

УДК 612.015.1:577.152.087

©Коллектив авторов

ГЕННАЯ И ГЕННО-КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

УГРЮМОВ М.В.^{1,2}, ЕРМАКОВ А.С.³, ПОПОВ А.П.¹, ЖДАНОВ Р.И.³

¹Институт Биологии Развития им. Н.К. Кольцова РАН, Россия, Москва,
ул. Вавилова, д. 26

²Институт Нормальной Физиологии им. П.К. Анохина РАМН, Россия, Москва,
ул. Балтийская, д. 8

³НИИ Биологической и Медицинской Химии РАМН, Россия, Москва, ул.
Погодинская, д. 10, тел. (095) 245-0509, факс (095) 245-0857,
эл. почта: genat@ibmh.msk.su

В обзоре рассмотрены современные подходы к лечению нейродегенеративных заболеваний. Нейродегенеративные заболевания возникают в результате дегенерации нервных клеток центральной нервной системы, в результате чего происходит дисбаланс в синтезе нейромедиаторов и как следствие – нарушение координации движений, умственных и мыслительных способностей. Традиционные методы фармакотерапии и нейрохирургического лечения нейродегенеративных заболеваний дают относительно кратковременный положительный эффект. С середины 80-х годов разрабатывается новая технология лечения нейродегенеративных заболеваний – нейротрансплантация, являющаяся частным случаем клеточной терапии с использованием эмбрионального материала. Суть указанного подхода состоит в попытке компенсировать локальный дефицит нейротрансммиттера путем замещения дегенерировавших нейронов в мозге больного, например, дофаминергических нейронов при болезни Паркинсона, гомологичными дифференцирующими нейронами плода человека. В настоящее время одним из наиболее перспективных путей повышения эффективности нейротрансплантации является переход на качественно новый уровень экспериментальной разработки метода нейротрансплантации – сочетание клеточной терапии с модификацией генома пересаживаемых клеток. В статье приводятся краткая характеристика методов генотерапии и поиск оптимальных генно-клеточных подходов при лечении нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: генотерапия, нейродегенеративные заболевания, болезнь Паркинсона.

ВВЕДЕНИЕ. Проблема нейродегенеративных заболеваний стала в последние годы особенно острой в связи с увеличением продолжительности жизни в развитых странах Запада и ростом числа больных, например, в США

более 2 млн. человек страдают нейродегенеративными заболеваниями.

Попытки лечения нейродегенеративных заболеваний методами медикаментозной терапии и классической нейрохирургии не приносят желаемых результатов. В начале 80-х годов для разработки новых подходов к лечению нейродегенеративных заболеваний усилия нейробиологов и клиницистов были сосредоточены на выяснении возможностей компенсации дефицита дофамина в стриатной системе головного мозга, возникающего в результате дегенерации нейронов черной субстанции при одном из распространенных нейродегенеративных заболеваний - болезни Паркинсона. Такого рода дефицит дофамина, наблюдающийся у человека при этой патологии, а в эксперименте на животных при использовании нейротоксина - 6-оксидофамина, приводит к нарушениям двигательной активности. Экспериментальные исследования, проведенные в основном шведской школой (A. Bjorklund, O. Lindvall, P. Brundin), показали, что пересадка эмбриональных дофаминергических нейронов черной субстанции в нигростриатную систему взрослых животных после фармакологически вызванной у них дегенерации дофаминергических нейронов приводит к коррекции как метаболизма дофамина, так и их поведения. Обнадёживающие результаты, полученные на экспериментальной модели болезни Паркинсона, позволили приступить в те годы к активным клиническим испытаниям нейротрансплантации, как новому подходу в лечении нейродегенеративных заболеваний.

Широкий международный интерес к разработке и внедрению в клинику достаточно эффективной (на начальных этапах) пересадки нервной ткани подтверждался созданием специальных национальных и международных программ, обеспечивающих проведение уникальных операций с максимально быстрым и плодотворным обменом полученной информацией.

Новый этап в разработке лечения нейродегенеративных заболеваний знаменует собой возможность использования подходов генно-клеточной терапии, заключающейся в трансплантации клеток различной природы (дофаминергические нейроны, глиальные клетки-астроциты, фибробласты), в которые предварительно были перенесены функциональные гены ростовых (нейротрофических) факторов или гены ферментов синтеза нейромедиаторов.

Появление генной терапии явилось результатом достижений молекулярной генетики и генетической инженерии [1, 2]. Генная терапия предполагает лечение путем введения в ткани или клетки пациента функциональных генов, способных экспрессироваться в клетке и производить необходимый организму белок [3,4].

Первые клинические испытания генной терапии как метода были осуществлены в 1989 г. для генетического маркирования опухолей-инфильтрующих лимфоцитов в случае прогрессирующей меланомы [1]. Первым моногенным наследственным заболеванием, в отношении которого были применены методы генной терапии, оказался наследственный иммунодефицит, обусловленный мутацией в гене аденозиндезаминазы. В 1992 г. приступили к лечению гиперхолестеринемии, гемофилии, в 1993 г. - муковисцидоза, болезни Гоше. К 1995 г. в мире было реализовано уже 100 проектов генотерапии. К концу 1999 г. зарегистрировано 380 клинических протоколов генной терапии, и 3173 пациента имеют в своем теле генетически модифицированные клетки [5], а в настоящее время их число возросло до 396 и 3278 соответственно.

В США созданы десятки центров генной терапии, а также национальные

лаборатории по разработке векторных систем. Успешно работает центр генной терапии при Университете Южной Калифорнии. Во Франции национальный проект «Геном человека» переориентирован на проблемы генной терапии. В Германии в 1995 году правительство выделило 300 млн марок на национальные центры биотехнологии и генотерапии. Центр молекулярной медицины им. М. Дельбрюка в предместье Берлина ориентирован на проблемы генотерапии. В России государственная поддержка проектов по генной терапии осуществляется через программы Миннауки «Геном человека» и «Национальные приоритеты в медицине и здравоохранении».

Технологически генная терапия может проводиться как в культуре клеток (*ex vivo*), так и непосредственно в организме (*in vivo*) [6]. Существуют вирусные и невирусные конструкции для введения генов. Пока эффективность переноса и экспрессии генов у пациентов невысока. В настоящее время разработано значительное число систем для невирусного переноса генов в клетки [5,7,8], в том числе в клетки нервной системы, в частности, на модели глиальных клеток – клеток невриномы гассерова узла крысы [9-11].

Общая характеристика нейродегенеративных заболеваний. Нейродегенеративные заболевания обусловлены дегенерацией определенных отделов центральной нервной системы (ЦНС), что влечет за собой нарушение выработки нейромедиаторов и, в целом, – регуляции ЦНС нормального функционирования организма (координации движений, памяти, мыслительных способностей и т. п.).

В частности, при болезни Альцгеймера происходит дегенерация неокортекса, гиппокампа, субкортикальных ядер. Эта болезнь в значительной степени обусловлена генетически и связана с нарушением синтеза белка – предшественника β -амилоида. В результате этого нарушается формирование нейрофибрилл, что в конечном итоге ведет к гибели нервных клеток и недостаточному синтезу нейротрансмиттеров.

В случае болезни Хантингтона происходит дегенерация стриальных нейронов, что приводит к недостаточному синтезу такого нейромедиатора, как гамма-аминомасляная кислота. На генетическом уровне эта болезнь связана с геном, который так и называется – хантингтин [12].

При болезни Паркинсона происходит дегенерация нейронов дофаминэргической системы, в первую очередь – nigrostriatной. Дегенерация дофаминэргических нейронов черной субстанции приводит к нарушению синтеза дофамина в стриатуме, а в конечном итоге – к выраженным двигательным расстройствам и нарушению координации движений. Считается, что основной причиной паркинсонизма на генетическом уровне является мутация в гене α -синуклеина.

Нейротрансплантация как метод лечения нейродегенеративных заболеваний

В экспериментальных исследованиях нейродегенеративные заболевания изучаются на моделях животных. Например, хорей Хантингтона моделируется путем разрушения участка стриатума животного иботениевой кислотой. При этом наблюдаются изменения в поведении, напоминающие синдромы хантингтонизма [13]. Классической моделью болезни Паркинсона является разрушение области черной субстанции [14,15]. При этом нарушается нормальная выработка в стриатуме дофамина. У таких животных наблюдается «вертячка», индуцируемая амфетамином. Показано, что пересадка дофаминэргических нейронов таким

животным вызывает улучшения двигательной активности и их поведения [14]. Пересадки фетального человеческого вентрального мезенцефалона в стриатум крыс, моделирующих болезнь Паркинсона, показали, что дофаминэргические нейроны приживаются и иннервируют стриатум [16]. Авторы полагают, что пораженные нервные клетки мозга пациентов с болезнью Паркинсона можно заменить эмбриональными нейронами человека.

Эти исследования позволили перейти к клинической нейротрансплантации. Еще в 1985 г. были опубликованы первые положительные результаты лечения болезни Паркинсона пересадкой хромаффинной ткани надпочечников в стриатум больных [17]. В последующие годы был опубликован ряд работ, посвященных разработке методов нейротрансплантации. В частности, было показано, что если пациентам с болезнью Паркинсона пересадить эмбриональный мезенцефалон от зародышей 8-9 недель развития, то происходит улучшение состояния больных, особенно на контрлатеральной пересадке стороне тела [18]. Использование позитронно-эмиссионной томографии выявило активное включение меченого 6-L-(¹⁸F)-ДОФА структурами мозга в области трансплантации. Было показано, что включение 6-L-(¹⁸F)-ДОФА в течение года в эту область мозга возрастает, тогда как с неоперированной стороны происходит дальнейшая дегенерация нервных клеток [19].

Российская научно-исследовательская группа (координатор - проф. М.В. Угрюмов), объединяющая многопрофильный коллектив специалистов, с 1992 года включена в Европейскую программу по клинической трансплантации - «NECTAR» (Network of European CNS Transplantation and Restoration), а также - в Госпрограмму «Здоровье населения России». В течение шести лет Российская группа специалистов NECTAR на базе Института нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко РАМН успешно провела 13 операций по пересадке клеточной суспензии вентрального мезенцефалона плодов человека при болезни Паркинсона [20]. Технология операции схематически представлена на рис. 1 и включает следующие основные этапы: а) получение плодов человека в возрасте от 6 до 11 недель в результате легальных аборт, б) приготовление клеточной суспензии вентрального мезенцефалона, в) стереотаксическое введение суспензии в нигростриатную систему больного по заранее рассчитанным координатам. С помощью позитронно-эмиссионной томографии по включению меченого 6-L-(¹⁸F)-ДОФА продемонстрировано усиление метаболизма дофамина в нигростриатной системе больных уже через несколько месяцев после операции, что, очевидно, обусловлено дифференцировкой трансплантированных нейронов и их интеграцией с мозгом реципиента. После нейротрансплантации ряду больных была проведена иммуносупрессорная терапия на базе циклоспорина А. Целесообразность иммуносупрессии обусловлена механическим повреждением гемато-энцефалического барьера в момент введения в мозг канюли с клеточной суспензией и проникновением в мозг иммунокомпетентных клеток реципиента, а также экспрессией антигенов гистосовместимости клетками имплантируемой суспензии, что может являться потенциальным триггером иммунной реакции и угрозой возможного отторжения трансплантата. Хотя вопрос о возможности отторжения трансплантата в мозгу реципиента до сих пор остается нерешенным, что объясняет отсутствие единой стратегии в ее профилактике.

Таким образом, накопленный опыт по использованию нейротрансплантации при лечении болезни Паркинсона свидетельствует, что

унилатеральная трансплантация практически атравматична и не сопровождается послеоперационными осложнениями. Трансплантация эмбриональных нейронов приводит к улучшению общего состояния и показателей двигательной активности больных, к повышению уровня метаболизма дофамина в мозге и повышению эффективности традиционной фармакотерапии L-ДОФА-содержащими препаратами.

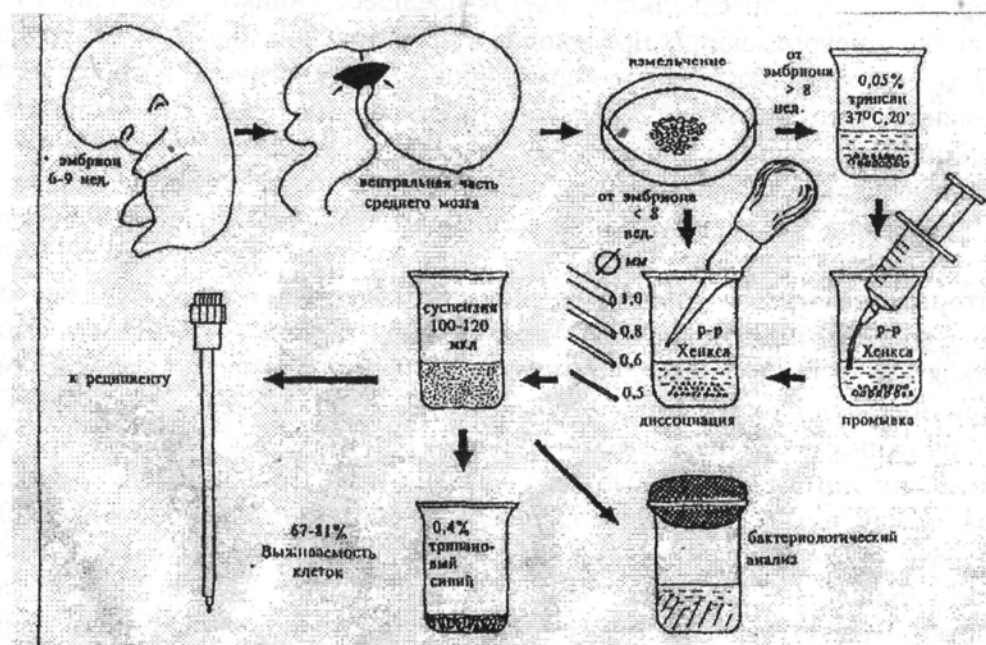


Рисунок 1

Схема получения материала для нейротрансплантации (из 20).

Однако при более длительных сроках наблюдения за прооперированными больными (от 3 до 6 лет) реальной положительный эффект нейротрансплантации составлял до 30 % от проведенных операций с учетом комплементарности этого метода с традиционными подходами (фармакотерапия, таламотомия и др.). Возможно, снижение положительного клинического эффекта трансплантации связано с недостаточным количеством трансплантированных и прижившихся эмбриональных нейронов в стриатной системе мозга реципиентов. Выход из сложившейся ситуации может быть связан с поиском путей повышения выживаемости пересаживаемых эмбриональных дофаминергических нейронов, стимуляцией их дифференцировки, а также пересадкой эмбриональных клеток с модифицированным геномом. Поэтому в настоящее время приостановлены клинические испытания нейротрансплантации и поиски переведены на экспериментальный уровень с привлечением фундаментальных научных решений на генно-инженерном уровне. В перспективе нейробиологические аспекты пересадки эмбриональных дофаминергических нейронов при нейродегенеративных заболеваниях требуют внедрения достижений современной клеточной и молекулярной биологии [21]. Сочетание классической нейротрансплантации с методами генотерапии - один из возможных выходов в сложившейся ситуации.

В настоящее время фундаментальные аспекты нейротрансплантации интенсивно изучаются. Определены оптимальные условия приживления нервной ткани донора в мозге реципиента и достижения желаемого функционального эффекта [22]. Показано, что одним из основных лимитирующих факторов является возраст донора. Оптимальный возраст соответствует моменту окончания пролиферации нейроэпителиальных клеток-предшественников нейронов (что у плацентарных млекопитающих происходит в пренатальном периоде). В это время нейроны хотя и обладают высокодетерминированной генетической программой и максимальной потенцией к росту отростков, но выход нейронов в дифференцировку еще находится на начальном этапе и между ними не устанавливаются межнейрональные специфические связи, то есть существует гарантия минимальной травматизации нейронов с отростками и, следовательно, меньшей их гибели при пересадке.

Вторым важным условием, от которого зависит исход трансплантации, является способ подготовки нервной ткани донора. Пересадка может осуществляться в виде небольших кусочков ткани, либо в виде клеточной суспензии или культуры клеток. В первом случае достигается очень высокий уровень приживаемости пересаженных нервных структур, однако при этом затруднена их интеграция с мозгом хозяина из-за образования глиальных барьеров между ними. Во втором случае, выживаемость нейронов несколько меньше, зато наблюдается максимальная интеграция с мозгом хозяина, так как глиальные рубцы на границе клеточный трансплантат - мозг реципиента практически отсутствуют. В третьем случае, нарушаются сформировавшиеся нейрональные связи, что приводит к повреждению отростков и гибели большего числа нейронов.

Показано, что отторжение трансплантата обычно обуславливается: 1) механическим повреждением гематоэнцефалического барьера в результате трансплантации; 2) экспрессией генов гистосовместимости клетками трансплантируемой эмбриональной нервной ткани; 3) наличием собственной иммунной системы мозга. Трансплантация нервной ткани, особенно ксенотрансплантация, должна сопровождаться иммуносупрессией кортикостероидами и циклоспорином А. Лучшая приживляемость трансплантата в случае иммуносупрессии была показана в модельных экспериментах по пересадке крысам фетального мезенцефалона от мыши [23].

Выживаемость нервной ткани донора зависит от конкретного места пересадки в мозг хозяина. Очень важным условием является прорастание сосудов мозга хозяина в трансплантат, благодаря чему обеспечивается трофика пересаженной ткани. Приживляемости нервной ткани донора и дифференцировке его нейронов может способствовать введение трансплантата в заранее подготовленную в мозге хозяина полость. Оптимальным местом для пересадки являются желудочки мозга. Трансплантация различных отделов гипоталамуса используется как для изучения фундаментальных аспектов развития этой уникальной области мозга, так и в интересах клиники с целью компенсации регионального дефицита нейрогормонов.

В настоящее время стало очевидным, что применяемый сейчас традиционный подход использования клинической нейротрансплантации при лечении нейродегенеративных заболеваний имеет существенные ограничения и нуждается в развитии.

Для клинических целей нейротрансплантацию чаще всего используют в лечении болезни Паркинсона, хореи Хантингтона и травм спинного мозга. Наибольший опыт накоплен в случае лечения болезни Паркинсона, которая развивается в результате спонтанной дегенерации дофаминэргических нейронов в черной субстанции и возникающего при этом локального дефицита дофамина в стриатуме. Установлено, что трансплантированные дофаминэргические нейроны выживают в мозге реципиента, дифференцируются и начинают синтезировать дофамин. Однако следует отметить, что в ряде случаев операция приводит лишь к относительно кратковременному улучшению состояния больного.

Эффект операции может быть улучшен как за счет увеличения количества пересаживаемого материала, так и за счет обработки трансплантата ростовыми (нейротрофическими) факторами, которые способны увеличивать выживаемость нейронов [24]. Большое значение имеет открытие роли нейрональных ростовых факторов в подавлении нейродегенеративных процессов, на основе которого предлагается использовать ростовые факторы для лечения нейродегенеративных заболеваний [25]. На макаках резус было показано, что пересадки холинэргических областей переднего мозга ведет к повышению концентрации нейронального ростового фактора и синтеза белка-предшественника β -амилоида. Установление этого факта важно для возможного лечения болезни Альцгеймера. Большой выживаемости человеческих нейронов в культуре способствует нейротрофический глиальный фактор GDNF [26]. Вместе с тем успех в лечении нейродегенеративных заболеваний может быть достигнут за счет применения методов генной терапии.

Доставка генов при терапии заболеваний нервной системы.

Остановимся на примерах разработки подходов генной терапии для лечения болезней нервной системы. В последние годы сформировались два основных подхода генной терапии в лечении заболеваний нервной системы: направленное введение генов путем использования систем доставки и непосредственной инъекции в ткань и ненаправленный перенос генов путем трансплантации генетически модифицированных клеток или инокулятов рекомбинантных вирусов [27]. В работе проводилась инъекция плазмиды, несущей ген β -gal, в мозг молодых мышей в сочетании с липочастицами или кальций-фосфатной преципитацией. Спустя 9 дней после экспериментального воздействия в клетках той области мозга, где производилась инъекция, выявлялась экспрессия гена β -галактозидазы [28]. На крысиной модели рака мозга производили инъекцию липосом, содержащих ген тимидинкиназы вируса герпеса, с последующей обработкой ганцикловиром [29].

Первые попытки создания систем доставки генов *in vivo* были сделаны еще с начала 80-х годов [30]. Было показано на крысах, что после внутривенного введения липосом, содержащих ген препроинсулина 1, наблюдается экспрессия этого гена в печени.

Особенно следует упомянуть о векторах на основе вируса простого герпеса. Его уникальной особенностью является выраженная тропность к клеткам нервной системы [31]. Поэтому можно полагать, что такие векторы перспективны для лечения опухолей мозга, болезни Паркинсона и других заболеваний нервной системы. В работе [32] разработана генетическая конструкция, в которой

объединены достоинства вируса герпеса (тропность к клеткам нервной ткани, высокую вместимость) и аденоассоциированных вирусов (высокая способность интегрироваться в геном). С помощью этой конструкции с высокой эффективностью осуществляется трансфекция клеток глиомы человека U87.

Генная и генно-клеточная терапия и нейродегенеративные заболевания

По-видимому, большие перспективы имеет сочетание методов генной и клеточной терапии, т.е. трансплантация клеток, предварительно «нагруженных» генетическими конструкциями.

Логическим продолжением двух передовых подходов медицины XX века – классической трансплантации и генной терапии является их объединение и появление генно-клеточной терапии [33]. При этом предполагается пересаживать клетки или кусочки ткани, предварительно «нагруженные» генными конструкциями.

В работе Uchida и Тоуа рассмотрены перспективы так называемой "graft-gene therapy", то есть сочетания классической трансплантации кусочков фетальной ткани мозга с методами генетической трансфекции [33]. Технология такого подхода довольно проста [34, 35]. Сначала получают культуру клеток из той области нервной системы, которую необходимо трансплантировать. Затем производят трансфекцию этой культуры с помощью конструкции, несущей необходимый функциональный ген. Наконец, на заключительном этапе производят трансплантацию таких клеток в мозг. (рис. 2). Используются две основных группы вводимых генов. В случае лечения нейродегенеративных заболеваний вводятся конструкции либо с геном ростового фактора, либо – с геном фермента, влияющего на синтез нейромедиатора (рис. 3) В случае компенсации недостатка синтеза дофамина вводят ген тирозингидроксилазы.

Сходные подходы разрабатываются группой ученых под руководством F. Gage по отношению к стволовым нейрональным клеткам [36]. Показано, что, используя те или иные сигнальные молекулы, можно управлять дифференцировкой стволовых клеток. Установлено участие ростового фактора FGF-2 в активации дифференцировки по нейральному типу [37].

В настоящее время при разработке генно-терапевтических методов лечения нейродегенеративных заболеваний рассматриваются возможности как классических систем адресной доставки, так и генно-клеточные технологии. Одним из возможных подходов к лечению нейродегенеративных заболеваний является использование антисмысловых нуклеиновых кислот, в частности, этот подход предлагается использовать для лечения болезни Хантингтона [38].

Другой предлагаемый подход для лечения нейродегенеративных заболеваний – использование вирусных векторов, несущих ген, способный скорректировать заболевание. Так, в случае болезни Паркинсона предлагается вводить ген тирозингидроксилазы – одного из ферментов синтеза дофамина, синтез которого при этом заболевании недостаточен. На моделях животных с паркинсонизмом было показано, что инъекция векторов на основе аденоассоциированных вирусов, несущих ген тирозингидроксилазы в стриатум, удается получить синтез этого фермента *de novo*. В основном, синтез фермента идет в нейронах, незначительно, частично, – в глиальных клетках [39].

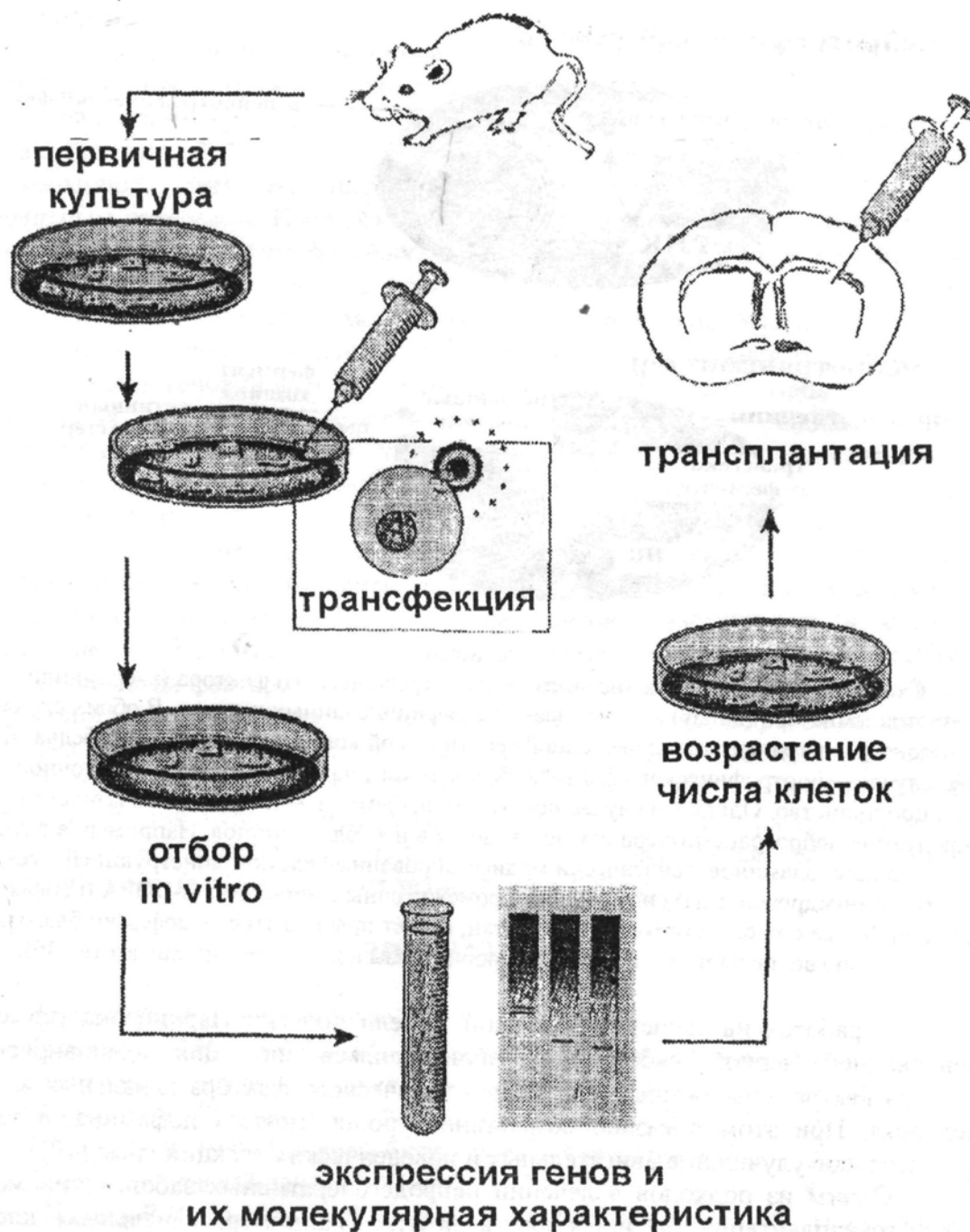


Рисунок 2.

Схематическое изображение пересадки клеток, предварительно трансфицированных.

Первичные клетки (например, фибробласты кожи), получают из биоптата и культивируют. Когда количество клеток достаточно увеличится, клетки генетически модифицируются (показан метод липофекции). После селекции определяется экспрессия. Модифицированные клетки культивируются, а потом, когда нарастет необходимое количество, трансплантируются (из 36).

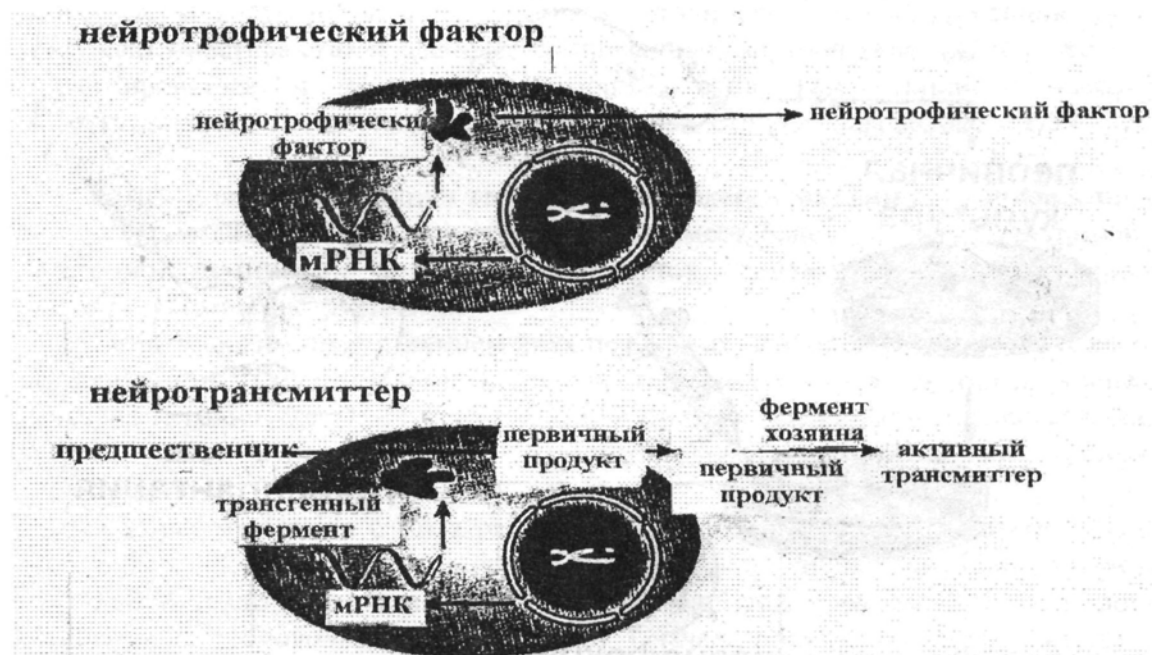


Рисунок 3.

Схематическое изображение синтеза нейротрофического фактора (вверху) или нейротрансмиттера (внизу) в генетически модифицированных клетках. В обоих случаях, происходит транскрипция введенной генетической конструкции, и синтез белка. В случае нейротрофического фактора, белок затем секретируется во внеклеточное пространство. Однако, в случае некоторых нейротрансмиттеров, окончательная продукция нейротрансмиттера осуществляется в несколько этапов. Например, в случае синтеза катехоламинов, генетически модифицированные клетки (конструкцией с геном тирозингидроксилазы) синтезируют промежуточный метаболит L-DOPA (первая стадия). Когда она секретируется из клетки, может превращаться в дофамин благодаря наличию во внеклеточной среде декарбоксилазы ароматических кислот (из 36).

В работах на экспериментальной модели болезни Паркинсона (крысы с денервацией черной субстанции) производилась инъекция аденовирусного вектора вектора, содержащего ген нейротрофического фактора глиальных клеток человека. При этом показано возрастание уровня синтеза дофамина, а также значительное улучшение двигательных и поведенческих реакций крыс [40].

Одним из подходов в лечении нейродегенеративных заболеваний может быть трансплантация не нейронов, а других (например, глиальных) клеток, «нагруженных» генами ростового фактора. Как показано в работе [41], культура клеток астроцитов человека может быть трансдуцирована с помощью ретровирусного вектора, несущего ген нейронального ростового фактора. При этом наблюдается высокая степень экспрессии мРНК и секреция биологически активного ростового фактора (41 нг в день на каждые 10000 клеток).

Конкретным приложением такой методики было применение векторов на основе адено-ассоциированных вирусов, несущих ген трофического фактора и маркерный ген, для трансфекции фетального материала для трансплантации, что может серьезно увеличить шансы на выживаемость нейронов [42]. Полученные результаты могут открыть значительные перспективы в лечении болезни

Хантигтона и Паркинсона.

В работе Aebischer с соавторами [43] была произведена трансфекция почечных клеток детенышей хомячка вектором, несущим ген цилиарного нейротрофического фактора. Установлено, что этот фактор синтезируется в клетках. Клетки были заключены в полимерные капсулы, затем имплантированы в люмбарное интратекальное пространство больных амиотрофическим латеральным склерозом. Наблюдалась активность нейротрофического фактора в спинномозговой жидкости больных вплоть до 15 месяца после имплантации. Однако, добиться излечения не удалось.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Итак, можно выделить несколько основных направлений в генотерапии нейродегенеративных заболеваний. Первое связано с разработкой систем доставки генов *in vivo*. При этом предполагается вводить гены ферментов, участвующих в синтезе недостающего нейромедиатора. Однако, более перспективным, по мнению большинства исследователей, представляется второе направление - объединение генной терапии и нейротрансплантации, т. е. генно-клеточная терапия.

При всем разнообразии работ по трансфекции клеток перед трансплантацией, можно выделить несколько основных подходов. В основном, это введение конструкций с генами ферментов, участвующих в синтезе недостающего медиатора, а также введение конструкций с генами нейротрофических факторов. Одним из подходов в лечении нейродегенеративных заболеваний может быть также трансплантация не нейронов, а других (например, глиальных клеток или фибробластов), «нагруженных» генами ростового фактора.

В настоящее время уже проводятся клинические испытания генно-клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний. Несмотря на временные трудности, есть все основания полагать, что генно-клеточная терапия станет одной из ведущих биомедицинских технологий в XXI веке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Anderson W.F. (1992). Science. 256. P.808-813.
2. Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. — СПб. — (1997). — 287 с
3. Xantopoulos. Gene therapy. — NATO ASI. — (1997). — 223p.
4. Жданов Р.И. 1999. Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. — (1999). 4. 3-6.
5. Жданов Р.И., Хусаинова Р.С., Иваницкий Г.Р., Борисенко А.С. Невирусные векторы в генной терапии. Новый подход в липофекции. (2000). Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. 1, 10-17.
6. Strauss M, Barranger J. Concepts in gene therapy. — N.Y. — (1997). — 553 p.
7. Подобед О.В., Жданов Р.И. Генный перенос с помощью невирусных векторов на основе поликатионов и гидрофобных поликатионов в целях генной терапии. (1999). Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. 4.
8. Lasic D.D. Liposomes in gene delivery. — Boca Raton. — (1997).
9. Жданов Р.И., Куценко Н.Г., Подобед О.В., Бунеева О.А., Цветкова Т.А., Коневец Д.Н., Власов В.В. (1998). Докл. РАН. 361. 5. 695-699.
10. Жданов Р.И., Подобед О.В., Куценко Н.Г., Бунеева О.А., Цветкова Т.А.,

- Гурьев С.О., Лавренова Т.П., Серебренникова Г.А., Константинова И.Д., Маслов М.А. (1998). Докл. РАН. 362. 4. 557-560.
11. Мурзина Т.А., Ермаков А.С., Кривцов Д.Г., Бронова Д.Д., Власов В.В. Перенос функциональных генов в глиальные клетки (невриномы гассерова узла крысы) с помощью хитозанов и холестеринавых производных олигоэтиленimina. – Тез. Докл. Актуальные проблемы нейробиологии. – (1999). – С. 85-88.
 12. Emerich D.F., Wimm S.R., Hantraye P.M., Peschanski M., Chen E.Y. Chu Y., McDermott P., Baetge E.E., Kordower J.H. (1997). *Nature*. 386(6623). 395-399.
 13. Isacson O., Brundin P., Kelly P.A., Gage F.H., Bjorklund A. (1984). *Nature*. 311(5985). 458-460.
 14. Brundin P., Strecker R.E., Lodos E., Bjorklund A. (1987). *Exp. Brain Res.* 69(1). 183 – 194.
 15. Brundin P., Isacson O., Gage F.H., Prochiantz A., Bjorklund A. (1986). *Brain Res.* 366(1-2). 346 – 349.
 16. Brundin P., Nilsson O.G., Strecker R.E., Lindvall O., Astedt B., Bjorklund A. (1986). *Exp. Brain Res.* 65(1). 235-240.
 17. Backlund E.O., Granberg P.O., Hamberger B., Knutsson E., Martensson A., Sedvall G., Seiger A., Olson L. (1985). *J. Neurosurg.* 62(2). 169-173.
 18. Lindvall O., Brundin P., Widner H., Rehncrona S., Gustavii B., Frackowiak R., Leenders K.L., Sawle G., Rothwell J.C., Marsden C.D. et al. (1990). *Science*. 247(4942). 574-577.
 19. Sawle G.V., Bloomfield P.M., Bjorklund A., Brooks D.J., Brundin P., Leenders K.L., Lindvall O., Marsden C.D., Rehncrona S., Widner H. et al. (1992). *Ann. Neurol.* 31(2). 166-173.
 20. Угрюмов М.В., Шабалов В.А., Федорова Н.В., Попов А.П., Шток В.Н., Сотникова Е.И., Меликян А.Г., Гатина Т.А., Фетисов С. О., Архипова Н.А., Буклина С.Б., Луценко Г.В. (1996). *Вестник РАМН* 8. 40-51.
 21. Виноградова О.С. (2000). *Журн. ВНД*. № 5(в печати)
 22. Угрюмов М.В. *Механизмы нейроэндокринной регуляции*. – М.: Наука, (1999).
 23. Brundin P., Nilsson O.G., Gage F.H., Bjorklund A. (1985). *Exp. Brain Res.* 60(1). P.204-208.
 24. Zawada W.M., Kirschman D.L., Cohen J.J., Heidenreich K.A., Freed C.R. (1996). *Exp. Neurol.* 140(1). 60-67.
 25. Tuszynski M.H., Smith D.E., Roberts J., McKay H., Mufson E. (1998). *Exp. Neurol.* Dec; 154(2). 573-582
 26. Clarkson E.D., Zawada W.M., Freed C.R. (1997). *Cell Tissue Res.* 289(2). 207—210.
 27. Ridet J.-L., Privat A. (1995). *J. Neurosci. Res.* 42. 287-293.
 28. Ono T., Fujino Y., Tsuchiya T, Tsuda M. (1990). *Neurosci. Lett.* 117. 259-263.
 29. Berger F., Vicat J.M., Laine M., Crapari D., Chen H., Amalfitano G., Brunei J.F., Molin L., Nissour M.F., Verna J.M., Benabid A.L. (1994). 1994. *Soc. Neurosci. Abstr.* V.20. 1784.
 30. Nicolau C., Le Pape A., Sorjano P., Fargette F., Juhel M.F. (1983). 1983. I. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 80. 1068-1072.
 31. Breakfield X.O., DeLuca N.A. (1991). *New Biol.* № 3. 203-218.
 32. Johnston K.M., Jakoby D., Pechan P.A., Fraefel C., Borghesani P., Schuback

- D., Dunn R.J., Smith F.I. and Breakefield X. (1997). Human Gene Therapy. 8. 359-370.
33. Куликов А.В., Жданов Р.И. (2000). Вopr. биол. мед. и фармацевт. хим. 1. 42-47.
 34. Uchida K., Toya S. (1996). Keio J. Med. – 1996. 45(2). 81-89
 35. Freedmann T. (1994). TIG. V. 10. 6. 210-214
 36. Gage F. (1991). TINS. V. 14. 8.
 37. Shihabuddin L.S., Jasodhara R., Gage F.H. (1999). Arch. Neurol. 56. 29-32
 38. Palmer T.D., Markakis E.A., Willhoit A.R., Safar F., Gage F.H. Fibroblast. (1999). J. Neurosci. 19(19). 8487-8497
 39. Haque N., Isacson O. (1997). Exp. Neurol. 144(1). P. 139-146
 40. Kaplitt M.G., Loewy A.D. Viral vectors. Gene therapy and neuroscience applications. – (1995). – USA. – San Diego: Acad. Press. – 486p.
 41. Lapchak P.A., Araujo D.M., Hilt D.C., Sheng J., Jiao S. (1997). Brain Res. Nov 28. 777(1-2). 53-160
 42. Lin Q., Cunningham L.A., Epstein L.G., Lechan P.A., Short M.P., Fleet C., Bohn M.C. (1997). Hum. Gene Ther. Feb 10. 8(3). 331-339
 43. Mittoux V., Ouary S., Monville C., Lisovski F., Conde F., Brouillet E., Trembleau A., Peschanski M. and Hantraye P. (1999). Int. Congr. Soc. for Neurosci. V. 25. P. 1010.
 44. Aebischer P., Baetge E.E., Regli F., Kato A.C., Zurn A.D., Hammang J.P., Goddard M., Heyd B., Hirt L., Joseph J.M., Deglon N., Schluep M. I. (1996). Nat. Med. 2(6). 696-699

Поступила 16.04.00.

GENE AND GENE-CELL THERAPY AND NEURODEGENERATIVE DISEASES

M.V. UGRUMOV^{1,2}, A.S. YERMAKOV³, A.P. POPOV,¹ R.I. ZHDANOV³

¹Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Russia, Moscow, Vavilova str., 26

²Anokhin Institute of Normal Physiology, Baltiyskaya str., 8, Moscow, Russia

³Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences
Russia, 119832, Moscow, Pogodiskaya str., 10

The modern methods of the treatment of the neurodegenerative diseases are considered. Neurodegenerative diseases originate due to the degeneration of the neuronal cells of central nervous system that leads to imbalance of the neurotransmitter synthesis and, as a consequence, movement disorders and mental disabilities. Traditional methods of pharmacotherapy and neurosurgery give short-term effect. Since 1980 neurotransplantation was developed as a new technology for the treatment of the neurodegenerative diseases. This approach represents a case of cell therapy being used for transplantation of the human fetal material. Cell transplantation compensates the local deficiency of the neurotransmitter level by substitution of degenerated neurons of patient's brain (e.g. dopaminergic neurons). Gene-cell conjunction of cell therapy with modification of genome of transplanted cells is the most perspective approach to increase an efficiency of neurotransplantation. Short description of gene therapy approaches and a search for optimal gene-cell protocols for therapy of neurodegenerative diseases are presented in this paper.

Key words: gene therapy, neurodegenerative diseases, Parkinson's disease.