

УДК 591

ТРАНСГЕННЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ, СИНТЕЗИРУЮЩИЕ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ, И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В ТЕРАПИИ

© 2012 г. Г. В. Павлова², Н. Н. Канайкина¹, Д. Ю. Пантелеев¹, В. Е. Охотин¹, А. В. Ревущин²

¹ Учреждение Российской Академии Наук Институт биологии гена РАН
117984 Москва, ГСП-1, ул. Вавилова, д. 34/5

² ООО “Институт медицины и трансплантации клетки”
105082 Москва, ул. Большая Почтовая, д. 36, стр. 5

E-mail: lkorochkin@mail.ru

Поступила в редакцию 12.10.10 г.

Окончательный вариант получен 27.07.11 г.

В лаборатории нейрогенетики и генетики развития Института биологии гена РАН под руководством член-корр. РАН Л.И. Корочкина на протяжении многих лет проводились исследования проблем, связанных с развитием нервной системы, дифференцировкой нервных клеток и возможностями применения генных и клеточных технологий для лечения нейродегенеративных заболеваний. Результаты этих исследований, подтверждают перспективность применения трансгенных нейротрофических факторов и белков теплового шока в качестве нейропротекторов в клеточной терапии. Показана перспективность применения промотора гена белка теплового шока HSP70 дрозоды для создания терапевтических трансгенных конструкций. Дальнейшее совершенствование техники невирусного переноса терапевтических генов и создание многокомпонентных генетических конструкций, которые содержат несколько терапевтических факторов, усиливающих действие друг друга, позволят создавать эффективные клеточные препараты для лечения нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: эмбриональные нейральные клетки дрозоды, нейральная дифференцировка, глиальный рубец, трансплантация, спинальный ганглий, нейротрофические факторы, трансгенные клетки.

В лаборатории нейрогенетики и генетики развития Института биологии гена РАН под руководством член-корр. РАН Л.И. Корочкина на протяжении многих лет проводились исследования проблем, связанных с развитием нервной системы и дифференцировкой нервных клеток, а также потенциалом стволовых/прогениторных клеток и возможностями их применения для лечения нейродегенеративных заболеваний. Первое упоминание понятия “стволовая клетка” можно отнести к 1908 году, когда А.А. Максимов предложил концепцию стволовой клетки для кровяной ткани. За более чем 100 лет исследователи дали определение эмбриональной стволовой клетке (Stevens, 1970), затем обнаружили, что существуют региональные стволовые клетки, и в конечном итоге была составлена ныне существующая классификация видов стволовых клеток. Новый интерес к данному направлению был спровоцирован обнаружением стволовых клеток в головном мозге млекопитающих, включая человека. Появилось предположение о возможности использования стволовых клеток для введения их в зону пораженного органа человека в целях замещения погибших клеток и/или повышения жизнеспособности клеток окружающей ткани. В 1998 г. была осуществлена пересадка нейральных ство-

ловых клеток человеку после инсульта, а в 2001 г. Филипп Менаш произвел пересадку аутологичных скелетных миобластов больному с инфарктом миокарда (Pouzet et al., 2001). С этого момента начался новый этап исследований, связанных с использованием стволовых и прогениторных клеток в регенеративной медицине. Л.И. Корочкин с сотрудниками своей лаборатории, а также в сотрудничестве с другими российскими и зарубежными лабораториями принял активное участие в развитии этого перспективного направления. Исследования головного мозга позволили ему сделать предположение, что нейрогенез клеток-предшественников зависит от трех условий: 1) от экспрессии собственных генов и от экспрессии генов окружающих клеток; 2) от ниши, в которой поддерживается стволовой статус клетки (эффект ниши); 3) от гормонального статуса организма. Корочкиным был предложен новый принцип выбора пути дифференцировки прогениторными клетками, так называемый “принцип качелей” (Корочкин, Михайлов, 2000). Схема клеточной дифференцировки по Уолдингтону основана на последовательном и однонаправленном сужении перспективных потенций, тогда как Л.И. Корочкин предложил модель ступенчатого

выбора направления дифференцировки, назвав его принципом “качелей”. Каждая клетка-предшественник по его теории, опираясь на три вышеописанных условия, выбирает свой путь не прямолинейно, а испытывая колебания в начале каждого этапа развития с последующим сужением набора экспрессируемых тканеспецифичных генов (Корочкин, Михайлов, 2000). Клетка дочерняя по отношению к нейральной стволовой, выйдя из ниши некоторое время экспрессирует маркеры как глиальных так и нейрональных предшественников. Затем, выбрав нейрональный путь развития, она прекращает экспрессию глиальных маркеров, став нейробластом. По окончании миграции, в начале этапа окончательной дифференцировки нейробласт может снова испытывать колебания экспрессии генов. На ранних стадиях дифференцировки в нейрональном прогениторе активны системы генов, которые ответственны за формирование нейронов различных типов. При этом клетка вступает во взаимодействие с ближним и дальним окружением, которые влияют на дифференцировку и блокируют активность “ненужных” генетических каскадов, за исключением одного, который и необходим для конкретного типа нейронов. Например, дифференцирующийся в аденоэргическом направлении нейробласт сначала содержит как мРНК, кодирующую белок, свойственный этому типу нервных клеток, так и мРНК, обслуживающую холинэргический путь развития, и только в конце процесса дифференцировки ферменты холинэргического каскада исчезают (Корочкин, Михайлов, 2000). Корочкин неоднократно подчеркивал огромную роль в управлении дифференцировкой ключевых генов, от которых зависит специфика развития определенной ткани или органа (“гены-господа” по Корочкину), которые запускают каскады структурных генов (“гены-рабы” по Корочкину), обеспечивающих синтез тканеспецифичных белков (Корочкин, 2004). Очевидно, что индивидуальное развитие регулируется иерархически организованной системой генов. Таким образом, изменение экспрессии ключевого гена может изменить дифференцировку не только клетки, но и всей ткани. На основании изложенных выше теоретических предпосылок в лаборатории Л.И. Корочкина была выделена новая аллель гена *Notch* – *Notch*^{84k35}, специфическим морфогенетическим проявлением которого является нейрогенная трансформация не только вентральной, но и дорзальной эктодермы (Kogochkin, et al., 1991; Ivanov et al., 1993). В результате этого вся эктодермальная закладка трансформируется в нервную ткань. Гигантская нервная система мутантных эмбрионов *Notch*^{84k35} позволяет использовать их в экспериментах по трансплантации с минимальной долей клеток других гистотипов (Ivanov et al., 1993).

При исследовании межклеточных взаимодействий и процессов развития нервной системы успешно используются методы ксенопластических трансплантаций. Однако в большинстве работ такого рода применяются трансплантации между видами, принадлежащими к одному роду или семейству. До настоящего времени была предпринята только одна попытка совместить нейральные закладки филогенетически удаленных организмов, которые характеризуются разными стратегиями поведения (Савельев, Корочкин и др., 1990). В этой работе провели трансплантацию нервной ткани дрозофилы в мозг амфибий для исследования дифференцировочного потенциала донорской ткани. В качестве донорской ткани использовали вентральную нейрогенную закладку мутантов *Notch Drosophila melanogaster*. В качестве реципиентов были использованы зародыши сибирского углозуба *Hynobius keyseplingi* и шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* на ст. 20–22 и ст. 20–23 соответственно. Гистологический анализ показал, что в большинстве случаев трансплантат локализовался в полости III-го желудочка головного мозга амфибий, прошедших метаморфоз. Лучшее всего трансплантаты выживали и дифференцировались в нервной трубке зародыша сибирского углозуба. В желудочках мозга трансплантированные клетки нейральной закладки дрозофилы дифференцировались и образовывали несколько типов морфологических структур. Наиболее характерным было формирование в трансплантате выраженного нейропиля. Нейропил образывали отростки, выходящие из небольших скоплений клеток. Как во внутренней части, так и на краях трансплантатов возникали ганглиеподобные структуры. Отдельные клетки трансплантата проникали в мозг реципиента и дифференцировались. При этом нервные клетки дрозофилы сохраняли заданные генотипом морфологические особенности (Корочкин, 1992; Савельев и др., 1991; Савельев, Корочкин и др., 1990). У лягушек, обладающих химерным мозгом, повышалась способность к обучению в тесте на выход из лабиринта (Савельев и др., 1991; Saveliev et al., 1997).

Успешные ксенотрансплантации клеток дрозофилы в мозг амфибий стимулировали эксперименты по трансплантации их в мозг млекопитающих – мышей и крыс. Прежде всего, было необходимо разработать простой и эффективный метод идентификации клеток дрозофилы в мозге реципиента. Для этой цели в линии дрозофилы, используемые для ксенотрансплантации и содержавшие мутантные гены *Notch* или *Delta* (с идентичным эффектом на процессы нейрогенеза у мухи), методом микроинъекций в развивающиеся яйца была введена конструкция с геном бактериальной галактозидазы (*lacZ*), продукт которого может быть выявлен с помощью специальной

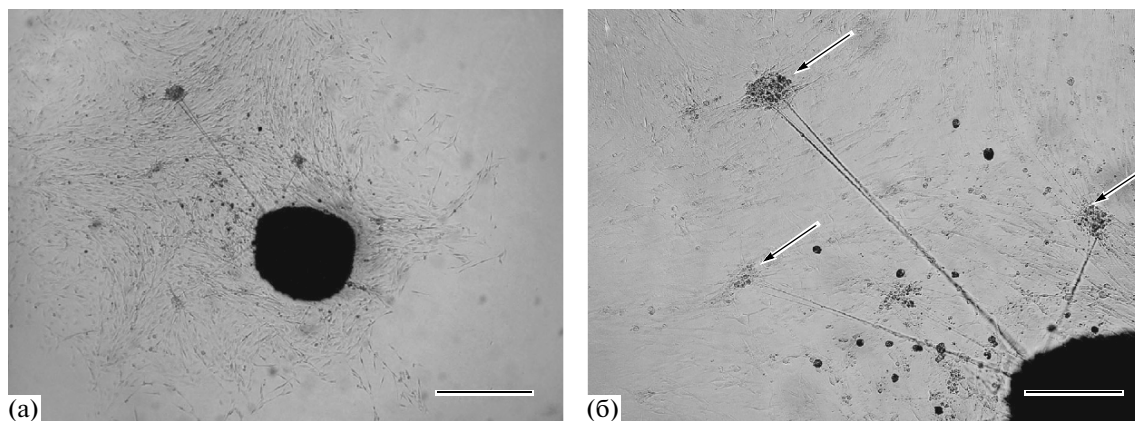
окраски. Этот ген был поставлен под контроль промотора гена белка теплового шока дрозофилы, так что репортерный ген автоматически активировался при температуре тела млекопитающих. Таким образом, были подготовлены условия для проведения экспериментов по введению эмбриональных нейральных тканей дрозофилы в мозг млекопитающих. Предварительные эксперименты показали, что трансплантируемый материал выживал в тканях мозга млекопитающих, однако в отличие от эксперимента с амфибиями клетки дрозофилы постепенно исчезали, так что через месяц обнаруживались лишь единичные клетки трансплантата. Корочкин предложил использовать эмбриональную нервную ткань дрозофилы в качестве носителя трансгенных конструкций для клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона. При паркинсонизме происходит ускоренная гибель дофаминергических нейронов. Данное нарушение связано с образованием альфа-синуклеиновых бляшек. Так как дифференцировка собственных прогениторных клеток не приносит желаемого результата (полученные нейроны также генетически обречены на гибель), в свое время была предложена трансплантация эмбриональных дофаминергических нейронов черной субстанции в поврежденный мозг млекопитающих. Исследования шведских нейробиологов показали, что трансплантация эмбриональных дофаминергических нейронов в мозг взрослых животных с экспериментальной дегенерацией нейронов в черной субстанции, приводит к компенсации дефекта метаболизма дофамина (Bjorklund, 2003; Lindvall, 1998). При аналогичных трансплантациях у человека обнаружили, что рецидив заболевания происходит в течение 1–3 лет. Одной из причин этого является образование глиального рубца, который нарушает связи между трансплантатом и тканью мозга реципиента. Таким образом, необходимо искать пути управления нейральной дифференцировкой трансплантируемого материала для его быстрой интеграции и подавления образования глиального рубца. Для решения этих проблем Корочкиным было предложено использовать генетические конструкции, кодирующие нейротрофические факторы. В ходе работы в лаборатории использовали гены трех факторов: GDNF (glial cell line derived neurotrophic factor) – глиальный нейротрофический фактор, NGF (nerve growth factor) – фактор роста нервов и BDNF (brain derived neurotrophic factor) – нейротрофический фактор мозга. Выбор трансгенных факторов был обусловлен многочисленными литературными данными о влиянии упомянутых факторов на нервную ткань. Так известно, что инъекция GDNF в желудочки мозга вызывает значительное увеличение тирозингидроксилазной активности в нейронах черной субстанции и стриатума у старых

крыс. Совместное введение GDNF и NGF приводит к повышению холинацетилтрансферазной активности в септуме, гиппокампе, стриатуме и коре и вызывает повышение локомоторной активности у старых крыс (Lapchak et al., 1997).

Поскольку длительное инъектирование фактора в область повреждения чрезвычайно травматично для ткани мозга, а нейротрансплантаты могут долго переживать, не повреждая мозга, то работы были направлены на создание генно-инженерными методами клеток, способных экспрессировать какой либо нейротрофический фактор. Трансплантаты, содержащие такие клетки, способны длительно выделять факторы в области повреждения мозга.

Для введения генно-инженерных конструкций используют различные популяции соматических или нервных клеток млекопитающих (Tseng et al., 1997). Нами были созданы конструкции на основе вектора pCaSpeг, где исследуемый ген ставится под контроль гена белка теплового шока дрозофилы *HSP70*. Предложенная нами модель выгодно отличается тем, что промотор гена *HSP70* дрозофилы может активироваться при температуре тела млекопитающих, обеспечивая тем самым постоянно высокий уровень экспрессии гена, находящегося под контролем этого промотора.

Чтобы выяснить, будут ли активироваться и функционировать нейротрофические гены млекопитающих в клетках и тканях дрозофилы (Корочкин, 1992, Корочкин и др., 2002) были получены три генно-инженерные конструкции на основе вектора CaSpeг, содержащие один из нейротрофических генов млекопитающих (*Gdnf*, *Bdnf*, *Ngf*). В каждой конструкции нейротрофические гены находились под контролем промотора гена белка теплового шока дрозофилы. Данные конструкции были инъектированы в эмбрионы дрозофилы линии Df(1)w^{67c23(2)}, которая содержала ген *white*, обуславливающий фенотип “белые глаза” у взрослых мух. Сами конструкции содержали ген *mini-white*, который позволяет идентифицировать трансформантов в поколении F1 (Павлова и др., 2001, Павлова и др., 2002). В результате селекции мы получили три гомозиготные линии: С3 – содержащая ген человека *Gdnf*, G8 – содержащая ген мыши *Ngf* и G7 – содержащая ген человека *Bdnf*. Каждая из этих линий была скрещена с линией, несущей ген бактериальной галактозидазы *lacZ* и мутацию *Delta* (вызывает трансформацию вентральной нейроэктодермы в нейральном направлении). Полученные линии С3-1М, G8-1М и G7-1М содержали *lacZ* и *Delta*, а также гены млекопитающих *Gdnf*, *Ngf*, *Bdnf* соответственно. Было установлено, что конструкция с геном *Gdnf* встроилась во вторую хромосому линии С3, а конструкции с генами *Ngf* и *Bdnf* встроились в третью хромосому линий G8 и G7 соот-



Совместное культивирование спинального ганглия новорожденной крысы и нервной ткани эмбриона трансгенной дрозофилы, экспрессирующей *Bdnf*. Масштаб а – 100 мкм; б – 50 мкм. Стрелками отмечено положение трансфицированных клеток дрозофилы.

ответственно. Методом блот-гибридизации по Саузерну были подтверждены вставки в геном дрозофилы. Контроль экспрессии встроенных генов был осуществлен методом блот-гибридизации по Нозерну. Аналогичный анализ экспрессии мРНК был проведен и для конечных линий G7-1M, G8-1M и C3-1M (Павлова и др., 2001, 2002; Pavlova et al., 2003).

Индукцированную экспрессию мРНК нейротрофических факторов наблюдали только при воздействии на эмбрионы шоковой температуры (37°C). Методом гибридизации *in situ* на целых эмбрионах трансгенной линии C3-1M индуцированная транскрипция человеческого *Gdnf* обнаружена на всех стадиях эмбрионального развития, как у гетерозигот *Dl/+*, так и у гомозиготных (*Dl/Dl*) особей. На стадии синцитиальной и клеточной бластодермы реакция была умеренной, равномерно распределенной по поверхности эмбриона. По ходу сегментации повышенная экспрессия гена *Gdnf* наблюдалась в парасегментах, в результате чего формировался характерный “тигровый” рисунок окраски. С развитием нейральных элементов областью преимущественной локализации мРНК гена *Gdnf* являлась центральная нервная система эмбрионов. Соответствующие транскрипты были выявлены как в головном, так и в торакальных ганглиях. После воздействия теплового шока на эмбрионы линий G7-1M и G8p1M были обнаружены мРНК введенных генов *Bdnf* и *Ngf*, соответственно, на всех стадиях эмбрионального развития, а также у личинок. Как и в случае с геном *Gdnf*, на стадии синцитиальной и клеточной бластодермы наблюдали умеренную реакцию равномерно распределенную по всей поверхности эмбриона. При изучении эмбрионов трансгенной линии дрозофилы, экспрессирующей *Ngf*, было обнаружено, что по мере сегментации повышенная экспрессия гена на-

блюдалась в парасегментах, что давало характерный “тигровый” рисунок. С развитием нейральных элементов у эмбрионов линии G8-1M с трансгенным *Ngf* была обнаружена интенсивная окраска в области головного ганглия, в то время как у эмбрионов линии G7-1M с трансгенным *Bdnf* окраска наблюдалась практически во всех областях эмбриона. (Павлова и др., 2001, 2002; Pavlova et al., 2003).

Далее была проверена способность клеток дрозофилы, содержащих трансгены нейротрофических факторов, влиять на развитие нервных клеток и нейробластов млекопитающих *in vitro*. С этой целью фрагменты нейроэктодермы эмбрионов, содержащих трансгены нейротрофических факторов, ко-культивировали со спинальными ганглиями новорожденных крысят (Pavlova et al., 2003). В контрольных культурах отростки нервных клеток появлялись не ранее 3-х суток. При добавлении в культуру нейроэктодермы эмбриона трансгенной линии дрозофилы, содержащей ген *Bdnf* человека, наблюдался интенсивный рост отростков нервных клеток по направлению к ткани дрозофилы (рис. 1). Этот процесс начинался уже спустя 1 ч. после начала ко-культивирования. Аналогичный эффект оказывали и эксплантаты с двумя другими трансгенами (*Gdnf*, *Ngf*). Нейроэктодерма диких линий дрозофилы не влияла на рост отростков. Известно, что при культивации спинального ганглия новорожденных крысят, отростки появляются на 3-и сут и растут равномерно во все стороны. При добавлении в среду нейротрофических факторов, отростки образуются быстрее, но также не имеют предпочтительного направления роста (Родионов, 1996). В нашей работе трансфицированные клетки стимулировали направленный рост отростков эмбрионального спинального ганглия.

Трансгенные линии дрозофилы с геном, человека, кодирующим глиальный нейротрофический фактор (*GDNF*) трансплантировали в мозг млекопитающих. *GDNF*, член суперсемейства TGF-beta, известен своим трофическим влиянием на дофаминэргические нейроны в развивающемся мозге и мозге взрослых животных (Sauer et al., 1995). *GDNF* оказывает трофическое влияние и на другие популяции нейронов мозга. Его введение в желудочки или паренхиму мозга способствует выживанию ишемизированных нейронов неокортекса (Wang et al., 1997). В экспериментах, проведенных совместно с М.А. Александровой, эмбриональные нервные клетки линии С3–1М с трансгенным *Gdnf* и ткань неокортекса 15-суточных эмбрионов крысы трансплантировали в затылочную кору мозга взрослых крыс (Александрова и др., 2000). Через 33 сут трансплантаты были обнаружены у всех исследуемых крыс. При этом нервные клетки дрозофилы при трансплантации в мозг не погибали и образовывали отростки. Иммуногистохимическая реакция на *lacZ* подтвердила успешность приживания трансплантированных нервных клеток дрозофилы. В этих клетках выявлен также белок *GDNF* (Александрова и др., 2000). Таким образом, нейротрофический ген, под контролем промотора *HSP70* дрозофилы активизировался при попадании ткани дрозофилы в мозг млекопитающих. Котрансплантируемый клеточный материал (эмбриональный неокортекс крысы) интенсивно экспрессировал тирозингидроксилазу. Основным результатом этих исследований является достижение блокирования образования глиального рубца между трансплантатом и тканями реципиента. Следует отметить, что клетки дрозофилы через месяц после трансплантации практически исчезали. в трансплантате, не вызывая воспалительных процессов (Александрова и др., 2000).

Таким образом, были получены трансгенные клеточные культуры, в одном случае стимулирующие направленное образование нейральных отростков (трансген *Bdnf*), в другом — повышающие приживляемость трансплантатов (трансген *Gdnf*). Трансгенные клеточные культуры, продуцирующие *BDNF*, можно использовать в тех случаях, где необходима стимуляция образования отростков от нервных тканей или клеток в заданном направлении (например для восстановления слуха при атрофии нервных волокон в кортиевом органе или спиральном ганглии).

Трансгенные эмбриональные нервные клетки дрозофилы, экспрессирующие *Gdnf*, блокируют образование глиального рубца, что важно при лечении нейродегенеративных заболеваний. Было выдвинуто предположение, что это обусловлено сочетанием нейротрофического фактора и белков теплового шока дрозофилы, которые активируются при температуре тела млекопитающих в

клетках дрозофилы после трансплантации. Возможно, *Hsp70*, наряду с трансгенным фактором *GDNF*, позволяет клеткам дрозофилы, а также клеткам котрансплантируемого эмбрионального крысиного мозга, выжить в ишемических условиях нового микроокружения и повышенной температуры. Точный механизм блокирования образования глиального рубца вокруг нейротрансплантата остается неясным и нуждается в дальнейших исследованиях. Короткая продолжительность переживания клеток дрозофилы после трансплантации их в ткань млекопитающих облегчает применение этих клеток в качестве носителя терапевтического фактора, так как при этом ограничивается длительность воздействия препарата и снижается вероятность неоплазии.

При использовании в качестве носителя нейротрофических трансгенов клеток млекопитающих следует учитывать, что материал, используемый для генно-клеточной терапии наращивают и трансфицируют в культуре. Клетки в условиях культуры лишены специфического влияния тканевого окружения (в частности стволовые клетки оказываются вне ниши, поддерживающей их статус) и нуждаются в ростовых и трофических факторах для своей дифференцировки. Для дальнейших исследований был выбран фактор *GDNF*, который способен снижать образование глиального рубца при трансплантациях.

Была получена генетическая конструкция на основе вектора pEGFP-N1, содержащая ген человеческого нейротрофического фактора *Gdnf* и маркерный ген зеленого флуоресцентного белка (*GFP*). Данная конструкция была трансфицирована в человеческие клетки линии HEK293. Наличие вставки и ее экспрессия были подтверждены Саузерн-, Нозерн- и Вестерн-гибридизациями. Правильность вставки также была подтверждена сиквенсом. Клетки трансплантировали взрослым (2 мес.) мышам линии СВА. В мозг (полосатое тело) животных подопытной группы вводили клетки, продуцирующие химерный белок *GDNF/GFP*, а животным контрольной группы клетки, содержащие *GFP*. Срезы мозга окрашивали иммуногистохимически на маркеры рубцовой ткани с помощью антител на глиальный кислый фибриллярный белок (*GFAP*), актин, фибронектин и коллаген типа IV. Клетки, синтезирующие *GFP*, располагались плотной группой в средней части полосатого тела. Глиальная реакция выражалась в увеличении количества клеток, экспрессирующих *GFAP*, а также в увеличении экспрессии актина, фибронектина и коллагена типа IV (Павлова и др., 2006).

На 5-е сут после трансплантации различия в силе глиальной реакции не обнаружены. 9-е сут различия были минимальны. На 18-е сут после трансплантации глиальная реакция в контрольной группе значительно превышала реакцию в

опытной группе (Павлова и др., 2006). Результаты подтверждают перспективность применения GDNF в качестве нейротрофактора в тканевой терапии.

Известно, что при температуре тела млекопитающих клетки дрозофилы активно синтезируют белки теплового шока, имеющие важное адаптивное значение (Samali et al., 1998; Hightower et al., 1989; Houenou et al., 1996; Jaattela et al., 1992; Holmberg, 2001). На этом основании мы предположили, что выделение этих белков из клеток дрозофилы также вносит вклад в торможение формирования рубцовой ткани. Корочкин с соавт. подтвердил, что огромную роль в снижении образования глиального рубца играет белок теплового шока (HSP70), который синтезируется в клетках дрозофилы при температуре тела млекопитающих (Корочкин и др., 2001a, 2002; Korochkin et al., 2004b). Наши эксперименты подтверждают, что оптимальным вариантом факторов для предотвращения образования глиального рубца при трансплантациях является сочетание белка теплового шока и нейротрофических факторов.

Таким образом, трансплантация трансгенных клеток, продуцирующих нейротрофические факторы, в мозг животных тормозит образование глиального рубца. В отличие от клеток дрозофилы, человеческие клетки линии НЕК293, в мозге млекопитающих выживали более длительное время. Вместе с тем комбинация эмбриональных нейральных клеток дрозофилы и синтеза трансгенного *Gdnf* давала более полное подавление глиальной реакции и может считаться наиболее оптимальной при трансплантациях.

Результаты исследований, начатых под руководством Л.И. Корочкина подтверждают перспективность применения трансгенных нейротрофических факторов в качестве нейротрофакторов в тканевой терапии. Дальнейшее совершенствование техники невирусного переноса терапевтических генов в клетки млекопитающих позволит создавать эффективные клеточные препараты для лечения нейродегенеративных заболеваний. Наиболее продуктивным мы считаем создание многокомпонентных генетических конструкций, которые содержат несколько терапевтических факторов, усиливающих действие друг друга. Другим аспектом дальнейших разработок будет использование управляющих элементов, включающих экспрессию трансгенов в ответ на внешний сигнал и/или на патологическое состояние тканевого окружения.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 11-04-00790-а, 11-04-01157-а), Государственным контрактом П720, № 16.512.11.2100.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александрова М.А., Павлова Г.В., Ревещин А.В. и др. Влияние чужеродного гена *GDNF* на развитие трансплантата и ксенотрансплантата в мозге крыс // Генетика. 2000. Т. 36. С. 1553–1560.
- Корочкин Л.И. Перспективы развития нейрогенетики в России // Вестник РАН. 1992. Т. 7. С. 63–75.
- Корочкин Л.И. Новые подходы в генетике развития и генотерапии: ксенотрансплантация эмбриональных, нервных клеток дрозофилы в мозг позвоночных // Генетика. 2000. Т. 36. С. 1436–1442.
- Корочкин Л.И. Стволовые клетки // Онтогенез. 2003. Т. 34. № 3. С. 164–166.
- Корочкин Л.И., Александрова М.А., Башкиров В.Н. и др. Ксенотрансплантация эмбриональной нервной ткани нейромутанта *Drosophila* стимулирует развитие трансплантата в мозгу крысы в нейральном направлении и блокирует образование глиального рубца // Цитология. 2002. Т. 44. № 12. С. 1181–1185.
- Корочкин Л.И., Александрова М.А., Павлова Г.В. и др. Влияние семейства HSP70 белков при алло- и ксенотрансплантации в мозг крысы // Цитология. 2001. Т. 40. С. 803–806.
- Корочкин Л.И., Александрова М.А., Ревещин А.В. и др. Эффект белка теплового шока HSP70 на формирование глиального рубца при нейротрансплантации // ДАН. 2001. Т. 383. № 3. С. 113–115.
- Корочкин Л.И. Геном, клонирование, происхождение человека. Фрязино: Век-2, 2004.
- Корочкин Л.И., Михайлов А.Т. Введение в нейрогенетику. Москва: Наука, 2000.
- Павлова Г.В., Ефанов А.А., Башкиров В.Н. и др. Экспрессия генов *ngf* и *bdnf* человека в трансгенных линиях *Drosophila melanogaster* // Цитология. 2002. Т. 44. № 11. С. 1104–1108.
- Павлова Г.В., Модестова Е.А., Венгрова С.Н. и др. Экспрессия человеческого гена *gdnf* в трансгенной линии *Drosophila melanogaster* // ДАН. 2001. Т. 376. С. 694–696.
- Павлова Г.В., Ревещин А.В., Мирошникова О.А. и др. Влияние чужеродного гена *gdnf* в ксенотрансплантатах на посттравматические процессы в мозге мышей // Молекулярная медицина. 2006. Т. 2. С. 44–48.
- Родионов И.М. Фактор роста нервов // Соросовский образовательный журнал. 1996. Т. 3. С. 17–22.
- Савельев С.В., Иванов А.И., Гулимова В.И. и др. Изменения в развитии амфибий после трансплантации в мозг нейральных зародышевых клеток *Drosophila* // ДАН. 1991. Т. 316. № 3. С. 735–738.
- Савельев С.В., Корочкин Л.И., Иванов А.И., и др. Трансплантация нейральной закладки дрозофилы в нервную трубку зародышей амфибий // ДАН СССР. 1990. Т. 313. № 6. С. 1491–1493.
- Bjorklund A., Dunnett S.B., Brundin P. et al. Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease // Lancet Neurol. 2003. V. 2. P.437–45.
- Hightower L., Guidon P. Selective release from cultured mammalian cells of heat-shock (stress) proteins that resemble glia-axon transfer proteins // J. Cell Physiol. 1989. V. 138. P. 257–266.

- Holmberg C.I.* Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1 // *The EMBO Journal*. 2001. V. 20. P. 3800–3810.
- Houenou L., Li L., Lei M. et al.* Exogenous heat shock cognate protein Hsp70 prevents axotomy-induced death of spinal sensory neurons // *Cell Stress Chap*. 1996. V. 1. P. 161–166.
- Ivanov A.I., Frolova I.P., Zakharov I.K. et al.* Analysis of disorders in development of the brain in the new Notch mutant of *Drosophila melanogaster* // *Dokl Akad Nauk*. 1993. V. 331(6). P. 776–780.
- Jaattela M., Wissing D., Bauer P.A. et al.* Major heat shock protein Hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity // *EMBO J*. 1992. V. 11. P. 3507–3512.
- Korochkin L.I., Alexandrova A., Pavlova G. et al.* Genetic engineering methods of the regulation of stem cells differentiation // *Biotechnology and Medicine*, Nova Science Publishers. 2004. P. 121–136.
- Korochkin L.I., Alexandrova A., Pavlova G. et al.* Protein Hsp70 blocks the glial scar formation around the neurotransplant // *Biotechnology and Medicine*, Nova Science Publishers. 2004. P. 137–141.
- Korochkin L., Saveliev S., Ivanov A. et al.* Nerve cells of *Drosophila* Notch mutant are differentiated inside amphibian brain: a new approach for the analysis of genetic control of nerve cell differentiation // *Genetica (Netherl.)*. 1991. V. 85. P. 23–28.
- Lapchak P.A., Miller P.J., Jiao S.* Glial cell line-derived neurotrophic factor induces the dopaminergic and cholinergic phenotype and increases locomotor activity in aged Fisher 344 rats // *Neurosci*. 1997. V. 77. P. 745–752.
- Lindvall O.* Update on fetal transplantation: the Swedish experience // *Mov. Disord*. 1998. V. 13. P. 83–7.
- Nedeljkovich M., Korochkin L.I., Baschkirov V.N. et al.* Genetic analysis of transgenic *D. melanogaster* // *DIS*. 1997. V. 80. P. 10–11.
- Pavlova G., Enblom A., Revishchin A. et al.* The influence of donor *Drosophila* cells on survival of peripherally grafted embryonic or fetal rat dorsal root ganglia // *Cell Transplantation*. 2003. V. 12. P. 705–715.
- Pouzet B., Hagège A.A., Vilquin J.T. et al.* Transplantation of autologous skeletal myoblasts in ischemic cardiac insufficiency // *J. Soc. Biol*. 2001. V. 195. P. 47–49.
- Price M.L., Hoffer B.J., Granholm A.C.* Effects of GDNF on fetal septal forebrain transplants *in oculo* // *Exp. Neurol*. 1996. V. 141. P. 181–189.
- Samali A., Orrenius S.* Heat shock protein: regulators of stress response and apoptosis // *Cell Stress Chap*. 1998. V. 3. P. 228–236.
- Sauer H., Rosenblad C., Björklund A.* Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor beta 3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. V. 92. P. 8935–8939.
- Saveliev S., Lebedev V., Evgenev M. et al.* Chimeric brain: theoretical and clinical aspects // *Intern. J. Develop. Biol*. 1997. V. 41. P. 801–808.
- Stevens L.C.* The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos // *Dev. Biol*. 1970. V. 21. P. 364–382.
- Tseng J.L., Baetge E.E., Zurn A.D.* GDNF reduces drug-induced rotational behavior after medial forebrain bundle transection by a mechanism not involving striatal dopamine // *J. Neurosci*. 1997. V. 17. P. 325–333.
- Wang Y., Lin S.Z., Chiou A.L. et al.* Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against ischemia-induced injury in the cerebral cortex // *J. Neurosci*. 1997. V. 17. P. 4341–4348.

Transgenic Cell Cultures That Synthesize Neurotrophic Factors and the Possibility of Therapeutic Use of Its Cells

G. V. Pavlova^b, N. N. Kanaykina^a, D. Yu. Panteleev^a, V. E. Okhotin^a, and A. V. Revishchin^b

^a*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 34/5, Moscow, GSP-1, 117984 Russia*

^b*OOO Institute of Medicine and Transplantation of Cells. ul., Bolshaya Pochtovaya 36/5, Moscow, 105082 Russia*

e-mail: lkorochkin@mail.ru; revishchin@mail.ru

Abstract—Under the leadership of Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences L.I. Korochkin, the Laboratory of Neurogenetics and Developmental Genetics (Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences) for many years has been conducting studies of nervous system development, neural cell differentiation, and application of gene and cell technology to cure neurodegenerative diseases. The results of the study initiated by L.I. Korochkin and continued by his scientific successors support the direction of allocation of transgenic neurotrophic factors and heat-shock proteins as neuroprotectors for cell therapy. Potential for usage of promoter of *HSP70* heat-shock gene of *Drosophila* to create transgenic constructs for therapy has been shown. Further improvement of technology of nonvirus transfer for therapeutic genes, as well as production of multicomponent genetic constructs coding several therapeutic factors with synergy effect, would stimulate creation of efficient cell medicals to cure neurodegenerative diseases.

Keywords: neural cells from transgenic *Drosophila* embryos, neural differentiation, glial scar, transplantation, dorsal root ganglion, neurotrophic factors, transgenic cells