

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА УЛУЧШАЕТ ПРОСТРАНСТВЕННУЮ ПАМЯТЬ У APP/PS1 ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ С МОДЕЛЬЮ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Е.О. Петухова¹, Я.О. Мухамедшина^{1,2}, А.А. Ризванов², А.Р. Мухитов³, А.Л. Зефирова¹, Р.Р. Исламов¹, М.А. Мухамедьяров¹

¹Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

³Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, Россия

Transplantation of mononuclear cells of human umbilical cord blood improves spatial memory in APP/PS1 transgenic mice with alzheimer's disease model

E.O. Petukhova¹, Y.O. Mukhamedshina^{1,2}, A.A. Rizvanov², A.R. Mukhitov³, A.L. Zefirova¹, R.R. Islamov¹, M.A. Mukhamedyarov¹

¹Kazan State Medical University, Kazan, Russia

²Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

³Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of RAS, Kazan, Russia

Болезнь Альцгеймера — прогрессирующее неизлечимое нейродегенеративное заболевание, главным проявлением которого является деменция. Перспективным направлением в разработке методов лечения болезни являются генно-клеточные технологии. Целью работы стало проведение трансплантации нативных или экспрессирующих репортерный ген (EGFP) мононуклеарных клеток пуповинной крови человека (МКПК) APP/PS1 трансгенным мышам с моделью болезни Альцгеймера с последующей оценкой эффектов трансплантации поведенческими (Т-образный лабиринт, крестообразный лабиринт, открытое поле) и иммуногистохимическими методами. Было установлено, что трансплантация МКПК оказывает положительные клинические эффекты на APP/PS1 мышей: улучшает пространственную память, снижает тревожность и неспецифическую возбудимость, повышает эффективность исследовательского поведения. Трансплантированные клетки были выявлены в коре и гиппокампе даже через 3 мес. после трансплантации; при этом на ранних сроках после трансплантации была подтверждена экспрессия репортерного гена EGFP трансплантированными клетками. Таким образом, применение генно-клеточных конструкций на основе МКПК является перспективным направлением в разработке терапии болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, стволовые клетки, генно-клеточная терапия, APP/PS1 трансгенные мыши, мононуклеарные клетки пуповинной крови, Т-образный лабиринт.

Болезнь Альцгеймера — прогрессирующее неизлечимое нейродегенеративное заболевание, главным проявлением которого является деменция. В настоящее время более 25 млн людей во всем мире страдают от болезни Альцгеймера, а в 2040 г. по экспертным оценкам, их число достигнет 80 млн [1].

Ключевую роль в развитии болезни Альцгеймера играет избыточная продукция и накопление β-амилоидного пептида (βАП), являющегося основным компонентом сенильных бляшек в ткани мозга. βАП имеет широкий спектр нейротоксических эффектов, включающий окислительный стресс, митохондриальную дисфункцию, нарушение работы ионного транспорта, синаптическую дисфункцию, апоптоз нейронов [2, 3].

В настоящее время отсутствуют эффективные способы лечения болезни Альцгеймера — применяемые лекарства действуют симптоматически и способны лишь замедлить прогрессирование, но

Alzheimer's disease is progressive incurable neurodegenerative disease, which is manifested mainly by dementia. One of the most promising directions in development of Alzheimer's disease treatment is use of gene-cell technologies. The aim of current study was to perform transplantation of wild-type or EGFP expressing umbilical cord blood mononuclear cells (МКПК) to APP/PS1 transgenic mice with Alzheimer's disease model with further evaluation of transplantation impact with behavioral (T-maze, plus maze, open field) and immunohistochemical methods. It was found that МКПК transplantation significantly ameliorates behavioral performance of APP/PS1 mice: improves spatial memory, decreases anxiety and non-specific excitability, increases the efficacy of exploratory behavior. Grafted cells were found in cortex and hippocampus of mice even 3 months after МКПК transplantation, herewith EGFP expression in grafted cells was found at early stages after transplantation. Thus, use of МКПК-based gene-cell constructs represents a promising direction in development of Alzheimer's disease therapy.

Key words: Alzheimer's disease, stem cells, gene-cell therapy, APP/PS1 transgenic mice, umbilical cord blood mononuclear cells, T-maze.

не могут излечить пациента. Перспективным направлением разработки патогенетической терапии болезни является доставка ростовых и нейротрофических факторов в очаги нейродегенерации. Показано изменение уровня ряда нейротрофических факторов в спинномозговой жидкости и различных областях головного мозга при болезни Альцгеймера [4, 5]. Установлено положительное влияние фактора роста нервов (NGF) и мозгового нейротрофического фактора (BDNF) на выживание нейронов, синаптическую функцию и память при болезни Альцгеймера [6–8].

Доставка ростовых и нейротрофических факторов в ткань мозга возможна благодаря развитию генно-клеточных технологий. Одним из наиболее перспективных подходов является применение мононуклеарных клеток пуповинной крови (МКПК). МКПК включают в себя различные стволовые и прогениторные клетки, служат источником ростовых

и трофических факторов, а также могут быть модифицированы с целью введения векторов, обеспечивающих высокий уровень экспрессии терапевтических генов [9–12].

Целью работы стало проведение трансплантации нативных или экспрессирующих репортерный ген (EGFP) МКПК трансгенным мышам с моделью болезни Альцгеймера с последующей оценкой поведенческих характеристик мышей и способности трансплантированных клеток к хоумингу и выживанию в ткани мозга.

Материал и методы

Создание генно-клеточных конструкций

Заготовку пуповинной крови человека проводили после получения информированного согласия у беременной и дородового скрининга на наличие противопоказаний к донорству пуповинных клеток. Кровь собирали в пластиковые контейнеры CPDA-1 250 GG (Terumo, Япония) и доставляли в Банк стволовых клеток Казанского государственного медицинского университета, где из неё выделяли мононуклеарную фракцию с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколла [13]. Полученные клетки ресуспендировали в среде DMEM, к которой были добавлены сыворотка крови плодов коровы (10%), L-глутамин (2 мМ), смесь антибиотиков пенициллина и стрептомицина (1%) (Sigma, США). Для генетической модификации клетки трансдуцировали рекомбинантными аденовирусами, экспрессирующими ген EGFP (Ad-EGFP) (10 бляшко-образующих единиц на клетку) [14]. МКПК культивировали 14–16 ч в 10 см культуральных чашках при 37°C в условиях термостатирования с поддержанием 5% уровня CO₂ во влажной атмосфере. Перед трансплантацией МКПК осаждали центрифугированием и разводили в стерильном физиологическом растворе до концентрации 2×10⁷ кл./мл МКПК вводили животным ретроорбитально.

Экспериментальные группы животных

Трансгенные мыши с моделью болезни Альцгеймера, экспрессирующие мутантные человеческие гены белка предшественника амилоида и пресенелина 1 (генотип B6C3 – Tg(APP695)85Dbo Tg(PSENI)85Dbo) (далее – APP/PS1 мыши) были закуплены в Jackson Laboratory (США) и содержатся в питомнике лабораторных животных «Пушино» (Московская область). К началу эксперимента мышей доставили в КГМУ и разделили на 4 группы: 1) мыши дикого типа (n = 15, группа WT); 2) APP/PS1 мыши (n = 15, группа Alz); 3) APP/PS1 мыши после ксенотрансплантации 2 млн интактных МКПК (n = 6, группа Alz-МКПК); 4) APP/PS1 мыши после ксенотрансплантации 2 млн МКПК, трансдуцированных Ad-EGFP (n = 9, группа Alz-EGFP). Возраст всех животных был в пределах 8–9 мес.

Поведенческие тесты

T-образный лабиринт. Для исследования пространственной памяти мышей был использован T-образный лабиринт (Открытая Наука, Россия). В ходе эксперимента мыши были ограничены в потреблении пищи. Подготовительный период начинался через 5 дней после трансплантации МКПК и

длился 7 дней. Затем начиналось собственно обучение, которое длилось 14 дней. В ходе обучения каждый день мыши проходили по 6 пар тренировочных испытаний. В первом (принудительном) испытании один из рукавов лабиринта был закрыт, и мышь шла в открытый (где находилась пища). Во втором (свободном) испытании оба рукава были открыты, но пища находилась в противоположном, то есть ранее закрытом рукаве. Когда два испытания даются с коротким временным промежутком, во второй раз животное склонно выбрать рукав, не посещенный ранее, что свидетельствует о памяти первого выбора. Этот феномен называется «спонтанной альтернативой» [15]. Мышь считалась обученной, если она делала не менее 5 правильных выборов из 6 во время второго испытания в течение 3 дней подряд. При этом мыши присваивалось значение, соответствующее номеру последнего из этих трех дней. Если же мышь в течение двух недель так и не обучилась, то ей присваивалось значение «14».

Крестообразный лабиринт. Применяли закрытый крестообразный лабиринт, состоящий из центрального и 4 боковых отсеков (НПК Открытая Наука, Москва, Россия) по ранее описанной методике [16, 17]. Мышь помещали в центральный отсек и регистрировали последовательность ее переходов из одного рукава в другой. Тест заканчивался, когда происходило 13 таких переходов. Анализировали следующие параметры (в скобках указано, что он отражает): общее время, проведенное в лабиринте (уровень двигательной исследовательской активности), время в боковых отсеках (уровень тревожности), число циклов «патрулирования» (эффективность ориентировочно-исследовательского поведения, пространственная память), число актов дефекации (уровень тревожности).

Открытое поле. Двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность оценивали методом открытого поля. Установка «Открытое поле» представляет собой круглую арену, пол которой имеет отверстия и разлинован на квадраты (НПК Открытая Наука, Москва, Россия). Метод позволяет оценивать поведение грызунов в новых (стрессогенных) условиях. Мышь помещали в центр арены и в течение трех минут подсчитывали количество пересеченных линий (горизонтальная активность), вертикальных стоек (вертикальная активность, неспецифическая возбудимость), заглядываний в отверстия (исследовательская активность).

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Идентификацию МКПК в гиппокампе и соматосенсорной коре мышей проводили на сроках 7 сут. и 3 мес. после трансплантации. Для этого мышей под анестезией транкардиально перфузировали фосфатно-солевым буфером (PBS) и 4% раствором параформальдегида (4°C). Затем извлекали головной мозг и фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение суток, после чего перекладывали в 30% раствор сахарозы в PBS с добавлением 0,02% азидата натрия. Для приготовления криостатных срезов ткань помещали в заливочную среду Neg 50 и замораживали в течение 2 мин. Приготовленные срезы помещали в PBS, промывали в 0,1% растворе Triton-X100 на PBS (PBST), инкубировали в 5% растворе ослиной сыворотки в PBST в течение 45 мин при комнатной температуре.

Для идентификации антигенов срезы инкубировали с антителами к маркёру ядер клеток человека (HNU, Millipore, 1:150) и зеленому флуоресцирующему белку (EGFP, Osenses, 1:100) в течение суток при 4°C, промывали в PBS, затем инкубировали со вторичными антителами ослы, конъюгированными с флуоресцентным красителем Alexa 647 и 488 в течение 2 ч в при комнатной температуре в темноте, промывали в PBS. Для визуализации ядер срезы дополнительно инкубировали 10 мин в 0,02% растворе пропидиума иодида (PI) на PBS, промывали в PBS. Окрашенные срезы заключали в среду Shandon Immu-Mount и изучали при помощи конфокального сканирующего микроскопа LSM 510-Meta (Carl Zeiss).

Результаты представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего значения, статистическая значимость различий оценивалась при помощи t-критерия Стьюдента или критерия Фише-

ра, отличия считались достоверными при $p < 0,05$. По критерию Фишера оценивались различия процентных значений обученных мышей от их общего количества между группами, по t-критерию Стьюдента – различия всех остальных параметров.

Результаты

Исследование пространственной памяти в Т-образном лабиринте

WT мыши обучались в среднем за $10,4 \pm 0,6$ дней, при этом к 10 дню обучилось 42%, а к 14-му – 72,5% мышей от общего количества в группе (рис. 1А). В ходе обучения происходило снижение латентного периода захода в рукав лабиринта с $29,2 \pm 3,4$ с до $11,1 \pm 3,0$ с. Alz мыши обучались достоверно дольше в сравнении с WT мышами – за $13,3 \pm 0,3$ дней. При этом процентное количество обучившихся Alz мышей было достоверно ниже в сравнении с WT группой:

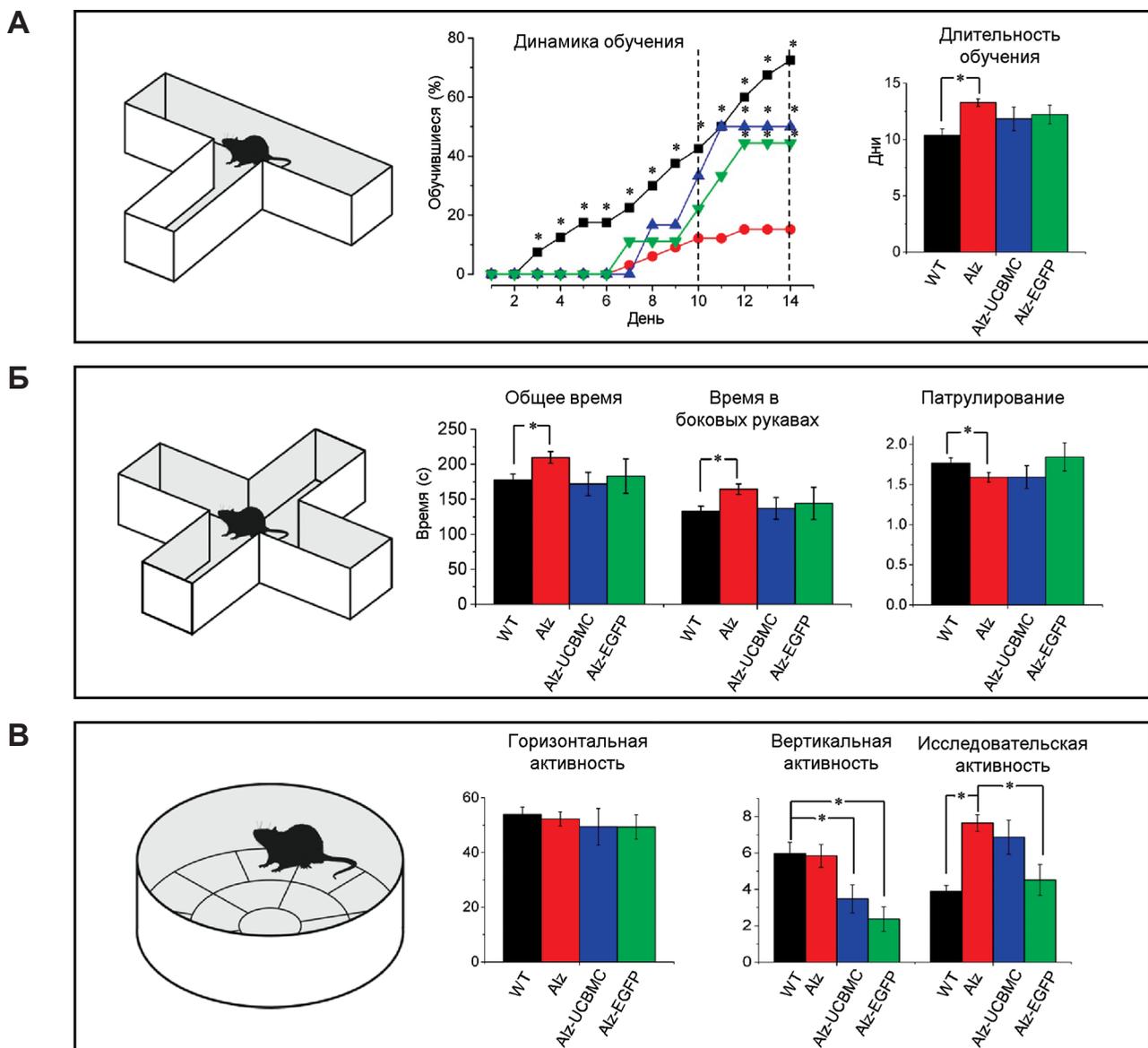


Рис. 1. Влияние трансплантации МКПК человека на поведенческие характеристики APP/PS1 трансгенных мышей: А – результаты эксперимента в Т-образном лабиринте; Б – результаты тестирования в крестообразном лабиринте; В – результаты тестирования в открытом поле.

WT – мыши дикого типа; Alz – APP/PS1 мыши без лечения; Alz-МКПК – APP/PS1 мыши с трансплантацией МКПК человека; Alz-EGFP – APP/PS1 мыши с трансплантацией МКПК человека, трансдуцированных Ad-EGFP.

*различия между группами статистически значимы при $p < 0,05$

на 10-й день обучилось 12,1%, на 14-й день — 15,2%. Латентный период захода в рукав лабиринта у Alz мышей в начале обучения был достоверно выше показателей WT и составлял $42,2 \pm 5,7$ с, а к 14-му дню достиг $19,2 \pm 3,3$ с и не отличался от группы WT.

Alz-МКПК и Alz-EGFP мыши обучались за $11,8 \pm 1,0$ и $12,2 \pm 0,8$ дней, соответственно. Количество обучившихся мышей в группах Alz-МКПК и Alz-EGFP на 14-й день составило 50 и 44,4%, соответственно, что достоверно больше в сравнении с группой Alz (рис. 1А). Латентные периоды захода в рукав лабиринта Alz-МКПК и Alz-EGFP мышей в первые дни обучения не отличались от Alz группы, однако, начиная с 5-го дня, становились ниже и приближались к показателям группы WT.

Таким образом, трансплантация МКПК значительно улучшала показатели пространственной памяти у APP/PS1 мышей.

Исследование ориентировочно-исследовательского поведения и тревожности мышей в закрытом крестообразном лабиринте

WT мыши проводили в крестообразном лабиринте $177,4 \pm 8,7$ с, из них в центральном отсеке — $43,5 \pm 2,0$ с, в боковых отсеках — $132,7 \pm 7,5$ с. Количество циклов патрулирования, совершаемое WT мышами, составляло $1,8 \pm 0,1$. Общее время, проведенное Alz мышами в лабиринте, было достоверно больше в сравнении с WT группой и составило $209,6 \pm 8,4$ с, что связано с более длительным временем в боковых отсеках; при этом количество циклов патрулирования было достоверно меньше. В группах Alz-МКПК и Alz-EGFP общее время в лабиринте и время в боковых отсеках были меньше, чем в группе Alz, и достоверно не отличались от группы WT (рис. 1Б). Таким образом, в группах Alz-МКПК и Alz-EGFP было выявлено снижение тревожности в сравнении с Alz мышами.

Исследование двигательной и исследовательской активности мышей в открытом поле

Горизонтальная активность у мышей разных групп достоверно не различалась. У WT мышей величина горизонтальной активности составила $54,0 \pm 2,6$, вертикальной активности $6,0 \pm 0,6$, исследовательской активности $3,9 \pm 0,3$. У Alz мышей отличия заключались только в более высокой исследовательской активности ($7,7 \pm 0,5$). В группе Alz-МКПК вертикальная и исследовательская активность не отличалась от группы Alz, тогда как в группе Alz-EGFP эти виды активности были достоверно снижены в сравнении с Alz мышами (рис. 1В).

В целом, можно отметить, что трансплантация МКПК не оказывала значимых эффектов на поведение APP/PS1 мышей, приводя лишь к некоторому уменьшению вертикальной активности, что может свидетельствовать о снижении неспецифической возбудимости.

Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов головного мозга

При анализе срезов мозга мышей Alz-МКПК на обоих сроках после трансплантации были обнаружены единичные человеческие (HNU⁺) клетки в коре и в области зубчатой извилины. У Alz-EGFP мышей

на 7 сут. после трансплантации обнаруживались как HNU⁺, так и HNU⁺/EGFP⁺ клетки, локализованные преимущественно в области CA1 гиппокампа и коре (рис. 2А); при этом количество человеческих клеток было больше в сравнении с группой Alz-МКПК. При анализе материала мышей Alz-EGFP через 3 мес. после трансплантации обнаруживались только HNU⁺ клетки, локализованные в гиппокампе и глубоких слоях коры. Экспрессия EGFP этими клетками не наблюдалась, либо была минимальна (рис. 2Б).

Таким образом, было выявлено наличие клеток человека в гиппокампе и коре головного мозга APP/PS1 мышей на разных сроках после трансплантации МКПК, а также подтверждена возможность экспрессии ими рекомбинантных генов.

Обсуждение

Известно, что именно синаптическая патология является основной причиной нарушения когнитивных функций при болезни Альцгеймера. В гиппокампе и коре мозга наблюдается снижение количества синапсов и пресинаптического белка синаптофизина, хорошо коррелирующее с выраженностью когнитивных нарушений [3]. При этом нарушение памяти и синаптическая дисфункция обнаруживаются еще до появления амилоидных бляшек и массивной гибели нейронов [18]. Дисфункция локальных нейронных сетей, вызванная нарушением синаптических связей между нейронами, приводит не только к нарушению обучения и памяти, но, вероятно, и к нейродегенерации [19].

С учетом вышеуказанных фактов, основными задачами генно-клеточной терапии болезни Альцгеймера являются не только замена утраченных и поддержка жизнеспособности оставшихся нейронов, но и восстановление локальных нейронных сетей и синаптических связей.

В данной работе нами были применены генно-клеточные конструкции на основе МКПК. Преимуществами МКПК являются безопасность, доступность, низкая иммуногенность, способность проникать через гематоэнцефалический барьер, отсутствие законодательных и этических норм для их применения. Трансплантированные МКПК способны к преимущественной миграции в очаги нейродегенерации [20], служат источником ростовых и трофических факторов — сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), глиального фактора роста (GDNF), NGF, цитокинов, хемокинов и др. [9–11]. Кроме того, существует возможность генетической модификации МКПК с целью введения векторов, обеспечивающих высокий уровень экспрессии терапевтических или репортерных генов. Показана способность МКПК дифференцироваться в различные клеточные типы в ткани мозга [21, 22].

В ходе работы нами было установлено два важных факта. Во-первых, трансплантация МКПК значительно улучшала пространственную память у APP/PS1 мышей. Наиболее вероятным объяснением этому является улучшение функций межнейронных синапсов и локальных нейронных сетей у больных животных под действием трансплантированных клеток. Были отмечены и другие положительные клинические эффекты (снижение тревожности, повышение эффективности исследовательского поведения, снижение неспецифической возбудимости). Во-вторых, трансплантированные клетки обнаруживались в коре

и гиппокампе даже через 3 месяца после трансплантации, что должно обеспечить долгосрочность терапевтических эффектов; при этом на ранних сроках после трансплантации была подтверждена экспрессия репортерного гена EGFP трансплантированными клетками.

Таким образом, применение генно-клеточных конструкций на основе МКПК является многообещающим направлением в разработке терапии болезни Альцгеймера. Модификация МКПК с целью доставки терапевтических генов может значительно улучшить эффекты трансплантации.

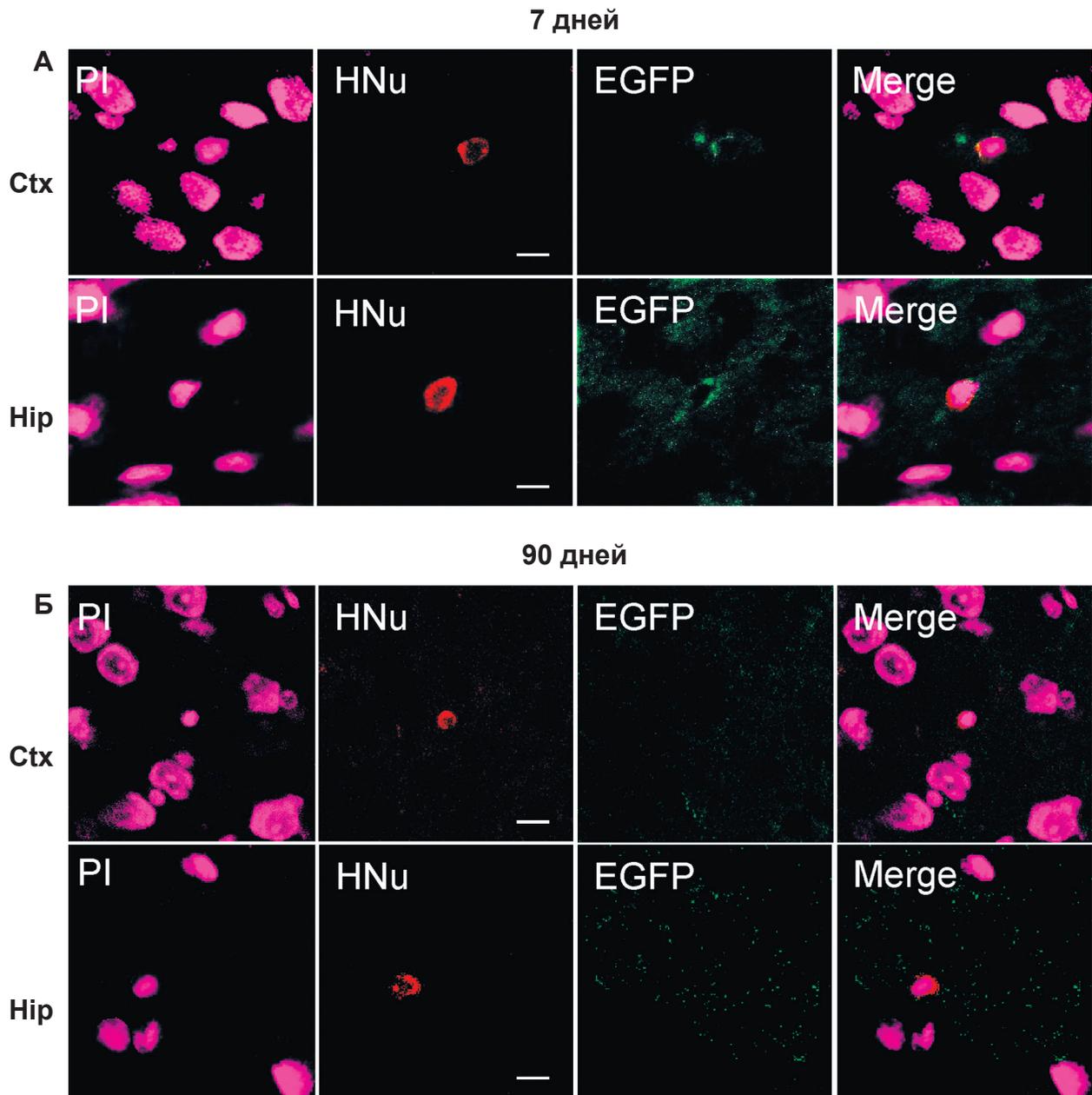


Рис. 2. Трансплантированные клетки в головном мозге APP/PS1 трансгенных мышей: А – 7 сут.; Б – 3 мес. после трансплантации. Ctx – кора, Hip – гиппокамп. Иммуногистохимическая реакция с антителами к HNu и EGFP, докраска ядер PI. Флуоресцентная микроскопия. Шкала 5 мкм

Благодарности

Работа проведена при поддержке грантов РФФИ №№ 13-04-02057, 12-04-33195, совместного гранта РФФИ и Академии наук Республики Татарстан № 13-04-97156. 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. Prince M., Bryce R., Albanese E. et al. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement.* 2013; 9: 63–75 e62.
2. Мухамедьяров М.А., Зефиоров А.П. Влияние β -амилоидного пептида на функции возбудимых тканей: физиологические и патологические аспекты. *Успехи физиологических наук* 2013; 44: 55–71.
3. Querfurth H.W., LaFerla F.M. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 2010; 362: 329–44.
4. Lu B., Nagappan G., Guan X. et al. BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 2013; 14: 401–16.
5. Sopova K., Gatsiou K., Stellos K. et al. Dysregulation of neurotrophic and haematopoietic growth factors in Alzheimer's disease: from pathophysiology to novel treatment strategies. *Curr. Alzheimer Res.* 2014; 11: 27–39.
6. Tuszynski M.H. Nerve growth factor gene therapy in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 2007; 21: 179–89.
7. Ernfors P., Bramham C.R. The coupling of a trkB tyrosine residue to LTP. *Trends Neurosci.* 2003; 26: 171–3.
8. Nagahara A.H., Merrill D.A., Coppola G. et al. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2009; 15: 331–7.
9. Newman M.B., Willing A.E., Manresa J.J. et al. Cytokines produced by cultured human umbilical cord blood (HUCB) cells: implications for brain repair. *Exp. Neurol.* 2006; 199: 201–8.
10. Neuhoff S., Moers J., Rieks M. et al. Proliferation, differentiation, and cytokine secretion of human umbilical cord blood-derived mononuclear cells in vitro. *Exp. Hematol.* 2007; 35: 1119–31.
11. Fan C.G., Zhang Q.J., Tang F.W. et al. Human umbilical cord blood cells express neurotrophic factors. *Neurosci. Lett.* 2005; 380: 322–5.
12. Chen N., Newcomb J., Garbuzova-Davis S. et al. Human umbilical cord blood cells have trophic effects on young and aging hippocampal neurons in vitro. *Aging Dis.* 2010; 1: 173–90.
13. Fuss I.J., Kanof M.E., Smith P.D. et al. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr. Protoc. Immunol.* 2009; Chapter 7: Unit 7.1.
14. Завалишин И.А., Бочков Н.П., Суевна З.А. и др. Генная терапия бокового амиотрофического склероза. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2008; 145: 467–70.
15. Deacon R.M., Rawlins J.N. T-maze alternation in the rodent. *Nat. Protoc.* 2006; 1: 7–12.
16. Salimov R. M., McBride W. J., Sinclair J. D. et al. Performance in the cross-maze and slip funnel tests of four pairs of rat lines selectively bred for divergent alcohol drinking behavior. *Addict. Biol.* 1996; 1: 273–80.
17. Markina N.V., Salimov R.M., Poletaeva I.I. Behavioral screening of two mouse lines selected for different brain weight. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2001; 25: 1083–9.
18. Selkoe D.J. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 2002; 298: 789–91.
19. Garden G.A., La Spada A.R. Intercellular (mis)communication in neurodegenerative disease. *Neuron* 2012; 73: 886–901.
20. Garbuzova-Davis S., Willing A.E., Zigova T. et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 2003; 12: 255–70.
21. 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. (Maywood).* 2010; 236(1): 91–8.
22. 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: 389–94.

Поступила: 30.07.2014