

© Коллектив авторов, 2011  
УДК 616.832-001-003.93:599.323.4

Г.Ф. Шаймарданова<sup>1</sup>, Я.О. Мухамедшина<sup>2</sup>, С.С. Архипова<sup>2</sup>, И.И. Салафутдинов<sup>4</sup>,  
А.А. Ризванов<sup>3,4</sup> и Ю.А. Чельшев<sup>2</sup>

## ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ГЕНАМИ *vegf* и *fgf2*

<sup>1</sup> Лаборатория молекулярных основ патогенеза (зав. — проф. В.М. Чернов), Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН; <sup>2</sup> кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. Ю.А. Чельшев), <sup>3</sup> Центральная научно-исследовательская лаборатория (зав. — С.Р. Абдулхаков), Казанский государственный медицинский университет; <sup>4</sup> кафедра генетики (зав. — проф. Б.И. Барабанщиков), Казанский (Приволжский) федеральный университет, e-mail: gulnara\_kzn@rambler.ru; yanakazmedhist1@rambler.ru

Исследование проведено на 25 белых лабораторных крысах. На модели дозированной контузионной травмы спинного мозга крысы на уровне T<sub>viii</sub> измеряли площадь патологических полостей и подсчитывали количество миелиновых волокон в наружных зонах белого вещества при немедленном однократном введении в область повреждения моноклеарных клеток крови пуповины человека, трансфицированных плазмидой с генами *vegf* и *fgf2*. Животным контрольной группы в аналогичных условиях вводили те же клетки, трансфицированные плазмидой pEGFP-N2 с геном усиленного зеленого флюоресцентного белка (*egfp*). К 30-м суткам после введения у животных подопытной группы на поперечном срезе спинного мозга на расстоянии 3 мм от эпицентра травмы в каудальном направлении суммарная площадь патологических полостей в наружных зонах белого вещества уменьшалась более чем в 2 раза по сравнению с контролем. В тех же зонах белого вещества на том же расстоянии от эпицентра травмы в каудальном и ростральном направлении количество миелиновых волокон в среднем на 20% превышало соответствующий показатель в контроле, а на расстоянии 5 мм в ростральном направлении — на 40–70%. Доставка в область повреждения терапевтических генов *vegf* и *fgf2* уменьшала кавитацию, сдерживала процессы вторичной дегенерации и поддерживала количество миелиновых волокон в поврежденном спинном мозгу.

**Ключевые слова:** спинной мозг, клетки крови пуповины, *vegf*, *fgf2*

Ввиду низкого регенераторного потенциала ЦНС, применяемые методы лечения травмы спинного мозга остаются малоэффективными. Перспективным подходом в этом направлении считается клеточная терапия. Показано, что введение стволовых и прогениторных клеток при экспериментальной травме спинного мозга стимулирует регенерацию и приводит к частичному восстановлению утраченных функций [8, 13–15]. Тип вводимых клеток, наиболее эффективно поддерживающих выживание нейронов или олигодендроцитов, рост аксонов, ремиелинизацию, сохранность ткани, остается неясным. Существенными недостатками введения клеток при травме спинного мозга являются их плохое выживание и неконтролируемая дифференцировка.

Введение клеток крови пуповины человека при травме спинного мозга сдерживает воспалительную реакцию, оказывает нейротрофическое действие, стимулирует неоваскуляризацию [7], снижает экспрессию проапоптозных генов и поддерживает выживание нейронов [8]. На ряде экспериментальных моделей установлено, что клетки крови пуповины, вырабатывая колониестимулирующий фактор 1, тромбопоэтин и интерлей-

кин-11, обладают иммуномодулирующим свойством [18].

Усилить терапевтический эффект вводимых клеток и регенераторный потенциал спинного мозга можно путем применения генетически модифицированных клеток, обладающих способностью к длительной гиперэкспрессии ключевых факторов, которые поддерживают выживание и дифференцировку нейральных клеток. Становится очевидным, что при травме спинного мозга введение генетически модифицированных клеток при помощи вирусных и плазмидных векторов с клонированными генами нейротрофических факторов, противоапоптозных молекул, молекул адгезии и других стимуляторов нейрорегенерации оказывается более эффективным, чем введение тех же нативных клеток.

Остается неясным, доставка каких генов или их комбинаций наиболее эффективно стимулирует посттравматическую регенерацию спинного мозга. Сравнительные исследования, проведенные на единой экспериментальной модели, отсутствуют. В качестве стимуляторов нейрорегенерации особый интерес вызывают сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и фактор роста фибробластов-2 (FGF2). VEGF проявляет свой-

ства типичного нейротрофического фактора. Он поддерживает выживание чувствительных [17] и двигательных [11] нейронов. Данные о влиянии на нейрорегенерацию прямой доставки VEGF в область повреждения спинного мозга противоречивы [5, 9], что определяет актуальность работ по анализу эффектов VEGF как потенциального стимулятора регенерации в ЦНС.

Введение FGF2 совместно с эпидермальным фактором роста (EGF) в область травмы спинного мозга существенно уменьшает объём патологических полостей и способствует сохранности белого вещества [12]. Под действием FGF2 предшественники макроглиоцитов дифференцируются в зрелые клетки. Введение FGF2 в комбинации с трансплантацией стволовых мезенхимных клеток человека улучшает функциональные показатели регенерации спинного мозга крысы [13].

Цель данного исследования — по величине патологических полостей и количеству миелиновых волокон в белом веществе оценить посттравматические изменения спинного мозга крысы при немедленном однократном введении в область повреждения моноклеарных клеток крови пуповины человека, трансфицированных генами *vegf* и *fgf2*.

**Материал и методы.** Эксперименты проведены на 25 белых лабораторных крысах, самках и самцах массой 200–250 г. Содержание и использование лабораторных животных соответствовало правилам, принятым в Казанском государственном медицинском университете и одобренным этическим комитетом. Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к воде и корму. Крысы были разделены на 2 группы — контрольную и подопытную. Всем животным, наркотизированным путем внутривенной инъекции хлоралгидрата (Sigma, США) (80 мг/мл, 0,4 мл на 100 г), проводили ламинэктомию на уровне T<sub>VIII</sub>. Дозированную контузионную травму спинного мозга наносили с помощью вертикально падающего стержня массой 10 г с высоты 2,5 см по методу [1]. Взятие крови пуповины человека и выделение моноклеарной фракции клеток осуществляли по методу I.J. Fuss [16]. Клетки крови пуповины получали из Банка стволовых клеток Казанского государственного университета. Выделенные клетки трансфицировали путем электропорации плазмидой pBud-VEGF-FGF2 [2] для введения животным подопытной группы. Сразу после нанесения травмы трансфицированные клетки инъецировали по 1 мл в 5 мкл DPBS (фосфатно-солевой буфер Дубленко, стерильный без ионов Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>, Биолот, Россия) в 2 точки на расстоянии 1 мм роstralнее и каудальнее эпидентра травмы и 0,5 мм латеральнее срединной линии при помощи гамилтоновского шприца (Sigma, США). Животным контрольной группы в тех же условиях и в том же количестве вводили аналогичные клетки, трансфицированные плазмидой pEGFP-N2 (Clontech, США), содержащей ген улучшенного зеленого флуоресцентного белка (EGFP). В течение 7 сут после операции животным обеих групп внутримышечно вводили гентамицин (5 мг/кг) 1 раз в сутки. Через 30 сут после нанесения травмы животных наркотизировали и транскардиально

перфузировали 4% раствором параформальдегида (4 °С). Фрагмент спинного мозга брали вместе с позвонками. Через 12 ч от начала фиксации выделяли спинной мозг, дофиксировали в 1% растворе OsO<sub>4</sub> в фосфатном буфере с добавлением сахарозы и заливали в эпон-812 (Fluka, Швейцария). На окрашенных метиленовым синим полутонких срезах измеряли площадь патологических полостей и определяли количество миелиновых волокон на расстоянии 3, 5 и 15 мм от эпидентра травмы в роstralном и каудальном направлениях. Количество миелиновых волокон подсчитывали на площади 0,0962 мм<sup>2</sup> при ув. 25 у всех выживших животных на трех серийных срезах у каждого (6 — контрольных и 12 подопытных крыс; в контрольной группе летальность составила 33%, а в подопытной — 25%). Морфометрию производили в следующих зонах белого вещества: 1 — вентромедиальная часть переднего канатика, прилежащая к срединной щели, правая сторона; 2 — то же, левая сторона; 3 — латеральная часть бокового канатика в пределах фронтальной плоскости, проходящей через центральный канал, правая сторона; 4 — то же, левая сторона.

Просмотр препаратов и оцифровку изображений проводили с помощью микроскопа Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Германия). Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме LKB-III (Bromma, Швеция). Препараты контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и просматривали с помощью трансмиссионного микроскопа JEM-1200 (Jeol, Япония). Результаты морфометрии обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента.

Для флуоресцентной иммуногистохимии поперечные срезы спинного мозга толщиной 20 мкм, изготовленные на вибротоме MA 752 (Campden Instruments, Великобритания), инкубировали с антителами к белку периферического миелина P0 (Sigma, США) в разведении 1:200 при температуре 4 °С в течение 12 ч. После промывки в PBS с добавлением 0,05% Triton X-100 срезы инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с Atto 647 (Sigma, США) в разведении 1:100. Ядра клеток дополнительно окрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, Sigma, США). Срезы просматривали в конфокальном сканирующем микроскопе LSM 510-Meta (Carl Zeiss, Германия) с использованием лазера He/Ne 663 (фильтр LP650).

**Результаты исследования.** К 30-м суткам после нанесения дозированной контузионной травмы спинного мозга и введения трансфицированных клеток в относительно сохраненном белом веществе присутствуют многочисленные мелкие полости, которые локализуются преимущественно по периферии (рис. 1). К этому сроку у животных подопытной группы после введения клеток, трансфицированных плазмидой pBud-VEGF-FGF2, суммарная площадь патологических полостей, на поперечном срезе спинного мозга при удалении от эпидентра травмы на расстояние в 3 мм в каудальном направлении, значительно уменьшается (рис. 2). Так, по сравнению с таковой в контрольной группе крыс в вентромедиальной части переднего канатика справа и слева (зоны 1 и 2) она уменьшается в среднем в 2,2 раза ( $P < 0,05$ ), а в латеральной части бокового канатика

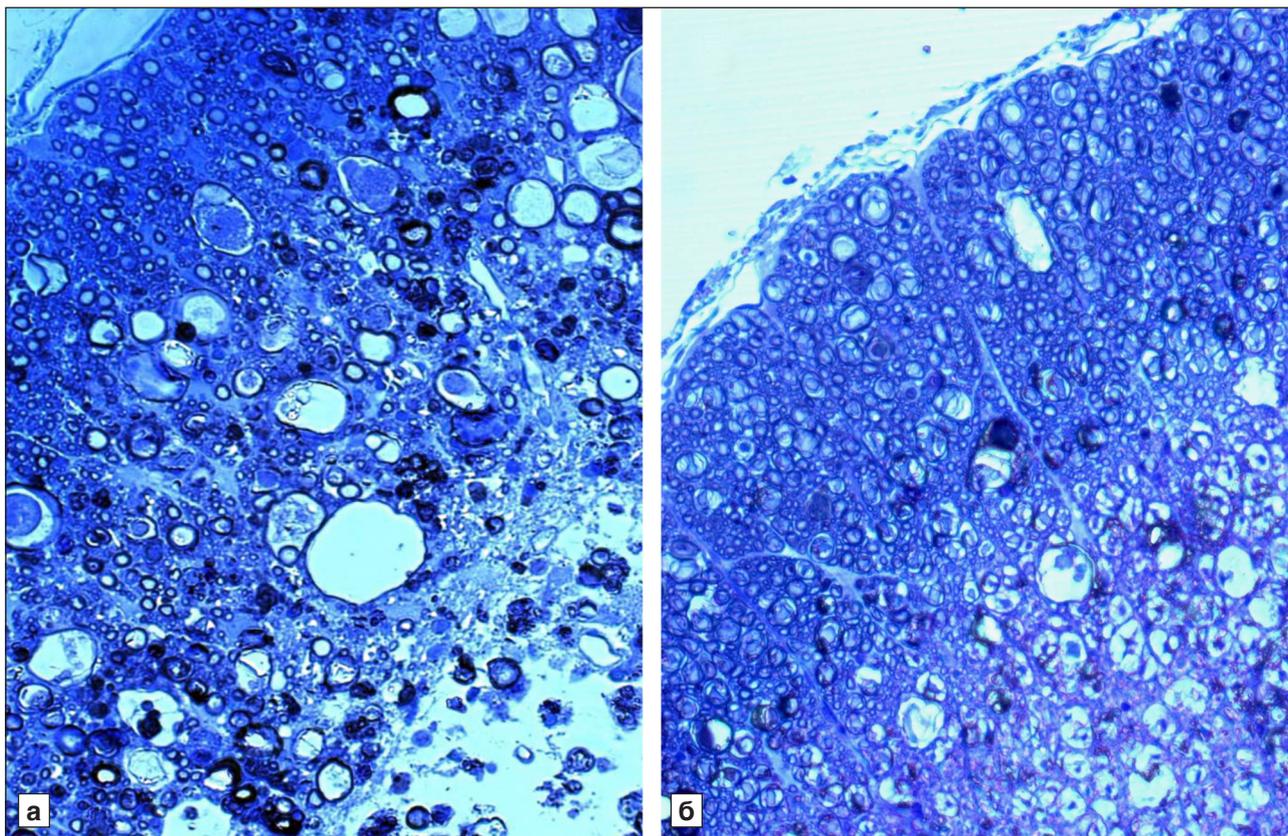


Рис. 1. Многочисленные патологические полости небольших размеров в белом веществе спинного мозга крысы на 30-е сутки после нанесения дозированной контузионной травмы на уровне  $T_{VIII}$  и введения мононуклеарных клеток крови пуповины человека, трансфицированных плазмидой pEGFP-N2 (а) и плазмидой pBud-VEGF-FGF2 (б).

а — справа внизу видна часть крупной сливной полости. Полутонкие срезы, окраска метиленовым синим. Ув. 400.

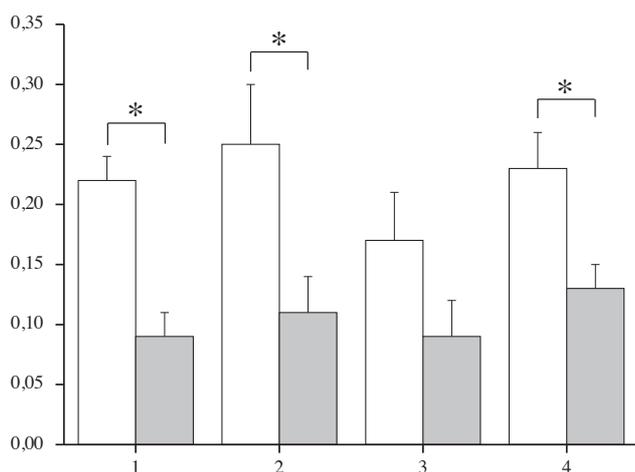


Рис. 2. Суммарная площадь патологических полостей на поперечном срезе спинного мозга крысы на расстоянии 3 мм в каудальном направлении от эпицентра травмы на 30-е сутки после введения клеток.

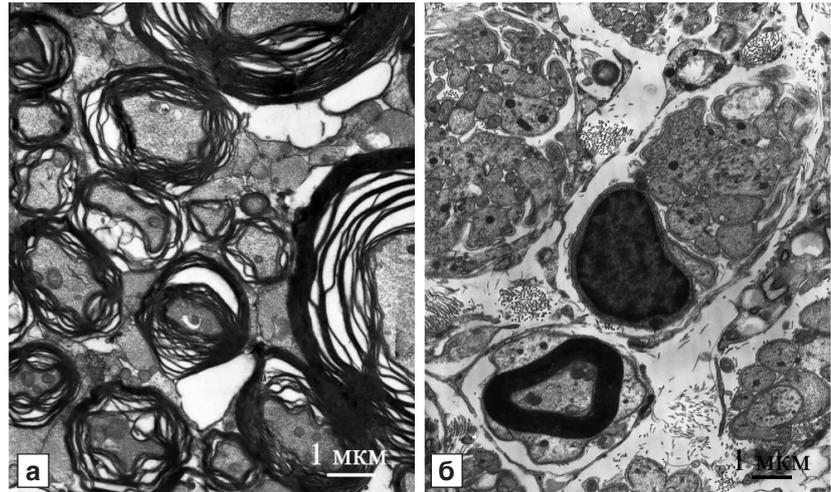
Белые столбики — контроль (pEGFP-N2), серые столбики — опыт (pBud-VEGF-FGF2). По оси абсцисс — зоны морфометрии; по оси ординат — исследуемый параметр (мм<sup>2</sup>). Звездочки — различия значимы при  $P < 0,05$ ; вертикальные отрезки — квадратические отклонения.

справа и слева (зоны 3 и 4) — в 1,8 раза ( $P < 0,05$ ). В тех же зонах и на том же удалении от эпицентра, но в ростральном направлении, суммарная площадь патологических полостей у животных подопытной группы в 2,5 раза ( $P < 0,05$ ) меньше соответствующего показателя в контроле с введением клеток, трансфицированных плазмидой pEGFP-N2.

В спинном мозгу животных как контрольной, так и подопытной группы на расстоянии 3 и 5 мм от эпицентра травмы, помимо мелких полостей, формируется единая патологическая полость, которая затрагивает белое и большую часть серого вещества (см. рис. 1, а). В полости присутствуют отдельные дегенерирующие клетки и их скопления. Стенка полости выстлана глиоцитами, снаружи от которых, не образуя сплошного слоя, присутствуют фибробластоподобные клетки.

У животных подопытной группы размеры этой полости меньше — на поперечных срезах спинного мозга площадь полости на расстоянии 3 мм от эпицентра травмы в ростральном направлении на 27% ( $P < 0,05$ ), а на том же удалении от эпицентра в каудальном направлении — на 10% ( $P < 0,05$ ) по сравнению с контролем, т.е. при введении клеток, трансфицированных плазмидой

Рис. 3. Миелиновые волокна в белом веществе спинного мозга крысы на расстоянии 5 мм в ростральном направлении от эпицентра травмы на 30-е сутки после введения клеток крови пуповины человека, трансфицированных плазмидой pEGFP-N2 (а) и плазмидой pBud-VEGF-FGF2 (б).



pEGFP-N2. При удалении плоскости среза от эпицентра на расстояние 5 мм в ростральном направлении площадь полости уменьшается на 58% ( $P < 0,05$ ), а в каудальном — на 49% ( $P < 0,05$ ).

У крыс контрольной группы в белом веществе в участках, расположенных на расстоянии 3 и 5 мм от эпицентра травмы, как в ростральном, так и в каудальном направлении, отмечена деструкция миелиновых волокон. Она характеризуется глубокими изменениями миелиновой оболочки, расслоением и дезинтеграцией миелина и образованием крупных вакуолей по периферии волокон большого диаметра. При развитии деструктивного процесса эти вакуоли вызывают значительную деформацию аксонов (рис. 3, а), вплоть до полного их исчезновения. Такие дегенерирующие волокна могут полностью замещаться мелкими полостями, которые при слиянии образуют обширные области деструкции в белом веществе.

У животных подопытной группы в стандартных зонах наружной части белого вещества на расстоянии 5 мм от эпицентра в ростральном

направлении выявлено значительное увеличение количества миелиновых волокон с сохранной структурой. При этом в латеральной части бокового канатика справа (зона 3) количество миелиновых волокон превышало соответствующий показатель в контроле на 67% ( $P < 0,05$ ), а слева (зона 4) — на 60% ( $P < 0,05$ ). В вентромедиальной части переднего канатика это превышение в подопытной группе составило 50% ( $P < 0,05$ ) на правой стороне (зона 1) и 47% ( $P < 0,05$ ) — на левой (зона 2).

По сравнению с контролем у животных подопытной группы количество миелиновых волокон в плоскости поперечного среза, удаленной от эпицентра травмы на расстояние 5 мм в каудальном направлении, увеличивается в латеральной части бокового канатика справа (зона 3) на 57% ( $P < 0,05$ ) (рис. 4, а), а слева (зона 4) — на 65% ( $P < 0,05$ ) (см. рис. 4, б); в вентромедиальной

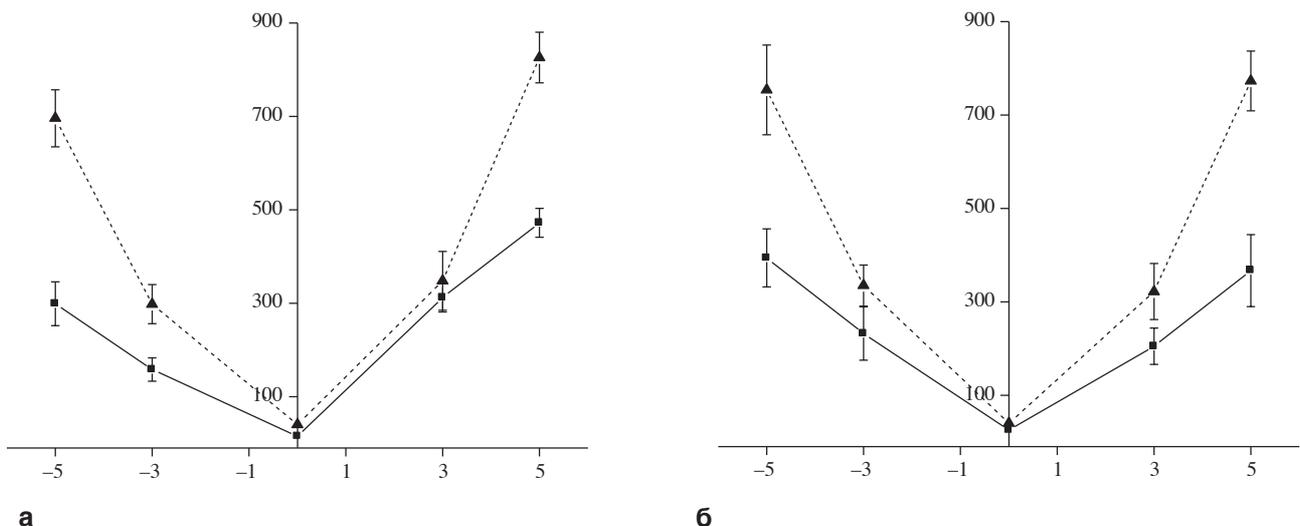


Рис. 4. Количество миелиновых волокон в зонах 3 (а) и 4 (б) к 30-м суткам после нанесения травмы и введения трансфицированных мононуклеарных клеток крови пуповины.

Сплошная линия — контроль (pEGFP-N2); пунктирная линия — опыт (pBud-VEGF-FGF2); по оси абсцисс — расстояние от эпицентра травмы до плоскости среза (мм); слева от оси ординат — в ростральном, справа — в каудальном направлении; по оси ординат — количество волокон на  $0,0962 \text{ мм}^2$  площади среза при ув. 25; вертикальные отрезки — квадратические отклонения.

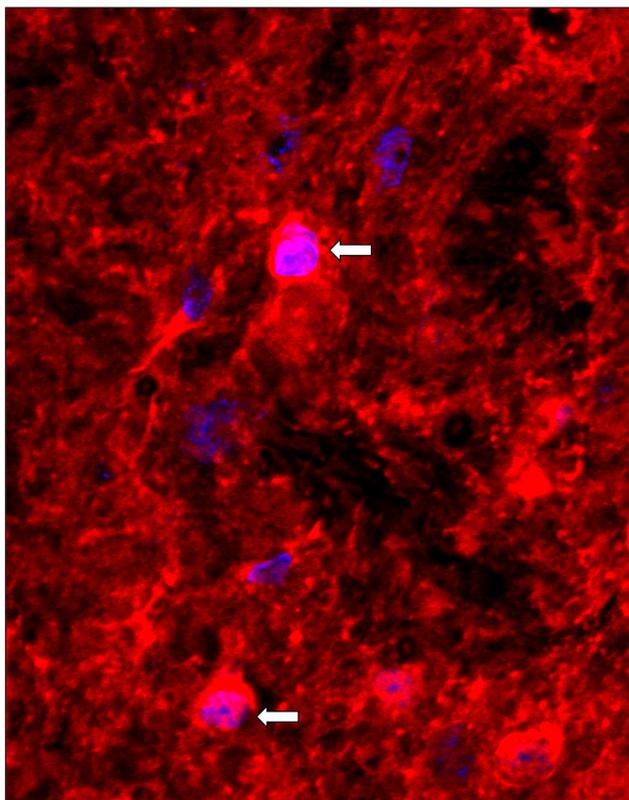


Рис. 5. Экспрессия белка периферического миелина P0 в редких клетках в пределах наружной части левого бокового канатика (зона 3) на поперечном срезе спинного мозга крысы на расстоянии 1,5 см в каудальном направлении от эпицентра на 30-е сутки после нанесения контузионной травмы.

Стрелки — иммунопозитивные клетки. Флюоресцентный краситель Atto 647, ядра окрашены DAPI. Конфокальная микроскопия. Ув. 400.

части переднего канатика этот прирост составляет соответственно 57% ( $P < 0,05$ ) (зона 1) и 52% ( $P < 0,05$ ) (зона 2).

У животных подопытной группы в белом веществе на расстоянии 3 мм от эпицентра травмы в каудальном и ростральном направлении во всех зонах морфометрии количество миелиновых волокон увеличивается незначительно, в среднем на 20% ( $P < 0,05$ ) (см. рис. 4, а, б).

Признаки деструкции большинства миелиновых волокон в белом веществе у животных подопытной группы менее выражены: миелиновые оболочки имеют незначительные локальные расслоения, характеризуются отсутствием вакуолей, аксоны менее деформированы (см. рис. 3, б). Они содержат митохондрии, микротрубочки и нейрофиламенты. В отличие от контрольной группы в наружной части белого вещества у животных подопытной группы присутствуют волокна с компактной миелиновой оболочкой. Некоторые из них имеют хорошо выраженную базальную мембрану и окружены пучками коллагеновых воло-

кон (см. рис. 3, б). В непосредственной близости от миелиновых волокон прослежено большое количество безмиелиновых волокон (см. рис. 3, б), что не характерно для соответствующего по локализации материала, полученного от животных контрольной группы.

В выбранный нами срок наблюдения выраженность дегенерации и морфологическая характеристика миелиновых волокон в ростральном и каудальном по отношению к эпицентру травмы отделах спинного мозга у животных контрольной и подопытной группы практически не различаются.

В белом веществе в области повреждения спинного мозга у животных подопытной и контрольной групп выявлены редкие  $PO^+$ -клетки (рис. 5), которые по данному фенотипическому признаку могут быть идентифицированы как шванновские. Их количество постепенно уменьшается по мере удаления от эпицентра травмы. На поперечном срезе спинного мозга на расстоянии 15 мм от эпицентра в каудальном направлении на  $1 \text{ мм}^2$  белого вещества в среднем содержится до 200  $PO^+$ -клеток.

**Обсуждение полученных данных.** При экспериментальной травме спинного мозга введение фракции клеток из крови пуповины, обогащенной  $CD34^+$ -клетками, существенно уменьшает площадь области повреждения, увеличивает область сохраненной ткани в белом веществе и поддерживает регенерацию аксонов [14]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что применение мононуклеарных клеток крови пуповины для доставки терапевтических генов *vegf* и *fgf2* в область контузионной травмы спинного мозга крысы по критериям величины патологических полостей и количеству миелиновых волокон в белом веществе превышает эффективность введения в эту же область нативных мононуклеарных клеток крови пуповины человека. Этот эффект может быть результатом гиперэкспрессии терапевтических трансгенов и прямого влияния кодируемых ими нейротрофических и одновременно ангиогенных факторов на клетки-мишени в поврежденной ткани реципиента. С другой стороны — эти же факторы могут поддерживать выживание и миграционный потенциал вводимых клеток, используемых в качестве носителей терапевтических генов и способствовать процессу нейрорегенерации.

Выявленное нами уменьшение патологической кавитации при введении мононуклеарных клеток крови пуповины человека, трансфицированных конструкцией pBud-VEGF-FGF2, в спинной мозг крысы согласуется с результатами введения кле-

ток других типов. По показателю величины патологических полостей наши данные с доставкой в область повреждения терапевтических генов *vegf* и *fgf2* при помощи моноклеарных клеток крови пуповины соответствуют результатам введения нейральных стволовых клеток, трансфицированных геном *vegf* при помощи ретровирусного вектора [10]. При этом в качестве благоприятного для поддержания регенерации фактора авторы отмечают возрастание количества пролиферирующих *NG2*<sup>+</sup>-клеток, которые рассматриваются как предшественники олигодендроцитов и протоплазматических астроцитов [4].

В условиях генно-клеточной терапии увеличение количества миелиновых волокон может быть результатом прямого поддерживающего влияния нейротрофических факторов на выживание и дифференцировку олигодендроцитов и на процесс ремиелинизации [3]. Появление безмиелиновых волокон в белом веществе в области повреждения у животных с доставкой генов *vegf* и *fgf2* при помощи моноклеарных клеток крови пуповины в качестве носителей трансгенов однозначно свидетельствует в пользу позитивного влияния данной комбинации генов на процесс нейрорегенерации.

Присутствие, наряду с характерной структурой периферического миелина нервных волокон, окруженных межклеточным веществом с отчетливо выраженной базальной мембраной и пучками коллагеновых волокон, рассматривается как признак миграции в область повреждения шванновских клеток, способных участвовать в ремиелинизации в ЦНС [6, 15]. Редкие шванновские клетки, экспрессирующие белок периферического миелина, обнаружены нами в белом веществе на расстоянии 15 мм в ростральном и каудальном направлении от эпицентра контузионной травмы. Пока остается неясным, как влияет локальная гиперэкспрессия генов *vegf* и *fgf2* на миграцию в мозг шванновских клеток, их выживание и дифференцировку.

*Работа частично финансирована государственным контрактом ФЦП 16.512.11.2101 Федерального агентства по науке и инновациям и грантом РФФИ 11-04-00902-а. Работа частично выполнена на оборудовании Регионального центра коллективного пользования физико-химических исследований веществ и материалов (РЦКП ФХИ) ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет». Исследование поддержано также грантом ФЦП Федерального агентства по науке и инновациям 16.512.11.2101.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Лебедев С.В., Тимофеев С.В., Жарков А.В. и др. Нагрузочные тесты и метод ВВВ при оценке двигательных нарушений после контузионной травмы спинного мозга. Бюл. экспер. биол., 2008, т. 145, № 10, с. 471–476.
2. Салафутдинов И.И., Шафигуллина А.К., Ялвач М.Э. и др. Эффект одновременной экспрессии различных изоформ фактора роста эндотелия сосудов VEGF и основного фактора роста фибробластов FGF2 на пролиферацию эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVEC. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2010, т. 5, № 2, с. 62–57.
3. Чельшев Ю.А. и Викторов И.В. Клеточные технологии ремиелинизации при травме спинного мозга. Неврол. вестн. им. В.М. Бехтерева, 2009, № 1, с. 49–55.
4. Чельшев Ю.А. и Шаймарданова Г.Ф. Глиальные NG2-клетки в нейроонтогенезе и регенерации. Неврол. вестн. им. В.М. Бехтерева, 2010, т. 42, № 4, с. 84–90.
5. Benton R.L. and Whitemore S.R. VEGF165 therapy exacerbates secondary damage following spinal cord injury. Neurochem. Res., 2003, v. 28, № 11, p. 1693–1703.
6. Bunge R.P. The role of the Schwann cell in trophic support and regeneration. J Neurol., 1994, v. 242, p. 19–21.
7. Chen C.T., Foo N.H., Liu W.S. and Chen S.H. Infusion of human umbilical cord blood cells ameliorates hind limb dysfunction in experimental spinal cord injury through anti-inflammatory, vasculogenic and neurotrophic mechanisms. Pediatr. neonatol., 2008, v. 49, № 3, p. 77–83.
8. Dasari V.R., Veeravalli K.K., Tsung A.J. et al. Neuronal apoptosis is inhibited by cord blood stem cells after spinal cord injury. J. Neurotrauma, 2009, v. 26, № 11, p. 2057–2069.
9. Facchiano F., Fernandez E., Mancarella S. et al. Promotion of regeneration of corticospinal tract axons in rats with recombinant vascular endothelial growth factor alone and combined with adenovirus coding for this factor. J. Neurosurg., 2002, v. 97, № 1, p. 161–168.
10. Howang D.H., Kim B.G., Kim E.J. et al. Transplantation of human neural stem cells transduced with Olig 2 transcription factor improves locomotor recovery and enhances myelination in the white matter of rat spinal cord following contusive injury. BMC Neurosci., 2009, v. 10, № 1, p. 117–133.
11. Islamov R.R., Chintalgattu V., Pak E.S. et al. Induction of VEGF and its Flt-1 receptor after sciatic nerve crush injury. Neuroreport, 2004, v. 15, № 13, p. 2117–2121.
12. Jimenez Hamann M.C., Tator C.H. and Shoichet M.S. Injectable intrathecal delivery system for localized administration of EGF and FGF-2 to the injured rat spinal cord. Exp. Neurol., 2005, v. 194, № 1, p. 106–119.
13. Kim K. N., Oh S. H., Lee K.H. and Yoon D.H. Effect of human mesenchymal stem cell transplantation combined with growth factor infusion in the repair of injured spinal cord. Acta Neurochir. Suppl, 2006, v. 99, p. 133–136.
14. Nishio Y., Koda M., Kamada T. et al. The use of hemopoietic stem cells derived from human umbilical cord blood to promote restoration of spinal cord tissue and recovery of hindlimb function in adult rats. J. Neurosurg Spine, 2006, v. 5, № 5, p. 424–433.
15. Radtke C., Akiyama Y., Brokaw J. et al. Remyelination of the non-human primate spinal cord by transplantation of H-transferase transgenic adult pig olfactory ensheathing cells. FASEB J., 2004, v. 18, № 2, p. 335–337.
16. Rizvanov A.A., Kiyasov A.P., Gazizov L.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 neuron-trophic factors to support neuron-gene-

- sis-a novel approach in stem cell therapy. *Neurochem. Int.*, 2008, v. 53, № 6–8, p. 389–394.
17. Sondell M., Lundborg G. and Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J. Neurosci.*, 1999, v. 19, № 14, p. 5731–5740.
18. Vendrame M., Cassady J., Newcomb J. et al. Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume. *Stroke*, 2004, v. 35, № 10, p. 2390–2395.

Поступила в редакцию 19.05.2011

#### **POSTTRAUMATIC CHANGES OF RAT SPINAL CORD AFTER TRANSPLANTATION OF HUMAN UMBILICAL CORD BLOOD MONONUCLEAR CELLS TRANSFECTED WITH *vegf* AND *fgf2* GENES**

*G.F. Shaymardanova, Ya.O. Mukhamedshina, S.S. Arkhipova, A.A. Rizvanov, I.I. Salafutdinov and Yu.A. Chelyshev*

Using the model of the rat spinal cord dosed contusion injury at T8 level, cross sectional area of the pathological cavities was measured and the number of myelinated nerve fibers was

calculated in the outer zones of white matter after immediate single injection in the damaged area of human umbilical cord blood mononuclear cells (UCB-MC) transfected with plasmid with *vegf* and *fgf2* genes. UCB-MC transfected with pEGFP-N2 plasmid with *egfp* gene of enhanced green fluorescent protein were injected into the rats of control group under similar conditions. By Day 30 after the injection of UCB-MC transfected with *vegf* and *fgf2* genes, total cross-sectional area of the cavities in outer zones of white matter at a distance of 3 mm caudally from the epicenter of the injury was reduced more than twice as compared with that found in control group. Number of myelinated nerve fibers in the same zones of white matter at the same distance from the epicentre in rostral and caudal directions, was increased by 20% on the average as compared with control, and at a distance of 5 mm in rostral direction — by 40 to 70%. Thus, the delivery to the injury region of the therapeutic genes *vegf* and *fgf2* reduced cavitation, restrained the processes of secondary degeneration and supported the number of myelinated fibers in the injured spinal cord.

**Key words:** *spinal cord, umbilical cord blood cells, VEGF, FGF2*

Laboratory of Molecular Basis of Pathogenesis, RAS Kazan' Institute of Biochemistry and Biophysics, RAS Kazan' Scientific Center; Department of Histology, Cytology and Embryology, Central Research Laboratory, Kazan' State Medical University; Department of Genetics, Kazan' (Volga Region) Federal University