

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ГЕНОВ В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ КРОВИ ПУПОВИНЫ, ТРАНСДУЦИРОВАННЫХ ТРЕМЯ АДЕНОВИРУСНЫМИ ВЕКТОРАМИ, КОДИРУЮЩИМИ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ GDNF И VEGF И МОЛЕКУЛУ НЕЙРОНАЛЬНОЙ АДГЕЗИИ NCAM

*Р.Р. Исламов<sup>1</sup>, А.А. Ризванов<sup>2</sup>, Е.Е. Черенкова<sup>2</sup>, Я.О. Мухамедшина<sup>1</sup>, И.И. Салафутдинов<sup>2</sup>, З.З. Сафиуллов<sup>1</sup>, А.А. Измаилов<sup>1</sup>, М.А. Мухамедьяров<sup>1</sup>, Д.С. Гусева<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

<sup>2</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

### Investigation of recombinant therapeutic genes expression in umbilical cord blood mononuclear cells transduced with three adenoviral vectors encoding neurotrophic factors GDNF, VEGF and neural cell adhesion molecule NCAM

*R.R. Islamov<sup>1</sup>, A.A. Rizvanov<sup>2</sup>, E.E. Cherenkova<sup>2</sup>, Y.O. Mukhamedshina<sup>1</sup>, I.I. Salafutdinov<sup>1</sup>, Z.Z. Safiullova<sup>1</sup>, A.A. Izmailov<sup>1</sup>, M.A. Mukhamedyarov<sup>1</sup>, D.S. Guseva<sup>1</sup>*

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

<sup>2</sup>Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

Для преодоления последствий нейродегенерации и стимулирования нейрорегенерации в спинном мозге мышам с моделью бокового амиотрофического склероза интраспинально были инъецированы мононуклеарные клетки пуповинной крови (МКПК), трансдуцированные тремя аденовирусными векторами, кодирующими сосудистый эндотелиальный фактор роста, глиальный нейротрофический фактор и молекулу нейрональной адгезии. Через 2 нед. после трансплантации МКПК локализовались как в месте инъекции, так и на удалении от него, что свидетельствует о миграционном потенциале клеток в паренхиме спинного мозга. С помощью тройного иммунофлуоресцентного окрашивания были выявлены МКПК, экспрессирующие терапевтические гены. Результаты исследования позволяют предположить целесообразность применения данного генно-клеточного препарата для стимуляции нейрорегенерации в ЦНС после травм, ишемических инсультов и при нейродегенеративных заболеваниях.

**Ключевые слова:** боковой амиотрофический склероз, мононуклеарные клетки пуповинной крови, иммунофлуоресценция, VEGF, GDNF, NCAM.

Развитие регенеративной медицины базируется на современных технологиях генной, клеточной и тканевой инженерии. Одним из перспективных направлений регенеративной медицины является создание лекарственных препаратов нового поколения, содержащих рекомбинантные гены [1]. Такие препараты могут применяться как для прямой генной терапии, так и для генной терапии на клеточных носителях. Клонированные гены, кодирующие молекулы иммунной защиты, апоптоза, трофические факторы и др. применяются в клинических испытаниях терапии моногенных, сердечно-сосудистых, неврологических заболеваний, при онкологических состояниях. Для клеточно-опосредованной терапии используют разные типы клеточных носителей. Наиболее часто для этой цели применяют стволовые мезенхимные клетки из красного костного мозга и мононуклеарные клетки из крови пуповины (МКПК) [2]. Доставку терапевтического гена в клетки осуществляют с помощью плазмидных или вирусных векторов. Плазмидные векторы поддерживают кратковременную (недели) сверхэкспрессию целевого гена, тогда как вирусные могут обеспечивать экспрессию терапевтического гена месяцы и годы [3].

e-mail: slamru@yahoo.com

To overcome the effects of neurodegeneration and stimulating neuroregeneration in the spinal cord transgenic mice with model of amyotrophic lateral sclerosis were injected intraspinally with umbilical cord blood mononuclear cells (UCBMCs) transduced with adenoviral vectors encoding for vascular endothelial growth factor, glia-derived neurotrophic factor and neural adhesion molecule. Two weeks after transplantation UCBMCs were localized in the site of injection and at a distance from it, confirming the migration capacity of the cells in spinal cord parenchyma. Using triple immunofluorescence staining UCBMCs expressing therapeutic genes were found. The study results suggest the expedience of given gene-cell construct to stimulate the neuroregeneration in central nervous system after neurotrauma, ischemic stroke and in neurodegenerative diseases.

**Key words:** amyotrophic lateral sclerosis, umbilical cord blood mononuclear cells, immunofluorescence, VEGF, GDNF, NCAM.

Выбор вектора и клеточного носителя определяется конкретными терапевтическими задачами.

Целью наших исследований является создание генно-клеточного лекарственного препарата для стимуляции нейрорегенерации после травмы, ишемического инсульта и при нейродегенеративных заболеваниях. Ранее нами были получены генно-клеточные конструкции на основе мононуклеарной фракции пуповинной крови и двухкассетного плазмидного вектора, одновременно кодирующего два терапевтических гена [4, 5]. Конкретной задачей настоящего исследования является создание генно-клеточного лекарственного препарата на основе МКПК и трех аденовирусных векторов, экспрессирующих рекомбинантные гены глиального нейротрофического фактора (GDNF), сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и молекулы нейрональной адгезии (NCAM). Предполагается, что доставка именно этой комбинации терапевтических генов будет наиболее эффективно способствовать преодолению последствий нейродегенерации и стимулировать нейрорегенерацию в ЦНС. Иммуноэкспрессия терапевтических генов была изучена *in vivo*, после ксенотрансплантации трансдуцированных МКПК трансгенным G93A

мышам с моделью нейродегенеративного заболевания бокового амиотрофического склероза.

### Материал и методы

#### Выделение МКПК в градиенте плотности фиколла

Выделение МКПК проводили в пробирках объемом 50 мл, согласно опубликованной ранее методике [6]. В каждую пробирку вносили по 25 мл раствора фиколла плотностью 1,077 г/мл (ПанЭко, Россия), на который аккуратно при помощи автоматического дозатора наслаивали равный объем пуповинной крови с антикоагулянтом (соотношение крови и антикоагулянта колебалось в пределах 1:1–3:1). Проводили центрифугирование при 720 g в течение 20 мин и получали четкое разделение крови на 4 фракции: эритроциты, фиколл, лейкоциты и плазму. Лейкоцитарную фракцию собирали в отдельную пробирку, ресуспендировали в растворе фосфатно-солевого буфера, модифицированного Дульбекко (DPBS) (ПанЭко, Россия) в соотношении 1:2 и центрифугировали при 305g в течение 15 мин. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в 10 мл раствора DPBS и повторно центрифугировали при 305 g в течение 15 мин. Для удаления эритроцитов клетки ресуспендировали в гипотоническом лизирующем буфере (0,168 M NH<sub>4</sub>Cl, 0,1 M KHCO<sub>3</sub>, 1,27 mM EDTA, pH 7,3), на заключительном этапе клетки отмывали раствором DPBS.

МКПК человека после выделения поддерживали на среде RPMI-1640 (Sigma) с добавлением 1 mM L-глутамин, 10% сыворотки крови плодов коров и 1% смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (100 ЕД/мл; 100 мкг/мл) (Sigma, США).

#### Генетическая модификация МКПК человека рекомбинантными аденовирусами Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1

Непосредственно после выделения мононуклеарные клетки высевали на 6 см культуральный планшет из расчета 2 млн кл./лунка и трансдуцировали рекомбинантными аденовирусами [7, 8]. При ко-трансдукции тремя аденовирусами Ad5-GDNF, Ad5-VEGF165, Ad5-NCAM1 МКПК общий показатель «множественность инфицирования» (multiplicity of

infection, MOI) был равен 10. Клетки выдерживали во влажной среде при температуре +37°C с 5% содержанием CO<sub>2</sub>. Через 96 ч после инфицирования клетки снимали с планшета и анализировали экспрессию мРНК VEGF165, GDNF, NCAM1 методом ПЦР-РВ.

Для ксенотрансплантации трансгенным животным, экспрессирующим фенотип бокового амиотрофического склероза, трансдуцированные МКПК собирали через 16 ч путем центрифугирования при 500g в течение 5 мин. Клеточный осадок трижды промывали в растворе DPBS, после чего растворяли в стерильном растворе 0,9% хлорида натрия из расчета 2×10<sup>6</sup> клеток в 100 мкл инъекции.

#### Оценка экспрессии мРНК рекомбинантных генов *vegf165*, *gnfn* и *ncam1* в МКПК

Выделение тотальной РНК из модифицированных и нативных МКПК проводили с помощью набора Yellow solve (Силекс, Россия), согласно инструкциям производителя. Для синтеза кДНК использовали 150 нг РНК-матрицы. Реакцию обратной транскрипции проводили на приборе C1000 (BioRad). Реакционная смесь общим объемом 12,5 мкл содержала 150 нг РНК, 50 нм гексануклеотидного random-праймера и деионизированную воду. Первоначально проводили предварительный нагрев в течение 5 мин при 65°C. Далее в каждый исследуемый образец добавляли по 4 мкл 5X буфера для обратной транскриптазы, 20U ингибитора РНаз Ribolock RNase inhibitor (Thermoscientific), 1 mM дНТФ, 200 U обратной транскриптазы Revertaid Reverse Transcriptase (Thermoscientific). Синтез кДНК проводили при следующих параметрах реакции: 25°C 10 мин, 42°C 60 мин, 70°C 10 мин.

Количественную оценку транскрипции мРНК генов *vegf165*, *gnfn*, *ncam1* в МКПК проводили методом ПЦР-РВ на приборе CFX96 Real-Time System (BioRad) с использованием программного обеспечения BioRad CFX Manager и пакета программ MS Excel. ПЦР-РВ проводили по методике гидролизуемых проб (TaqMan) с использованием геноспецифичных ДНК-зондов. Нуклеотидные последовательности праймеров и проб представлены в таблице 1.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и ДНК-зондов для ПЦР-РВ

Название праймера	Нуклеотидная последовательность
VEGF-TM-Forward	ATCACCATGCAGATTATGCG
VEGF-TM-Reverse	TGCATTACATTTGTTGTGC
VEGF-TM-Probe	[FAM]TCAAACCTCACCAAGGCCAGCA[BHQ1]
GDNF-TM-Forward	CGCTGAGCAGTGACTCAAAT
GDNF-TM-Reverse	CGATTCCGCTCTCTTAGG
GDNF-TM-Probe	[FAM]TCCATGACATCATCGAAGTATCAGG[BHQ1]
18S-TM-Forward	GCCGCTAGAGGTGAAATCTTG
18S-TM-Reverse	CATTCTTGCAAATGCTTTCCG
18S-TM-Probe	[HEX]ACCGCGCAAGACGGACCAG[BHQ2]
NCAM1-TM-Forward	AGATGAGGGCACTTATCGCT
NCAM1-TM-Reverse	GATGGTAGGTGGCACATTCA
NCAM1-TM-Probe	[FAM]CCGTGCCAGGATTCTGCCCT[BHQ1]

Компоненты реакции для проведения ПЦР-РВ (15 мкл): 0,5  $\mu$ л ДНК-матрицы, 2,5X реакционная смесь Б (Синтол), 200 нМ прямого и обратного праймера и 100 нМ флуоресцентной пробы (табл. 1). Амплификацию проводили при режиме: 95°C 3 мин, 39 циклов: 95°C 10 с, 55°C 15 с, включая сканирование планшета. Количество мРНК было нормализовано по гену «домашнего хозяйства» 18S рРНК. Для построения стандартных кривых и оценки относительной экспрессии рекомбинантных генов, кодирующих NCAM1, VEGF и GDNF, использовали серийные разведения плазмидной ДНК со вставками целевых генов. Уровень экспрессии генов в нетрансдуцированных МКПК принимали за 100%. ПЦР-РВ ставили в трех повторностях. Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ MS Excel 2007. Для оценки достоверности полученных результатов использовали t-тест Стьюдента с уровнем значимости менее 1% ( $p < 0,01$ ).

*Ксенотрансплантация МКПК, сверхэкспрессирующих рекомбинантные гены *vegf165*, *gdnf* и *ncam1*, в спинной мозг трансгенных мышей с моделью бокового амиотрофического склероза*

Доклинические испытания полученного генно-клеточного лекарственного препарата были проведены на трансгенных мышах B6SJL-Tg(SOD1-G93A) dl1Gur/J, приобретенных из питомника лабораторных животных «Пушино» при филиале института биоорганической химии им. академика М.М. Шемякина и академика Ю.А. Овчинникова РАН (филиал ИБХ РАН). Данная линия мышей характеризуется присутствием в геноме аллелей мутантного гена человека — Cu/Zn-супероксиддисмутазы *sod1* (глицин заменен на аланин в позиции 93), в результате чего у мышей развивается заболевание, напоминающее боковой амиотрофический склероз человека. В виварии Казанского государственного медицинского университета половозрелые мыши в возрасте 26 нед. (до проявления клинических признаков заболевания) были отобраны для трансплантации МКПК, трансдуцированных Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad-NCAM1. Трансплантацию клеток выполняли путем интраспинальной инъекции  $1 \times 10^6$  МКПК в 5 мкл DPBS (БиолоТ, Россия) в поясничный отдел спинного мозга подопытных животных. Через 2 нед.

после трансплантации мышей наркотизировали, через большой круг кровообращения транкардиально перфузировали сначала холодным фосфатно-солевым (ФС) буфером (Биолот), затем — холодным 4% раствором параформальдегида на ФС буфере. Спинной мозг извлекали из позвоночного столба, в течение 12 ч фиксировали в растворе параформальдегида, после чего, в целях криопротекции, фиксированную ткань насыщали 30% раствором сахарозы (Хеликон, Россия), приготовленным на ФС буфере с добавлением азидата натрия (Sigma, США). Все процедуры с животными проведены в соответствии с решением этического комитета Казанского государственного медицинского университета (№5 от 27.05.2014).

*Иммунофлуоресцентный метод*

Продукт экспрессии рекомбинантных генов (VEGF, GDNF, NCAM) выявляли с помощью тройного иммунофлуоресцентного окрашивания поперечных срезов спинного мозга. МКПК идентифицировали по иммуноэкспрессии человеческого ядерного АГ. Замороженные срезы толщиной 20 мкм готовили на криостате HM560 Cryo-Star (CarlZeiss). После промывки срезов в ФС буфере неспецифические места связывания блокировали в ФС буфере, содержащем 0,1% Тритон X-100 и 5% сыворотку ослы (Jackson ImmunoResearch lab., США), в течение 45 мин при комнатной температуре. Для идентификации АГ срезы инкубировали с первичными АТ к HNA, VEGF и GDNF (табл. 2) в течение 1 сут. при 4°C, затем промывали в ФС буфере и инкубировали со вторичными АТ ослы, конъюгированными с флуоресцентными красителями Alexa 488 и Alexa 647 (разведение 1:250) в течение 2 ч при комнатной температуре. После промывки в ФС буфере проводили инкубацию АТ к NCAM, конъюгированным с флуоресцентным красителем PE (фикоэритрин). Для визуализации клеточных ядер срезы дополнительно окрашивали в течение 10 мин. при комнатной температуре раствором 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI, 10 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, Sigma, США). Окрашенные срезы заключали в среду, поддерживающую флуоресценцию, и изучали при помощи конфокального сканирующего микроскопа LSM 780-Meta (Carl Zeiss, Германия).

Таблица 2. Первичные антитела для иммунофлуоресцентного окрашивания

Антиген	Антитела	Разведение	Производитель
HNA (ядерный антиген человека)	Мышь, моноклональные	1:100	Chemicon, США
VEGF (сосудистый эндотелиальный фактор роста)	Кролик, поликлональные	1:150	Santa Cruze, США
GDNF (глиальный нейротрофический фактор)	Кролик, поликлональные	1:150	Santa Cruze, США
NCAM (CD56-PE) (молекула нейрональной адгезии)	Мышь, моноклональные	1:100	Сорбент, Россия

## Результаты

### Экспрессия рекомбинантных терапевтических генов в МКПК *in vitro*

На гистограмме (рис. 1) представлены данные, полученные в ходе трех независимых экспериментов. Через 96 ч после трансдукции МКПК собирали с культурального планшета и анализировали относительное содержание мРНК генов *veg165*, *gdnf* и *ncam1* методом ПЦР-РВ. Было показано, что при ко-трансдукции двумя рекомбинантными генами эффективность их экспрессии увеличилась в 200 и 140 раз, соответственно. При одновременной генетической модификации тремя аденовирусными векторами показатели относительной экспрессии для каждого гена колебались в пределах 50–90 раз по сравнению с нетрансдуцированным контролем.

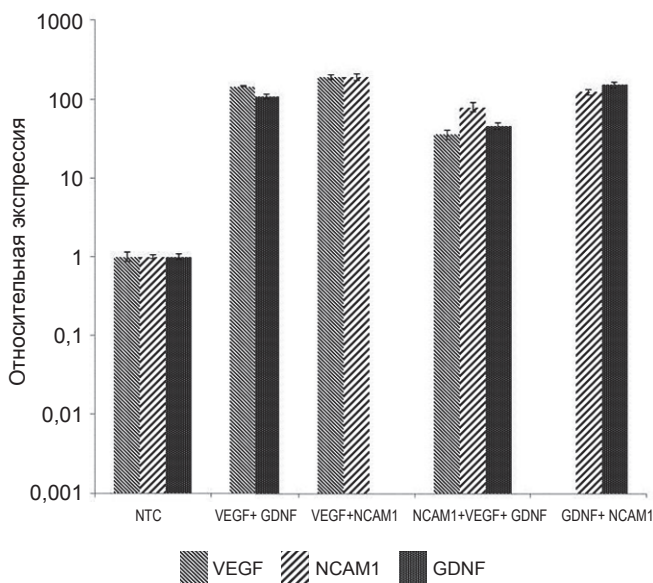


Рис. 1. Содержание мРНК генов *veg165*, *gdnf*, *ncam1* в МКПК через 96 ч после трансдукции аденовирусами *Ad5-VEGF165*, *Ad5-GDNF* и *Ad5-NCAM1*. ПЦР-РВ, нормализация по гену *18S* рРНК

### Иммуноэкспрессия VEGF, GDNF и NCAM в модифицированных МКПК человека после трансплантации в спинной мозг трансгенных G93A мышей

Для идентификации VEGF, GDNF и NCAM в МКПК было проведено тройное иммунофлуоресцентное окрашивание поперечных срезов спинного мозга мышей с помощью АТ в комбинациях:

- 1) против ядерного АГ человека (HNA), GDNF и NCAM;
- 2) HNA, VEGF и NCAM.

Через две недели после трансплантации в спинном мозге подопытных мышей были обнаружены HNA-позитивные клетки. Преимущественно клетки локализовались в месте инъекции, однако МКПК были выявлены и на удалении, что свидетельствует об их миграционном потенциале. С помощью тройного иммунофлуоресцентного окрашивания были выявлены МКПК, экспрессирующие терапевтические гены GDNF, VEGF и NCAM (рис. 2).

## Обсуждение

Ранее для стимулирования нейрорегенерации нами были получены и испытаны генно-клеточные конструкции на основе МКПК и двухкассетных плазмидных векторов. Впервые нами было показано, что МКПК, трансфицированные плазмидным вектором *pBud-VEGF-L1CAM* и введенные ретроорбитально 22–25-недельным трансгенным G93A мышам выживали более 4 нед. и дифференцировались в эндотелиальные клетки и клетки микроглии [4, 5]. В следующей своей работе мы установили, что МКПК, трансфицированные двухкассетным плазмидным вектором *pBud-VEGF-FGF2* могут дифференцироваться в S100-позитивные клетки [9]. Таким образом, полученные нами результаты по трансплантации МКПК, трансфицированных плазмидными векторами, трансгенным G93A мышам свидетельствуют о том, что инъекцированные в кровь клетки мигрируют через гематоэнцефалический барьер в паренхиму спинного мозга, длительно сохраняют жизнеспособность и, в зависимости от типа экспрессионного вектора, могут дифференцироваться

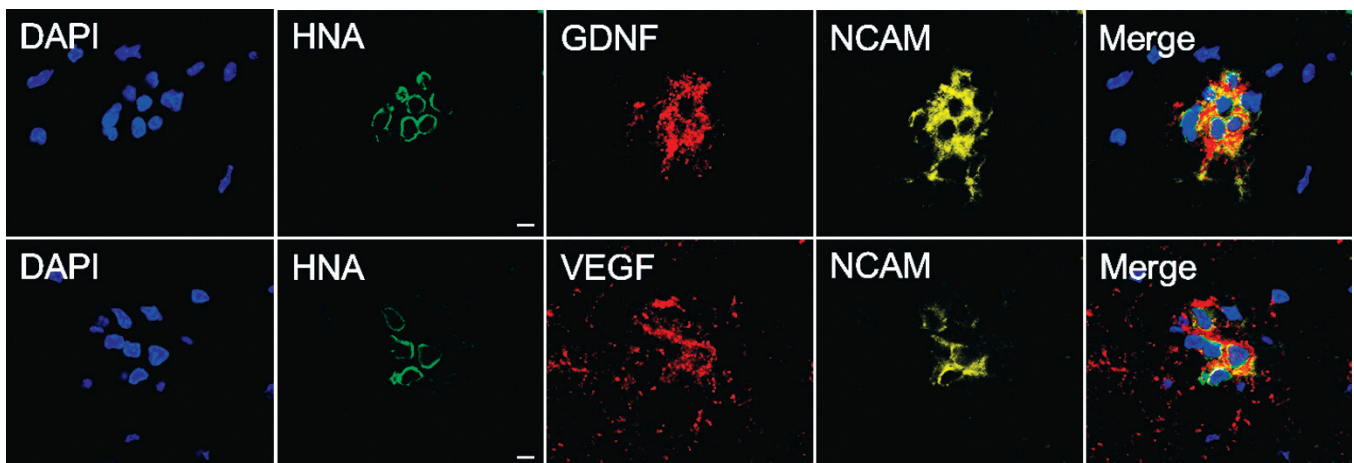


Рис. 2. Трансдуцированные МКПК человека в поясничном отделе спинного мозга *B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J* трансгенных мышей на расстоянии 5 мм в ростральном направлении от места инъекции через 14 сут. после трансплантации. Верхняя панель – экспрессия HNA, GDNF и NCAM; нижняя панель – экспрессия HNA, VEGF и NCAM. Иммуногистохимическая реакция. Флуоресцентная микроскопия. Шкала – 5 мкм

в макрофаги, эндотелиальные клетки или астроциты. На данном этапе мы рассматривали МКПК как источник новых паренхиматозных клеток спинного мозга. Недавно было установлено, что мезенхимные стволовые клетки человека, одновременно сверх-экспрессирующие рекомбинантные гены *gdnf* и *vegf*, при внутримышечной инъекции крысам с моделью бокового амиотрофического склероза поддерживают структуру нервно-мышечного синапса и продлевают жизнь животных, по-видимому, за счет сверх-продукции рекомбинантных нейротрофических факторов [10]. Исходя из вышеизложенного в настоящем исследовании нами был получен новый генно-клеточный препарат на основе МКПК и трех аденовирусных векторов, кодирующих нейротрофические молекулы (VEGF и GDNF) и молекулу нейрональной адгезии (NCAM). По нашим представлениям, трансдуцированные МКПК за счет синергичной сверх-продукции VEGF и GDNF могут иметь более выраженный эффект на выживание нервных клеток в очаге нейродегенерации. Трансдукция моноуклеарных клеток вирусом, экспрессирующим NCAM, позволит повысить их выживаемость, хоминг и миграцию в паренхиму мозга. Исследования с применением указанной комбинации генов для трансдукции

моноуклеаров крови пуповины и их трансплантации с целью стимулирования нейрорегенерации после нейротравмы, ишемического инсульта и при нейродегенеративных заболеваниях представляется перспективным направлением в создании лекарственных препаратов, содержащих клонированные гены, и для развития регенеративной медицины в целом.

### Благодарности

*Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-15-00847, совместным грантом РФФИ и Академии наук РТ № 13-04-97156, а также грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых докторов наук МД-433.2013.4. Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров. Работа частично выполнена на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования и Научно образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.*

### ЛИТЕРАТУРА:

1. 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): 29–37.
2. Malgieri A., Kantzari E., Patrizi M.P. et al. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. Int. J. Clin. Exp. Med. 2010; 3(4): 248–69.
3. Гусева Д.С., Ризванов А.А., Киясов А.П. и др. Генетически модифицированные моноуклеары пуповинной крови – стимуляторы нейрорегенерации при дегенеративных заболеваниях центральной нервной системы. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2013; 8(3): 1–7.
4. Ризванов А.А., Гусева Д.С., Салафутдинов И.И. и др. Генно-клеточная терапия бокового амиотрофического склероза моноуклеарными клетками пуповинной крови человека, сверхэкспрессирующими гены нейронной молекулы адгезии L1cam и сосудистого эндотелиального фактора роста *vegf*. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2010; 5(4): 1–11.
5. 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 neurogenesis a novel

approach in stem cell therapy. Neurochem. Int. 2008; 53(6-8): 389–94.

6. Hawley T.S., Herbert D.J., Eaker S.S. et al. Multiparameter flow cytometry of fluorescent protein reporters. Methods Mol Biol. 2004; 263: 219–38.

7. Черенкова Е.Е., Федотова В.Ю., Борисов М.А. и др. Создание рекомбинантных аденовирусов и лентивирусов, экспрессирующих ангиогенные и нейропротекторные факторы, с помощью технологии клонирования Gateway. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2012; 7(3): 164–8.

8. Федотова В.Ю., Черенова Е.Е., Исламов Р.Р. и др. Создание рекомбинантных аденовирусов, кодирующих гены нейральных молекул клеточной адгезии *psam1*, *psam2* и *l1cam*. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2013; 8(3): 142–6.

9. Rizvanov A.A., Guseva D.S., Salafutdinov I.I. et al. Genetically modified human umbilical cord blood cells expressing VEGF and FGF2 differentiate into glial cells after transplantation into amyotrophic lateral sclerosis (ALS) transgenic mice. Exper. Biol. Med. 2010; 236(1): 91–8.

10. Krakora D., Mulcrone P., Meyer M. et al. Synergistic Effects of GDNF and VEGF on lifespan and disease progression in a familial ALS rat model. Mol. Ther. 2013; 21(8): 1602–10.

*Поступила: 14.07.2014*