



## ОБЗОРЫ

# Генная и клеточная терапия нейродегенеративных заболеваний

Р.Р. Исламов<sup>1</sup>, А.А. Ризванов<sup>1,2</sup>, Д.С. Гусева<sup>1</sup>, А.П. Киясов<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Казанский государственный медицинский университет

<sup>2</sup> Казанский государственный университет

<sup>3</sup> Банк стволовых клеток Казанского государственного медицинского университета

### Gene and stem-cell therapy for neurodegenerative diseases

R.R. Islamov<sup>1</sup>, A.A. Rizvanov<sup>1,2</sup>, D.S. Guseva<sup>1</sup>, A.P. Kiasov<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Kazan State Medical University

<sup>2</sup> Kazan State University

<sup>3</sup> Stem-cell bank of Kazan State Medical University

Эффективных методов лечения нейродегенеративных заболеваний на сегодняшний день не существует. В эксперименте потеря нейронов, вызванная мутациями известных генов, может быть остановлена путём введения в геном клетки-мишени терапевтического гена с целью повышения жизненной стойкости нейрона, или путём замены погибших нейронов на молодые здоровые нервные клетки путём нейротрансплантации стволовых клеток или их потомков, пре-дифференцированных в нейрональном направлении. В настоящем обзоре представлены модели нейродегенеративных заболеваний на животных и новые направления в терапии нейродегенерации разной этиологии, основанные на генетической модификации нейронов в очаге дегенерации, а также стволовых клеток перед нейротрансплантацией. Нами обобщены результаты по генной терапии с помощью антисмысловых олигонуклеотидов, РНК-интерференции и вирусных систем. Рассмотрены преимущества и недостатки нейротрансплантации эмбриональных и разных стволовых клеток взрослого организма. До настоящего времени в мировой научной литературе отсутствовали прямые указания на возможность применения генетически модифицированных клеток пуповинной крови для клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний. На основании чего представлена гипотеза о том, что генетически модифицированные стволовые клетки пуповинной крови, трансфицированные плазмидным вектором, одновременно экспрессирующими клонированные нейрональную молекулу адгезии L1 и сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), значительно усилият терапевтический эффект стволовых клеток пуповинной крови у трансгенных G93A мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза.

**Ключевые слова:** нейродегенеративные заболевания, стволовые клетки, клеточная терапия, генная терапия.

### Введение

Нейродегенеративные заболевания характеризуются прогрессирующей гибелю нервных клеток головного и спинного мозга. Начиная с работ Сантьяго Рамон-и-Кахаля [1], проблема регенерации нейронов остаётся одной из важнейших в нейробиологии. До сих пор в научной литературе резонирует пророческое высказывание С. Рамон-и-Кахаля: «...в конце развития родники роста и регенерации

Currently there are no available effective therapies for treating neurodegenerative diseases. In animal models, the loss of neurons, caused by mutations in known genes, can be alleviated by genetically modifying target cells to increase their regeneration and viability, or by replacing dead neurons with new healthy neural cells by neurotransplantation of stem or progenitor cells, differentiated in neural pathway. Here we summarized results for gene therapy using antisense oligonucleotides, siRNA, and viral vectors. Critically reviewed advantages and disadvantages of neurotransplantation of embryonic and different adult stem cells. To date we found no reports of using genetically modified stem cells from umbilical cord blood for cell therapy of neurodegenerative diseases. We state a hypothesis, that stem cells from umbilical cord blood, genetically modified by transfection with plasmid vector, simultaneously expressing neural cell adhesion molecule L1 and vascular endothelial growth factor (VEGF), could have a significantly enhanced therapeutic effect in transgenic mice G93A, which serve as animal model for amyotrophic lateral sclerosis (ALS).

**Key words:** neurodegenerative diseases, stem cells, cell therapy, gene therapy.

аксонов и дендритов высыхают безвозвратно. Посередине взрослоти нервные пути — нечто фиксированное, законченное и неизменное. Всё может погибнуть, ничто не может регенерировать. Науке будущего предписано изменить, если возможно, это суровое правило» [2]. Сегодня процесс клеточной регенерации в центральной нервной системе (ЦНС) не считается нереализованным. Вместе с открытием нейрональной стволовой клетки, опровергнувшим догму о нереальности

### Адрес для корреспонденции:

Исламов Рустем Робертович. Казанский ГМУ, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии  
420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49. E-mail: islamru@yahoo.com, телефон: (843) 292-76-54, (843) 292-76-19



клеточного механизма регенерации нейронов в ЦНС, в настоящее время рушится и представление о невозможности синтеза белка в аксоне. Функциональная значимость нервных клеток для организма предусматривает их потенциальную возможность к регенерации за счёт стволовых клеток, а значительная протяжённость аксонов в составе периферических нервов предполагает существование в аксоплазме локальных биохимических процессов жизнеобеспечения. Очевидно, что подобные открытия в нейробиологии вместе с прогрессом молекулярных и клеточных технологий открывают широкие перспективы разработки новых способов лечения неврологических болезней.

Нейродегенеративные заболевания затрагивают разные структуры ЦНС и разные типы нервных клеток. Необходимой дегенерации подвергаются холинергические нейроны спинного мозга и ствола головного мозга при боковом амиотрофическом склерозе и спинальной мышечной атрофии, дофаминергические нейроны чёрного вещества (*substantia nigra*) при болезни Паркинсона, GABA-ergicеские нейроны базальных ганглиев при хорее Хантингтона, нейроны головного мозга при болезни Альцгеймера. Поддержание жизни нейронов, вступивших в патологический процесс, и восстановление утраченных межклеточных связей в нервной ткани могут существенно повысить качество и продолжительность жизни больных. Перспективными методами лечения больных, страдающих нейродегенеративными заболеваниями, считаются коррекция экспрессии гена, ответственного за развитие заболевания, трансплантация стволовых клеток, а также сочетание генной инженерии с клеточной терапией — трансплантация генетически модифицированных стволовых клеток.

### Моделирование нейродегенеративных заболеваний

Для изучения влияния конкретных генов на развитие заболевания широко применяют мутантные линии животных, в первую очередь — генетически модифицированных мышей. Мыши относятся к наиболее изученной разновидностью млекопитающих. На сегодняшний день имеется полная расшифровка генома мыши (30 тыс. генов), который на 80% гомологичен геному человека (35–40 тыс. генов). Поэтому мыши, полученные с помощью генной инженерии, являются удобной биологической моделью для изучения механизмов патогенеза заболеваний, связанных с мутацией известного гена, а также разработки методов лечения заболевания, вызванного мутацией данного гена.

**Болезнь Альцгеймера** — первичное дегенеративное заболевание головного мозга, характеризующееся прогрессирующей гибелью нервных клеток гиппокампа и коры больших полушарий. Гистологическое исследование нервной ткани выявляет отложения  $\beta$ -амилоидного белка в виде сенильных бляшек и агрегаты фосфорилированной формы tau-белка в составе нейрофибрillaryных клубков. В патогенезе заболевания основное значение имеет генетическая предрасположенность. При болезни Альцгеймера найдены дефекты генов APP (21q21.3–q22.05), APOE (19q13.2), AD2 (19cen–q13.2), PSEN1 (14q24.3) и PSEN2 (1q31–q42). Модели болезни Альцгеймера на мышах основаны на экспрессии одного из дефектных генов человека. У трансгенных мышей отложение аберрантного белка сопровождается дегенерацией нервных клеток головного мозга и нарушениями памяти, как у человека. Например, мыши APPswe экспрессируют ген, кодирующий предшественник  $\beta$ -амилоидного белка [3], а трансгенные мыши APPswe, PSEN1dE9 экспрессируют дефектные гены предшественника  $\beta$ -амилоидного белка и пресенилина 1 [4].

**Болезнь Паркинсона** — идиопатическое и медленно прогрессирующее дегенеративное заболевание ЦНС, занимающее второе место по частоте встречаемости среди нейродегенеративных заболеваний. Характеризуется замедленностью движений, ригидностью мышц, tremором в покое и нарушением позных рефлексов. В основе заболевания — поражение дофаминергических нейронов чёрного вещества и других содержащих дофамин нейронов ствола головного мозга. Причины гибели нейронов при спорадической форме неизвестны. Мендельевское наследование встречается в 5% случаев этого заболевания. Семейная болезнь Паркинсона 1 типа возникает вследствие мутаций гена  $\alpha$ -синуклеина (*SNCA* 4q21–q23), кодирующего пресинаптический белок. Выявлены также мутации генов *parkin*, *DJ-1*, *NR4A2*. У гомозиготных мышей, экспрессирующих дефектный  $\alpha$ -синуклеин человека (A53T; аланин замещён на треонин в позиции 53), развиваются двигательные расстройства, приводящие к параличу скелетных мышц и, как следствие, к смертельному исходу [5].

**Боковой амиотрофический склероз** принадлежит к группе нейродегенеративных заболеваний с прогрессирующей гибелью двигательных нейронов головного и спинного мозга. Наиболее выраженные изменения происходят в передних рогах спинного мозга в шейных и поясничных сегментах, в двигательных ядрах ствола мозга, в двигательной зоне коры головного мозга. Причины гибели нейронов при наиболее частой (спорадической) форме заболевания неизвестны, но часть случаев семейной формы заболевания обусловлена доминантными мутациями гена *SOD1* (21q22.1–q22.2), кодирующего Cu/Zn-супероксиддисмутазу. *SOD1* — главный фермент антиоксидантной защиты клетки. Локализуется в ядре, цитозоле и митохондриях. Гомодимер состоит из двух субъединиц, каждая из которых содержит один Си-связывающий домен, один Zn-связывающий домен и дисульфидный мостик. Известно более 100 мутаций гена *SOD1*. Преимущественно это точечные мутации, характеризующиеся заменой одной аминокислоты из 153 аминокислотных остатков белка. Трансгенные мыши G93A, экспрессирующие мутантный *SOD1* (Gly93 $\ominus$ Ala; глицин замещён на аланин в позиции 93), характеризуются прогрессирующей дегенерацией мотонейронов, как при боковом амиотрофическом склерозе человека. Гомозиготные G93A мыши на фоне прогрессирования паралича скелетных мышц умирают в возрасте 4–5 месяцев [6].

**Хорея Хантингтона** — наследственное (аутосомно-доминантное) нейродегенеративное заболевание, характеризующееся прогрессирующей гибелью GABA-ergicеских нервных клеток в базальных ганглиях, особенно в хвостатом ядре и скорлупе. Патогенез заболевания связан с мутацией гена хантингтина *HD* (4p16–3). Мутантный ген содержит увеличенное число повторов CAG-кодонов и экспрессирует белок, полиглутаминовый трек которого содержит более 40 остатков глутамина при нормальной длине 20–25 остатков. Модель заболевания — трансгенные мыши R6/2; мутированный *HD* содержит более 150 повторов CAG кодонов и кодирует аберрантный белок с увеличенным полиглутаминовым треком [7].

**Спинальная мышечная атрофия** — аутосомное рецессивное заболевание, характеризующееся дегенерацией двигательных нейронов передних рогов спинного мозга и ствола мозга. Спинальная мышечная атрофия — самая частая причина смертности в раннем детском возрасте в результате мутации гена выживания мотонейронов *Smtl* (5q13). Трансгенные мыши, экспрессирующие дефектный ген *Smtl* и дикий тип гена *Smtl2*, после рождения выживают в течение 4–6 суток. Дрожащие мыши не способны передвигаться, у них нарушен сосательный рефлекс, затруднено



дыхание. Клинические и гистологические характеристики заболевания соответствуют типу III спинальной мышечной атрофии человека. У мышей, экспрессирующих только дефектный ген *Smn1* [без трансгена *Smn2*], смерть наступает во внутриутробном периоде [8].

### Генная инженерия в лечении нейродегенеративных заболеваний

Лечение нейродегенеративных заболеваний, патогенез которых обусловлен мутациями конкретных генов, безусловно, требует вмешательства в организм больного на генном уровне. Генная терапия позволяет как подавить, так и усилить экспрессию гена-мишени. В настоящее время для коррекции экспрессии гена-мишени существует ряд подходов, некоторые из которых находятся в экспериментальном стадии, тогда как другие уже проходят клинические испытания.

**Антисмыловые олигонуклеотиды.** Одним из первых методов вмешательства в экспрессию гена является применение антисмыловых олигонуклеотидов — одноцепочечных ДНК или РНК, комплементарно взаимодействующих с мРНК-мишенью. Антисмыловая РНК при связывании с комплементарной последовательностью мРНК препятствует трансляции белка, тогда как антисмыловая ДНК образует гибрид ДНК/РНК, который разрушается РНКазой Н. Создание антисмыловых олигонуклеотидов первоначально было направлено на блокирование мРНК-теломеразы, имеющей высокую активность в трансформированных опухолевых клетках. Применительно к нейродегенеративным заболеваниям, технология антисмыловых олигонуклеотидов имеет практическое значение при заболеваниях, вызванных мутациями конкретных генов. Так, при введении антисмыловых олигонуклеотидов, комплементарных мРНК супероксиддисмутазы *SOD1*, трансгенным мышам G93A, экспрессирующими фенотип бокового амиотрофического склероза, было установлено значительное снижение содержания мРНК *SOD1* и белка *SOD1* в тканях головного и спинного мозга. Кроме того, у таких мышей наблюдалось замедленное развитие симптомов заболевания [9].

**РНК-интерференция.** В 2006 году за открытие РНК-интерференции Andrew Z. Fire из Станфордского университета и Craig C. Mello из Массачусетского университета были удостоены Нобелевской премии в номинации «Физиология и медицина». РНК-интерференция — эволюционно консервативный механизм посттранскрипционной блокады синтеза белка. Комплементарное взаимодействие короткой интерферирующей РНК (siRNA) с мРНК-мишенью заканчивается деградацией мРНК, и — как следствие — прекращением синтеза белка. Способность siRNA инициировать посттранскрипционное «молчание» генов, ассоциированных с конкретными заболеваниями, в культуре клеток и на моделях болезней человека у животных определила новое направление в генной терапии. Совершенствование способов доставки молекулы siRNA в клетку и потенциальная возможность лабораторного синтеза siRNA, комплементарной любой известной мРНК, открывает широкие перспективы применения РНК-интерференции в лечении инфекционных, онкологических и нейродегенеративных заболеваний (боковой амиотрофический склероз, хорея Хантингтона, болезнь Альцгеймера). У трансгенных мышей SCA1 со спиномозжечковой атаксией после внутримозжечковой инъекции вирусного вектора, экспрессирующего siRNA, комплементарной мутантному гену *ATX1* (атаксин 1), значительно улучшалась координация движений и восстановливалась цитоархитектоника мозжечка [10]. В другом случае при скрещивании трансгенных *SOD1*-мышей с мышами, экспрессирующими анти-*SOD1* siRNA, у полученного потомства транскрипция siRNA, комплементарной мРНК мутированного гена,

предотвращала дегенерацию мотонейронов [11]. Внутримышечная [12] или интраспинальная [13] инъекция вирусного вектора, экспрессирующего siRNA (комплементарной мРНК мутированного *SOD1*) трансгенным G93A-мышам отодвигала начало заболевания и значительно увеличивала время жизни G93A-мышей. В настоящее время ведётся интенсивная подготовка к клиническим испытаниям модифицированной молекулы siRNA у пожилых больных, страдающих дегенерацией ёлочного пятна сетчатки [14]. Введение в стекловидное тело глаза siRNA (комплементарной мРНК сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF) прекращает рост сосудов из хориокапиллярной пластины в сетчатку через разрушенную лазером мембрану Бруха у приматов [15]. Полученные нами результаты свидетельствуют, что siRNA путём интернализации попадает в аксоны мотонейронов и может селективно заблокировать экспрессию белка-мишени [16]. Для большей эффективности захвата и ретроградного транспорта siRNA может быть коньюгирана, например, с нейротрофином-3 или С-фрагментом столбнячного токсина. Далее путём инъекции в органы коньюгиранная siRNA может быть целенаправленно доставлена в перикарионы нейронов, иннервирующих эти органы, что является альтернативой векторной трансфекции нервных клеток [17].

**Вирусная трансфекция.** Одним из перспективных методов доставки генетического материала в органы и клетки-мишени являются вирусные векторы. С помощью методов генной инженерии в геном вирусов встраивают экспрессионные конструкции, несущие один или более рекомбинантных генов. Подобные конструкции состоят из промотора, рекомбинантного гена и сигнала для полиаденилирования мРНК. В настоящее время используются экспрессионные векторы, основанные на различных вирусах.

**Аденовирусные векторы** — безоболочечные вирионы, несущие двухцепочечный вирусный геном [18]. Аденовирусные векторы способны инфицировать широкий спектр как делящихся, так и неделящихся клеток. Вирусный геном может принять трансгенные вставки до 8 тыс. пар нуклеотидов (т.п.н.). Существенным недостатком данной системы является нежелательное взаимодействие с иммунной и гуморальной системами организма и, как следствие, осложнения при первоначальном инфицировании и невозможность (при необходимости) повторного использования данной вирусной системы [19]. Из-за отсутствия способности к интеграции в геном хозяина адено-вирусная система позволяет добиться лишь временной экспрессии трансгенов. Несмотря на то, что адено-вирусы не инфицируют ЦНС, показано, что адено-вирусные векторы способны к ретроградному аксонному транспорту [20, 21]. Эти векторы, экспрессирующие различные терапевтические нейротрофические факторы, успешно применяли на различных моделях животных [22–24]. Проблемы иммунологической памяти и использования адено-вирусных векторов в клинической генной терапии также рассмотрены [25].

**Адено-ассоциированный вирус.** Ещё одним перспективным вирусным вектором для генной терапии нейродегенеративных заболеваний является рекомбинантный адено-ассоциированный вирус (recombinant adeno-associated virus, rAAV) [26]. Это непатогенный парвовирус человека нуждается в коинфекции хелперным вирусом для репликации [27]. Было показано, что rAAV эффективен в нервной системе и инфицирует преимущественно нейроны [28, 29]. Несмотря на то, что AAV дикого типа интегрируется в хромосому хозяина, рекомбинантный rAAV потерял данную способность и присутствует в клетке хозяина в виде эпизомы. Одним из недостатков rAAV является ограничение на размер вставки трансгенной конструкции (менее 5 т.п.н.). Использование rAAV позволяет достичь долговременной экспрессии



трансгенов. гAAV поддерживали экспрессию трансгенов в мозге крыс до 19 месяцев.

*Вирусные векторы на основе герпесвирусов (herpes simplex viruses, HSV)* обладают высокой инфекционностью по отношению к нервным клеткам в связи с природным тропизмом данных вирусов. Эти вирусы также участвуют в эффективном анtero- и ретроградном транспорте в нервной системе. Модифицированные герпесвирусные векторы устанавливают эпизомную репликацию в клетке хозяина и способны нести значительные трансгенные вставки (менее 50 т.п.н.) [30]. Основными недостатками данной вирусной системы являются иммунный ответ организма на вирусные белки и кратковременная экспрессия трансгенов. Использование вирусных векторов на основе герпесвирусов подробно рассмотрено [31].

*Ретровирусы* также рассматриваются как векторы для генетической терапии нейродегенеративных заболеваний. Создаются рекомбинантные вирусные системы, лишённые значительной части генетической информации вируса, что увеличивает их безопасность при клиническом применении. Успешно ведутся работы по псевдотипированию ретровирусов, когда гликопротеины вирусной оболочки ретровирусов заменяют на гликопротеины других вирусов (например, VSV-G, vesicular stomatitis virus), что придаёт рекомбинантным ретровирусам способность инфицировать широкий спектр клеток [32]. Ретровирусы способны нести до 10 т.п.н. трансгенной информации и вызывают долговременную экспрессию трансгенов. Применение ретровирусов для генной терапии нейродегенеративных заболеваний рассматривается с целью доставки разных факторов роста и нейротрофических факторов в ЦНС [33]. При нейродегенерации снижается экспрессия нейротрофических факторов, поэтому считается перспективной доставка нейротрофинов с помощью вирусных векторов (например, при болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона и боковом амиотрофическом склерозе). В эксперименте инфицирование трансгенных G93A мышей вирусным вектором, экспрессирующими VEGF [34], или IGF-1 [17] существенно отодвигало начало заболевания и значительно увеличивало время жизни G93A мышей. Однако, начатые клинические испытания не выявили положительного эффекта [35, 36].

### Клеточная терапия нейродегенеративных заболеваний

Травмы головного и спинного мозга, ишемические инсульты и нейродегенеративные заболевания сопровождаются гибеллю нейронов, дегенерацией аксонов, нарушением коммуникаций в нейронных сетях и контролируемых ими функций. Для предотвращения вторичной дегенерации и поддержания роста нервных волокон одним из перспективных подходов представляется применение клеточных технологий, нейротрансплантация эмбриональных стволовых клеток, преддифференцированных в нейральном направлении прогениторных клеток и нейральных стволовых клеток. Аллотрансплантация (например, сердца, почек, печени) вошла в широкую практику клиницистов. В то же время лечение нейродегенерации путём трансплантации эмбриональной ткани и/или клеток остаётся пока на уровне экспериментов в лабораториях или (в лучшем случае) начаты клинические испытания. Возможности клеточной терапии в ЦНС интенсивно изучаются для преодоления посттравматических и постишемических дефектов нервной ткани, а также для лечения нейродегенеративных заболеваний. Вместе с тем клиницисты сталкиваются с этическими проблемами (например, возможность применения ткани плода, высокая вероятность опухолевой трансформации трансплантированных

клеток). Подготовленные для трансплантации стволовые клетки должны иметь предсказуемые и воспроизводимые характеристики, а именно:

- сохранять жизнеспособность;
- активно размножаться с образованием достаточного для восстановления утраченной ткани количества клеток;
- интегрироваться с клетками органа-реципиента;
- дифференцироваться в требуемые клеточные типы;
- восстанавливать тканевый матрикс и формировать направляющие пути для роста аксонов;
- участвовать в процессе миелинизации;
- оказывать трофическое и нейропротекторное действие;
- стимулировать рост аксонов.

При этом вряд ли можно рассчитывать на замещение погибших нейронов трансплантированными клетками. Результаты клеточной терапии при нейродегенерации указывают на восстановление чувствительной и (в меньшей мере) двигательной функции, но выраженность положительного эффекта в большинстве случаев незначительна. Для трансплантации в головной или спинной мозг применяют:

- эмбриональные стволовые клетки;
- стволовые мезенхимные клетки костного мозга (многипotentные мезенхимальные стромальные клетки);
- стволовые клетки пуповинной крови.

Эмбриональные стволовые клетки получают из внутренней клеточной массы бластоциты. Из бластоциты 4–5 суток развития методом иммунохирургии (при помощи антител, вызывающих повреждение клеток трофобласта) внутреннюю клеточную массу отделяют от трофэктомиды. Полученные клетки культивируют *in vitro* с целью выделения чистой клеточной линии, способной формировать шарообразные скопления — эмбриоидные тела. К характерным маркерам эмбриональных стволовых клеток относятся: SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, Oct-4. С помощью специфических факторов роста можно направлять дифференцировку диссоциированных клеток эмбриоидных тел. Фактор роста гепатоцитов (HGF) и фактор роста нервов (NGF) стимулируют дифференцировку клеток всех трёх зародышевых листков. Ретиноевая кислота, фактор роста эпидермиса (EGF), костный морфогенетический белок 4 (BMP4) и щёлочный фактор роста фибробластов (FGFb) индуцируют дифференцировку клеток, образующихся из эктодермы. Производные мезодермы можно получить путём воздействия на стволовые клетки трансформирующим фактором роста  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ) и активином-А.

Эмбриональные половые клетки выделяют из эмбриоидных тел, которые формируются при культивировании примордиальных половых клеток, полученных из половых валиков эмбриона 5–9-й недели развития. Для диагностики эмбриональных половых клеток применяют следующие маркёры: SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81. С помощью различных факторов роста из эмбриональных половых клеток получены специализированные клетки — производные всех трёх зародышевых листков.

Для нейротрансплантации применяют клетки, полученные из эмбриоидных сфер, преддифференцированные нейральные клетки, дифференцированные нервные клетки, а также генетически модифицированные клетки, экспрессирующие нейротрофические факторы или нейральные молекулы адгезии [37]. В эксперименте на крысах эмбриональные стволовые клетки, полученные из зародышевых клеток человека, после однократной инъекции в цереброспинальную жидкость восстанавливали двигательную активность парализованных животных, инфицированных вирусом Sindbis [38]. Вместе с тем установлено, что после трансплантации эмбриональных стволовых клеток мыши в головной мозг



крыс в 20% из трансплантированных клеток возникают тератомы [39]. Риск опухолевой трансформации эмбриональных стволовых клеток может быть снижен, если клетки *in vitro* предварительно были подвергнуты дифференцировке в нейральные предшественники. Чаще применяют эмбриональные стволовые клетки, преддифференцированные в нервные клетки, экспрессирующие фенотип дофаминергических нейронов для терапии болезни Паркинсона [40, 41] или холинергические нейроны [42] для нейротрансплантации в спинной мозг при дегенеративных заболеваниях и травмах. Однако по причине высокой вероятности трансформации стволовых клеток в опухолевые и контаминации неизвестными инфекционными агентами из материала животных, используемого для культивирования клеток, применение стволовых клеток человека в клеточной терапии было ограничено лишь экспериментальными исследованиями [43]. В США 9 августа 2001 года был принят закон о финансировании лабораторных исследований эмбриональных стволовых клеток человека известных линий и удовлетворяющих специфическим критериям [44].

**Стволовая мезенхимная клетка красного костного мозга (мультипотентная мезенхимальная стромальная клетка, ММСК)** с фенотипом CD29<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD106<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>/SH2<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>/SH3<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, Thy-1<sup>+</sup>, B2M<sup>+</sup> относится к самообновляющейся клеточной популяции, из которой образуются стромальные клетки Stro-1<sup>+</sup>, экспрессирующие маркёры стволовых клеток (CD34, Sca-1 и др.). ММСК, а также её дочерние стромальные клетки могут дифференцироваться в жировые, костные, хрящевые клетки [45]. Дальнейшие исследования потенциальных возможностей ММСК обнаружили её трансдифференцировку в клетки других зародышевых листков. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* установлено, что ММСК может быть дифференцирована в нейральном и миогенном направлениях [45, 46]. ММСК человека, трансплантированные в головной мозг крысы, давали начало астроцитам [47], а в культуре клеток были получены нейроны, экспрессирующие фенотипы холинергических, дофаминергических, глутаматергических нейронов [48]. Доступность клеточного материала, возможность трансплантации аутогенных клеток, отсутствие признаков образования тератомы, а также снятие множества этических вопросов открывают широкие перспективы в применении собственных мезенхимных стволовых клеток костного мозга в клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний. После нейротрансплантации дофаминергических нейронов, дифференцированных из ММСК, животным с моделью болезни Паркинсона был обнаружен выраженный положительный терапевтический эффект, что и явилось отправной точкой для клинических испытаний лечения болезни Паркинсона [49]. Другим, не менее важным свойством ММСК является их способность к миграции. Так, после внутривенной трансфузии ММСК выселяются не только в органы гемопоэза. Например, трансплантированные клетки мигрируют в область ишемии головного мозга при моделировании инсульта у крыс [50]. Таким образом, ММСК красного костного мозга, инъецированные в кровь, целенаправленно мигрируют к месту нейродегенерации и способны дифференцироваться в нейроны и глиальные клетки. Отметим, что из 20–100 мл аспираата красного костного мозга через две недели экспансии из клеточной культуры можно получить  $10 \times 10^6$  ММСК, что достаточно для нейротрансплантации человеку [48].

**Стволовые клетки пуповинной крови.** К настоящему времени охарактеризованы выделенные из пуповинной крови стволовая кроветворная клетка (CD34<sup>+</sup>, CD31<sup>+</sup>, CD59<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, Thy1<sup>+</sup>, Oct-4<sup>+</sup>, Nanog<sup>+</sup>, SOX2<sup>+</sup>, FGF-4<sup>+</sup>), ММСК, прегениторная эндотелиальная клетка (CD34<sup>+</sup>, GATA2<sup>+</sup>, Flk-1<sup>+</sup>);

SP (side population) клетка, способная дифференцироваться в миогенном и кроветворном направлениях, а также клетки, экспрессирующие специфические CD-маркёры и дающие начало разным клеточным типам. После подтверждения трансдифференцировки стволовой кроветворной клетки и ММСК в нейральном направлении [46, 51–55] начались интенсивные исследования по нейротрансплантации этих клеток в эксперименте. Признанной экспериментальной моделью нейродегенерации считается модель бокового амиотрофического склероза. Трансплантация пуповинных клеток крови человека трансгенным мышам G93A продлевала их жизнь, а терапевтический эффект зависел от количества трансплантированных клеток [56, 57]. Было показано, что введённые внутривенно клетки пуповинной крови мигрировали преимущественно в места дегенерации нервной ткани, хотя эти клетки также были обнаружены и в других органах [58]. Кроме того, было установлено что трансплантированные клетки человека экспрессировали нейрональные маркёры (например, нестин, нейрональная форма  $\beta$ -тубулина TuJ1, глиальный фибриллярный кислый белок GFAP). При моделировании инсульта у крыс трансплантация клеток пуповинной крови уменьшила клинические проявления ишемии мозга [59]. Таким образом, вместе с появлением доказательных экспериментов по эффективности трансплантации клеток пуповинной крови животным с фенотипом нейродегенеративных заболеваний человека — наряду с клиническими испытаниями по аутотрансплантации CD34-позитивных клеток периферической крови больным амиотрофическим латеральным склерозом без видимого улучшения — становится очевидным, что применение стволовых клеток пуповинной крови является одним из перспективных направлений в клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний.

### Генетическая модификация стволовых клеток для клеточной терапии

Для повышения эффективности нейротрансплантации в настоящее время активно исследуются возможности применения генетически модифицированных стволовых клеток, экспрессирующих терапевтические гены, с целью доставки в область нейродегенерации факторов, поддерживающих выживание нейронов и рост нервных волокон. Существует несколько технологий доставки генетического материала в эукариотические клетки.

**Вирусные системы.** Аденовирусные векторы являются одним из самых широко применяемых методов генетической модификации эукариотических клеток. В одной из первых работ, посвящённых генетической модификации CD34 гемопоэтических клеток, S.J. Neering et al. использовали рекомбинантный аденовирусный вектор, экспрессирующий репортерные гены *lacZ* или щелочной фосфатазы [60]. Было показано, что после инфицирования до 45% клеток экспрессировали репортерные гены. При этом важным наблюдением явилась малая токсичность аденовирусного вектора.

Другой коллектив авторов применил рекомбинантный аденовирусный вектор для экспрессии транскрипционного фактора HOXB4 в CD34 клетках, выделенных из пуповинной крови человека [61]. Основываясь на ранее опубликованных данных о том, что экспрессия транскрипционного фактора HOXB4 в стволовых кроветворных клетках мыши приводила к росту пролиферативной активности, авторы выдвинули гипотезу, что экспрессия HOXB4 в инфицированных CD34 клетках пуповинной крови человека также усилит их пролиферацию. Был достигнут высокий уровень экспрессии трансгенов в клетках-мишениях, но вместо ожидаемого роста скорости пролиферации инфицированные CD34<sup>+</sup> клетки преимущественно дифференцировались в миелоидном направлении.



Ленти- и ретровирусные системы способны к эффективной генетической модификации стволовых кроветворных клеток. В 1999 году появилась серия работ, в которых исследователи показали возможность генетической модификации стволовых клеток пуповинной крови рекомбинантными ретро- и лентивирусами. Так было установлено, что способность клеток с фенотипом CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD33<sup>-</sup>, выделенных из пуповинной крови человека, к пролиферации— необходимый фактор для успешного введения вирусного вектора в клеточный геном [62]. В другой лаборатории были получены модифицированные клетки пуповинной крови человека с фенотипом CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> [63]. В качестве модельного вектора был применён рекомбинантный лентивирус, экспрессирующий репортерный белок EGFP. Средняя эффективность экспрессии трансгена EGFP составила 59±7%. Большинство эритроидных и миелоидных колоний, полученных из инфицированных CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> клеток, экспрессировали ген EGFP. Один из главных недостатков ретровирусов связан с их способностью к интеграции в геном хозяина в случайных сайтах, что может привести к мутагенезу и активации онкогенов. С целью повышения безопасности применения подобных вирусных векторов в клинике продолжаются интенсивные исследования по дальнейшей оптимизации данной вирусной системы [64].

**Химическая трансфекция.** Одним из распространённых подходов для химической трансфекции разных эукариотических клеточных линий считается применение катионных липидов или полимеров. Метод основан на образовании липосомных комплексов, способных проникать сквозь плазматическую мембрану клеток. Преимуществом метода считается его относительная простота и доступность необходимого оборудования. Эффективность низкомолекулярных полиэтилениминов для трансфекции невирусных систем была показана для гемопоэтических клеточных линий и CD34<sup>+</sup> клеток пуповинной крови человека [65]. Более того, клетки, трансформированные с помощью низкомолекулярных полиэтилениминов, показали хорошую жизнеспособность. Сравнение эффективности трансфекции клеток с помощью полиэтилениминов и реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США), который применяется для химической трансфекции эукариотических клеток и используется многими научными коллективами в качестве стандарта, показало более высокий уровень экспрессии гена EGFP (до 23 раз) в различных клеточных культурах, включая CD34<sup>+</sup> клетки пуповинной крови (после трансфекции с помощью полиэтилениминов).

**Электропорация** является одним из самых универсальных методов физической доставки генетического материала в различные эукариотические клеточные культуры. В нескольких лабораториях успешно продемонстрировали возможность применения электропорации для генетической модификации гемопоэтических клеток и CD34<sup>+</sup> клеток пуповинной крови. Группа немецких учёных путём электропорации провела трансфекцию репортерной конструкции, содержащей ген EGFP, в свежевыделенные CD34<sup>+</sup> клетки пуповинной крови человека [66]. Была документирована 80%-ная эффективность трансфекции клеток при высоких вольт-амперных параметрах эксперимента, но этот результат был получен лишь с 50%-ной выживаемостью клеток. Увеличение ёмкости электрического импульса и/или концентрации ДНК приводило к повышению эффективности электропорации, но также и к понижению выживаемости клеток. Более щадящие параметры электропорации позволили повысить жизнеспособность клеток при трансфекции. Так, была достигнута 41,2%-ная эффективность электропорации CD34<sup>+</sup> клеток пуповинной крови без значительного снижения жизнеспособности клеток [67]. M. Jurga et al. успешно использовали электропорацию для введения плазмида,

экспрессирующей белок EGFP, в нейральные стволовые клетки, дифференцированные при культивировании клеток пуповинной крови человека [68].

Таким образом, применение вирусов для доставки генетического материала в геном клетки-мишени ограничено возможными иммунологическими и онкогенными побочными эффектами. Поэтому, несмотря на относительно более низкую эффективность трансфекции, невирусные системы обладают высокой биобезопасностью трансгеноза, что существенно облегчает внедрение разрабатываемых генно-клеточных технологий в клиническую практику.

### **Нейротрансплантация генетически модифицированных стволовых клеток**

Стволовые клетки, экспрессирующие клонированный ген, могут значительно усилить терапевтический эффект трансплантированных клеток и регенераторный потенциал органа-мишени. Трансфекция эмбриональных стволовых клеток мыши плазмидами, экспрессирующими клонированный ген нейрональной молекулы адгезии L1, обеспечивает не только встраивание этой молекулы адгезии в клеточную мембрану стволовых клеток, но и секрецию её растворимой формы [69]. После трансплантации подобных клеток в травмированный спинной мозг они формировали отростки и обнаруживались в ткани реципиента спустя месяц после трансплантации, тогда как аналогичные, но нетрансформированные клетки выживали лишь в течение 7 суток. В следующих работах [70] было установлено, что экспрессия L1 направляет дифференцировку эмбриональных стволовых клеток по нейрональному пути. В настоящее время проводятся интенсивные исследования с целью получения генетически модифицированных стволовых мезенхимных клеток, способных дифференцироваться в заданном направлении. Установлено, что трансфекция стволовых мезенхимных клеток красного костного мозга вирусным вектором, экспрессирующим ген тирозингидроксилазы, вызывает их дифференцировку в дофаминергические нейроны [50].

В качестве дальнейшей разработки этого подхода представляет интерес использование и других менее опасных в плане возможной опухолевой трансформации стволовых клеток. Более перспективными в этом смысле являются стволовые клетки пуповинной крови.

Основанием для трансплантации стволовых клеток пуповинной крови для стимуляции регенерации нервной ткани является их пригодность как для алло-, так и для аутотрансплантации у человека, их низкая иммуногенность, доступность, простота получения и хранения. Кроме того, в пуповинной крови присутствуют стволовые клетки, способные давать начало специализированным клеткам разных тканей. Так, стволовая кроветворная клетка может выходить из красного костного мозга, находиться в общем кровотоке и заселять, например, сердце, головной мозг, печень или скелетные мышцы. Далее, в зависимости от микроокружения, стволовая кроветворная клетка может дифференцироваться в миобласты скелетной и сердечной мышечной ткани, гепатоциты, эндотелиальные клетки сосудов, нейроны, олигодендроциты, астроциты. В настоящее время существуют единичные экспериментальные работы по трансплантации генетически модифицированных клеток пуповинной крови для стимуляции регенерации сердечной мышцы и сосудов. Наибольшее внимание уделяется возможности трансплантации клеток пуповинной крови, генетически модифицированных геном VEGF. Например, трансплантация клеток пуповинной крови, трансформированных человеческим геном VEGF, активирует ангиогенез в тканях при моделировании хронической ишемии конечностей у крысы [71] и инфаркта миокарда у мышей [72]. Таким образом, для устранения дефектов нервной



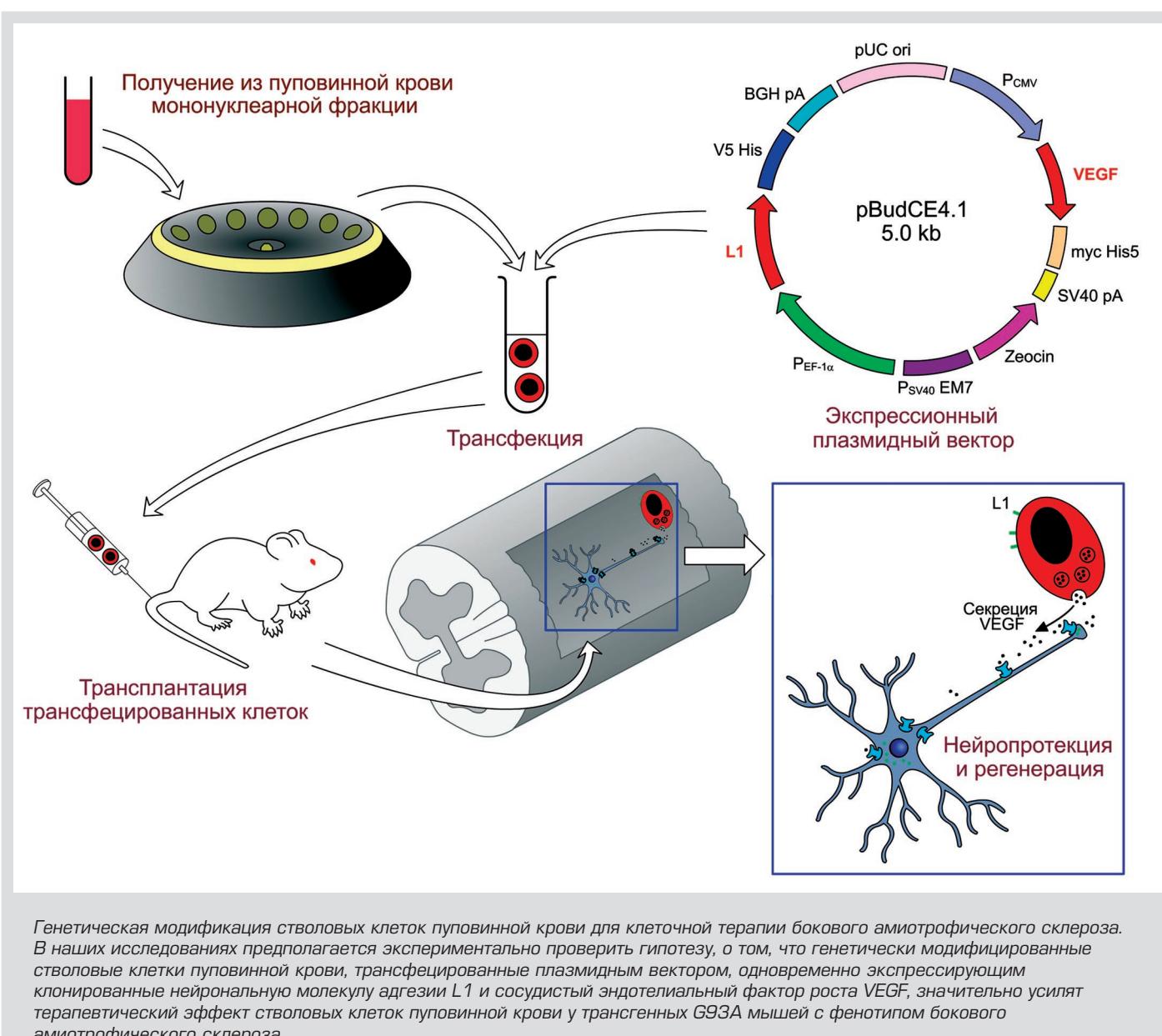
ткани, для нейропротекции и стимулирования регенерации нервных волокон в ЦНС получение и испытание генетически модифицированных клеток пуповинной крови можно считать перспективным направлением клеточной терапии. При этом возможно тестирование множества конкретных подходов (например, применение различных клеточных типов пуповинной крови, разные генетические модификации клеток перед трансплантацией, варианты по срокам, количеству и способу введения клеток непосредственно в область травмы, в кровоток, в биоматрикс).

### Заключение

В наших исследованиях планируется экспериментально обосновать целесообразность трансплантации стволовых клеток пуповинной крови при нейродегенеративных заболеваниях, в частности, при боковом амиотрофическом склерозе. Для усиления терапевтического эффекта стволовые кроветворные клетки пуповинной крови будут подвергнуты генетической модификации, трансфекции плазмидными векторами, экспрессирующими гены нейрональной молекулы

адгезии L1 и сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF (рис.). Усиление экспрессии генов, кодирующих синтез подобных молекул, позволяет рассчитывать на более выраженный трофический эффект генетически модифицированных клеток на мотонейроны головного и спинного мозга при боковом амиотрофическом склерозе.

Известно, что молекула адгезии L1 поддерживает выживание нейронов и рост аксонов. Что касается VEGF, то его нейротрофическое действие является новым и неожиданным открытием, а применение этого фактора обоснованно считается одним из наиболее перспективных направлений. Фактор поддерживает выживание нейронов, что, согласно нашим данным, осуществляется через receptor Flk-1 [73]. На модели экспериментальной травмы спинного мозга VEGF в гелевом носителе на основе экстракта белков базальной мембранны существенно поддерживает васкуляризацию и рост аксонов [74]. Наш выбор именно этого фактора роста обусловлен также его выраженным стимулирующим влиянием на процесс неоваскуляризации, что представляется важным для скорейшего устранения эффекта цитотоксичности.





Решение поставленных задач в эксперименте позволит начать клинические испытания, что ускорит внедрение в клиническую практику трансплантацию генетически модифицированных стволовых клеток пуповинной крови больным, страдающим нейродегенеративными заболеваниями, после нейротравмы и ишемических инсультов. Анализ первых клинических испытаний по трансплантации больным боковым амиотрофическим склерозом стволовых клеток, выделенных из периферической крови, показал безопасность трансплантации и толерантность больного к трансплантированным клеткам [52]. Однако клиническое применение для нейротрансплантации стволовых клеток пуповинной крови требует дополнительных экспериментальных исследований с учётом их трансдифференцировки в разные

клеточные типы [75]. При этом генетическая модификация стволовых клеток пуповинной крови может быть полезна в двух аспектах. Во-первых, для направленной дифференцировки клеток и ограничения возможности их злокачественной трансформации. Во-вторых, для доставки специфических ростовых и трофических факторов для поддержания устойчивости нервных клеток при нейропатологии.

### Благодарность

Авторы выражают сердечную благодарность профессору Э.Г. Улумбекову за помощь и полезные советы при обсуждении рукописи. Работа частично финансировалась грантами: РФФИ № 06-04-49396, ФЦНТП № 02.442.11.7319 и № 02.512.11.2052

### ЛИТЕРАТУРА:

1. Cajal S.R. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. 1909–1911. Translated as «*Histology of the nervous system of man and vertebrates*» by Swanson N. and Swanson L.W. New York, Maloine, Paris: Oxford University Press; 1995.
2. Cajal S.R. *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. New York: Hafner; 1928.
3. Jankowsky J.L., Slunt H.H., Gonzales V. et al. Persistent amyloidosis following suppression of Abeta production in a transgenic model of Alzheimer disease. *PLoS Med*. 2005; 2(12): e355.
4. Jankowsky J.L., Fadale D.J., Anderson J. et al. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum. Mol. Genet.* 2004; 13(2): 159–70.
5. Giasson B.I., Duda J.E., Quinn S.M. et al. Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron* 2002; 34(4): 521–33.
6. Gurney M.E., Pu H., Chiu A.Y. et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994; 264(5166): 1772–5.
7. Mangiarini L., Sathasivam K., Seller M. et al. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 1996; 87(3): 493–506.
8. Monani U.R., Sendtner M., Covert D.D. et al. The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in Smn(–/–) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2000; 9(3): 333–9.
9. Smith R.A., Miller T.M., Yamanaka K. et al. Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J. Clin. Invest.* 2006; 116(8): 2290–6.
10. Xia H., Mao Q., Eliason S.L. et al. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar atrophy. *Nat. Med.* 2004; 10(8): 816–20.
11. Saito Y., Yokota T., Mitani T. et al. Transgenic small interfering RNA halts amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(52): 42826–30.
12. Ralph G.S., Radcliffe P.A., Day D.M. et al. Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat. Med.* 2005; 11(4): 429–33.
13. Raoul C., Abbas-Terkki T., Bensadoun J.C. et al. Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat. Med.* 2005; 11(4): 423–8.
14. Karagiannis T.C., El-Osta A. RNA interference and potential therapeutic applications of short interfering RNAs. *Cancer Gene Ther.* 2005; 12(10): 787–95.
15. Tolentino M.J., Brucker A.J., Fosnot J. et al. Intravitreal injection of vascular endothelial growth factor small interfering RNA inhibits growth and leakage in a nonhuman primate, laser-induced model of choroidal neovascularization. *Retina* 2004; 24(4): 660.
16. Murashov A.K., Chintalgattu V., Islamov R.R. et al. RNAi pathway is functional in peripheral nerve axons. *Faseb J.* 2007; 21(3): 656–70.
17. Kaspar B.K., Llado J., Sherkat N. et al. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* 2003; 301(5634): 839–42.
18. St George J.A. Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Ther.* 2003; 10(14): 1135–41.
19. Schagen F.H., Ossevoort M., Toes R.E., Hoeben R.C. Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2004; 50(1): 51–70.
20. Ende N., Weinstein F., Chen R., Ende M. Human umbilical cord blood effect on sod mice (amyotrophic lateral sclerosis). *Life Sci.* 2000; 67(1): 53–9.
21. Boulis N.M., Turner D.E., Imperiale M.J., Feldman E.L. Neuronal survival following remote adenovirus gene delivery. *J. Neurosurg.* 2002; 96(2 Suppl): 212–9.
22. Baumgartner B.J., Shine H.D. Targeted transduction of CNS neurons with adenoviral vectors carrying neurotrophic factor genes confers neuroprotection that exceeds the transduced population. *J. Neurosci.* 1997; 17(17): 6504–11.
23. Manabe Y., Nagano I., Gazi M.S. et al. Adenovirus-mediated gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor prevents motor neuron loss of transgenic model mice for amyotrophic lateral sclerosis. *Apoptosis* 2002; 7(4): 329–34.
24. Miagkov A., Turchan J., Nath A., Drachman D.B. Gene transfer of baculoviral p35 by adenoviral vector protects human cerebral neurons from apoptosis. *DNA Cell Biol.* 2004; 23(8): 496–501.
25. Naldini L., Blomer U., Gallay P. et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; Vol. 272. N. 5259, P. 263–7.
26. Mandel R.J., Manfredsson F.P., Foust K.D. et al. Recombinant adeno-associated viral vectors as therapeutic agents to treat neurological disorders. *Mol. Ther.* 2006; 13(3): 463–83.
27. Muzyczka N., Berns K. I. In Howley P.M., editors. *Parvoviridae: the viruses and their replication*. Fields Virology Lippincott. New York: Williams & Wilkins; 2001: 2327–60.
28. Burger C., Nash K., Mandel R.J. Recombinant adeno-associated viral vectors in the nervous system. *Hum. Gene Ther.* 2005; 16(7): 781–91.
29. McCown T.J. Adeno-associated virus (AAV) vectors in the CNS. *Curr. Gene Ther.* 2005; 5(3): 333–8.
30. Glorioso J.C., Fink D.J. Herpes vector-mediated gene transfer in treatment of diseases of the nervous system. *An. Rev. Microbiol.* 2004; 58(P): 253–71.
31. Latchman D.S. Herpes simplex virus-based vectors for the treatment of cancer and neurodegenerative disease. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2005; 7(5): 415–8.
32. Naldini L., Blomer U., Gallay P. et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272(5259): 263–7.
33. Ralph G.S., Birley K., Wong L.F. et al. Gene therapy for neurodegenerative and ocular diseases using lentiviral vectors. *Clin. Sci. (Lond)*. 2006; 110(1): 37–46.
34. Azzouz M., Ralph G.S., Storkebaum E. et al. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* 2004; 429(6990): 413–7.
35. Dawbarn D., Allen S.J. Neurotrophins and neurodegeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2003; 29(3): 211–30.
36. Zuccato C., Ciampola A., Rigamonti D. et al. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 2001; 293(5529): 493–8.
37. Liew C.G., Draper J.S., Walsh J. et al. Transient and stable transgene expression in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2007; 25(6): 1521–8.
38. Kerr D.A., Llado J., Shambrott M.J. et al. Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury. *J. Neurosci.* 2003; 23(12): 5131–40.
39. Björklund L.M., Sanchez-Pernaute R., Chung S. et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99(4): 2344–9.
40. Lindvall O., Sawle G., Widner H. et al. Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 1994; 35(2): 172–80.
41. Zhang S.C., Wernig M., Duncan I.D. et al. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2001; 19(12): 1129–33.
42. Hendricks W.A., Pak E.S., Owensby J.P. et al. Predifferentiated embryonic stem cells prevent chronic pain behaviors and restore sensory function following spinal cord injury in mice. *Mol. Med.* 2006; 12(1–3): 34–46.
43. Correia A.S., Anisimov S.V., Li J.Y., Brundin P. *Ann. Med.* 2005; 37(7): 487–98.
44. Notice of extended receipt date and supplemental information guidance for applications requesting funding that proposes research with human embryonic STEM CELLS. <http://grants.nih.gov/grants/guide/notice-files/NOT-OD-02-006.html>.
45. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418(6893): 41–9.
46. Mezey E., Chandross K.J. Bone marrow: a possible alternative source of cells in the adult nervous system. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 405(1–3): 297–302.



47. Azizi S.A., Stokes D., Augelli B.J. et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats—similarities to astrocyte grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95(7): 3908–13.
48. Dezawa M. Insights into autotransplantation: the unexpected discovery of specific induction systems in bone marrow stromal cells. *Cell Mol. Life Sci.* 2006; 63(23): 2764–72.
49. Schwarz E.J., Alexander G.M., Prockop D.J., Azizi S.A. Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engraftment in a rat model of Parkinson disease. *Hum. Gene Ther.* 1999; 10(15): 2539–49.
50. Lu L., Zhao C., Liu Y. et al. Therapeutic benefit of TH-engineered mesenchymal stem cells for Parkinson's disease. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 2005; 15(1): 46–51.
51. Brazelton T.R., Rossi F.M., Keshet G.I., Blau H.M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290(5497): 1775–9.
52. Mazzini L., Fagioli F., Boccaletti R. et al. Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans. *Amyotroph. Lateral. Scler. Other Motor Neuron Disord.* 2003; 4(3): 158–61.
53. Mezey E., Chandross K.J., Harta G. et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000; 290(5497): 1779–82.
54. Hao H.N., Zhao J., Thomas R.L. et al. Fetal human hematopoietic stem cells can differentiate sequentially into neural stem cells and then astrocytes in vitro. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 2003; 12(1): 23–32.
55. Munoz-Elias G., Woodbury D., Black I.B. Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation: stem cell and precursor functions. *Stem Cells* 2003; 21(4): 437–48.
56. Chen R., Ende N. The potential for the use of mononuclear cells from human umbilical cord blood in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis in SOD1 mice. *J. Med.* 2000; 31(1–2): 21–30.
57. Ende N., Weinstein F., Chen R., Ende M. Human umbilical cord blood effect on sod mice (amyotrophic lateral sclerosis). *Life Sci.* 2000; 67(1): 53–9.
58. Garbuzova-Davis S., Willing A.E., Zigova T. Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 2003; 12(3): 255–70.
59. Chen J., Sanberg P.R., Li Y. et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* 2001; 32(11): 2682–8.
60. Neering S.J., Hardy S.F., Minamoto D. et al. Transduction of primitive human hematopoietic cells with recombinant adenovirus vectors. *Blood* 1996; 88(4): 1147–55.
61. Brun A.C., Fan X., Bjornsson J.M. et al. Enforced adenoviral vector-mediated expression of HOXB4 in human umbilical cord blood CD34+ cells promotes myeloid differentiation but not proliferation. *Mol. Ther.* 2003; 8(4): 618–28.
62. Gentry T., Smith C. Retroviral vector-mediated gene transfer into umbilical cord blood CD34+CD38–CD33– cells. *Exp. Hematol.* 1999; 27(8): 1244–54.
63. Evans J.T., Kelly P.F., O'Neill E., Garcia J.V. Human cord blood CD34+CD38– cell transduction via lentivirus-based gene transfer vectors. *Hum. Gene Ther.* 1999; 10(9): 1479–89.
64. Szyda A., Paprocka M., Krawczenko A. et al. Optimization of a retroviral vector for transduction of human CD34 positive cells. *Acta Biochim. Pol.* 2006; 53(4): 815–23.
65. Shin J.Y., Suh D., Kim J.M. et al. Low molecular weight polyethylenimine for efficient transfection of human hematopoietic and umbilical cord blood-derived CD34+ cells. *Biochim. Biophys. Acta* 2005; 1725(3): 377–84.
66. von Levetzow G., Spanholz J., Beckmann J. et al. Nucleofection, an efficient nonviral method to transfer genes into human hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 2006; 15(2): 278–85.
67. Oldak T., Kruszewski M., Machaj E.K. et al. Optimisation of transfection conditions of CD34+ hematopoietic cells derived from human umbilical cord blood. *Acta Biochim. Pol.* 2002; 49(3): 625–32.
68. Jurga M., Markiewicz I., Sarnowska A. et al. Neurogenic potential of human umbilical cord blood: neural-like stem cells depend on previous long-term culture conditions. *J. Neurosci. Res.* 2006; 83(4): 627–37.
69. Chen J., Bernreuther C., Dihne M., Schachner M. Cell adhesion molecule L1-transfected embryonic stem cells with enhanced survival support regrowth of corticospinal tract axons in mice after spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 2005; 22(8): 896–906.
70. Bernreuther C., Dihne M., Johann V. et al. Neural cell adhesion molecule L1-transfected embryonic stem cells promote functional recovery after excitotoxic lesion of the mouse striatum. *J. Neurosci.* 2006; 26(45): 11532–9.
71. Ikeda Y., Fukuda N., Wada M. et al. Development of angiogenic cell and gene therapy by transplantation of umbilical cord blood with vascular endothelial growth factor gene. *Hypertens. Res.* 2004; 27(2): 119–28.
72. Chen H.K., Hung H.F., Shyu K.G. et al. Combined cord blood stem cells and gene therapy enhances angiogenesis and improves cardiac performance in mouse after acute myocardial infarction. *Eur. J. Clin. Invest.* 2005; 35(11): 677–86.
73. 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; 15(13): 2117–21.
74. 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; 97(1): 161–8.
75. Silani V., Leigh N. Stem therapy for ALS: hope and reality. *Amyotroph. Lateral Scler. Other. Motor Neuron Disord.* 2003; 4(1): 8–10.

Поступила 15.07.2007