

Л.А. Осипова¹, Л.М. Кузенкова^{1, 2}, Л.С. Намазова-Баранова^{1, 2, 3}, А.К. Геворкян^{1, 2}, Т.В. Подклетнова¹, Н.Д. Вашакмадзе^{1, 3}

¹ Научный центр здоровья детей, Москва, Российская Федерация

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Российская Федерация

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Российская Федерация

Нейронопатические мукополисахаридозы: патогенез и будущее терапевтических подходов

Контактная информация:

Осипова Лилия Александровна, заочный аспирант НЦЗД, врач-невролог консультативного отделения КДЦ НЦЗД

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2/62, тел.: +7 (495) 967-14-20, e-mail: osipova_la@nczd.ru

Статья поступила: 22.07.2015 г., принята к печати: 28.10.2015 г.

Мукополисахаридозы — группа наследственных заболеваний обмена веществ, относящихся к лизосомным болезням накопления и связанных с дефицитом ферментов, расщепляющих гликозаминогликаны (мукополисахариды). Для тяжелых форм мукополисахаридозов I, II и VII типа и мукополисахаридоза III типа характерно первичное поражение центральной нервной системы и нейродегенеративный характер течения заболевания, проявляющийся регрессом когнитивных функций, нарушениями поведения и уменьшением продолжительности жизни. Нейропатогенез мукополисахаридозов изучен недостаточно. Вопрос о возможности обратного развития повреждений на клеточном уровне остается открытым. Эффективных методов лечения мукополисахаридозов с первичным поражением центральной нервной системы до настоящего времени не разработано. Препараты для ферментозаместительной терапии, вводимые внутривенно, не проникают через гематоэнцефалический барьер и, соответственно, не оказывают влияния на течение нейродегенеративного процесса. Многообещающие результаты демонстрируют доклинические исследования высокодозной, интратекальной и интравентрикулярной ферментозаместительной терапии; применения модифицированного фермента, способного преодолеть гематоэнцефалический барьер; генной, клеточной, субстратредуцирующей терапии; методов считывания через стоп-кодон.

Ключевые слова: нейронопатические мукополисахаридозы, гематоэнцефалический барьер, генная терапия, клеточная терапия, субстратредуцирующая терапия.

(Для цитирования: Осипова Л.А., Кузенкова Л.М., Намазова-Баранова Л.С., Геворкян А.К., Подклетнова Т.В., Вашакмадзе Н.Д. Нейронопатические мукополисахаридозы: патогенез и будущее терапевтических подходов. *Вопросы современной педиатрии*. 2015; 14 (5): 539–547. doi: 10.15690/vsp.v14i5.1436)

ВВЕДЕНИЕ

Мукополисахаридозы (МПС) — группа наследственных заболеваний обмена веществ, относящихся к лизосомным болезням накопления и связанных

с дефицитом ферментов, ответственных за расщепление гликозаминогликанов (ГАГ) — мукополисахаридов [1–3]. Описано 7 типов и 11 подтипов МПС и соответствующий им дефицит 11 ферментов, каждый из кото-

L.A. Osipova¹, L.M. Kuzenkova^{1, 2}, L.S. Namazova-Baranova^{1, 2, 3}, A.K. Gevorkyan^{1, 2}, T.V. Podkletnova¹, N.D. Vashakmadze^{1, 3}

¹ Scientific Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

² Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

³ N.I. Pirogov Russian National Medical Research University, Moscow, Russian Federation

Neuronopathic Types of Mucopolysaccharidoses: Pathogenesis and Emerging Treatments

Mucopolysaccharidoses are a group of hereditary metabolic diseases, relating to lysosomal storage disorders and caused by a deficiency of the enzymes, involved in degradation of glycosaminoglycans (mucopolysaccharides). Severe forms of mucopolysaccharidoses of types I, II and VII and mucopolysaccharidosis of type III are characterised by primary central nervous system damage and neurodegenerative course of the disease with cognitive decline, behavioural abnormalities and decreased lifespan. Neuropathogenesis of mucopolysaccharidoses is not completely studied. The question of reversibility of cellular damage is still open. There is currently no effective treatment for mucopolysaccharidoses with primary central nervous system damage. Intravenous enzyme replacement therapy doesn't cross the blood-brain barrier and has no influence on neurodegeneration. Investigation of alternative treatment options, providing delivery of therapeutic agent to central nervous system, is currently being carried out. Preclinical studies of high-dose, intrathecal, intraventricular enzyme replacement therapy; administration of modified enzyme, capable of crossing the blood-brain barrier; gene, cell therapies, stop codon readthrough approach and substrate reduction therapy show promising results.

Key words: neuronopathic mucopolysaccharidosis, blood-brain barrier, gene therapy, cell therapy, substrate reduction therapy.

(For citation: Osipova L.A., Kuzenkova L.M., Namazova-Baranova L.S., Gevorkyan A.K., Podkletnova T.V., Vashakmadze N.D. Neuronopathic Types of Mucopolysaccharidoses: Pathogenesis and Emerging Treatments. *Voprosy sovremennoi pediatrii — Current Pediatrics*. 2015; 14 (5): 539–547. doi: 10.15690/vsp.v14i5.1436)

рых катализирует одну из реакций пути распада ГАГ [4]. Результатом недостаточности данных ферментов является прогрессирующее накопление ГАГ в различных органах и тканях, в т.ч. в центральной нервной системе (ЦНС), оболочках головного и спинного мозга [1, 5, 6]. Для каждого типа МПС характерно разнообразие клинической симптоматики, выраженность которой некоторые исследователи связывают с остаточной активностью фермента, которая в свою очередь обусловлена типом генетической мутации. Для тяжелых форм МПС I, II, VII типа и МПС III характерно нейродегенеративное течение заболевания, характеризующееся регрессом когнитивных функций, нарушениями поведения и сокращением продолжительности жизни. При всех нейронопатических типах МПС нарушен метаболизм гепарансульфата [3, 4, 7].

МЕТАБОЛИЗМ ЛИЗОСОМНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

С точки зрения терапевтической тактики наибольшие трудности представляют лизосомные болезни накопления, сопровождающиеся поражением ЦНС. Понимание характера метаболизма лизосомных ферментов в ЦНС и особенностей его нарушения при болезнях накопления необходимо для разработки методов лечения.

Микроглия представляет собой популяцию макрофагов головного мозга и обладает многими свойствами данных клеток, включая наличие гидролаз. Популяция клеток микроглии происходит из циркулирующих в кровяном русле моноцитов, которые мигрируют в ткань головного мозга в раннем постнатальном периоде и последовательно дифференцируются в амебоидные и ветвистые микроглиальные клетки. Постнатально микроглиальные клетки продолжают непрерывно замещаться проникающими через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) моноцитами костного мозга [8, 9].

Лизосомные ферменты, содержащиеся в сайтах гликозилирования маннозо-6-фосфатные остатки, секретируются микроглиальными клетками и в дальнейшем подвергаются опосредованному маннозо-6-фосфатными рецепторами обратному захвату окружающими нейронами [8, 10]. Существование механизма обратного захвата лизосомных ферментов нейронами, так называемой кросс-коррекции, было неоднократно продемонстрировано на экспериментальных моделях животных с нейродегенеративными заболеваниями из группы лизосомных болезней накопления [4, 8, 10].

Помимо механизма секреции и обратного захвата существуют и другие виды транспорта лизосомных ферментов в ЦНС. В частности, важным способом доставки лизосомных ферментов на более отдаленные участки считается аксональный транспорт, изучение которого имеет большое значение для разработки новых методов терапии [8].

НЕЙРОПАТОГЕНЕЗ

Дефицит лизосомных ферментов приводит к накоплению нерасщепленных или частично расщепленных ГАГ, следствием чего является нарушение структуры и функции клеток, тканей и органов [2, 8, 9]. Для лизосомных болезней накопления характерно медленное отложение

продуктов нарушенного метаболизма, при котором развитие клинической симптоматики связано с достижением некоторого порога накопления субстрата [10].

Несмотря на произошедший в последние годы значительный прогресс в понимании генетических, молекулярных и биохимических основ лизосомных болезней накопления, механизмы нейродегенеративного процесса и его влияние на течение болезни в целом до конца не изучены [9].

Накопление субстрата в нейронах, считающееся первичным фактором каскада дальнейших патогенетических реакций, чаще всего происходит в перинуклеарных областях [4, 8, 9]. В головном мозге экспериментальных мышей с МПС I, IIIA и B описано прогрессирующее увеличение размера лизосом. В коре головного мозга экспериментальных животных также было продемонстрировано наличие дистрофированных аксонов с истонченной миелиновой оболочкой, так называемых аксональных сфероидов, содержащих митохондрии и множественные везикулы, сходные по структуре с аутофагосомами [3, 9, 10].

По мнению A. Biffi и L. Naldini, активацию микроглии в ЦНС при многих болезнях накопления можно рассматривать как первичную реакцию на накопление субстрата внутри клеток или как воспалительный ответ на первичное нейрональное повреждение [10]. Другие исследователи также указывают на роль активации микроглии в патогенезе нейронопатических МПС. На экспериментальной мышинной модели МПС VII продемонстрировано повышение интенсивности экспрессии генов, связанных с развитием воспалительного ответа в виде активации микроглии, астроглиоза и клеточной гибели [8, 11]. В условиях патологического процесса микроглиальные клетки, ответственные в физиологических условиях за поддержание целостности синаптических связей и гомеостаза межклеточного пространства, удаление продуктов распада клеток, регуляцию обмена глутамата и трофических факторов, активируются, пролиферируют и начинают продуцировать реактивные кислородные радикалы, оксид азота и провоспалительные цитокины [9]. Гиперпродукция реактивных форм кислорода, в свою очередь, приводит к повреждению клеток головного мозга, оказывая негативное влияние на целостность синаптических связей, таким образом, внося вклад в развитие нейродегенеративного процесса [8, 11].

Накопление в клетках первичного субстрата приводит к нарушению функции лизосом и, соответственно, дополнительному отложению вторичных продуктов нарушенного метаболизма [2, 9, 10]. В головном мозге экспериментальных животных моделей МПС I, IIIA, B и VII в качестве первичного субстрата описано накопление сульфатированного гепарансульфата, в качестве вторичных продуктов — GM2-, GM3-, GD3-ганглиозидов и эфиров холестерина [3, 10, 12]. Предполагают, что эти липиды ответственны за образование полосатых телец (от англ. zebra bodies), напоминающих лизосомные включения при сфинголипидозах [1, 2, 10]. У пациентов с МПС I и III также описано накопление β -амилоидного пептида в головном мозге, у больных МПС IIIB — повышенная экспрессия глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) [10]. Накопление первичных и вторичных продуктов аномального метаболизма приводит к наруше-

нию внутриклеточных процессов и клеточного гомеостаза, нарушению обмена кальция, механизмов аутофагии, внутриклеточного перемещения липидов [9].

В норме зрелые протеогликаны, локализующиеся со стороны наружной поверхности клеточных мембран и участвующие в межклеточных сигнальных механизмах, в качестве боковых цепей содержат ГАГ. Протеогликаны играют важную роль в процессе созревания ЦНС и формирования синапсов посредством взаимодействия с факторами роста и другими экстраклеточными компонентами. При накоплении ГАГ внутри клеток нарушается их сигнальная функция, что, вероятно, также вносит вклад в развитие патогенетических механизмов повреждения ЦНС [3, 9, 10].

В настоящее время считают, что нейропатогенез МПС характеризуется клеточной гибелью, однако большая часть изменений относится к обратимому накоплению субстрата. Вопрос о возможности обратного развития повреждений на клеточном уровне остается открытым [9].

ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР

Доставка многих потенциально лекарственных веществ ограничена наличием ГЭБ, считающегося в настоящее время главным препятствием для лечения большинства заболеваний головного мозга. Основой ГЭБ являются эндотелиальные клетки капилляров головного мозга, связанные между собой плотными контактами, формирующими преграду для осуществления парацеллюлярной водной диффузии. Подобные межклеточные контакты эндотелиальных клеток не встречаются в периферических капиллярах [8, 9, 13]. Полагают, что такое уникальное свойство эндотелиальных клеток капилляров головного мозга обусловлено тесным контактом астроцитов с базальной мембраной. Ножки астроцитов формируют подобие сети, оплетающей капилляры. ГЭБ также обладает свойствами электрического барьера за счет формирования трансэндотелиального электрического сопротивления [8, 9, 14]. Таким образом, ГЭБ предотвращает проникновение растворенных в крови веществ в ЦНС и обеспечивает формирование уникальной стабильной жидкостной среды нервной системы. Однако возможность проникновения моноцитов через ГЭБ посредством моноцитарно-эндотелиального взаимодействия и последующей дифференцировки в клетки микроглии сохраняется [8, 9, 13].

Данные о состоянии ГЭБ при нейродегенеративных МПС противоречивы. Так, например, на мышинной модели МПС IIIA была продемонстрирована интактность ГЭБ даже на поздних стадиях болезни [8, 9]. Однако данные аутопсии головного мозга 2 пациентов с МПС IIIA и IIID свидетельствовали о нарушении целостности ГЭБ [15].

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ, НАПРАВЛЕННЫЕ НА ВОСПОЛНЕНИЕ НЕДОСТАТОЧНОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА

Эффективных подходов к лечению лизосомных болезней накопления, сопровождающихся поражением нервной системы, до настоящего времени не разработано [8–10]. В основе изучения новых методов лечения лежит возможность использования экспериментальных моде-

лей животных с прицельным разрушением соответствующего гена [1, 8, 10].

Для обратного развития, остановки или, по крайней мере, замедления деструктивного воздействия ГАГ на головной мозг и оболочки ЦНС необходимо уменьшение количества накапливаемого субстрата [4]. В зависимости от причины, лежащей в основе дефицита фермента, возможно применение различных тактик лечения: восполнение недостающего фермента или его стабилизация в случае недостаточности, обусловленной нестабильностью дефектного белка [8].

Принято считать, что частичная коррекция, обеспечивающая остаточную активность фермента на уровне 5–10%, может быть достаточной для поддержания нормального клинического фенотипа [8, 10]. Кроме того, по мнению многих исследователей, для достижения оптимального эффекта лечение должно быть начато на досимптомной стадии болезни, до начала необратимого повреждения ЦНС [10, 16].

Ферментозаместительная терапия

Первым клинически успешным методом лечения лизосомных болезней накопления стала ферментозаместительная терапия (ФЗТ). Впервые концепцию введения экзогенного фермента предложил в 1964 г. Кристиан Де Дюв, бельгийский ученый, которому принадлежит открытие таких клеточных структур, как лизосомы и пероксисомы. Первые клинические испытания внутривенного введения человеческого белка были проведены в 1970 г. Вслед за начавшимися исследованиями внутривенного введения фермента пришло понимание невозможности достижения структур ЦНС по причине наличия ГЭБ [9, 10, 17]. Тем не менее ФЗТ продолжают успешно использовать для лечения соматических проявлений МПС во многих странах мира, в т.ч. и в России [18]. Исследования альтернативных терапевтических подходов, способных воздействовать на нейродегенеративный процесс, продолжаются до настоящего времени [4].

Высокодозная ферментозаместительная терапия

В течение последних нескольких лет исследователи изучали влияние высоких доз ФЗТ на моделях экспериментальных животных некоторых лизосомных болезней накопления, в том числе МПС I, II, IIIA и VII [8, 19, 20]. Результаты большинства исследований демонстрируют возможность уменьшения степени выраженности патологического процесса в ЦНС, а также улучшения некоторых неврологических функций экспериментальных животных под влиянием высокодозной ФЗТ. Механизм проникновения в ЦНС фермента, используемого в высоких дозах, остается неизвестным. Предполагается, что данный эффект может быть обусловлен перенесением фермента макрофагами крови, насыщением маннозо-6-фосфатных рецепторов, увеличением периода полураспада в плазме крови [8].

Интравентрикулярная и интратекальная ферментозаместительная терапия

Другими методами преодоления ГЭБ являются прямое интрацеребровентрикулярное и интратекальное введение лизосомных ферментов. В недавно проведенном исследовании показано уменьшение содержания гепарансуль-

фата и вторично накапливающимися соединений в головном мозге экспериментальных мышинных моделей МПС IIIВ при интрацеребровентрикулярном введении α -N-ацетилглюкозаминидазы, соединенной с фрагментом инсулиноподобного фактора роста II (IGF II), связывающимся с маннозо-6-фосфатным/IGFII рецептором и, таким образом, обеспечивающим поступление фермента в клетки [21].

В другом исследовании продемонстрирована возможность интратекальной ФЗТ увеличивать активность фермента в головном мозге в 3–20 раз по сравнению с таковой, демонстрируемой гетерозиготными носителями мутантного гена [4]. Уменьшение степени выраженности нейропатологических изменений в головном мозге и отложений ГАГ в твердой мозговой оболочке при применении данного метода описаны у экспериментальных мышей, собак и кошек с заданными генетическими свойствами МПС I, II, IIIА [8, 22, 23]. Повышение эффективности лечения при сочетании внутривенной ФЗТ и регулярного интратекального введения фермента показано на экспериментальных собаках с заданными генетическими свойствами МПС I [4].

В литературе описано 2 случая успешного интратекального введения рекомбинантного фермента при компрессии спинного мозга взрослым пациентам с МПС I и VI. В результате проведенной терапии, не сопровождавшейся побочными эффектами, у пациента с МПС I были отмечены улучшение походки, показателей дыхательных функций и уменьшение числа используемых обезболивающих препаратов [24]. У пациента с МПС VI имело место медленное, но стабильное улучшение температурной чувствительности и рефлексов, однако функция ходьбы продолжала прогрессивно ухудшаться [25].

Основным недостатком интратекального метода введения фермента является его инвазивность, предполагающая риск возникновения инфекционных и хирургических осложнений. Следует также отметить, что распределение фермента при интратекальном введении может быть недостаточно равномерным, особенно в большем по объему головном мозге человека, а вероятность получения положительного эффекта при манифестировавшем в ЦНС процессе, по мнению исследователей, представляется сомнительной [4, 9, 26]. Нерешенными остаются и вопросы выбора пути (вентрикулярного, цистернального или люмбального), метода (болюсного или непрерывного, при помощи осмотической помпы) и частоты введения фермента [8].

Обнадёживающие результаты доклинических испытаний и единичных случаев интратекальной ФЗТ у человека стали основанием для инициации клинических исследований метода у пациентов с МПС I, II, IIIА [8, 9, 27]. По данным M. Vera и соавт., у 1 из 5 пациентов с МПС I и компрессией спинного мозга, включенных в исследование интратекальной ФЗТ, было отмечено развитие признаков воспалительного ответа в виде лейкоцитоза, повышения концентрации интерлейкина 5 и иммуноглобулина G в цереброспинальной жидкости, появления боли в области спины и парестезий в области ягодиц [28]. В настоящее время продолжается клиническое исследование, направленное на изучение влияния интратекального введения α -L-идуронидазы на нейродегенера-

тивный процесс до и после проведения трансплантации костного мозга у пациентов с МПС I (NCT00638547¹) [29].

Результаты I/II фазы клинического исследования интратекального введения идурсульфазы 16 пациентам с тяжелой формой МПС II демонстрируют снижение концентрации ГАГ в цереброспинальной жидкости [30].

Исследование эффективности и безопасности интратекального введения идурсульфазы совместно с внутривенным введением данного фермента у пациентов с нейропатическим вариантом синдрома Хантера продолжается в настоящее время (NCT01506141) [29]. Также проводится открытое контролируемое многоцентровое исследование эффективности и безопасности интратекального введения рекомбинантного фермента гепаран-N-сульфатазы у пациентов с МПС IIIА на ранней стадии заболевания (NCT02060526) и продолжается исследование длительно проводимой интратекальной ФЗТ у пациентов с данным типом МПС (NCT01299727) [29].

Применение модифицированного фермента для доставки в центральную нервную систему

С целью рецепторопосредованного пересечения ГЭБ предложено использование эндогенных пептидов или моноклональных антител, связанных с ферментами или генами, так называемых молекулярных троянских коней [9]. В экспериментах с введением белков, содержащих моноклональные антитела к человеческому рецептору инсулина, опосредующие преодоление ГЭБ, и один из лизосомных ферментов (идуронат-2-сульфатазу или N-сульфоглюкозамин сульфогидролазу), макакам-резусам, было продемонстрировано проникновение данных соединений в клетки головного мозга животных в достаточных концентрациях [31, 32].

Трансплантация костного мозга

В исследованиях на животных показано, что гемопоэтические стволовые клетки способны проникать через ГЭБ и быть источником обновления микроглиальных клеток ЦНС [8, 33]. В связи с этим были предприняты попытки трансплантации гемопоэтических стволовых клеток с целью восстановления утраченной функции непосредственно в костном мозге и клетках, происходящих из костного мозга, локализующихся в других тканях, в т.ч. в клетках микроглии. При тяжелой форме МПС I трансплантация гемопоэтических стволовых клеток способна остановить прогрессирование нейродегенеративного процесса или замедлить регресс психического развития у детей в возрасте до 18–24 мес жизни с незначительными когнитивными нарушениями, имеющимися на момент трансплантации [9, 10]. Однако трудности подбора донора, развитие реакции «трансплантат против хозяина» и осложнений миелоаблативной терапии с высоким риском летального исхода заставляют искать альтернативные терапевтические подходы [9, 10, 34]. Опыт трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у пациентов с МПС II и III свидетельствует о неэффективности этого метода лечения в отношении нейродегенеративного процесса [9, 35, 36].

¹ Здесь и далее по тексту приведены регистрационные номера клинических исследований.

Клеточная и генная терапия

Еще одним разрабатываемым методом лечения нейропатических МПС является генная терапия, способная обеспечить непрерывное поступление терапевтического белка в головной мозг. Существуют 2 основных способа доставки гена в организм — *in* и *ex vivo* [8].

Генная терапия *in vivo*

При генной терапии *in vivo* печень используют в качестве «депо», обеспечивающего периферические органы терапевтическим белком. В экспериментах на животных для трансдукции клеток печени применяют аденоассоциированные, ретро- и лентивирусные векторы. В результате клетки печени продуцируют и секретируют в кровоток большое количество фермента, который впоследствии через взаимодействие с маннозо-6-фосфатным рецептором захватывается клетками органов. Эффективность этого метода в отношении коррекции и предотвращения патологических изменений в соматических клетках и внутренних органах была описана на экспериментальных животных моделях МПС [4, 8, 10].

В некоторых исследованиях с использованием внутривенного введения аденоассоциированного (AAV8) и лентивирусного векторов, а также других способов доставки гена в клетки печени (гидродинамических инъекций плазмид; микроциркулярной ДНК, представляющей собой плазмиду, лишённую некоторых бактериальных последовательностей ДНК; транспозона «спящая красавица», способного к интеграции в геном клеток хозяина) продемонстрирована возможность уменьшения степени выраженности патологических изменений не только в соматических клетках, но и в тканях головного мозга экспериментальных животных моделей МПС I, IIIA и VII [4, 37, 38]. По мнению некоторых исследователей, механизм данного явления может быть связан с проникновением через ГЭБ непрерывно синтезируемого на периферии фермента, преодолением вирусным вектором незрелого ГЭБ или несостоятельностью ГЭБ в связи с течением воспалительного процесса у используемых лабораторных животных [8, 10].

В недавних исследованиях на экспериментальных животных была показана возможность непосредственной трансдукции клеток ЦНС и, соответственно, повышения активности фермента в клетках головного мозга при внутривенном введении аденоассоциированного вирусного вектора серотипа 9 (AAV9), экспрессирующего фермент α -N-ацетилглюкозаминидазу, дефицит которого приводит к развитию МПС IIIB [39].

Долговременный анализ переноса некоторых генов позволил установить возникновение иммунного ответа, приводящего к элиминации трансдуцированных (генетически изменённых) клеток и/или потере активности фермента [40]. Однако в других исследованиях продемонстрировано, что возникновение иммунного ответа может быть предотвращено при использовании специфических для гепатоцитов промоторов, ограничивающих экспрессию трансгенов паренхиматозными клетками печени и предотвращающих их экспрессию в антигенпрезентирующих клетках, а также с помощью других методов доставки гена в печень, например при введении микроциркулярной ДНК в сочетании с иммуномодулирующей терапией [8, 10, 38].

Несмотря на результаты некоторых экспериментов, описывающих возможность уменьшения выраженности патологических изменений в ЦНС, исследователи полагают, что секретируемые в кровоток лизосомные ферменты при трансдукции гена в клетки печени не способны преодолеть ГЭБ. Данный факт положил начало исследованиям интракраниального введения вирусных векторов [8, 10]. Исследования интракраниальной генной терапии с применением аденоассоциированных, аденовирусных и лентивирусных векторов на экспериментальных животных моделях МПС I, III и VII продемонстрировали возможность распределения и экспрессии вирусных векторов, увеличение активности дефицитного фермента в головном мозге, предотвращение и исчезновение отложений первичного субстрата, GM2- и GM3-ганглиозидов, уменьшение степени выраженности нейропатологических проявлений, улучшение некоторых поведенческих и когнитивных характеристик экспериментальных животных [41–43]. Опыт интратекального введения AAV9 кошачьим моделям МПС I также продемонстрировал коррекцию биохимических и гистологических характеристик ЦНС у экспериментальных животных [44].

Исследования сочетанного внутривенного и интракраниального введения вирусных векторов свидетельствуют о возможности достижения положительных результатов. H. Fu и соавт. показано, что комбинация внутривенного и интракраниального введения AAV-вектора мышинной модели МПС IIIB приводит к увеличению продолжительности жизни, значительному уменьшению поведенческих нарушений и коррекции патологических изменений в ЦНС и соматических тканях [45].

Помимо механизма «кросс-коррекции», в основе эффективности терапии с использованием вирусных векторов лежит способность некоторых из них подвергаться ретроградному аксональному транспорту, что в свою очередь приводит к вторичной трансдукции и экспрессии фермента в отдалённых областях [10].

В целом, на доклиническом уровне применение методов переноса генов демонстрирует многообещающие результаты, однако возможность получения достаточного количества секретируемого фермента для достижения отдалённых от места инъекции областей большого по объёму головного мозга человека до сих пор представляется сомнительной [4, 8, 9]. Кроме того, требуется дальнейшая тщательная проработка многих аспектов эффективности и безопасности данного метода лечения, включающих риск активации онко-, лейкомо- и мутагенеза, нарушения транскрипции и экспрессии генов, находящихся в непосредственной близости к встраиваемым вирусным векторам [4, 9, 10].

Клиническое исследование генной терапии

Результаты первого клинического применения генной терапии у пациентов с МПС были опубликованы в июне 2014 г. В I/II фазу клинического исследования интракраниального введения аденоассоциированного вирусного вектора серотипа rh.10, несущего гены гепаран-N-сульфамидазы (SGSH) и модифицирующего фактора сульфатаз (SUMF1), были включены 4 пациента с МПС IIIA. Возраст 3 пациентов с наличием признаков атрофии головного мозга на момент начала исследования варьи-

ровал от 5,5 до 6 лет, возраст 4-го пациента составлял 2 года 8 мес. Введение вирусного вектора проводили в сочетании с иммуносупрессирующей терапией микофенолата мофетиллом и такролимусом. Данные о безопасности данной терапии, включающие сведения о состоянии пациентов во время лечения и в течение последующего года наблюдения, свидетельствуют о хорошей переносимости, отсутствии побочных эффектов, связанных с введением вирусного вектора, а также об отсутствии увеличения числа инфекционных заболеваний и токсичности, связанной с применением иммуносупрессирующих препаратов. По данным нейропсихологического исследования отмечалось незначительное улучшение показателей поведения, внимания и сна; данные магнитно-резонансной томографии показали нарастание атрофии головного мозга у 2 пациентов и отсутствие динамических изменений у 2 других детей. Наибольший положительный эффект на нейрокогнитивные характеристики продемонстрирован у самого младшего пациента [46]. С целью уточнения отдаленного эффекта, а также безопасности ранее проведенной генной терапии наблюдения за данными пациентами продолжается (NCT02053064) [29].

Генная терапия *ex vivo*

В связи с удовлетворительными результатами, полученными при проведении трансплантации гемопоэтических стволовых клеток больным с лизосомными болезнями накопления, одним из перспективных путей лечения считается генная терапия с применением гемопоэтических стволовых клеток. При генной терапии *ex vivo* производится трансфекция гена в аутологичные стволовые клетки, которые впоследствии снова вводят пациенту [8, 10].

Воздействие генной терапии с использованием гемопоэтических стволовых клеток на центральную и периферическую нервную систему основано на последовательном замещении эндогенных микроглиальных клеток и эндоневральных макрофагов генетически модифицированными гемопоэтическими стволовыми клетками, обеспечивающими резидентные нервные клетки дефицитным ферментом по механизму «кросс-коррекции», предотвращающими активацию микроглии и, соответственно, уменьшающими степень выраженности воспалительных и нейродегенеративных изменений [10].

Стратегия переноса генов, направленная на коррекцию генетического дефекта в гемопоэтических стволовых клетках, имеет значительные преимущества перед традиционной аллогенной трансплантацией стволовых клеток. Использование для генной терапии *ex vivo* аутологичных клеток позволяет снизить риск заболеваемости и смертности, связанный с введением чужеродного трансплантата, избежать реакции «трансплантат против хозяина» и характерной для генной терапии активации мутагенеза. Более того, при применении генетически модифицированных клеток возможно достижение более высокого уровня экспрессии фермента и, соответственно, большей терапевтической эффективности по сравнению с использованием клеток дикого типа [8–10].

Эффективность данного метода лечения была изучена на многих животных моделях лизосомных болезней накопления, в т.ч. МПС II и III. A. Langford-Smith и соавт. продемонстрировали нормализацию содержания гепа-

рансульфата в головном мозге, уменьшение степени выраженности нейровоспалительных проявлений, улучшение поведенческих характеристик экспериментальных мышинных моделей МПС IIIA после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, трансдуцированных *ex vivo* лентивирусным вектором, экспрессирующим сульфамидазу [47]. В другом опыте трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, трансдуцированных лентивирусным вектором, экспрессирующим идуронат-2-сульфатазу, мышинным моделям МПС II зафиксировано повышение активности фермента в ЦНС, уменьшение отложений ГАГ и вторичных продуктов нарушенного метаболизма в головном мозге экспериментальных животных [48].

Нейрональные стволовые клетки

Нейрональные стволовые клетки — примордиальные нейтральные клетки нервной системы. Основные свойства нейрональных стволовых клеток — способность к самообновлению в течение жизни, мультипотентность (т.е. способность дифференцироваться в нейроны, астроциты, олигодендроциты) и возможность заселять развивающиеся и замещать дегенерирующие нейрональные области. В связи с данными свойствами применение нейрональных стволовых клеток представляется привлекательным терапевтическим подходом [4, 10]. В нескольких экспериментах продемонстрировано, что трансплантация нейрональных стволовых клеток и клеток-предшественников в желудочки головного мозга экспериментальных мышинных моделей МПС VII приводит к миграции клеток на значительные от места инъекции расстояния, приживлению донорских клеток на всем протяжении нейроаксиса, уменьшению/коррекции лизосомных отложений субстрата в нейрональных и глиальных клетках, улучшению поведенческих характеристик экспериментальных животных [49–51]. Однако инвазивность данной процедуры, этические вопросы, касающиеся источника донорских клеток, в частности использования человеческих эмбрионов, и необходимость повсеместного и длительного замещения лизосомного белка в большем по объему головном мозге человека препятствуют внедрению данного терапевтического метода [8, 10].

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ШАПЕРОНЫ

При генетически обусловленных заболеваниях миссенс-мутации и некоторые делеции внутри рамки считывания приводят к аномальному фолдингу белка (организации полипептидной цепи в пространственную структуру), его последующей нестабильности, уменьшению активности фермента и неправильному «маршруту» белка в клетке, не затрагивая при этом (или затрагивая минимально) функционально-значимые домены мутантного полипептида (активный или рецепторсвязывающий сайты). Молекулярные шапероны, обладающие низкой молекулярной массой, могут быть использованы для коррекции данного нарушения. Шапероны являются частью клеточной системы контроля правильности синтеза белков. В естественных условиях они восстанавливают нативную конформацию аномальных белков, таким образом препятствуя их преждевременному распаду и обеспечивая доставку белка в лизосомы. Шапероны могут проникать через ГЭБ и распределяться в тканях, что представляет

особый интерес для терапии лизосомных болезней накопления с вовлечением ЦНС. Один из основных недостатков лечения фармакологическими шаперонами — возможность воздействия только на ограниченный спектр мутаций [4, 8, 9]. В опытах *in vitro* продемонстрирована возможность использования 2-ацетамидо-1,2-дидеоксинойримицина и 6-ацетамидо-6-деоксикастаноспермина в качестве шаперонов для терапии МПС IIIB, глюкозамина — для лечения МПС IIIC [52, 53].

СЧИТЫВАНИЕ ЧЕРЕЗ СТОП-КОДОН (STOP CODON READ THROUGH, SCRT)

Метод SCRT основан на подавлении терминации трансляции путем добавления случайной аминокислоты в позицию преждевременного стоп-кодона и обеспечения таким образом полной трансляции белка. Основными препаратами, используемыми с целью обеспечения считывания через стоп-кодон, являются аминокликозиды, механизм действия которых основан на повышении частоты инсерций аминокислот в области преждевременных стоп-кодонов и, соответственно, обеспечения продолжения трансляции на рибосоме [4].

Учитывая роль значительного числа нонсенс-мутаций в генезе МПС, препараты, обладающие способностью подавления преждевременных стоп-кодонов, представляют собой один из альтернативных подходов к лечению. В первом исследовании SCRT для терапии МПС I была описана способность гентамицина восстанавливать активность α -L-идуронидазы (IDUA) до 2,8% от нормального уровня, уменьшать внутриклеточное содержание ГАГ и вакуолизацию лизосом в фибробластах, гетерозиготных по нонсенс-мутациям *p.Q70X* и *p.W402X* [4, 54]. Недавние исследования, проведенные D. Wang и соавт., также продемонстрировали большую эффективность синтетического аминокликозида NB 84 по сравнению с другими аминокликозидами в обеспечении считывания через стоп-кодон для подавления мутации *p.W392X* в гене α -L-идуронидазы в эмбриональных фибробластах мышинной модели МПС I-H [55]. Дальнейшие исследования данного метода на мышинных моделях *in vivo* показали снижение экскреции и накопления ГАГ в различных тканях и органах, в т.ч. в головном мозге [56]. Основными преимуществами метода являются возможность перорального приема препаратов и их способность проникать через ГЭБ [4].

СУБСТРАТРЕДУЦИРУЮЩАЯ ТЕРАПИЯ

Основной задачей субстратредуцирующей терапии при МПС является снижение интенсивности образования ГАГ за счет ингибирования ферментов, необходимых для их синтеза. Субстратредуцирующая терапия предполагает использование молекул с низкой молекулярной массой, способных пересекать ГЭБ и достигать ЦНС. Для успешного применения данного вида лечения необходимо наличие остаточной активности фермента, обеспечивающей расщепление оставшегося количества накапливаемого субстрата [4, 10].

Терапия изофлавонами

Эффективным методом нарушения синтеза ГАГ и, соответственно, редукции отложений субстрата в клетках пациентов с МПС, по данным исследований, является терапия

генистеином (4',5,7-тригидроксиизофлавоном), предполагаемым механизмом действия которого считается ингибирование активности тирозинспецифичной протеинкиназы рецептора эпидермального фактора роста, оказывающей влияние на экспрессию генов, кодирующих ферменты, ответственные за синтез ГАГ [8, 27].

Опыты на мышинных моделях МПС II и III подтверждают возможность генистеина приводить к редукции отложенного гепарансульфата в печени и головном мозге животных, а также демонстрируют коррекцию поведенческих нарушений при его длительном применении [27, 57]. В недавних исследованиях *in vitro* также показана возможность других флавоноидов и их комбинаций приводить к уменьшению интенсивности синтеза ГАГ [8].

В клинических испытаниях с применением генистеина в дозе 5 мг/кг массы тела в сутки отмечено уменьшение частоты развития инфекционных осложнений и гастроинтестинальных проявлений, улучшение морфологии волос. Однако данные о влиянии генистеина на неврологический дефицит, когнитивные функции и экскрецию ГАГ мочи весьма противоречивы [27, 58]. Следует, тем не менее, отметить, что большинство исследований по изучению эффективности генистеина были открытыми, и единственное контролируемое исследование не продемонстрировало улучшения функций ЦНС [4].

Некоторые исследователи считают обоснованным применение высоких доз препарата, достигающих 160 мг/кг в сут. В исследовании с использованием синтетического генистеина в дозе 150 мг/кг в сут в течение 12 мес у 2 из 18 пациентов отмечался регресс показателей по шкале инвалидизации в течение периода наблюдения. Кроме того, у 2 пациентов мужского пола было зафиксировано увеличение молочных желез, у 2 субъектов женского пола — транзиторное нарушение менструального цикла. По мнению авторов, данные нежелательные явления следует отнести к легкому эстрогеноподобному действию генистеина [4]. Однако, по мнению других исследователей, наблюдаемые изменения могут быть связаны с описанным при МПС III преждевременным половым развитием центрального генеза [59].

Результаты исследований последних лет ставят под сомнение эффективность и безопасность использования генистеина. Так, по данным S.D. Kingma и соавт., применение генистеина на клеточной модели МПС I привело к увеличению содержания ГАГ в исследуемых фибробластах и хондроцитах [60]. В эксперименте на мышинных моделях МПС I применение высоких доз генистеина, соответствующих 160 мг/кг в сут, в течение 8 нед вызвало уменьшение длины тела и бедра, а также развитие паховых грыж и/или гидроцеле у 60% экспериментальных животных [61]. Кроме того, в опытах *in vitro* с использованием лейкоцитов пациентов с МПС IVA отмечено повреждающее действие генистеина на структуру ДНК [62].

В настоящее время, учитывая недостаточность данных об эффективности и безопасности, лекарственные препараты, содержащие генистеин, не зарегистрированы для применения при МПС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты научного прогресса последнего десятилетия позволяют надеяться на скорое внедрение в кли-

ническую практику эффективных способов лечения нейропатических МПС. Однако основными ограничениями клинических исследований новых методов терапии до настоящего времени являются недостаточное число пациентов, клиническая гетерогенность симптомов, отсутствие консенсуса о необходимой продолжитель-

ности исследований. По-прежнему недостаточно данных о естественном течении заболевания, что диктует необходимость детального изучения манифестации и прогрессирования неврологических симптомов с применением доступных в настоящее время инструментальных и нейробиологических методов обследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки/конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neufeld E., Muenzer J. The mucopolysaccharidosis. In: *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle (eds.). New York: McGraw-Hill. 2001. P. 3421–3452.
2. Lyon G., Kolodny E.H., Pastores G.M. Neurology of Hereditary Metabolic Disease of Children, Third Edition. McGraw-Hill. 2006. 542 p.
3. Wilkinson F.L., Holley R.J., Langford-Smith K.J., Badrinath S., Liao A., Langford-Smith A., Cooper J.D., Jones S.A., Wraith J.E., Wynn R.F., Merry C.L., Bigger B.W. Neuropathology in mouse models of mucopolysaccharidosis type I, IIIA and IIIB. *PLoS One*. 2012; 7 (4): 35787.
4. Giugliani R., Federhen A., Silva A.A., Bittar C.M., de Souza C.F., Netto C.B., Mayer F.Q., Baldo G., Matte U. Emerging treatment options for the mucopolysaccharidoses. *Res. Rep. Endocr. Dis*. 2012; 2: 53–64.
5. Краснопольская К.Д. Наследственные болезни обмена веществ. Справочное пособие для врачей. М.: Фохат. 2005. 364 с.
6. Al Sawaf S., Mayatepek E., Hoffmann B. Neurological findings in Hunter disease: pathology and possible therapeutic effects reviewed. *J. Inherit. Metab. Dis*. 2008; 31 (4): 473–480.
7. Zafeiriou D.I., Batziou S.P. Brain and spinal MR imaging findings in mucopolysaccharidoses: a review. *Am. J. Neuroradiol*. 2013; 34 (1): 5–13.
8. Arfi A., Richard M., Scherman D. Innovative Therapeutic Approaches for Improving Patient Life Condition with a Neurological Lysosomal Disease. 2012. URL: <http://www.intechopen.com/books/latest-findings-in-intellectual-and-developmental-disabilities-research/innovative-therapeutic-approaches-for-improving-patient-life-condition-with-a-neurological-lysosomal> (Available: 25.03.2015).
9. Mehta A., Winchester B. Lysosomal Storage Disease: A Practical Guide. NY: Wiley-Blackwell. 2012. 198 p.
10. Barranger J.A., Cabrera-Salazar M.A. Lysosomal Storage Disorders. Berlin: Springer. 2007. 564 p.
11. Arfi A., Richard M., Gandoche C., Bonnefont-Rousselot D., Therond P., Scherman D. Neuroinflammatory and oxidative stress phenomena in MPS IIIA mouse model: the positive effect of long-term aspirin treatment. *Mol. Genet. Metab*. 2011; 103 (1): 18–25.
12. McGlynn R., Dobrenis K., Walkley S.U. Differential subcellular localization of cholesterol, gangliosides, and glycosaminoglycans in murine models of mucopolysaccharide storage disorders. *J. Comp. Neurol*. 2004; 480 (4): 415–426.
13. Kniezel U., Wolburg H. Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell. Mol. Neurobiol*. 2000; 20 (1): 57–76.
14. Wilhelm I., Fazakas C., Krizbai I.A. In vitro models of the blood-brain barrier. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. 2011; 71 (1): 113–128.
15. Garbuzova-Davis S., Mirtly S., Sallot S.A., Hernandez-Ontiveros D.G., Haller E., Sanberg P.R. Blood-brain barrier impairment in MPS III patients. *BMC Neurol*. 2013; 13: 174.
16. Valstar M.J., Marchal J.P., Grootenhuys M., Colland V., Wijburg F.A. Cognitive development in patients with Mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo syndrome). *Orphanet J. Rare Dis*. 2011; 6: 43.
17. Blobel G. Christian de Duve (1917–2013). Biologist who won a Nobel prize for insights into cell structure. *Nature*. 2013; 498: 300.
18. Наезова-Баранова Л.С., Геворкян А.К., Кузенкова Л.М., Каркашадзе Г.А., Вашакмадзе Н.Д., Подклетнова Т.В. Ферментозаместительная терапия у детей с мукополисахаридозами в России: особенности организации, внедрение, перспективы. *Фарматека*. 2013; 11: 45–50.
19. Ou L., Herzog T., Koniar B.L., Gunther R., Whitley C.B. High-dose enzyme replacement therapy in murine Hurler syndrome. *Mol. Genet. Metab*. 2014; 111 (2): 116–122.
20. Ahn S.Y., Chang Y.S., Sung D.K., Ko A.R., Kim C.H., Yoo D.K., Lim K.H., Sohn Y.B., Jin D.K., Park W.S. High-dose enzyme replacement therapy attenuates cerebroventriculomegaly in a mouse model of mucopolysaccharidosis type II. *J. Hum. Genet*. 2013; 58 (11): 728–733.
21. Kan S.H., Aoyagi-Scharber M., Le SQ., Vincelette J., Ohmi K., Bullens S., Wendt D.J., Christianson T.M., Tiger P.M., Brown J.R., Lawrence R., Yip B.K., Holtzinger J., Bagri A., Crippen-Harmon D., Vondrak K.N., Chen Z., Hague C.M., Woloszynek J.C., Cheung D.S., Webster K.A., Adintori E.G., Lo M.J., Wong W., Fitzpatrick P.A., LeBowitz J.H., Crawford B.E., Bunting S., Dickson P.I., Neufeld E.F. Delivery of an enzyme-IGFII fusion protein to the mouse brain is therapeutic for mucopolysaccharidosis type IIIB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111 (41): 14870–14875.
22. Vite C.H., Wang P., Patel R.T., Walton R.M., Walkley S.U., Sellers R.S., Ellinwood N.M., Cheng A.S., White J.T., O'Neill C.A., Haskins M. Biodistribution and pharmacodynamics of recombinant human alpha-L-iduronidase (rhIDU) in mucopolysaccharidosis type I-affected cats following multiple intrathecal administrations. *Mol. Genet. Metab*. 2011; 103 (3): 268–274.
23. Sohn Y.B., Lee J., Cho S.Y., Kim S.J., Ko A.R., Nam M.H., Jin D.K. Improvement of CNS defects via continuous intrathecal enzyme replacement by osmotic pump in mucopolysaccharidosis type II mice. *Am. J. Med. Genet. A*. 2013; 161A (5): 1036–1043.
24. Munoz-Rojas M.V., Vieira T., Costa R., Fagundes S., John A., Jardim L.B., Vedolin L.M., Raymundo M., Dickson P.I., Kakkis E., Giugliani R. Intrathecal enzyme replacement therapy in a patient with mucopolysaccharidosis type I and symptomatic spinal cord compression. *Am. J. Med. Genet. A*. 2008; 146 A (19): 2538–2544.
25. Munoz-Rojas M.V., Horovitz D.D., Jardim L.B., Raymundo M., Llerena J.C. (Jr.), de Magalhaes Tde S., Vieira T.A., Costa R., Kakkis E., Giugliani R. Intrathecal administration of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase to a MPS VI patient with pachymeningitis cervicalis. *Mol. Genet. Metab*. 2010; 99 (4): 346–350.
26. Dickson P.I., Hanson S., McEntee M.F., Vite C.H., Vogler C.A., Mlikotic A., Chen A.H., Ponder K.P., Haskins M.E., Tippin B.L., Le S.Q., Passage M.B., Guerra C., Dierenfeld A., Jens J., Snella E., Kan S.H., Ellinwood N.M. Early versus late treatment of spinal cord compression with long-term intrathecal enzyme replacement therapy in canine mucopolysaccharidosis type I. *Mol. Genet. Metab*. 2010; 101 (2–3): 115–122.
27. Delgado I.V., O'Callaghan Mdel M., Artuch R., Montero R., Pineda M. Genistein supplementation in patients affected by Sanfilippo disease. *J. Inherit. Metab. Dis*. 2011; 34 (5): 1039–1044.
28. Vera M., Le S., Kan S.H., Garban H., Naylor D., Mlikotic A., Kaitila I., Harmatz P., Chen A., Dickson P. Immune response to intrathecal enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis I patients. *Pediatr. Res*. 2013; 74 (6): 712–720.
29. ClinicalTrials.gov. A service of the U.S. National Institutes of Health. URL: <https://clinicaltrials.gov> (Available: 24.05.2015).
30. Muenzer J., Hendriksz C.J., Fan Z., Vijayaraghavan S., Perry V., Santra S., Solanki G.A., Mascelli M.A., Pan L., Wang N., Sciarappa K., Barbier A.J. A phase I/II study of intrathecal idursulfase-IT in children with severe mucopolysaccharidosis II. *Genet. Med*. 2015. Epub ahead of print. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25834948> (Available: 24.06.2015).

31. Lu J.Z., Boado R.J., Hui E.K., Zhou Q.H., Pardridge W.M. Expression in CHO cells and pharmacokinetics and brain uptake in the Rhesus monkey of an IgG-iduronate-2-sulfatase fusion protein. *Biotechnol. Bioeng.* 2011; 108 (8): 1954–1964.
32. Boado R.J., Lu J.Z., Hui E.K., Pardridge W.M. Insulin receptor antibody-sulfamidase fusion protein penetrates the primate blood-brain barrier and reduces glycosaminoglycans in Sanfilippo type A cells. *Mol. Pharm.* 2014; 11 (8): 2928–2934.
33. Valstar M.J., Ruijter G.J., van Diggelen O.P., Poorthuis B.J., Wijburg F.A. Sanfilippo syndrome: a mini-review. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2008; 31 (2): 240–252.
34. Saudubray J., van den Berghe J., Walter J.H. Inborn Metabolic Diseases, 5th Edn. Berlin: Springer. 2012. 660 p.
35. Annibaldi R., Caponi L., Morganti A., Manna M., Gabrielli O., Ficcidenti A. Hunter syndrome (Mucopolysaccharidosis type II), severe phenotype: long term follow-up on patients undergone to hematopoietic stem cell transplantation. *Minerva Pediatr.* 2013; 65 (5): 487–496.
36. Welling L., Marchal J.P., van Hasselt P., van der Ploeg A.T., Wijburg F.A., Boelens J.J. Early Umbilical Cord Blood-Derived Stem Cell Transplantation Does Not Prevent Neurological Deterioration in Mucopolysaccharidosis Type III. *JIMD Rep.* 2015; 18: 63–68.
37. Quiviger M., Arfi A., Mansard D., Delacotte L., Pastor M., Scherman D., Marie C. High and prolonged sulfamidase secretion by the liver of MPS-IIIa mice following hydrodynamic tail vein delivery of antibiotic-free pFAR4 plasmid vector. *Gene Ther.* 2014; 21 (12): 1001–1007.
38. Osborn M.J., McElmurry R.T., Lees C.J., DeFeo A.P., Chen Z.Y., Kay M.A., Naldini L., Freeman G., Tolar J., Blazar B.R. Minicircle DNA-based gene therapy coupled with immune modulation permits long-term expression of α -L-iduronidase in mice with mucopolysaccharidosis type I. *Mol. Ther.* 2011; 19 (3): 450–460.
39. Murrey D.A., Naughton B.J., Duncan F.J., Meadows A.S., Ware T.A., Campbell K.J., Bremer W.G., Walker C.M., Goodchild L., Bolon B., La Perle K., Flanigan K.M., McBride K.L., McCarty D.M., Fu H. Feasibility and safety of systemic rAAV9-hNAGLU delivery for treating mucopolysaccharidosis IIIB: toxicology, biodistribution, and immunological assessments in primates. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 2014; 25 (2): 72–84.
40. Di Domenico C., Villani G.R., Di Napoli D., Reyero E.G., Lombardo A., Naldini L., Di Natale P. Gene therapy for a mucopolysaccharidosis type I murine model with lentiviral-IDUA vector. *Hum. Gene Ther.* 2005; 16 (1): 81–90.
41. McIntyre C., Derrick-Roberts A.L., Byers S., Anson D.S. Correction of murine mucopolysaccharidosis type IIIa central nervous system pathology by intracerebroventricular lentiviral-mediated gene delivery. *J. Gene Med.* 2014; 16 (11–12): 374–387.
42. Janson C.G., Romanova L.G., Leone P., Nan Z., Belur L., McIvor R.S., Low W. Comparison of Endovascular and Intraventricular Gene Therapy With Adeno-Associated Virus- α -L-iduronidase for Hurler Disease. *Neurosurgery.* 2014; 74 (1): 99–111.
43. Ariza L., Gimenez-Llort L., Cubizolle A., Pages G., Garcia-Lareu B., Serratrice N., Cots D., Thwaite R., Chillon M., Kremer E.J., Bosch A. Central nervous system delivery of helper-dependent canine adenovirus corrects neuropathology and behavior in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Hum. Gene Ther.* 2014; 25 (3): 199–211.
44. Hinderer C., Bell P., Gurda B.L., Wang Q., Louboutin J.P., Zhu Y., Bagel J., O'Donnell P., Sikora T., Ruane T., Wang P., Haskins M.E., Wilson J.M. Intrathecal gene therapy corrects CNS pathology in a feline model of mucopolysaccharidosis I. *Mol. Ther.* 2014; 22 (12): 2018–2027.
45. Fu H., Kang L., Jennings J.S., Moy S.S., Perez A., Dirosario J., McCarty D.M., Muenzer J. Significantly increased lifespan and improved behavioral performances by rAAV gene delivery in adult mucopolysaccharidosis IIIB mice. *Gene Ther.* 2007; 14 (14): 1065–1077.
46. Tardieu M., Zerah M., Husson B., de Bournonville S., Deiva K., Adamsbaum C., Vincent F., Hocquemiller M., Broissand C., Furlan V., Ballabio A., Fraldi A., Crystal R.G., Baugnon T., Roujeau T., Heard J.M., Danos O. Intracerebral administration of adeno-associated viral vector serotype rh.10 carrying human SGSH and SUMF1 cDNAs in children with mucopolysaccharidosis type IIIa disease: results of a phase I/II trial. *Hum. Gene Ther.* 2014; 25 (6): 506–516.
47. Langford-Smith A., Wilkinson F.L., Langford-Smith K.J., Holley R.J., Sergijenko A., Howe S.J., Bennett W.R., Jones S.A., Wraith J., Merry C.L., Wynn R.F., Bigger B.W. Hematopoietic stem cell and gene therapy corrects primary neuropathology and behavior in mucopolysaccharidosis IIIa mice. *Mol. Ther.* 2012; 20 (8): 1610–1621.
48. Wakabayashi T., Shimada Y., Akiyama K., Higuchi T., Fukuda T., Kobayashi H., Eto Y., Ida H., Ohashi T. Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy Corrects Neuropathic Phenotype in Murine Model of Mucopolysaccharidosis Type II. *Hum. Gene Ther.* 2015; 26 (6): 357–366.
49. Snyder E.Y., Taylor R.M., Wolfe J.H. Neural progenitor cell engraftment corrects lysosomal storage throughout the MPS VII mouse brain. *Nature.* 1995; 374 (6520): 367–370.
50. Meng X.L., Shen J.S., Ohashi T., Maeda H., Kim S.U., Eto Y. Brain transplantation of genetically engineered human neural stem cells globally corrects brain lesions in the mucopolysaccharidosis type VII mouse. *J. Neurosci. Res.* 2003; 74 (2): 266–277.
51. Fukuhara Y., Li X.K., Kitazawa Y., Inagaki M., Matsuoka K., Kosuga M., Kosaki R., Shimazaki T., Endo H., Umezawa A., Okano H., Takahashi T., Okuyama T. Histopathological and behavioral improvement of murine mucopolysaccharidosis type VII by intracerebral transplantation of neural stem cells. *Mol. Ther.* 2006; 13 (3): 548–555.
52. De Ruijter J., Valstar M.J., Wijburg F.A. Mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo Syndrome): emerging treatment strategies. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2011; 12 (6): 923–930.
53. Feldhammer M., Durand S., Pshzhetsky A.V. Protein misfolding as an underlying molecular defect in mucopolysaccharidosis III type C. *PLoS One.* 2009; 4 (10): 7434.
54. Keeling K.M., Brooks D.A., Hopwood J.J., Li P., Thompson J.N., Bedwell D.M. Gentamicin-mediated suppression of Hurler syndrome stop mutations restores a low level of alpha-L-iduronidase activity and reduces lysosomal glycosaminoglycan accumulation. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10 (3): 291–299.
55. Wang D., Belakhov V., Kandasamy J., Baasov T., Li S.C., Li Y.T., Bedwell D.M., Keeling K.M. The designer aminoglycoside NB84 significantly reduces glycosaminoglycan accumulation associated with MPS I-H in the Idua-W392X mouse. *Mol. Genet. Metab.* 2012; 105 (1): 116–125.
56. Gunn G., Dai Y., Du M., Belakhov V., Kandasamy J., Schoeb T.R., Baasov T., Bedwell D.M., Keeling K.M. Long-term nonsense suppression therapy moderates MPS I-H disease progression. *Mol. Genet. Metab.* 2014 Mar; 111 (3): 374–81.
57. Friso A., Tomanin R., Salvalaio M., Scarpa M. Genistein reduces glycosaminoglycan levels in a mouse model of mucopolysaccharidosis type II. *Brit. J. Pharmacol.* 2010; 159 (5): 1082–1091.
58. Piotrowska E., Jakobkiewicz-Banecka J., Maryniak A., Tylki-Szymanska A., Puk E., Liberek A., Wegrzyn A., Czartoryska B., Slominska-Wojewodzka M., Wegrzyn G. Two-year follow-up of Sanfilippo Disease patients treated with a genistein-rich isoflavone extract: assessment of effects on cognitive functions and general status of patients. *Med. Sci. Monit.* 2011; 17 (4): 196–202.
59. Jurecka A., Tylki-Szymanska A. Gynecomastia in MPS IIIa boys: related to treatment or precocious puberty? *Mol. Genet. Metab.* 2014; 111 (2): 61–62.
60. Kingma S.D., Wagemans T., IJlst L., Wijburg F.A., van Vlies N. Genistein increases glycosaminoglycan levels in mucopolysaccharidosis type I cell models. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2014; 37 (5): 813–821.
61. Kingma S.D., Wagemans T., IJlst L., Seppen J., Gijbels M.J., Wijburg F.A., van Vlies N. Adverse Effects of Genistein in a Mucopolysaccharidosis Type I Mouse Model. *JIMD Rep.* 2015. Epub ahead of print. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25854773> (Available: 24.06.2015).
62. Negretto G.W., Deon M., Burin M., Biancini G.B., Ribas G., Garcia S.C., Goethel G., Fracasso R., Giugliani L., Giugliani R., Vargas C.R. In vitro effect of genistein on DNA damage in leukocytes from mucopolysaccharidosis IVA patients. *Mol. Genet. Metab.* 2014; 111 (2): 205–208.