

Доклинические исследования терапии бокового амиотрофического склероза с помощью генетически модифицированных моноклеарных клеток крови пуповины

А.А. Ризванов, Д.С. Гусева, И.И. Салафутдинов, Ф.В. Баширов,
А.П. Киясов, Р.Р. Исламов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Казанский государственный медицинский университет, Казань

Банк стволовых клеток Казанского государственного медицинского университета, Казань

Республиканская клиническая больница МЗ РТ, Казань

Treatment of the amyotrophic lateral sclerosis using of genetically modified umbilical cord blood mononuclear cells in the preclinical studies

A.A. Rizvanov, D.S. Guseva, I.I. Salafutdinov, F.V. Bashirov, A.P. Kiasov,
R.R. Islamov

Kazan (Volga region) Federal University, Kazan

Kazan State Medical University, Kazan

Stem cell bank of the Kazan State Medical University, Kazan

Republican Clinical Hospital of the MH RT, Kazan

Развитие фундаментальной и клинической «регенеративной медицины» основывается на прогрессе генных и клеточных биотехнологий. Вместе с тем обнадеживающие доклинические исследования на животных и ведущиеся клинические испытания значительно отстают от доступных на сегодняшний день новых генных, клеточных и генно-клеточных подходов. Нейронаука является одной из быстро развивающихся областей знаний в биологии и медицине и поэтому пионерские исследования в генно-клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний в эксперименте обещают прорыв в клинической «регенеративной медицине» в ближайшем будущем. В обзоре представлены стратегии генно-клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний на примере бокового амиотрофического склероза. Особое внимание уделяется собственным оригинальным исследованиям по применению генно-клеточных конструкций на основе моноклеарных клеток пуповинной крови и двухкассетных плазмидных векторов для нейропротекции у трансгенных мышей SOD1-G93A с фенотипом бокового амиотрофического склероза. На основании полученных результатов по скелетотрансплантации моноклеарных клеток пуповинной крови, сверхэкспрессирующих рекомбинантные нейральную молекулы адгезии L1, сосудистый эндотелиальный фактор роста, фактор роста фибробластов 2 и глиальный нейротрофический фактор в разных комбинациях, обосновывается эффективность применения генетически модифицированных клеток крови пуповины для лечения нейродегенеративных заболеваний. Рассмотрены целесообразность генетической модификации клеток пуповинной крови не только с позиции доставки терапевтических молекул к нервным клеткам, но и с точки зрения увеличения выживаемости клеток после трансплантации, адресной миграции в места нейродегенерации и возможной дифференцировки в эндотелиальные клетки, а также в клетки макро- и микроглии.

Ключевые слова: «регенеративная медицина», генно-клеточные конструкции, клетки пуповинной крови, двухкассетные плазмидные векторы.

Development of the fundamental and clinical «regenerative medicine» is based on the progress of gene, stem cell and gene-cell biotechnologies. However, the reliable preclinical investigations on animal models and more over clinical trials stay far away from the available nowadays gene and cell constructions. Neuroscience is one of the fast growing fields of knowledge in biology and medicine. Pioneer experiments in neuroscience promises breakthrough in the innovative methods for treatment of neurodegenerative diseases in near future. This review addresses strategies for gene-cell therapy of neurodegenerative diseases by the example of amyotrophic lateral sclerosis. Precisely gene modification of mononuclear fraction of umbilical cord blood cells (UCBC) by dual cassette plasmid vectors is observed. Based on our own results of transplantation of genetically modified UCBC overexpressing recombinant neural cell adhesion molecule L1, vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor 2, and glial derived neurotrophic factor in different combinations we provide the experimental data for usefulness of transplantation of gene modified UCBC for treating neurodegenerative diseases. In the review we discuss the efficacy of gene modification of UCBC not only for secretion of recombinant proteins, but in increasing of transplanted cells survivability, their migration possibilities and capability to differentiate in endothelial, microglial and macroglial cell types.

Key words: «regenerative medicine», gene-cell constructions, umbilical cord blood cells, dual cassette plasmid vectors.

e-mail: rizvanov@gmail.com

Регенерация — восстановление утраченной или повреждённой структуры ткани и (или) органа — относится к фундаментальным свойствам организма. Проблема стимулирования регенерации неотъемлемо связана с проблемой повышения качества жизни больных, страдающих дегенеративными заболеваниями, а также от ишемических и травматических повреждений. Развитие инновационных технологий в области генной и клеточной терапии, получение новых научных сведений по стимулированию регенерации, доклинические испытания в этой области, интенсивное внедрение в медицину высоких технологий физики и химии открывают широкие перспективы развития «регенеративной медицины».

Аллотрансплантация активно применяется в клинической практике на органном (кожа, сердце, почки, печень), тканевом (кровь, скелетная мышечная ткань, хрящевая ткань) и клеточном уровнях. Трансплантация стволовых кроветворных клеток производится при лечении ряда врождённых заболеваний крови (апластическая анемия, β -талассемия, серповидноклеточная анемия, лимфопролиферативный синдром, связанный с X-хромосомой и др.) и гемобластозов (лимфом и лейкоз), при химиотерапии рака для поддержания пула полипотентных кроветворных клеток красного костного мозга.

В 1990 г. впервые в клинической практике была проведена коррекция генетической мутации с помощью генно-клеточной терапии [1]. Метод предполагает генетическую модификацию клеток перед трансплантацией, т.е. коррекцию функции мутированного гена с помощью соответствующего клонированного терапевтического гена. Для доставки генетического материала в трансплантируемые клетки применяют невирусные и вирусные векторы. Неотъемлемая часть генетического вектора — наличие экспрессионной кассеты, обычно состоящей из промотора, рекомбинантного гена и сигнала для терминирования и полиаденилирования мРНК. С помощью методов генной инженерии можно создать генетические векторы, экспрессирующие любые рекомбинантные гены. В настоящее время применяют экспрессионные векторы на основе различных вирусов (аденовирусы, адено-ассоциированные вирусы, герпесвирусы, ретровирусы) и плазмид.

В центральной нервной системе (ЦНС) аллотрансплантация целостной анатомической структуры или её части считается невозможной. В отличие от других органов и тканей, где паренхиматозные клетки могут быть представлены единичными клеточными типами (эпителиальные железы, скелетная мышца, кость), в образование любой из структур ЦНС вовлечены разные нервные клетки, отвечающие за выполнение свойственных только для них специализированных функций (двигательные, чувствительные, ассоциативные). Кроме того мозг человека высоко индивидуализирован не только в строении, но и в проявлениях высшей нервной деятельности (сознание, мышление, память, речь, чувства). Поэтому нейротрансплантация с целью замены поражённой области ЦНС на сегодняшний день остаётся лишь в эксперименте. Исключением является трансплантация ткани среднего мозга эмбриона человека, содержащей большое количество постмитотических дофаминергических нейронов, в полосатое тело пациентам, страдающим болезнью Паркинсона.

Альтернативным приёмом клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний является трансплантация генетически модифицированных клеток, сверхэкспрессирующих терапевтические гены. Поддержание жизни нейронов, вступивших в патологический процесс, и восстановление утраченных межклеточных связей в нейронных сетях с помощью нейротрофических факторов, факторов роста и молекул адгезии могут существенно повысить качество и продолжительность жизни пациентов с нейродегенеративными заболеваниями, затрагивающими разные структуры ЦНС и разные типы нервных клеток.

Стратегии генно-клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний

Нейродегенеративные заболевания сопровождаются гибелью нейронов, дегенерацией аксонов, нарушением коммуникаций в нейронных сетях и контролируемых ими функций. Необратимой 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-ергические нейроны базальных ганглиев при хорее Хантингтона, нервные клетки головного мозга при болезни Альцгеймера.

Перспективными методами лечения больных, страдающих нейродегенеративными заболеваниями, считаются коррекция экспрессии гена, ответственного за развитие заболевания, трансплантация стволовых клеток, а также сочетание генной и клеточной терапии — трансплантация генетически модифицированных стволовых клеток, сверхэкспрессирующих поддерживающие выживание нейронов факторы. Интенсивные научные поиски выявили наиболее значимые нейротрофические факторы, которые могут быть использованы в качестве лекарственных препаратов. К ним относятся мозговой нейротрофический фактор (BDNF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), инсулиноподобный фактор роста (IGF) и сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) [2-3]. Нейропротекторное действие этих факторов доказано в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. При этом установлено, что комбинации нескольких нейротрофических факторов могут иметь более выраженный эффект на выживание нервных клеток. Однако экспериментальные исследования и клинические испытания, проводимые с данными факторами, не выявили эффективный лекарственный препарат для стимулирования нейрорегенерации. Одна из главных причин заключается в способе доставки лекарственного средства в нервную ткань. В настоящее время исследуют доставку биологически активных молекул в организм больного путём инъекции рекомбинантного белка, с помощью экспрессионного вектора (плазмидного или вирусного) или методом трансплантации генетически модифицированных клеток, сверхэкспрессирующих ростовые и трофические факторы.

Последние достижения в биотехнологии позволяют применять комбинированную генно-клеточную терапию для стимулирования регенераторных процессов в ЦНС при нейротравмах, инсультах головного мозга, нейродегенеративных заболеваниях. При прямой генной терапии плазмидные или вирусные векторы, кодирующие терапевтические гены,

инъекционно вводят в организм. При этом ожидается, что генетические конструкции проникают в разные клетки реципиента и начинают экспрессироваться с продукцией целевых белковых молекул. При генно-клеточной терапии в организм больного вводят клетки, генетически модифицированные *in vitro* с помощью экспрессионного вирусного или плазмидного вектора.

Современные терапевтические стратегии для лечения нейродегенеративных заболеваний различной природы предполагают трансплантацию клеток или доставку терапевтических генов, продукты которых сдерживают развитие патологических проявлений и стимулируют нейрорегенерацию. Эти подходы по отдельности и в комбинации лежат в основе генно-клеточной терапии, с которой связывают большие надежды не только для стимулирования регенерации при нейродегенеративных заболеваниях, но и в «регенеративной медицине» в целом.

Генная терапия заболеваний, обусловленных наследственными или приобретёнными генными мутациями, априори основана на патогенезе заболевания. Недавно для лечения X-сцепленной аденолейкодистрофии (смертельное нейродегенеративное заболевание), чтобы остановить прогрессирующую демиелинизацию ЦНС, была выполнена трансплантация аутогенных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), в которых была проведена коррекция мутированного гена с помощью лентивирусного вектора. Аденолейкодистрофия обусловлена мутацией гена ABCD1, кодирующего кассетный транспортер, связывающий аденозин трифосфат (adenosine triphosphate-binding cassette transporter). Этот белок локализуется в мембране пероксисом олигодендроцитов и микроглии и участвует в расщеплении длинноцепочечных жирных кислот, а его дефицит приводит к выраженной демиелинизации в ЦНС. Смысл трансплантации собственных ГСК, после введения в них нормального гена ABCD1, заключается в том, что из этих клеток дифференцируются клетки системы мононуклеарных фагоцитов (и клетки микроглии в том числе) с восстановленной экспрессией гена ABCD1, благодаря чему они могут корректно участвовать в метаболизме жирных кислот [4].

Другим важным направлением генной и клеточной терапии в «регенеративной медицине» является увеличение уровня экспрессии генов, кодирующих трофические факторы, факторы роста и молекулы адгезии, поддерживающих выживание паренхиматозных клеток поражённого органа и стимулирующих его регенерацию. Способ доставки биологически активных молекул с помощью клеточных носителей, которые также выполняют функцию и продуцента данных молекул, является альтернативным внутривенному введению рекомбинантных белков. На протяжении последних десятилетий, с момента когда был зарегистрирован в качестве лекарства человеческий рекомбинантный инсулин, в практической медицине активно применяются препараты, полученные с помощью генетически модифицированных бактерий. Рекомбинантные белки обладают очень высокой эффективностью при терапии заболеваний, патогенетическим фактором которых является дефицит известной молекулы (инсулин, эритропоэтин, кальцитонин, паратиреоидный гормон, соматотропин, глюкагон), возникший при поражении определённого органа. Существенным недостатком применения таких пре-

паратов в качестве заместительной терапии считается их высокая цена (десятки тысяч долларов в год) и необходимость применения на протяжении всей жизни (приём препаратов не устраняет причину заболевания). Трансплантация генетически модифицированных клеток, экспрессирующих клонированные гены, обоснована не только возможностью продолжительной секрецией терапевтических молекул, но и стимулирующим влиянием трансплантированных (стволовых, прогениторных) клеток на репаративную регенерацию повреждённых тканей.

Инновационное направление в клеточной терапии, основанное на генетической модификации стволовых клеток перед трансплантацией, имеет широкие перспективы развития. Возможности генно-клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний интенсивно исследуют во многих лабораториях мира. Однако многие разработки остаются пока на уровне экспериментов в лабораториях или (в лучшем случае) начаты клинические испытания. Врачи сталкиваются с этическими проблемами (при применении клеток эмбриона или плода), опасностью инфицирования реципиента неизвестными возбудителями заболеваний из сыворотки и клеток животных, вероятностью возникновения иммунологического ответа на аллогенные клетки, неконтролируемой продукции рекомбинантного белка. Для сдерживания дегенерации и стимулирования нейрорегенерации в настоящее время ведутся активные поиски как «терапевтических генов», так и их клеточных носителей. Подготовленные для трансплантации клетки должны иметь предсказуемые и воспроизводимые характеристики, а именно: сохранять жизнеспособность, активно мигрировать в область дегенерации, интегрироваться с клетками реципиента, дифференцироваться в требуемые клеточные типы, восстанавливать внеклеточный матрикс нервной ткани и формировать направляющие пути для роста аксонов; участвовать в процессе миелинизации, оказывать трофическое и нейропротективное действие, стимулировать рост аксонов и восстановление межклеточных контактов. Клетки для последующей генетической модификации могут быть получены как от самого пациента (ауто трансплантация), так и от здорового донора (алло трансплантация). Трансплантацию стволовых, прогениторных и дифференцированных клеток многие исследователи рассматривают в качестве способа доставки ростовых и трофических факторов, сдерживающих гибель клеток реципиента и стимулирующих восстановление тканей и органов.

Учитывая специфику пролиферативного, дифференцировочного и синтетического потенциала различных типов клеток, доступность их тканевых источников, выбор исходной клеточной популяции как своеобразного «носителя» для терапевтических генетических конструкций является важнейшим этапом технологического подхода. Высоко перспективными в этом смысле являются стволовые и прогениторные клетки пуповинной крови. К настоящему времени охарактеризованы выделенные из пуповинной крови гемопоэтически стволовые клетки (CD34, CD31, CD59, Sca-1, Thy1, Oct-4, Nanog, SOX2, FGF-4), мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, эндотелиальные прогениторные клетки (CD34, GATA2, Flk-1), а также ряд других, минорных клеточных популяций, обладающих различными иммунофенотипическими особенностями и диффе-

ренцировочным потенциалом [5–8]. Многочисленные исследования, в частности, по трансплантации клеток пуповинной крови животным с экспериментальными ишемическими и дегенеративными поражениями, подтвердили эффективность клеточной терапии [9]. Кроме того, W.Z. Yang с соавт. (2010) убедительно продемонстрировали безопасность аллотрансплантации пуповинной крови для терапии разных нозологических форм [10].

Для повышения терапевтической эффективности клеток пуповинной крови активно исследуются возможности их «генетической модификации» для доставки в зоны повреждения ростовых факторов и молекул адгезии, поддерживающих выживание клеток реципиента, стимулирующих клеточную пролиферацию, восстановление межклеточных контактов и образование утраченных тканевых структур [11]. В настоящее время существуют единичные экспериментальные работы по трансплантации генетически модифицированных клеток пуповинной крови для обеспечения регенерации миокарда и сосудов. Наибольшее внимание уделяется возможности трансплантации клеток пуповинной крови, снабженных генетическими конструкциями с геном VEGF. В частности, трансплантация клеток пуповинной крови, трансфицированных геном VEGF человека, активирует ангиогенез в тканях при моделировании хронической ишемии конечностей у крыс [12] и инфаркта миокарда у мышей [13]. При этом эффективность генно-клеточной терапии можно усилить путём трансфекции клеток двухкассетным плазмидным вектором, экспрессирующим два терапевтических гена.

Молекулы VEGF и FGF считаются наиболее перспективными для индукции ангиогенеза в терапевтических целях [14]. Так, в настоящее время для улучшения реваскуляризации ишемизированных тканей на разных стадиях клинических испытаний проходит прямая генная терапия с применением плазмидных векторов, экспрессирующих VEGF или FGF2. Ряд авторов считают, что их комплексное использование (в виде двухкассетных плазмид с VEGF и FGF2) более эффективно за счет синергетического эффекта целевых белковых факторов на эндотелиальные клетки [15]. Прямая генная терапия для лечения коронарной недостаточности с применением плазмидного вектора VEGF-A165/bFGF также проходит клинические испытания. Интересно, что VEGF и FGF2 рассматриваются как потенциальные терапевтические молекулы и для лечения нейродегенеративных заболеваний. Известно, что усиление экспрессии гена VEGF играет важную роль не только для роста сосудов, но и в «навигации» аксонов [17]. Кроме того, VEGF стимулирует пролиферацию нейробластов [18], контролирует выживание нейронов *in vitro* и *in vivo* [19]. Экспрессию VEGF напрямую активируют рецепторы эстрогенов [20] и индуцированный гипоксией фактор-1 α (Hypoxia Inducible Factor-1 α , HIF-1 α) [21]. В многочисленных исследованиях выявлена связь между VEGF и патологией двигательных нейронов [22]. Так, при сниженной экспрессии *vegf* [21] или при отсутствии HIF-1 α — чувствительного элемента в промоторе VEGF — у *Vegf^{fl/e}*-мышей развивается прогрессирующая дегенерация мотонейронов, как при боковом амиотрофическом склерозе [23]. У трансгенных мышей SOD1-G93A, экспрессирующих мутантный ген супероксид дисмутазы SOD1 (при мутации гена развивается одна из наследственных форм бокового

амиотрофического склероза), показана ослабленная индуцированная гипоксией экспрессия VEGF [24]. При скрещивании *Vegf^{fl/e}*- и SOD1-G93A-мышей полученное потомство погибает в раннем возрасте в результате выраженной дегенерации мотонейронов [21]. *In vitro* VEGF способствует выживанию мотонейронов, экспрессирующих мутантный ген SOD1 [25]. Вместе с тем полной ясности в механизме VEGF-зависимой нейропротекции на сегодняшний день не существует. В наших исследованиях установлено, что одним из ключевых звеньев нейропротекторного действия VEGF при аксотомии мотонейронов поясничного отдела спинного мозга мыши являются усиление экспрессии *vegf* и его ядерного рецептора *flt-1* [26].

Новые сведения о том, что FGF2 является одним из ключевых факторов специализации нейрозкостерной предполагает, что FGF2 может играть существенную роль и в нейрорегенерации. FGF2 принадлежит семейству морфогенов, которые контролируют индукцию и спецификацию тканей в эмбриогенезе и рассматривается как обязательный компонент культуральных сред для индукции нейрональной дифференцировки [27–30]. Вместе с тем, нейральные стволовые клетки, культивируемые в присутствии FGF2 и EGF, образовывали нейросферы, клетки которых экспрессировали маркеры глиальных клеток [31]. FGF2 облигатно вовлечён в нейро- и глиогенез *in vivo*. Активация нейрогенных генов с помощью FGF-2 усиливает миграцию и созревание нейронов из нейральных стволовых клеток [32]. В постнатальном периоде онтогенеза молекулы FGF2 и его рецепторы создают специфическую нишу, поддерживающую нейрогенез [33]. FGF2 индуцирует фосфорилирование молекулы EphrinB, представителя семейства эфринов, контролирующего направленный рост аксонов в развивающемся и регенерирующем спинном мозге, с последующей активацией ГТФазы *Rho* и перестройкой цитоскелета в аксоне [34, 35]. Участие FGF2 в глиогенезе подтверждается фактами стимулирования предшественников астроцитов и олигодендроцитов к пролиферации и дифференцировке в зрелые клетки [36–38]. Таким образом, целесообразность введения в моноклеарные клетки гена, кодирующего FGF2, мотивировано, во-первых, его нейротрофическим действием, а во-вторых, его участием в дифференцировке клеток нейроглии.

Генетически модифицированные моноклеарные клетки пуповинной крови в терапии бокового амиотрофического склероза

В 1874 г. впервые французский врач-психиатр Жан-Мартен Шарко (1825–1893) описал боковой амиотрофический склероз. Заболевание стало широко известным в 1939 г. после смерти от бокового амиотрофического склероза легендарного бейсболиста США Генри Луиса. После этого клинического случая боковой амиотрофический склероз также известен как болезнь Луи Геринга. Термин «амиотрофический» отражает атрофию и слабость скелетной мускулатуры, возникающие в результате гибели двигательных нейронов, тогда как термин «боковой склероз» указывает на патоморфологические изменения спинного мозга, распад нисходящих двигательных путей сопровождается глиозом. Гибель двигательных нейронов при заболевании происходит путём апоптоза, причиной которого может быть один

из известных факторов, вызывающих гибель нервных клеток: глутаматная эксайтотоксичность, дисфункция митохондрий, окислительный стресс, нарушения аксонного транспорта, накопление токсичных внутриклеточных белковых агрегатов, реактивный астроцитоз. Предрасположенность двигательных нейронов к данной патологии может быть обусловлена фенотипическими особенностями мотонейронов. Двигательные нейроны имеют очень длинные аксоны — могут достигать более 1 м. Это требует высокой синтетической активности в перикарионе и эффективной работы аксонного транспорта, что определяется высокой метаболической активностью клеток, в т.ч. окислительными процессами в митохондриях. Немаловажным является факт высокой экспрессии глутаматных рецепторов в синаптической мембране двигательных нейронов ствола головного мозга и передних столбов спинного мозга.

В результате гибели двигательных нейронов прецентральной извилины коры ствола головного мозга или передних столбов спинного мозга развивается прогрессирующая слабость и атрофия скелетных мышц. Прогрессирующий в течение 3–5 лет паралич скелетной мускулатуры в конечном итоге затрагивает диафрагму и больные, в виду отсутствия патогенетической терапии, умирают от дыхательной недостаточности.

С тех пор как Шарко описал боковой амиотрофический склероз произошёл незначительный прогресс в понимании механизмов гибели двигательных нейронов и соответственно в разработке патогенетического лечения пациентов. Сегодня известно, что часть случаев семейной формы заболевания обусловлена доминантными мутациями гена *sod1* (21q22.1–q22.2), кодирующего Cu/Zn-супероксиддисмутазу SOD1 — главный фермент антиоксидантной защиты клетки, локализуемый в ядре, цитозоле и митохондриях. Гомодимер состоит из двух субъединиц, каждая из которых содержит один Cu- и один Zn-связывающий домены и дисульфидный мостик. Известно более 100 мутаций гена *sod1*. Преимущественно это точечные мутации, характеризующиеся заменой одной аминокислоты из 153 аминокислотных остатков белка. Мутантные линии животных (в первую очередь генетически модифицированные мыши), полученные с помощью трансгенных технологий — удобная биологическая модель для изучения патогенеза заболеваний, связанных с мутацией известного гена, а также для разработки методов лечения заболевания, вызванного мутацией данного гена. Так, линия мышей B6SJL-Tg(SOD1-SOD1-G93A) dl1Gur/J создана в лаборатории M.E. Gurney при Северозападном университете США (Northwestern University, USA). Клетки трансгенных мышей SOD1-G93A экспрессируют мутантный ген человека — Cu/Zn-супероксиддисмутазу SOD1 (глицин заменён на аланин в позиции 93), что приводит к прогрессирующей дегенерации мотонейронов, характерной для бокового амиотрофического склероза. В результате необратимой дегенерации холинергических нейронов спинного мозга и ствола головного мозга гомозиготные SOD1-G93A мыши умирают в возрасте 4–5 мес. на фоне прогрессирования паралича скелетных мышц [39].

Ранее нами была выдвинута гипотеза о том, что генетически модифицированные мононуклеарные

клетки пуповинной крови человека, трансфицированные плазмидным вектором, одновременно экспрессирующим клонированную молекулу адгезии нейронов L1CAM и VEGF, значительно усилят терапевтический эффект применения мононуклеарных клеток пуповинной крови у трансгенных мышей SOD1-G93A с фенотипом бокового амиотрофического склероза [11, 40].

При формировании ткани для образования «клеточных сообществ» важную роль играют процессы «узнавания» и адгезии. Клеточную адгезию обеспечивают специфичные для каждого типа клеток и тканей молекулы. Молекула адгезии L1CAM поддерживает выживание нейронов и рост аксонов. Экспрессия гена L1CAM, синтез этого белка и последующее встраивание его в клеточную мембрану трансплантированных и, возможно, клеток реципиента может иметь важное стимулирующее влияние на регенераторный рост аксонов. Трансфекция эмбриональных стволовых клеток мыши плазмидами, экспрессирующими клонированный ген L1CAM, обеспечивает не только встраивание этой молекулы адгезии в клеточную мембрану стволовых клеток, но и секрецию её растворимой формы [41]. После трансплантации данных клеток в травмированный спинной мозг они формировали отростки и поддерживали жизнеспособность в течение месяца после трансплантации, тогда как аналогичные, но не трансфицированные клетки выживали лишь в течение 7 сут. В следующих работах было показано, что экспрессия L1 направляет дифференцировку эмбриональных стволовых клеток по нейрональному пути [42]. VEGF принадлежит семейству полипептидов с васкулогенной активностью в эмбриогенезе и ангиогенной активностью при опухолевом росте, гипоксии и регенерации. VEGF контролирует пролиферацию и дифференцировку эндотелиальных клеток при неоваскуляризации, что представляется важным для нормализации кровоснабжения в очаге дегенерации. Кроме того VEGF, как уже было сказано выше, является и нейропротекторным фактором. В этой связи VEGF обоснованно считается одним из ключевых факторов регенерации.

Для подтверждения нашей гипотезы на основе плазмидного вектора pcDNA3.1 были получены генетические конструкции с различными генами человека: эритропоэтин (pcDNA-EPO), антиапоптозный белок Bcl2 (pcDNA-Bcl2), нейрональная молекула адгезии L1 (pcDNA-hL1CAM), различные изоформы VEGF (pcDNA-VEGF121, pcDNA-VEGF165, pcDNA-VEGF189), основной фактор роста фибробластов (pcDNA-FGF2), глиальный нейротрофический фактор (pcDNA-GDNF). Для повышения эффективности доставки комбинаций терапевтических генов в клетки-мишени на основе двухкассетной экспрессионной плазмиды pBudCE4.1 были впервые получены плазмиды pBud-VEGF-L1CAM, pBud-FGF2-L1CAM, pBud-VEGF-FGF2, pBud-VEGF-GDNF, pBud-GDNF-FGF2, pBud-Oct2-Sox4, которые позволяют одновременно и независимо продуцировать две разные терапевтические молекулы. Уровень экспрессии терапевтических генов в мононуклеарных клетках пуповинной крови после трансфекции плазмидных векторов путём электропорации многократно превышал эндогенную продукцию белка-мишени в нативных клетках.

Полученные нами результаты по трансплантации генетически модифицированных мононуклеарных

клеток крови пуповины мышам SOD1-G93A свидетельствуют о том, что трансплантированные клетки, в зависимости от типа экспрессионного вектора в спинном мозге мышей, могут дифференцироваться в макрофаги, эндотелиальные клетки или астроциты. Так, EGFP-трансфицированные клетки, экспрессирующие репортёрный ген, могут дифференцироваться в клетки микроглии (Iba1⁺) или эндотелиальные клетки (CD34⁺). Другими словами, мононуклеарные клетки крови пуповины реализуют свой эндогенный потенциал, т.е. моноциты дифференцируются в макрофаги, а прогениторные эндотелиальные клетки в эндотелий. При этом после трансфекции плазмидным вектором pBud-VEGF-L1CAM клетки пуповинной крови также дифференцируются в эндотелиоциты. Сверхэкспрессия VEGF и L1CAM в мононуклеарных клетках пуповинной крови человека стимулирует дифференцировку, пролиферацию и выживание прогениторных эндотелиальных клеток в спинном мозге мышей SOD1-G93A. Целесообразность генетической модификации мононуклеарных клеток крови пуповины человека геном нейронной молекулы адгезии L1CAM подтверждается повышенной жизнеспособностью трансплантационных клеток, а геном *vegf* — поддержанием дифференцировки эндотелиальных клеток и его нейропротекторным действием на мотонейроны [43].

Применение плазмидной конструкции pBud-VEGF-FGF2 на разных моделях регенерации также показало обнадеживающие результаты. Так, в опытах по стимулированию регенерации периферического нерва установлено, что прямое введение плазмиды pBud-VEGF-FGF2 в проксимальный и дистальный концы нерва, а также в саму аутонервную вставку, стимулируют регенерацию седалищного нерва крысы и ускоряет восстановление двигательной активности конечности [44]. In vitro клетки HEK293, трансфицированные плазмидами pBud-VEGF-FGF2, секретируют рекомбинантные белки в культуральную среду, которая усиливает пролиферацию эндотелиальных клеток пупочной вены человека по сравнению с культуральной средой клеток, трансфицированных плазмидами, не содержащими ангиогенные гены или включающими лишь один из генов [45]. Ксенотрансплантация мононуклеарных клеток крови пуповины человека, трансфицированных плазмидным вектором pBud-VEGF-FGF2, трансгенным мышам SOD1-G93A обнаружила дифференцировку генетически модифицированных клеток в астроциты (S-100-позитивные клетки) [46]. В отношении терапии бокового амиотрофического склероза известно, что астроциты оказывают нейротрофическое действие на мотонейроны, но их функция также нарушена при данном заболевании [47]. Следовательно, появление в спинном мозге «здоровых» астроцитов будет иметь терапевтический эффект, повышающий устойчивость мотонейронов к апоптозу. Кроме того, увеличение в зоне нейродегенерации концентрации VEGF и FGF2 также будет сдерживать вступление мотонейронов в апоптоз.

Предварительные результаты по ксенотрансплантации пуповинных клеток, трансфицированных двухкассетными плазмидами pBud-GDNF-FGF2, показали, что генетически модифицированные клетки способны к дифференцировке не только в эндотелиоциты, но и в другие типы клеток. Их фенотип еще не в полной мере охарактеризован, однако, тот

факт, что клетки имеют высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков in vitro и выявляются в местах нейродегенерации, позволяет сделать предположение об их паракринном нейротрофическом влиянии на мотонейроны спинного мозга.

Следует также отметить, что генетически модифицированные клетки через две недели после трансплантации трансгенным SOD1-G93A мышам продолжали циркулировать в сосудах кровеносной системы мыши и вне зависимости от типа экспрессионного вектора были выявлены не только в спинном мозге, но и в паренхиматозных органах (лёгких, печени, селезёнке). Причём в большем количестве в течение месяца после трансплантации выявлялись мононуклеарные клетки, трансфицированные плазмидным вектором pBud-VEGF-FGF2. В опытах по ксенотрансплантации мононуклеарных клеток пуповинной крови человека, трансфицированных геном L1CAM мыши, трансгенным SOD1-G93A мышам, генетически модифицированные клетки были обнаружены в спинном мозге через 3 мес. после введения. Этот факт позволяет предположить, что специфичное взаимодействие рекомбинантного белка L1CAM в мембране донорских клеток с нервной тканью реципиента поддерживает выживание пуповинных клеток.

Согласно нашей гипотезе, эффективность доставки терапевтического гена в нервную ткань можно увеличить путём трансфекции мононуклеарных клеток пуповинной крови двухкассетными плазмидными векторами, экспрессирующими нейротрофический фактор и молекулу адгезии нейронов. Предположительно одновременная сверхэкспрессия генов нейротрофического фактора и молекулы адгезии нейронов в генетически модифицированных клетках усилит их адресную миграцию, выживаемость и продолжительность действия нейротрофического фактора на клетки мишени. В условиях применения такой генно-клеточной конструкции можно рассчитывать на более выраженный нейропротекторный эффект трансплантированных клеток.

Однако продолжительность экспрессии плазмидного вектора ограничена, и поэтому наиболее эффективен в этом отношении является вирусный экспрессионный вектор. В настоящее время перспективным в клиническом применении считается аденоассоциированный вирус, безопасный по своим репликативным, инфекционным, иммуногенным и онкогенным свойствам. Сверхэкспрессия генов ростовых фактора на основе аденоассоциированного вируса в мононуклеарных клетках пуповинной крови увеличит продолжительность действия продуцируемых молекул на клетки-мишени. При применении такой генно-клеточной «конструкции» можно контролировать не только продукцию терапевтических генов, но и вирусную инфекцию. Другими словами, генно-клеточная терапия на основе вирусов является более эффективным и безопасным методом по сравнению с прямой генной терапией. В настоящее время нами получены и подготовлены к доклиническим испытаниям генно-клеточные конструкции на основе мононуклеарных клеток пуповинной крови и аденоассоциированных векторов, экспрессирующих ростовые факторы (VEGF165, VEGF121, FGF2), нейротрофические факторы (GDNF, BDNF), молекулы адгезии (L1CAM, NCAM1) и переносчик кислорода нейроглобин (NGB). Применение вирусных векто-

ров позволяет рассчитывать на действие как одного ростового фактора, так и комбинации двух разных ростовых и (или) трофических факторов, что может вызвать более выраженный регенераторный ответ. Предположительно, сверхэкспрессия двух терапевтических молекул может быть более эффективна, чем продукция одного ростового или трофического фактора. Возможность создания бицистронных векторов или трансдукция пуповинных клеток разными векторами могут существенно усилить эффективность генно-клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний.

Наряду с использованием генетически модифицированных клеток, экспрессирующих терапевтические гены, внимание исследователей в последнее время привлекают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (induced pluripotent stem cells, iPS-клетки). J.T. Dimos с соавт. (2008) генерировали iPS-клетки из ткани 82-летней женщины с боковым амиотрофическим склерозом [48]. Полученные iPS-клетки имели свойства эмбриональных стволовых клеток и дифференцировались в холинергические нейроны.

Существующие на сегодняшний день методы дедифференцировки соматических клеток в основном используют ретровирусную систему генетической модификации. Проблема вирусной трансфекции заключается в опасности активации или инактивации некоторых генов с последующей малигнизацией клеток. Поэтому очевидна необходимость разработки биологически безопасных способов репрограммирования клеток, один из которых — использование плазмидных векторов. Учитывая базовый уровень экспрессии генов транскрипционных факторов Oct4, Sox2, cMyc и Klf4 в мононуклеарных клетках пуповинной крови, нами была предложена идея репрограммирования мононуклеарных клеток с помощью плазмидного вектора pBud-Oct2-Sox4. После экспансии клеток *in vitro* ПЦР в режиме реального времени выявила высокий уровень экспрессии исследуемых генов. С помощью плазмидных векторов, экспрессирующих факторы транскрипции Oct4 и Sox2, планируется повысить терапевтический потенциал за счет повышения доли прогениторных и полипотентных клеток. Результаты данного исследования позволят получить мононуклеарную фракцию пуповинной крови человека, обогащенную стволовыми клетками, пригодную для использования в «регенеративной медицине», в частности, для стимулирования нейрорегенерации при боковом амиотрофическом склерозе.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Anderson W.F. September 14, 1990: the beginning. Hum. Gene Ther. 1990; 1(4): 371–2.
2. Lunn J.S., Hefferan M.P., Marsala M. et al. Stem cells: comprehensive treatments for amyotrophic lateral sclerosis in conjunction with growth factor delivery. Growth Factors 2009; 27(3): 133–40.
3. Hester M.E., Foust K.D., Kaspar R.W. et al. AAV as a gene transfer vector for the treatment of neurological disorders: novel treatment thoughts for ALS. Curr. Gene Ther. 2009; 9(5): 428–33.
4. Cartier N., Hacein-Bey-Abina S., Bartholomae C.C. et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. Science 2009; 326(5954): 818–23.
5. Gluckman E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. Exp. Hematol. 2000; 28(11): 1197–205.
6. Gluckman E., Locatelli F. Umbilical cord blood transplants. Curr. Opin. Hematol. 2000; 7(6): 353–7.
7. Laughlin M.J. Umbilical cord blood for allogeneic transplantation in children and adults. Bone Marrow Transplant. 2001; 27(1): 1–6.
8. Ballen K., Broxmeyer H.E., McCullough J. et al. Current status

Заключение

Генетическая модификация мононуклеарных клеток пуповинной крови может быть полезна в трёх аспектах. Во-первых, для повышения жизнеспособности трансплантированных клеток в тканях реципиента. Во-вторых, с целью доставки специфических ростовых и трофических факторов в область регенерации для повышения жизнестойкости переживающих клеток при дегенерации различной этиологии. В-третьих, для направленной дифференцировки трансплантированных клеток в целевых направлениях. Важно отметить, что мононуклеарные клетки пуповинной крови способны проникать через тканевые барьеры, в том числе и гематоэнцефалический. Терапевтические молекулы, транзитивно сверхэкспрессируемые генетически модифицированными клетками, могут влиять на клетки-мишени по аутокринному, паракринному или эндокринному механизму. По аутокринному механизму в отношении трансплантированных клеток с помощью терапевтических генов можно повысить их жизнеспособность, контролировать адресный хоуминг, миграцию и направленную дифференцировку. По паракринному и эндокринному механизму терапевтические молекулы, секретируемые трансплантированными клетками, могут оказывать трофический и нейропротекторный эффект на клетки-мишени в местах дегенерации [46].

Благодарности

Работа частично финансировалась государственным контрактом ФЦП Министерства образования и науки Российской Федерации №16.512.11.2101 и грантом Российского Фонда Фундаментальных Исследований №11-04-00902-а. Работа частично выполнена на оборудовании Регионального центра коллективного пользования физико-химических исследований веществ и материалов (РЦКП ФХИ) и Научно образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

Примечание

Статья этой же научной группы «Стимуляция посттравматической регенерации седалищного нерва крысы с помощью плазмиды, экспрессирующей сосудистый эндотелиальный фактор роста и основной фактор роста фибробластов», опубликованная ранее (Том VI, № 3), частично финансировалась ФЦП Министерства образования и науки РФ № 16.512.11.2101, а не Федеральным агентством по науке и инновациям, как было ошибочно указано.

of cord blood banking and transplantation in the United States and Europe. Biol. Blood Marrow Transplant. 2001; 7(12): 635–45.

9. Chen J., Sanberg P.R., Li Y. et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. J. Cerebr. Circulat. 2001; 32(11): 2682–8.

10. Yang W.Z., Zhang Y., Wu F. et al. Safety evaluation of allogeneic umbilical cord blood mononuclear cell therapy for degenerative conditions. J. Transl Med. 2010; 8:75.

11. Исламов Р.Р., Ризванов А.А., Гусева Д.С. и др. Генная и клеточная терапия нейродегенеративных заболеваний. Клеточная Трансплантология и Тканевая Инженерия 2007; 2(3): 21–37.

12. 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.

13. 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.

14. Al Sabti H. Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *J. Cardiothorac. Surg.* 2007; 2:49.
15. Kano M.R., Morishita Y., Iwata C. et al. VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFRbeta signaling. *J Cell Sci.* 2005; 118(16): 3759–68.
16. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00620217>.
17. Miao H.Q., Soker S., Feiner L. et al. Neuropilin-1 mediates collapsin-1/semaphorin III inhibition of endothelial cell motility: functional competition of collapsin-1 and vascular endothelial growth factor-165. *J Cell Biol.* 1999; 146(1): 233–42.
18. Jin K., Zhu Y., Sun Y. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *PNAS USA* 2002; 99(18): 11946–50.
19. Matsuzaki H., Tamatani M., Yamaguchi A. et al. Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity: signal transduction cascades. *Faseb* 2001; 15(7): 1218–20.
20. Klinge C.M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(14): 2905–19.
21. Lambrechts D., Storkebaum E., Morimoto M. et al. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat. Genet.* 2003; 34(4): 383–94.
22. Ilan N., Tucker A., Madri J.A. Vascular endothelial growth factor expression, beta-catenin tyrosine phosphorylation, and endothelial proliferative behavior: a pathway for transformation? *Lab Invest.* 2003; 83(8): 1105–15.
23. Oosthuysen B., Moons L., Storkebaum E. et al. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat. Genet.* 2001; 28(2): 131–8.
24. Murakami T., Ilieva H., Shiote M. et al. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor is selectively impaired in mice carrying the mutant SOD1 gene. *Brain Res.* 2003; 989(2): 231–7.
25. Li B., Xu W., Luo C. et al. VEGF-induced activation of the PI3-K/Akt pathway reduces mutant SOD1-mediated motor neuron cell death. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2003; 111(1-2): 155–64.
26. 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.
27. Weiss S., Dunne C., Hewson J. et al. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci.* 1996; 16(23): 7599–609.
28. Johansson C.B., Momma S., Clarke D.L. et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999; 96(1): 25–34.
29. Kojima A., Tator C.H. Intrathecal administration of epidermal growth factor and fibroblast growth factor 2 promotes ependymal proliferation and functional recovery after spinal cord injury in adult rats. *J. Neurotrauma* 2002; 19(2): 223–38.
30. Martens D.J., Seaberg R.M., van der Kooy D. In vivo infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 2002; 16(6): 1045–57.
31. Dromard C., Bartolami S., Deleyrolle L. et al. NG2 and Olig2 expression provides evidence for phenotypic deregulation of cultured central nervous system and peripheral nervous system neural precursor cells. *Stem Cells* 2007; 25(2): 340–53.
32. Vergano-Vera E., Mendez-Gomez H.R., Hurtado-Chong A. et al. Fibroblast growth factor-2 increases the expression of neurogenic genes and promotes the migration and differentiation of neurons derived from transplanted neural stem/progenitor cells. *Neuroscience* 2009; 162(1): 39–54.
33. Mudo G., Bonomo A., Di Liberto V. et al. The FGF-2/FGFRs neurotrophic system promotes neurogenesis in the adult brain. *J. Neural. Transm.* 2009; 116(8): 995–1005.
34. Bruckner K., Pasquale E.B., Klein R. Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science* 1997; 275(5306): 1640–3.
35. Chong L.D., Park E.K., Latimer E. et al. Fibroblast growth factor receptor-mediated rescue of x-ephrin B1-induced cell dissociation in *Xenopus* embryos. *Mol. Cell Biol.* 2000; 20(2): 724–34.
36. Naruse M., Nakahira E., Miyata T. et al. Induction of oligodendrocyte progenitors in dorsal forebrain by intraventricular microinjection of FGF-2. *Dev Biol.* 2006; 297(1): 262–73.
37. Lin G., Goldman J.E. An FGF-responsive astrocyte precursor isolated from the neonatal forebrain. *Glia.* 2009; 57(6): 592–603.
38. Hu B.Y., Du Z.W., Zhang S.C. Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 2009; 4(11): 1614–22.
39. 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.
40. Ризванов А.А., Гусева Д.С., Салафутдинов И.И. и др. Генно-клеточная терапия бокового амиотрофического склероза мононуклеарными клетками пуповинной крови человека, трансфицированными генами нейронной молекулы адгезии L1CAM и сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2010; 5(4): 55–65.
41. Chen J., Bernreuther C., Dihne M. et al. Cell adhesion molecule L1-transfected embryonic stem cells with enhanced survival support regrowth of corticospinal tract axons in mice after spinal cord injury. *Neurotrauma* 2005; 22(8): 896–906.
42. 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.
43. Rizvanov A.A., Kiyasov A.P., Gazizov 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 neuro-trophic factors to support neuro-genesis-a novel approach in stem cell therapy. *Neurochem. Int.* 2008; 53(6–8): 389–94.
44. Масгутов Р.Ф., Салафутдинов И.И., Богов А.А. и др. Стимулирование посттравматической регенерации седалищного нерва крысы с помощью плазмиды, экспрессирующей сосудистый эндотелиальный фактор роста и основной фактор роста фибробластов. *Клеточная Трансплантология и Тканевая Инженерия* 2011; 6(3): 67–70.
45. 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; 5(2): 62–7.
46. Rizvanov A.A., Guseva D.S., Salafutdinov I.I. et al. Genetically modified human umbilical cord blood cells expressing vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor 2 differentiate into glial cells after transplantation into amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice. *Exp. Biol. Med.* 2011; 236(1): 91–8.
47. Lepore A.C., Rauck B., Dejea C. et al. Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease. *Nat. Neurosci.* 2008; 11(11): 1294–301.
48. Dimos J.T., Rodolfa K.T., Niakan K.K. et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008; 321(5893): 1218–21.

Поступила 10.01.2012