076**	0,586±0,058
VH			
UCBMC+AdV-gdnf	0,736±0,011*	0,382±0,066	0,397±0,069
AdV-gdnf	0,722±0,034*	0,336±0,05	0,359±0,05
AdV-egfp	0,527±0,098	0,454±0,064**	0,455±0,076**

* – различия с контрольной группой (AdV-*egfp*) статистически значимы при $p<0,05$; ** – различия с 1-й (UCBMC+AdV-*gdnf*) и 2-й экспериментальными (AdV-*gdnf*) группами статистически значимы при $p<0,05$; # – различия с 1-й экспериментальной (UCBMC+AdV-*gdnf*) и контрольной (AdV-*egfp*) группами статистически значимы при $p<0,05$.

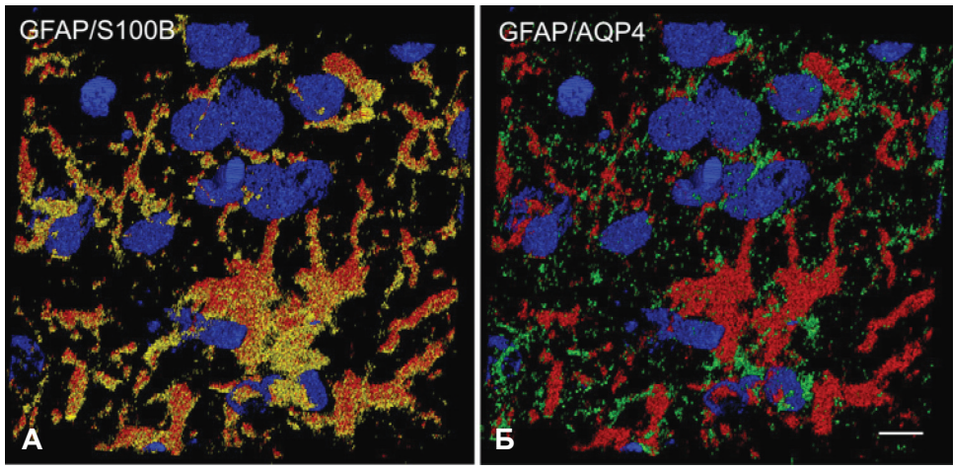

Рис. 3.
Ко-локализация белков GFAP/S100B (А) и GFAP/AQP4 (Б) в зоне DREZ в группе UCBMCs+AdV-gdnf на расстоянии 1 см от эпицентра травмы в ростральном направлении. GFAP (красный), S100B (желтый), AQP4 (зеленый). Конфокальная микроскопия, трехмерная реконструкция. Бар: 5 мкм

Таким образом, установлено, что клеточно-опосредованная терапия (UCBMC+AdV-*gdnf*) приводит к наиболее выраженным сдвигам в показателе экспрессии белков GFAP, S100B и AQP4 астроцитами в вентральных канатиках белого вещества спинного мозга. Полученные результаты коэффициентов колокализации свидетельствуют о том, что клеточно-опосредованная и прямая доставка гена GDNF в большей степени поддерживают популяцию GFAP$^+$/S100B$^+$-клеток.

Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что прямая и клеточно-опосредованная доставка гена GDNF в область травмы спинного мозга поразному влияет на количественный показатель популяций олигодендроцитов и экспрессию белков астроцитарной глией.

Cx47 является белком щелевых контактов и экспрессируется преимущественно олигодендроцитами и S100B$^+$-астроцитами [15]. В нашем эксперименте клеточно-опосредованная доставка гена GDNF (UCBMC+AdV-*gdnf*) в большей степени влияла на количественный показатель Cx47$^+$-клеток во всех исследуемых областях вблизи эпицентра травмы. Прямая генная терапия (AdV-*gdnf*) оказала значительное влияние на аналогичный показатель в DREZ на расстоянии 1 см в ростральном направлении от места повреждения. Результат в группе UCBMC+AdV-*gdnf* согласуется с полученным нами раннее, в котором показано достоверное увеличение количества α-PDGFR$^+$-олигодендроцитов в белом и сером веществе при клеточно-опосредованной доставке гена GDNF [14]. Однако требует дальнейшего изучения феномен увеличения количества Cx47$^+$-клеток в DREZ на удалении от эпицентра травмы (1 см в ростральном направлении) в группе с прямой доставкой гена GDNF (AdV-*gdnf*) по сравнению с клеточно-опосредованной (UCBMC+AdV-*gdnf*). Инъекция вирусных векторов позволяет трансдуцировать клетки, локализация которых ограничена достаточно узкой областью введения. Миграционный потенциал трансплантированных в область повреждения спинного мозга мононуклеарных клеток крови пуповины значителен, что показано нами ранее [19]. Поэтому возможность меньшей экспрессии GDNF и поддержании популяции Cx47$^+$-клеток в этой области при генно-клеточной терапии (UCBMC+AdV-*gdnf*) представляется менее вероятной.

Выявленные изменения в экспрессии белков GFAP, S100B и AQP4 астроцитами отражают перестройку цитоскелета глиальных клеток, возможные изменения архитектоники отростков и межклеточных коммуникаций, из которых наибольшее значение имеют взаимодействия астроцитов с нейронами. По критериям экспрессии GFAP и S100B, а также колокализации этих белков изменение фенотипа глиальных клеток в исследуемых зонах свидетельствует о сдвигах, характерных для реактивных астроцитов, экспрессия указанных белков которыми возрастает при патологических проявлениях в спинном мозге. Данные изменения следует рассматривать как позитивный фактор стимулирования нейрорегенерации в связи с известной способностью реактивных астроцитов оказывать антиоксидантное и цитопротекторное действие [20]. Полученные результаты свидетельствуют, что клеточно-опосредованная доставка гена GDNF в большей степени способствует поддержанию популяции астроцитов и их активации.

Увеличение экспрессии в области DREZ S100B в экспериментальных группах с применением генной терапии, в отличие от контрольной, возможно за счет привлечения в область повреждения S100B$^+$-шванновских клеток [21]. Известно, что GDNF стимулирует дифференцировку миелинобразующих шванновских клеток [22]. Указанные изменения со стороны астроцитов в опытных группах могут способствовать восстановлению трофической функции и формированию потенциального пространства для роста аксонов, а привлечение в область травмы шванновских клеток позитивно повлиять на их регенерацию.

Мононуклеарные клетки крови пуповины известны своей способностью вырабатывать специфические факторы, поддерживающие выживание и дифференцировку клеток, сдерживать воспалительную реакцию и оказывать нейротрофическое влияние [23]. Поэтому рассмотренный в данном исследовании метод генно-клеточной терапии при травме спинного мозга, предполагающий доставку аденовирусного вектора с геном GDNF при помощи мононуклеарных клеток крови пуповины человека в область повреждения в большей степени, чем прямая доставка того же гена, поддерживает популяцию наиболее значимых для нейрорегенерации глиальных клеток.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №14-04-31246_мол_а, РФФИ №13-04-12035_офи_м, гранта компании ОПТЭК 2014 г. Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров. Работа частично выполнена на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования и Научно образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Rowland J.W., Hawryluk G.W., Kwon B. et al. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. Neurosurg. Focus. 2008; 25(5): 1-17.
2. Xu H., Wang J., Zhai Y. et al. Oligodendrocyte and spinal cord injury. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi. 2012; 29(6): 1226-9.
3. Magnuson D.S., Trinder T.C., Zhang Y.P. et al. Comparing deficits following excitotoxic and contu-sion injuries in the thoracic and lumbar spinal cord of the adult rat. Exp. Neurol. 1999; 156: 191-204.
4. Rothermundt M., Peters M., Prehn J.H. et al. S100B in brain damage and neurodegeneration . Microsc. Res. Tech. 2003; 60(6): 614-32.
5. Cheng H., Wu J.P., Tzeng S.F. Neuroprotection of glial cell line–derived neurotrophic factor in damaged spinal cords following contusive injury. J. Neurosci. Res. 2002; 69(3): 397-405.
6. Airaksinen M.S., Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. Nat. Rev. Neurosci. 2002; 3: 383-94.
7. Doloff J.C., Waxman D.J. Adenoviral vectors for prodrug activation-based gene therapy for cancer. Anticancer Agents Med. Chem. 2014; 14: 115-26.
8. Tai M.H., Cheng H., Wu J.P. et al. Gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor promotes functional recovery following spinal cord contusion. Exp. Neurol. 2003; 183(2): 508-15.
9. Tang X.Q., Wang Y., Huang Z.H. et al. Adenovirus-mediated delivery of GDNF ameliorates corticospinal neuronal atrophy and motor function deficits in rats with spinal cord injury. Neuroreport 2004; 15(3): 425-9.
10. Degeorge M.L., Marlowe D., Werner E. et al. Combining glial cell line-derived neurotrophic factor gene delivery (AdGDNF) with L-arginine decreases contusion size but not behavioral deficits after traumatic brain injury. Brain Res. 2011; 27(1403): 45-56.
11. Scheff S.W., Rabchevsky A.G., Fugaccia I. et al. Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device. J Neurotrauma 2003; 20(2): 179-93.
12. Rizvanov A.A., Kiyasov A.P., Gaziziov I.M. et al. Human umbilical cord blood cells transfected with VEGF and L(1)CAM do not differentiate into neurons but transform into vascular endothelial cells and secrete neurotrophic factors to support neurogenesisa novel approach in stem cell therapy. Neurochem. Int. 2008; 53(6-8): 389-94.
13. Черенкова Е.Е., Федотова М.А., Борисов Р.Р. и др. Создание рекомбинантных аденовирусов и лентивирусов, экспрессирующих ангиогенные и нейропротекторные факторы, с помощью технологии клонирования Gateway. Ж. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2012; 7(3): 164-8.
14. Мухамедшина Я.О., Шаймарданова Г.Ф., Салафутдинов И.И. и др. Доставка рекомбинантного аденовируса с клонированным геном GDNF в область травмы спинного мозга при помощи клеток крови пуповины человека стимулирует восстановление двигательной функции и поддерживает популяцию глиальных клеток. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2013; 8(3): 129-32.
15. Odermatt B., Wellershaus K., Wallraff A. et al. Connexin 47 (Cx47)-deficient mice with enhanced green fluorescent protein reporter gene reveal predominant oligodendrocytic expression of Cx47 and display vacuolized myelin in the CNS. J. Neurosci. 2003; 23(11): 4549-59.
16. Martinez L., Sonsoles de Lacalle. Astrocytic reaction to a lesion, under hormonal deprivation. Neurosci. Lett. 2007; 415(2): 190-3.
17. Pisani F., Rossi A., Nicchia G.P. et al. Translational regulation mechanisms of aquaporin-4 supramolecular organization in astrocytes. Glia 2011; 59: 1923-32.
18. Donato R., Cannon B.R., Sorci G. et al. Functions of S100 proteins. Curr. Mol. Med. 2013; 13: 24-57.
19. Мухамедшина Я.О. Посттравматические реакции спинного мозга крысы при трансплантации мононуклеарных клеток крови пуповины человека, трансфицированных плазмидой pBud VEGF FGF2 [диссертация]. Саранск: Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва; 2013.
20. Lepore A.C., O'Donnell J., Kim A.S. et al. Reduction in expression of the astrocyte glutamate transporter, GLT1, worsens functional and histological outcomes following traumatic spinal cord injury. Glia 2011; 59(12): 1996-2005.
21. Iwase T., Jung C.G., Bae H. et al. Glial cell line–derived neurotrophic factor–induced signal-ing in Schwann cells. J. Neurochem. 2005; 94(6): 1488-99.
22. Jessen R.K., Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. Neuroscience 2005; 6: 671-82.
23. Chen C.T., Foo N.H., Liu W.S. Infusion of human umbilical cord blood cells ameliorates hind limb dysfunction in experimental spinal cord injury through anti–inflammatory, vasculogenic and neurotrophic mechanisms. Pediatr. Neonatol. 2008; 49(3): 77-83.

Поступила: 17.08.2014