

**Сафиуллов Зуфар Зуфарович**

**НЕЙРОНАЛЬНАЯ МОЛЕКУЛА АДГЕЗИИ NCAM В СОЧЕТАНИИ С  
НЕЙРОТРОФИЧЕСКИМИ ФАКТОРАМИ ДЛЯ КЛЕТОЧНО –  
ОПОСРЕДОВАННОЙ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ МЫШЕЙ С МОДЕЛЬЮ  
БОКОВОГО АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научный руководитель:**

Исламов Рустем Робертович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой медицинской биологии и генетики ГБОУ ВПО Казанский ГМУ Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научный консультант:**

Ризванов Альберт Анатольевич — доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник института фундаментальной медицины и биологии, профессор кафедры генетики ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет.

**Официальные оппоненты:**

Швалев Вадим Николаевич — доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, заслуженный деятель науки РФ, ведущий научный сотрудник лаборатории нейроморфологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ермолин Игорь Леонидович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии с цитологией и эмбриологией ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Ведущая организация:**

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «29» декабря 2015 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.034.01 при ГБОУ ВПО Казанский ГМУ Министерства здравоохранения Российской Федерации (420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО Казанский ГМУ Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу:

г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49 «б», [www.kgmu.kcn.ru](http://www.kgmu.kcn.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор



Л.Д. Зубаирова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Проблема терапии нейродегенеративных заболеваний, ишемических инсультов и нейротравм остается одной из актуальных и недостаточно разработанных в фундаментальной и практической медицине, что обуславливает низкую эффективность современных методов лечения (Гусева и др., 2013; Carvalho et al., 2015). Эти состояния сопровождаются гибелью нейронов, дегенерацией аксонов, а, следовательно, неизбежным нарушением функционирования иннервируемой ткани-мишени, при этом возможности регенерации нервной ткани в этих условиях изучены не достаточно (Исламов и др., 2007). Ввиду этого такие больные получают только симптоматическое лечение, которое существенно не повышает качество жизни и, как правило, не увеличивает ее продолжительность.

Результаты преодоления последствий нейродегенерации и стимулирование регенерации нервной ткани в ходе лечения неврологических больных требуют разработки и внедрения принципиально новых методов терапии, например с использованием генных и клеточных технологий (Silani et al., 2003), вместе с тем такой подход к лечению затруднителен ввиду малой изученности процессов, протекающих в организме в этих условиях. Для поддержания жизни и препятствия вторичной дегенерации нейронов, а также для стимулирования роста регенерирующих нервных волокон одним из перспективных терапевтических подходов представляется обеспечение нейронов специфическими ростовыми и трофическими факторами (Islamov et al., 2015), вместе с тем такой подход к лечению нейродегенеративных заболеваний требует детальной разработки.

Интенсивные научные поиски выявили наиболее значимые нейротрофические факторы, которые могут быть применены в качестве лекарственных препаратов, но их использование ограничено экспериментами или клиническими испытаниями (Budni et al., 2015). К ним относятся, в первую очередь, мозговой нейротрофический фактор (BDNF), глиальный нейротрофический фактор (GDNF) (Cheng et al., 2002), инсулиноподобный фактор роста (IGF) и сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) (Lunn et al., 2009). Нейропротекторное действие этих факторов доказано в эксперименте *in vitro* и *in vivo* (Garanina et al., 2015; Гусева и др., 2013). При этом установлено, что комбинации нескольких нейротрофических факторов могут иметь более выраженный положительный эффект на выживание мотонейронов при нейродегенеративных заболеваниях (Islamov et al., 2015); однако, экспериментальные исследования и клинические испытания, проводимые с данными факторами, на сегодняшний день пока не позволили создать лекарственный препарат для стимулирования нейрорегенерации.

Одна из главных причин отсутствия эффективной терапии нейродегенеративных заболеваний заключается в затруднениях с доставкой лекарственных средств в зону поражения нервной ткани. В настоящее время исследуют разные способы доставки биологически активных молекул в

организм больного, например путем инъекции рекомбинантного белка с помощью экспрессионного генетического вектора (плазмидного или вирусного) или на клеточных носителях; однако, создать наиболее эффективный способ доставки терапевтических молекул в зону нейродегенерации пока не удалось.

В рамках стратегии применения терапевтических трансгенов в последние годы активно разрабатывается технология их доставки в область повреждения при помощи разнообразных клеток (генно-клеточная, или клеточно-опосредованная генная терапия), вместе с тем, строгих научных обоснований использования конкретных клеток в качестве доноров генов на сегодняшний день не существует (Park et al., 2011). Данная стратегия предполагает применение ряда клеток в качестве носителей терапевтических генов. По сравнению с прямой генной терапией, предполагающей непосредственное введение рекомбинантных ДНК или РНК в организм, клеточно-опосредованная доставка терапевтических генов имеет очевидные преимущества. Главное из них, основанное на феномене адресной миграции клеток (хоминг), состоит в потенциальной возможности обеспечить доставку генов к множественным очагам нейродегенерации. Другое преимущество генно-клеточной терапии связано с эффективностью продукции в области любых повреждений молекул стимуляторов регенерации в оптимальных дозах. Наконец, сами трансплантируемые клетки могут служить источником молекул-стимуляторов регенерации и молекул внеклеточного матрикса, поддерживающих рост нервных проводников (Dasari et al., 2008).

Одними из наиболее перспективных в этом смысле являются мононуклеарные клетки крови пуповины человека, активно изучаемые в настоящее время (Ende et al., 2000). Основанием для применения этих клеток с целью лечения нейродегенеративных заболеваний является их пригодность как для алло-, так и для аутотрансплантации у человека, их низкая иммуногенность, доступность, простота получения и хранения. Немаловажным фактором, облегчающим использование такого подхода в клинической практике, является и отсутствие законодательных, этических и религиозных запретов для трансплантации выделенных из пуповины клеток. Кроме того, в пуповинной крови присутствуют стволовые клетки, способные дифференцироваться в разных направлениях, а также клетки, являющиеся источником многочисленных ростовых и трофических факторов (Islamov et al., 2015).

Генетическая модификация мононуклеарных клеток крови пуповины открывает дополнительные возможности генной терапии (Chen et al., 2005). Это не только адресная доставка специфических ростовых и трофических факторов, оказывающих нейропротекторный эффект, в область поражения при дегенерации нервной ткани различной этиологии, но и возможность направленной дифференцировки трансплантированных мононуклеарных клеток крови пуповины в эндотелиальные клетки и клетки нейроглии (Koh et al., 2008).

Однако, многие разработки в области генно-клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний остаются пока на уровне экспериментов в лабораториях, или (в лучшем случае) еще только начаты клинические

испытания (Weiss et al., 2006). Поэтому исследования, направленные на создание генно-клеточного препарата, сдерживающего нейродегенерацию, имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение.

### **Цель исследования:**

Изучение эффективности генно-клеточной терапии трансгенных SOD1 G93A мышей с моделью бокового амиотрофического склероза генетически модифицированными мононуклеарными клетками крови пуповины человека, экспрессирующими одновременно рекомбинантные гены нейротрофических факторов и нейрональной молекулы адгезии NCAM.

### **Задачи исследования:**

1. Получить генетически модифицированные мононуклеарные клетки крови пуповины (МККП) человека, трансдуцированные аденовирусным вектором (Ad5), кодирующим ген сосудистого эндотелиального фактора роста (Ad5-VEGF), глиального нейротрофического фактора (Ad5-GDNF) и нейрональной молекулы адгезии (Ad5-NCAM1) в различных комбинациях, а именно: Ad5-VEGF+Ad5-GDNF, Ad5-VEGF+Ad5-NCAM1 или Ad5-GDNF+Ad5-NCAM1.

2. Оценить экспрессию рекомбинантных генов в мононуклеарных клетках крови пуповины человека *in vitro* с помощью иммунофлуоресцентного и ПЦР-РВ методов.

3. Выявить влияние ксенотрансплантации полученных генно-клеточных препаратов на двигательную активность трансгенных SOD1 G93A мышей с моделью бокового амиотрофического склероза при помощи поведенческих тестов («открытое поле» и «сила хватки»).

4. Охарактеризовать способность к миграции и выживанию генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека в спинном мозге трансгенных SOD1 G93A мышей с моделью бокового амиотрофического склероза.

5. Изучить иммунофлуоресцентным методом экспрессию терапевтических генов (VEGF, GDNF и NCAM1) в трансплантированных мононуклеарных клетках крови пуповины человека в спинном мозге трансгенных SOD1 G93A мышей с моделью бокового амиотрофического склероза.

6. Оценить терапевтическую эффективность генно-клеточной терапии трансгенных SOD1 G93A мышей с помощью генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека, экспрессирующих рекомбинантные нейротрофические факторы (VEGF или GDNF) и нейрональную молекулу адгезии NCAM1 в различных сочетаниях.

### **Научная новизна работы**

Впервые на основе мононуклеарных клеток крови пуповины человека и аденовирусных векторов были получены генно-клеточные конструкции, несущие: ген глиального нейротрофического фактора и нейрональной

молекулы адгезии; ген сосудистого эндотелиального фактора роста и нейрональной молекулы адгезии; ген глиального нейротрофического фактора и сосудистого эндотелиального фактора роста, которые можно использовать в экспериментах с исследованием терапии бокового амиотрофического склероза. Новыми следует признать данные о том, что после ксенотрансплантации трансгенным SOD1 G93A мышам с моделью бокового амиотрофического склероза генетически модифицированные мононуклеарные клетки крови пуповины человека, экспрессирующие гены сосудистого эндотелиального фактора роста, глиального нейротрофического фактора и нейрональной молекулы адгезии выявлены в поясничном отделе спинного мозга трансгенных мышей через 5 месяцев после трансплантации. Приоритетными являются данные о положительной связи между продолжительностью жизни трансгенных SOD1 G93A мышей, количеством жизнеспособных мононуклеарных клеток крови пуповины человека в спинном мозге мышей и комбинацией терапевтических генов в генетически модифицированных клетках.

Несомненной новизной обладают результаты, свидетельствующие о более высокой двигательной активности и наибольшей продолжительности жизни у трансгенных мышей с моделью бокового амиотрофического склероза, которым трансплантировали мононуклеарные клетки крови пуповины человека, трансдуцированные рекомбинантными аденовирусами, кодирующими ген глиального нейротрофического фактора и ген нейрональной молекулы адгезии, или клетки, трансдуцированные рекомбинантными аденовирусами, кодирующими ген сосудистого эндотелиального фактора роста и ген нейрональной молекулы адгезии. Впервые показано, что трансплантация генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека, экспрессирующих нейротрофический фактор в сочетании с нейрональной молекулой адгезии, повышает миграционный потенциал и жизнеспособность трансплантированных клеток и, как следствие, имеет более выраженный терапевтический эффект у трансгенных мышей с моделью бокового амиотрофического склероза.

### **Научно-практическая значимость работы**

Результаты исследования имеют важное значение, как для практической медицины, так и для фундаментальной науки. Полученные данные могут служить основой для разработки нового класса лекарственных средств на основе мононуклеарных клеток крови пуповины человека и рекомбинантных аденовирусов, кодирующих терапевтические гены, предназначенных для лечения ряда нейродегенеративных заболеваний, а также терапии ишемических инсультов и нейротравм. Тот факт, что экспрессия генов ростовых факторов в сочетании с нейрональной молекулой адгезии в мононуклеарных клетках крови пуповины человека имеет более продолжительное действие на клетки-мишени в зоне нейродегенерации и что такой подход позволяет не только контролировать продукцию терапевтических генов, но и саму аденовирусную

инфекцию, позволяет надеяться на внедрение генно-клеточного препарата в практическую медицину для терапии нейродегенеративных заболеваний.

Предлагаемый метод лечения нейродегенеративных заболеваний при помощи генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека может быть использован в центрах неврологии и нейрохирургии. Разработанные в ходе выполнения диссертационной работы методические подходы для генно-клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний могут быть внедрены в учебный процесс в высших медицинских учебных заведениях как на теоретических (биология, гистология, физиология), так и на практических кафедрах (неврология, хирургические болезни).

#### **Положение, выносимое на защиту:**

Доставка в спинной мозг гена нейрональной молекулы адгезии NCAM1 с помощью мононуклеарных клеток крови пуповины человека повышает эффективность клеточно-опосредованной терапии мышей с моделью бокового амиотрофического склероза рекомбинантными генами нейротрофических факторов VEGF и GDNF.

#### **Степень достоверности и апробация работы**

Выбранные методы и технические способы их решения современны, адекватны поставленным задачам и соответствуют мировому уровню. Достоверность полученных данных подтверждается молекулярно-генетическими, иммунофлуоресцентными, морфометрическими, физиологическими и статистическими методами исследования. Результаты исследования, вошедшие в диссертационную работу, были доложены на 89–й Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 70-летию победы в Великой Отечественной войне (Казань, 2015); Всероссийской школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии 21-го века» (Казань, 2014); 3-й международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2013), V международном симпозиуме «Актуальные вопросы генных и клеточных технологий» (Москва, 2012), 87-й всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине» (Казань, 2012), II международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, 2008).

#### **Личный вклад автора**

Автор диссертационного исследования в соответствии с поставленными задачами исследования лично планировал и проводил научные эксперименты. Все полученные результаты, выраженные в выводах и положениях, выносимых на защиту, выполнены при личном участии соискателя. Автор лично занимался подготовкой к печати тезисов и статей по теме диссертации, а диссертационная работа написана автором самостоятельно.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК.

### **Структура и объем диссертационной работы**

Диссертация представлена на 108 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы и списка иллюстративного материала. Работа содержит 4 таблицы, 22 рисунка, которые включают микрофотографии флуоресцентной и конфокальной микроскопии, схемы. Список литературы содержит 187 источников, из которых 183 иностранных.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Трансгенные SOD1 G93A мыши. Эксперименты выполнены на 73 трансгенных мышах B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J, экспрессирующих мутантный ген человека — Cu/Zn-супероксиддисмутаза *sod1* (Gly93→Ala; глицин замещен на аланин в позиции 93) (далее трансгенные SOD1 G93A мыши). Животные приобретены в питомнике лабораторных животных «Пушино». Половозрелых трансгенных SOD1 G93A мышей содержали в стандартных условиях питомника (вивария) Казанского государственного медицинского университета со свободным доступом к воде и корму, тщательным уходом, контролируемой температурой, регулируемой влажностью и гуманным отношением в течение всей жизни животного в соответствии с требованиями приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики». Проведение диссертационного исследования одобрено локальным этическим комитетом Казанского государственного медицинского университета.

Получение генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека. Заготовку пуповинной крови производили после получения информированного согласия у беременной женщины, которая проходила тщательный дородовой скрининг на наличие противопоказаний к донорству крови пуповины (в соответствии с Приказом Минздрава РФ от 14.09.2001 №364 об утверждении порядка медицинского обследования доноров крови и ее компонентов). В течение суток из заготовленной пуповинной крови выделение мононуклеарных клеток проводили в градиенте плотности фиколла (Hawley et al., 2004).

Рекомбинантные экспрессионные конструкции на основе аденовирусов пятого серотипа, кодирующие гены *vegf*, *gdnf*, *ncam1* и *egfp*, были созданы ранее с помощью технологии Gateway-клонирования (Invitrogen, США) (Черенкова и др., 2012). Готовые для использования стоки аденовирусов Ad5-

VEGF, Ad5-GDNF, Ad5-NCAM1 и Ad5-EGFP были предоставлены отделом поисковых исследований НОЦ фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета (заведующий отделом Ризванов А.А.).

Для получения генно-клеточного препарата свежесыводенные МККП трансдуцировали готовыми рекомбинантными аденовирусами Ad5-VEGF, Ad5-GDNF, Ad5-NCAM, Ad5-EGFP в отдельности и их комбинациями. МККП ресуспендировали, рассеивали в шести луночных планшетах и добавляли аденовирусы в соотношении 10 инфекционных вирусных частиц на клетку (multiplicity of infection, MOI 10). Клетки культивировали в инкубаторе при 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Для ксенотрансплантации трансдуцированные МККП собирали и растворяли в стерильном растворе 0,9% хлорида натрия из расчета 2×10<sup>6</sup> клеток в 100 мкл инъекции. Все работы с клетками проводились в асептических условиях в ламинарном шкафу второго уровня защиты с соблюдением общепринятых правил работы с эукариотическими клетками.

Ксенотрансплантация генетически модифицированных МККП. На 27-й неделе жизни до появления клинических симптомов трансгенных мышей наркотизировали путем внутрибрюшинной инъекции хлоралгидрата (Sigma, США) (80 мг/мл, 0,4 мл на 100 г). После наступления медикаментозного сна производили инъекцию 2 млн МККП в 100 мкл DPBS (БиолоТ) в ретроорбитальный синус (Рисунок 1). В зависимости от генно-клеточного препарата, который вводили в венозную кровь, животные были разделены на восемь экспериментальных групп (Таблица 1).

Таблица 1 - Экспериментальные группы животных

Группа	Материал для инъекции в ретроорбитальный синус	Количество животных
Контроль	Физиологический раствор	10
МККП	Нативные МККП	13
МККП+Ad5-EGFP	МККП, трансдуцированные аденовирусом Ad5-EGFP	15
МККП+Ad5-VEGF	МККП, трансдуцированные аденовирусом Ad5-VEGF	7
МККП+ Ad5-GDNF	МККП, трансдуцированные аденовирусом Ad5-GDNF	6
МККП+Ad5-VEGF-NCAM	МККП, трансдуцированные аденовирусами Ad5-VEGF и Ad5-NCAM	8
МККП+Ad5-GDNF-NCAM	МККП, трансдуцированные аденовирусами Ad5-GDNF и Ad5-NCAM	8
МККП+Ad5-GDNF-VEGF	МККП, трансдуцированные аденовирусами Ad5-GDNF и Ad5-VEGF	6

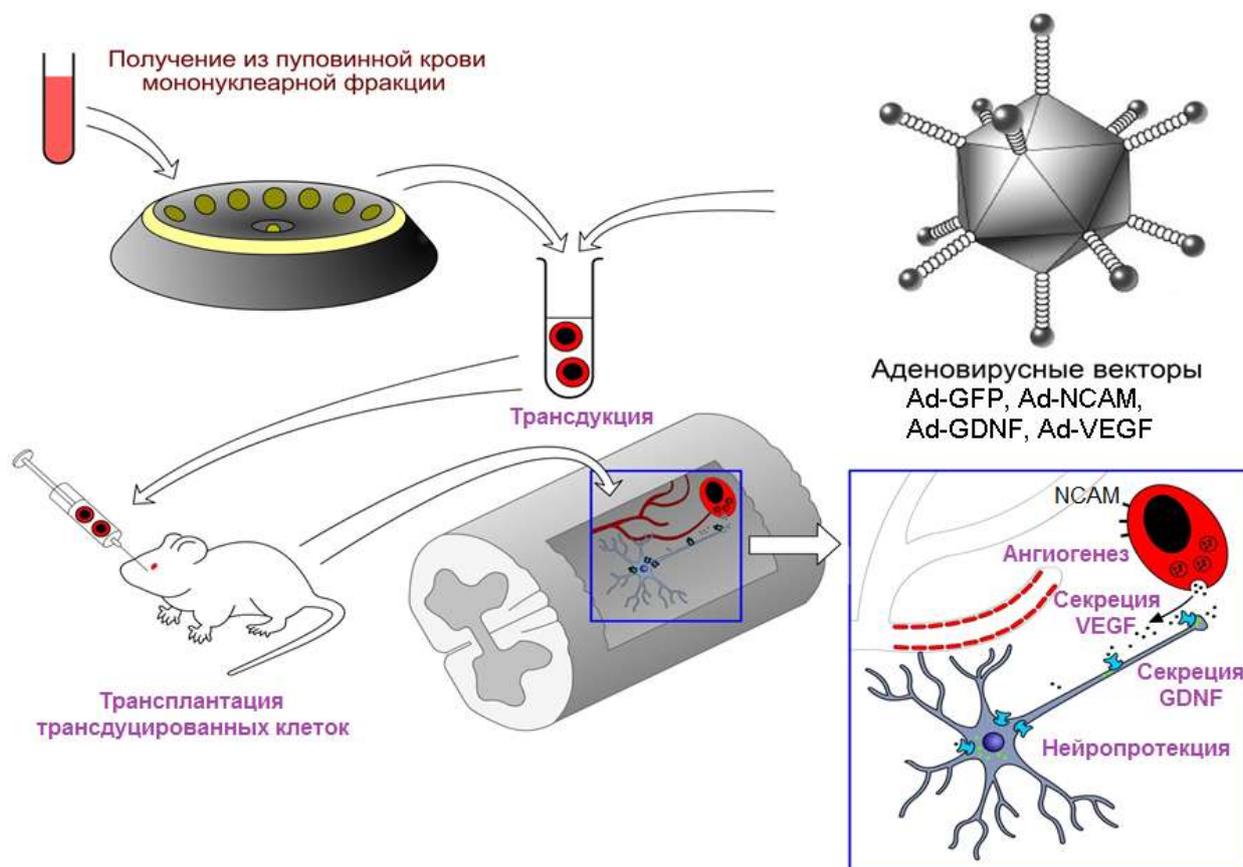


Рисунок 1 - Дизайн эксперимента [по Исламов и др., 2007 с изменениями]

Поведенческие тесты. Двигательную активность подопытных животных оценивали с 25-й недели жизни с помощью тестов «открытое поле» и «сила хватки». Для выполнения теста «сила хватки» мыши, удерживая ее за хвост, позволяют вцепиться всеми лапами в горизонтально расположенную металлическую решетку. После этого решетку медленно переворачивают таким образом, чтобы мышь оказалась вниз головой, и фиксируется период времени, пока животное не отцепится от решетки. Тест состоит из трех попыток, из которых выбирается наилучший результат (Weydt, 2003). Тест «открытое поле» выполняли в установке «Открытое поле» («Открытая Наука», Москва). Мышь помещали в установку и в течение 3 минут регистрировали число пересеченных линий на полу установки (горизонтальная активность), количество стоек животного на задних лапах (вертикальная активность) и количество заглядываний в отверстия в полу установки (исследовательская активность). Каждую мышь тестировали 2 раза в неделю по каждому тесту с момента трансплантации МККП до окончания эксперимента. Перед началом эксперимента животные обучались проведению тестов в течение двух недель.

Гистологическое исследование. По мере прогрессирования заболевания при достижении терминальной стадии примерно за 1-2 дня до предполагаемой гибели животных выводили из эксперимента путем погружения в глубокий наркоз с помощью внутрибрюшинной инъекции хлоралгидрата. Под глубоким наркозом производили транскардиальную перфузию сначала холодным PBS,

затем 4% раствором параформальдегида (4°C). Из позвоночного столба извлекали спинной мозг, вырезали поясничный отдел и помещали в 4% раствор параформальдегида на 12 часов, после чего объект пропитывали 30% раствором сахарозы, содержащим 0,1% азид натрия.

Для приготовления криостатных срезов поясничный отдел спинного мозга заливали в среду для заморозки TBS (Triangle Biomedical Science, Durham, NC) и замораживали в криостате Microm HM 560 (Carl Zeiss). Свободно плавающие поперечные срезы толщиной 20 мкм инкубировали с первичными антителами против ядерного антигена человека (HNA), терапевтических генов (VEGF, GDNF, NCAM), маркеров клеток спинного мозга (нейроны — нейрональная форма  $\beta$  III-тубулина, астроциты — S-100, олигодендроциты — OSP, клетки микроглии — Iba1, эндотелиальные клетки — CD34), цитозольного белка, инициирующего апоптоз (Caspase-3), и репортерного усиленного зеленого флуоресцирующего белка (EGFP) в течение суток при 4°C. Далее срезы промывали при помощи PBS и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями в течение 2 часов при комнатной температуре в темноте. Для визуализации ядер клеток срезы дополнительно окрашивали в растворе 4',6-диамино-2-фенилиндола (DAPI) в течение 10 минут при комнатной температуре в темноте. Для всех иммунных реакций выполняли отрицательные контроли с исключением из инкубационной среды первичных или вторичных антител путем их замены на 5% сыворотку осла. Окрашенные срезы заключали в среду, поддерживающую флуоресценцию и изучали с помощью конфокального микроскопа LSM 780 Meta (Carl Zeiss). При двойном иммунофлуоресцентном окрашивании учитывали происхождение первичных антител и характеристики флуоресцентных красителей. Иммунофенотипирование МККП выполнено совместно с к.б.н. Гусевой Д.С. и к.м.н. Мухамедшиной Я.О. Для количественного анализа трансплантированных МККП в спинном мозге трансгенных SOD1 G93A мышей подсчитывали HNA-положительные клетки (МККП, экспрессирующие ядерный антиген человека HNA) на 100 поперечных срезах поясничного отдела спинного мозга в нескольких повторностях.

**Статистический анализ.** Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы Microcal Origin. Полученные результаты представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки, статистическая достоверность различий оценивалась при помощи t-критерия Стьюдента, при этом отличия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

### **Результаты и обсуждение собственных исследований**

**Экспрессия рекомбинантных терапевтических генов в мононуклеарных клетках крови пуповины человека *in vitro*.** Эффективность генетической модификации МККП человека оценивали по биосинтезу в МККП репортерного усиленного зеленого флуоресцирующего белка (EGFP), который визуализировали с помощью флуоресцентной микроскопии. Установлено, что около 70-80% клеток синтезировали белковый продукт гена *egfp*. Экспрессия

гена *egfp in vitro* наблюдали в течение 30 дней после трансдукции МККП. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того факта, что аденовирус пятого серотипа является эффективным для генетической модификации МККП человека. После трансдукции клетки сохраняют жизнеспособность и синтезируют белок внесенного гена.

Результаты трансдукции МККП одним терапевтическим геном (*vegfl65* или *gdnf*) показали, что содержание мРНК этих генов в МККП увеличилось в 2000 (VEGF) и в 1700 (GDNF) раз по сравнению с контролем — немодифицированными МККП человека. При одновременной генетической модификации МККП аденовирусными векторами Ad5-GDNF и Ad5-VEGF содержание мРНК увеличилось в 4900 (GDNF) и 2500 (VEGF) раз, соответственно. В случае ко-трансдукции клеток двумя рекомбинантными аденовирусами Ad5-VEGF165 и Ad5-NCAM1 уровень мРНК этих генов увеличивался в 6200 (VEGF) и 3000 (NCAM1) раз. Аналогичная динамика прослеживалась нами при оценке экспрессии генов *gdnf* и *ncam1* в МККП одновременно трансдуцированных Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1. Уровень мРНК увеличился в 130 (VEGF) и 150 (NCAM1) раз по сравнению с контролем. Таким образом, показано, что трансдукция МККП аденовирусными векторами является эффективной, а генетически модифицированные МККП сверхэкспрессируют рекомбинантные терапевтические гены.

Иммунофенотипирование МККП в спинном мозге подопытных трансгенных SOD1 G93A мышей. Для идентификации МККП человека в организме мыши было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание срезов спинного мозга мышей с помощью АТ против ядерного АГ человека (HNA). Исследование препаратов с помощью люминесцентного микроскопа выявило HNA-позитивные (HNA<sup>+</sup>) клетки во всех экспериментальных группах животных, которым трансплантировали МККП. HNA-позитивные клетки были обнаружены в белом и сером веществе спинного мозга как на ранних сроках исследования (2 недели после трансплантации), так и на терминальной стадии заболевания (через 5 месяцев после трансплантации). Иммунофенотипирование МККП с применением маркеров нервных клеток (нейрональная форма  $\beta$ -III тубулина), астроцитов (S100) или олигодендроцитов (OSP) не обнаружило признаков принадлежности клеток ни к одному из клеточных типов ЦНС. Однако, через две недели после трансплантации среди МККП были обнаружены HNA<sup>+</sup>-клетки, которые реагировали с АТ против маркера эндотелиальных клеток CD34 (HNA<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>-клетки) и маркера клеток микроглии Iba1 (HNA<sup>+</sup>Iba1<sup>+</sup>-клетки). HNA<sup>+</sup>Iba1<sup>+</sup>-клетки по своим морфологическим признакам напоминали клетки микроглии. Они имели небольшое тело овальной формы с короткими отростками. Кроме того, на этом сроке были выявлены HNA<sup>+</sup>-клетки, локализующиеся в сосудах спинного мозга.

Боковой амиотрофический склероз характеризуется прогрессирующей гибелью двигательных нейронов ЦНС. Гибель двигательных нейронов

происходит путем апоптоза. Проведенная нами диагностика апоптоза с помощью антител к каспазе-3 выявила вступившие в апоптоз двигательные нервные клетки передних рогов спинного мозга у подопытных мышей. Поскольку животных выводили из эксперимента в терминальной стадии заболевания и клинически у мышей наблюдали выраженный паралич задних конечностей, среди мотонейронов преимущественно выявлялись каспаза-3-позитивные нейроны. При двойном иммунофлуоресцентном окрашивании с помощью антител к каспазе-3 и ядерному антигену человека среди каспаза-3-позитивных нейронов были выявлены HNA-позитивные клетки.

Все вышеизложенное подтверждает нашу гипотезу о том, что моноклеарные клетки способны проникать через гематоэнцефалический барьер, мигрировать в очаги нейродегенерации, создавать микроокружение нейронам, вступающим в апоптоз, секретировать терапевтические молекулы и по паракринному механизму поддерживать выживание нервных клеток.

Иммуноэкспрессия рекомбинантных генов в МККП после трансплантации трансгенным SOD1 G93A мышам. Иммунофлуоресцентное окрашивание при помощи антител к EGFP позволило установить характер миграции трансплантированных клеток, продолжительность их жизни и эффективность экспрессии репортерного гена. EGFP-позитивные клетки были обнаружены как в белом веществе спинного мозга (передних, задних и боковых канатиках), так и в сером веществе (преимущественно в передних рогах) через 14 недель после трансплантации. Таким образом, экспрессия репортерного гена выполняет функцию контроля и позволяет оценить влияние трансдукции на жизнеспособность МККП и возможность синтезировать продукты встроенных генов *in vivo*.

Изучение иммуноэкспрессии терапевтических генов в МККП после их трансплантации трансгенным SOD1 G93A мышам позволило установить, что МККП способны синтезировать рекомбинантные белки. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание обнаружило экспрессию генов *vegf* и *gdnf* в МККП, трансдуцированных одним вектором, – Ad5-VEGF или Ad5-GDNF.

Способность генетически модифицированных МККП успешно мигрировать в нервную ткань и синтезировать нейротрофические молекулы (VEGF или GDNF) указывает на то, что разработанная стратегия является успешной. Решение данного вопроса послужило основой для создания генно-клеточной конструкции, содержащей, помимо гена нейротрофического фактора, ген нейрональной молекулы адгезии NCAM1. При тройном иммунофлуоресцентном окрашивании МККП, трансдуцированных двумя вирусными векторами, выявлены HNA-позитивные клетки, синтезирующие два рекомбинантных белка VEGF и NCAM, или GDNF и NCAM. Установлено, что экспрессия нейрональной молекулы адгезии в трансплантированных клетках способствует более продолжительной продукции в них терапевтических молекул (VEGF и GDNF).

Адресная миграция и выживание генетически модифицированных МККП человека после трансплантации SOD1 G93A мышам. После трансплантации МККП в спинном мозге трансгенных мышей во всех экспериментальных группах обнаружены HNA-позитивные клетки, экспрессирующие ядерный антиген человека. Достоверных различий в количестве МККП на сроках до 8 недель после трансплантации не выявлено. При этом на более поздних сроках в спинном мозге трансгенных мышей, для лечения которых был использован один терапевтический ген, встречаются лишь единичные трансплантированные клетки, а на том же сроке после трансплантации в спинном мозге трансгенных мышей, получивших клетки, содержащие комбинацию терапевтического гена с нейрональной молекулой адгезии, были обнаружены многочисленные скопления трансплантированных клеток (Рисунок 2). Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что нейрональная молекула клеточной адгезии NCAM поддерживает жизнеспособность трансплантированных клеток. В экспериментальной серии МККП+GDNF-NCAM количество клеток было больше, чем в серии МККП+GDNF на сроке 9-10 недель, а на сроке 17 недель HNA<sup>+</sup> клетки были обнаружены только в серии МККП+GDNF-NCAM. При этом единичные HNA<sup>+</sup> клетки были выявлены и на более поздних сроках (21 неделя) в сериях МККП+GDNF-NCAM и МККП+VEGF-NCAM.

Анализ двигательной активности и продолжительности жизни подопытных животных. Эффективность генно-клеточной терапии у трансгенных SOD1 G93A мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза оценивали по двум поведенческим тестам: «открытое поле» и «сила хватки». На первой неделе исследования подопытные трансгенные мыши из контрольной группы показали следующие результаты: горизонтальная активность —  $70,9 \pm 2,7$ ; вертикальная активность —  $10,2 \pm 2,1$ ; исследовательская активность —  $6,3 \pm 1,4$ ; тест «сила хватки» —  $56,6 \pm 4,2$  секунд. По сравнению с результатами трансгенных мышей из других подопытных групп достоверных различий не обнаружено ( $p > 0,05$ ).

К 3-й неделе эксперимента в тесте «открытое поле» происходил постепенный спад горизонтальной активности во всех подопытных группах, кроме группы МККП+VEGF-GDNF, в которой отмечена двухфазная динамика — первоначальное увеличение активности до 3 недели с последующим снижением до завершения эксперимента. В целом постепенное снижение горизонтальной активности наблюдалось до 9-й недели во всех группах, однако темп снижения двигательной активности в контрольной группе был выше. К 12-й неделе активность контрольной группы, а также групп МККП+VEGF-NCAM и МККП+VEGF-GDNF снизилась до минимальных значений. Напротив, в группах МККП+GDNF и МККП+GDNF-NCAM горизонтальная активность не изменилась по сравнению с результатами 9-й недели, кроме того, появляются достоверные различия между группой МККП+EGFP с неуклонно снижающимися показателями горизонтальной активности и группами МККП+GDNF и МККП+GDNF-NCAM, снижение горизонтальной активности в которых приостановилось ( $p < 0,05$ ).

Вертикальная активность в тесте «открытое поле» постепенно снижалась на протяжении эксперимента, однако опять стоит обратить внимание на общую динамику снижения вертикальной активности в контрольной группе, где темп снижения активности наиболее высокий. Здесь важно отметить группу МККП+GDNF-NCAM, результаты вертикальной активности которой на 6-й неделе эксперимента достоверно выше таковых по сравнению с группами МККП+GDNF, МККП+VEGF-NCAM и контрольной группой ( $p < 0,05$ ). Интересен тот факт, что вертикальная активность почти всех групп на 12-й неделе близка к нулю, в то время как показатели группы МККП+GDNF достаточно высокие. При анализе вертикальной активности этой группы на протяжении всего эксперимента видно, что показатель незначительно изменился за все время.

Исследовательская активность животных в тесте «открытое поле» значительно колебалась в течение эксперимента, поэтому оценка этого параметра была затруднена и не учитывалась в анализе двигательной активности.

В тесте «сила хватки» на 3-й неделе мышечная сила в группах МККП+GDNF и МККП+GDNF-NCAM была достоверно выше по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). К 6-й неделе происходит резкое снижение силы хватки во всех группах, при этом достоверных различий между группами не установлено. Далее с 6-й по 12-й неделю, наоборот, происходит медленное снижение силы хватки. На 12-й неделе к тестированию были способны только мыши из групп МККП+EGFP, МККП+VEGF, МККП+GDNF и МККП+GDNF-NCAM. После этого срока трансгенные мыши всех групп данный тест выполнять не могли.

Выживаемость у трансгенных мышей различалась между экспериментальными группами. На 11-й неделе после трансплантации количество живых трансгенных мышей составило: 27,3% — в контрольной группе, 41,7% — МККП+EGFP, 60% — МККП+VEGF, 50% — МККП+GDNF, 20% — МККП+VEGF-GDNF, 42,8% — МККП+VEGF-NCAM и 87,5% в группе МККП+GDNF-NCAM, которая достоверно отличалась от контрольной группы (Рисунок 3). При этом выживаемость трансгенных мышей из группы МККП+GDNF-NCAM была выше по сравнению с другими группами. Учитывая, что животные из контрольной группы вышли из эксперимента на 14-й неделе и группы МККП+EGFP на 15-й, можно сделать предположение, что дальнейшее продолжение жизни трансгенных SOD1 G93A мышей обусловлено экспрессией трансплантированными клетками нейротрофических факторов. На 15-й неделе после трансплантации в живых осталось 16,7% животных в группе МККП+GDNF, 28,6% в группе МККП+VEGF-NCAM и 50% в группе МККП+GDNF-NCAM. При этом к этому сроку были выведены из эксперимента все животные из контрольной группы, а также из групп

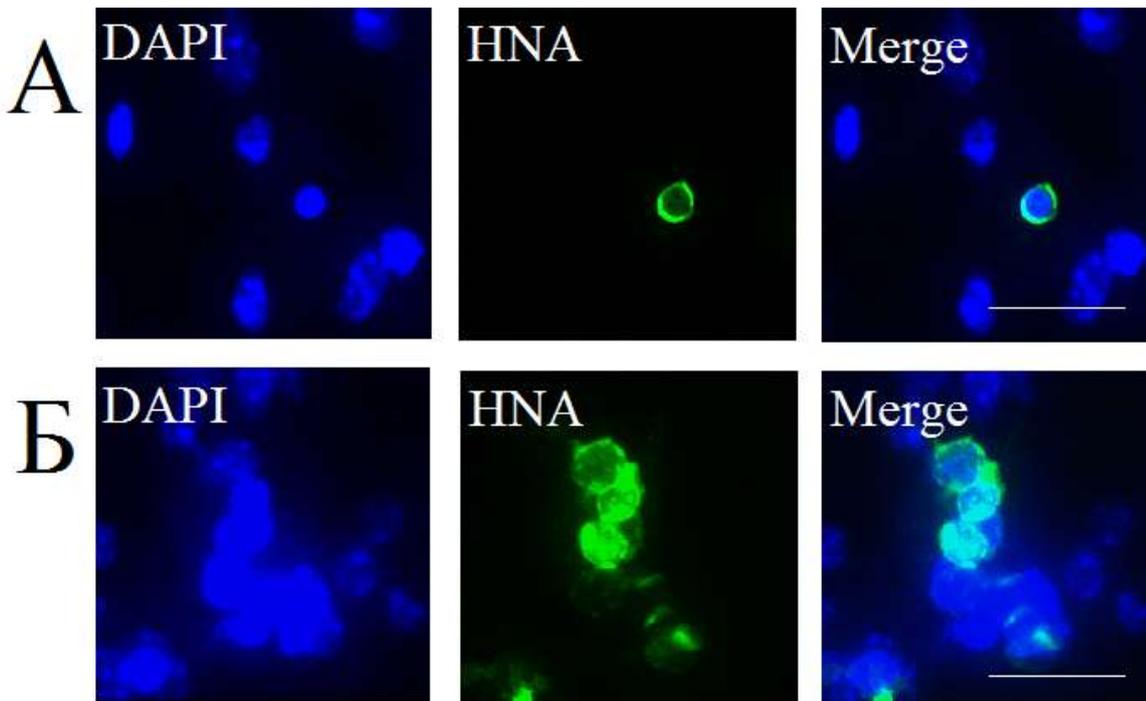


Рисунок 2 - Мононуклеарные клетки крови пуповины человека в спинном мозге трансгенной SOD1 G93A мыши через 9 недель после трансплантации. Иммунофлуоресцентное окрашивание: синий — ядра клеток окрашены DAPI; зеленый — ядра клеток окрашены с помощью АТ против ядерного антигена человека (HNA); Merge — совмещение двух изображений. А — HNA-позитивные клетки, трансдуцированные Ad-GDNF, Б — HNA-позитивные клетки, трансдуцированные Ad-GDNF и Ad-NCAM. Измерительная линейка — 20μм

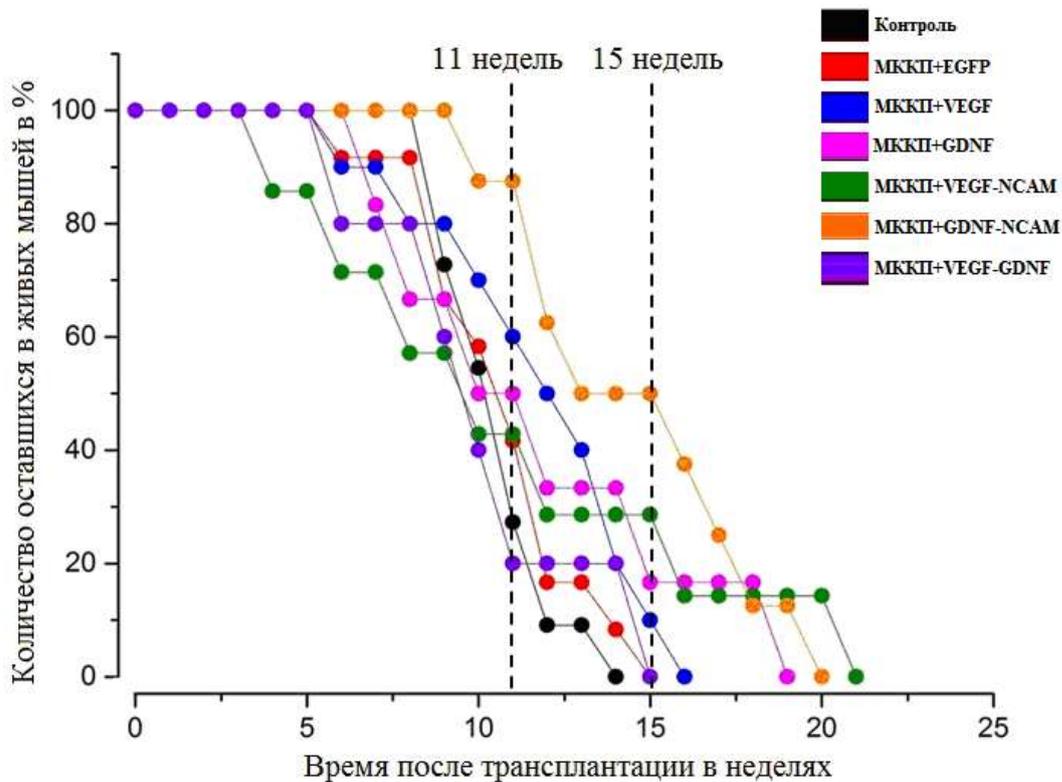


Рисунок 3 - Продолжительность жизни трансгенных SOD1 G93A мышей после трансплантации генетически модифицированных МККП

МККП+EGFP, МККП+VEGF и МККП+VEGF-GDNF. Максимальная продолжительность жизни установлена для групп МККП+GDNF-NCAM и МККП+VEGF-NCAM, которая составила 5 месяцев после лечения. Эти группы отличаются от остальных тем, что животным трансплантировали клетки, содержащие, помимо терапевтического гена, нейрональную молекулу адгезии, в результате чего эффективность генно-клеточного препарата оказалась выше.

### **Заключение**

В настоящее время эффективных способов преодоления последствий нейродегенерации при боковом амиотрофическом склерозе в клинической практике не существует, в связи с чем одним из перспективных подходов для решения этой проблемы является создание нового класса лекарственных средств, содержащих терапевтические гены. Генно-клеточная технология открывает новые возможности терапии различных заболеваний человека, которые до сих пор считаются неизлечимыми. Экспериментальные исследования позволяют надеяться, что генетически модифицированные клетки, имея огромный потенциал для доставки терапевтических генов в ЦНС с целью структурного и функционального восстановления мозга после нейротравм, ишемических инсультов и при различных нейродегенеративных заболеваниях, могут быть эффективны при решении таких проблем.

Мононуклеарные клетки крови пуповины человека представляют собой один из наиболее доступных источников стволовых клеток с минимальной иммуногенной реакцией реципиента. МККП человека легко поддаются культивированию, генетической модификации плазмидными и вирусными векторами и способны экспрессировать рекомбинантные гены с высокой эффективностью. Полученные на сегодняшний день результаты по трансплантации генетически модифицированных МККП экспериментальным животным с моделью бокового амиотрофического склероза указывают на целесообразность их применения не только как носителей терапевтических генов, но и как источника эндотелиальных и глиальных клеток (Гусева и др., 2013).

В настоящем исследовании на трансгенных SOD1 G93A мышах с моделью бокового амиотрофического склероза изучен терапевтический эффект генно-клеточного препарата на основе мононуклеарных клеток крови пуповины человека и аденовирусных векторов, несущих терапевтические гены (сосудистый эндотелиальный фактор роста, глиальный нейротрофический фактор и молекулу адгезии нервных клеток). Эффективность генно-клеточной терапии трансгенных SOD1 G93A мышей оценивали при помощи поведенческих тестов, продолжительности жизни и морфологического анализа спинного мозга. Экспрессию терапевтических генов в генетически модифицированных МККП человека оценивали с помощью молекулярно-генетического и иммунофлуоресцентного методов исследования.

Ранее нами была выдвинута гипотеза о том, что генетически модифицированные мононуклеарные клетки крови пуповины человека, одновременно экспрессирующие рекомбинантные нейротрофический фактор и

нейрональную молекулу адгезии, могут быть эффективным лекарственным препаратом для сдерживания гибели нейронов при нейродегенеративных заболеваниях (Исламов и др., 2007). Такой подход позволяет получить сверхэкспрессию молекулы стимулятора регенерации и молекулы, способствующей адресной миграции и выживанию генетически модифицированной клетки. Недавно было показано, что генетически модифицированные мезенхимные стволовые клетки человека, одновременно сверхэкспрессирующие гены GDNF и VEGF, при их внутримышечной инъекции крысам с моделью бокового амиотрофического склероза поддерживают структуру нервно-мышечного синапса и продлевают жизнь животных (Krakora et al., 2013). Наш выбор именно этих факторов также обусловлен их выраженным стимулирующим влиянием на процессы нейрогенерации и ангиогенеза. В наших исследованиях в мононуклеарные клетки крови человека, кроме гена стимулятора регенерации, был введен ген молекулы адгезии нервных клеток, которая, согласно полученным данным, способствовала адресной миграции трансплантированных клеток и поддерживала их выживание в тканях реципиента (Islamov et al, 2015).

Ранее было показано, что трансфекция эмбриональных стволовых клеток мыши плазмидными векторами, экспрессирующими клонированный ген L1CAM обеспечивает как встраивание этой молекулы адгезии в мембрану стволовых клеток, так и секрецию ее растворимой формы (Chen et al., 2005). После трансплантации таких клеток в травмированный спинной мозг они начинали формировать отростки и обнаруживались в тканях реципиента через месяц после трансплантации, в то время как аналогичные, но нетрансфицированные клетки выживали только в течение 7 суток.

Важно отметить способность МККП проникать через тканевые барьеры, в том числе через гемато-энцефалический барьер, что является немаловажным фактором при выборе этих клеток. При этом терапевтические молекулы, секретлируемые генетически модифицированными клетками, могут воздействовать на клетки-мишени по аутокринному, паракринному или эндокринному механизму. С помощью терапевтических генов по аутокринному механизму в отношении трансплантированных клеток можно повысить их жизнеспособность, контролировать адресную миграцию и направленную дифференцировку. По паракринному и эндокринному механизму терапевтические молекулы способны оказывать трофический и нейропротекторный эффект на клетки-мишени в очагах нейродегенерации.

Полученные данные смогут быть использованы в качестве основы для создания нового класса лекарственных препаратов, состоящих из рекомбинантных аденовирусов, кодирующих терапевтические гены, и мононуклеарных клеток крови пуповины человека. Решение поставленных задач на уровне эксперимента позволит начать клинические испытания, что ускорит внедрение и использование в клинической практике трансплантации генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины больным, страдающим нейродегенеративными заболеваниями, а также пациентам после ишемических инсультов и нейротравм. Результаты первых

клинических испытаний лечения больных боковым амиотрофическим склерозом трансплантацией стволовых клеток, выделенных из периферической крови, показали безопасность этого подхода и толерантность больного к трансплантированным клеткам (Mazzini et al., 2003). Таким образом, целесообразность генетической модификации мононуклеарных клеток крови пуповины человека для лечения нейродегенеративных заболеваний обусловлена:

1. высоким уровнем трансдукции мононуклеарных клеток и подтвержденной экспрессией терапевтических генов;
2. миграцией через гемато-энцефалический барьер и повышением жизнеспособности трансплантированных клеток в ЦНС реципиента;
3. адресной доставкой специфических ростовых и трофических факторов в область дегенерации;
4. секрецией мононуклеарными клетками крови пуповины собственных биологически активных молекул, способствующих регенерации;
5. действием терапевтических молекул на клетки-мишени по аутокринному, паракринному или эндокринному механизму;
6. направленной дифференцировкой трансплантированных клеток в разные паренхиматозные клетки (макрофаги, эндотелиальные клетки, астроциты и др.);
7. трансплантацией клеток без учета гистосовместимости по HLA;
8. возможностью контролировать вирусную инфекцию.

## ВЫВОДЫ

1. Мононуклеарные клетки крови пуповины человека способны к трансдукции одним или одновременно двумя генными векторами на основе рекомбинантного аденовируса 5 серотипа (Ad5), кодирующего гены человека: сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), глиальный нейротрофический фактор роста (GDNF) и нейрональную молекулу адгезии NCAM1.

2. Мононуклеарные клетки крови пуповины (МККП) человека, трансдуцированные аденовирусными векторами в различных комбинациях, а именно: МККП+Ad5-VEGF+Ad5-GDNF, МККП+Ad5-VEGF+Ad5-NCAM1, МККП+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM1, способны к синтезу терапевтических молекул (VEGF, GDNF, NCAM1) *in vivo* после трансплантации трансгенным SOD1 G93A мышам.

3. Мононуклеарные клетки крови пуповины человека, экспрессирующие сосудистый эндотелиальный фактор роста в сочетании с нейрональной молекулой адгезии в одном случае, и глиальный нейротрофический фактор вместе с нейрональной молекулой адгезии в другом, выявлены в спинном мозге мышей через 5 месяцев после их трансплантации.

4. Максимальное количество МККП в спинном мозге трансгенных SOD1 G93A мышей на всех сроках трансплантации (3, 6, 9, 12, 18, 21 неделя)

обнаружено после трансдукции МККП рекомбинантными генами VEGF и GDNF в сочетании с геном нейрональной молекулы адгезии NCAM1.

5. Наилучшие показатели двигательной активности и продолжительности жизни имели группы трансгенных SOD1 G93A мышей, которым трансплантировали МККП+Ad5-VEGF+NCAM1 и МККП+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM1.

6. Установлена прямая зависимость продолжительности жизни трансгенных SOD1 G93A мышей от количества в спинном мозге трансплантированных генетически модифицированных МККП и комбинации терапевтических генов.

7. Экспрессия в генетически модифицированных МККП нейрональной молекулы адгезии NCAM1 повышает миграционный потенциал и жизнеспособность трансплантированных клеток в спинном мозге трансгенных SOD1 G93A мышей с моделью бокового амиотрофического склероза.

## **РЕКОМЕНДАЦИИ**

Полученные данные об использовании генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека для терапии трансгенных мышей с моделью бокового амиотрофического склероза могут послужить основой для разработки нового класса терапевтических препаратов для стимулирования нейрорегенерации в научно-исследовательских коллективах Научного центра неврологии (г. Москва) и Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи (г. Москва). Результаты проведенного исследования рекомендованы для внедрения в научно-образовательный процесс для студентов Казанского медицинского университета и Казанского (Приволжского) федерального университета, а также для врачей в рамках повышения квалификации в Казанской государственной медицинской академии.

## **СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Измайлов А.А. Разработка, создание и доклинические испытания генно-клеточных конструкций для лечения нейродегенеративных заболеваний / А.А. Измайлов, З.З. Сафиуллов, В.Ю. Федотова // Материалы 86-й всероссийской студенческой научно-практической конференции. – Казань, 2012. - С.238.

2. Мухамедьяров М.А. Анализ эффективности генно-клеточной терапии у трансгенных мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза / М.А. Мухамедьяров, А.А. Ризванов, З.З. Сафиуллов и др. // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2012. - №4.- С.130-134.

3. Мухамедшина Я.О. Анализ экспрессии рекомбинантного гена *vegf* генетически модифицированными мононуклеарными клетками

**пуповинной крови в эксперименте *in vivo* / Я.О.Мухамедшина, В.В. Соловьева, И.И. Салафутдинов и др. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2012. - Т. VI, №3.- С.215-218.**

4. Измайлов А.А. Мононуклеарные клетки пуповинной крови человека, экспрессирующие сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF, продлевают жизнь у G93A мышей / А.А. Измайлов, З.З. Сафиуллов // Теоретические и практические аспекты клинической медицины. - Одесса, 2012.- С.45.

5. Измайлов А.А. Исследование поведенческой активности трансгенных G93A мышей после ксенотрансплантации генетически модифицированных клеток мононуклеарной фракции пуповинной крови человека и аденовирусного вектора, кодирующего сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) / А.А. Измайлов, З.З. Сафиуллов, Г.А. Шарифуллина и др. // Материалы 3-й международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». – Казань, 2013.- №1.- С. 88-89.

6. Сафиуллов З.З. Иммунофлюоресцентный анализ экспрессии рекомбинантного гена сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF в генетически модифицированных клетках пуповинной крови человека, после трансплантации трансгенным SOD1-G93A-мышам / З.З. Сафиуллов, А.А. Измайлов, Г.А. Шарифуллина и др. // Материалы 3-й международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». – Казань, 2013.- №1.- С. 96.

7. Сафиуллов З.З. Генно-клеточная терапия бокового амиотрофического склероза / З.З. Сафиуллов, А.А. Измайлов // Материалы 87-й всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине». – Казань, 2013. – С. 215-216.

8. Измайлов А.А. Генетически модифицированные клетки пуповинной крови для стимулирования нейрорегенерации / А.А. Измайлов, З.З. Сафиуллов, В.Ю. Федотова // Материалы 87-й всероссийской студенческой научно-практической конференции. – Казань, 2013. – С. 215.

9. Черенкова Е.Е. Изучение экспрессии рекомбинантных генов *vegfl65* и *pcam1* в мононуклеарных клетках крови пуповины человека *in vitro* и после трансплантации трансгенным мышам с моделью ююкового амиотрофического склероза / Е.Е. Черенкова, Я.О. Мухамедшина, З.З. Сафиуллов и др. // Материалы 3-й международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». – Казань, 2014.- №1.- С. 152.

10. Гаранина Е.Е. Эффективность генно-клеточной терапии бокового амиотрофического склероза с использованием рекомбинантных аденовирусов AD5-VEGF165 и AD5-NCAM / Е.Е. Гаранина, В.Ю. Федотова, З.З. Сафиуллов и др. // Материалы всероссийской школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии 21-го века». – Казань, 2014. - №1.- С. 23.

11. Сафиуллов З.З. Исследование поведенческой активности у трансгенных мышей с моделью бокового амиотрофического склероза после ксенотрансплантации генетически модифицированных клеток мононуклеарной фракции крови пуповины человека / З.З. Сафиуллов, А.А. Измайлов, В.В. Соловьева и др. // Материалы 88-й всероссийской студенческой научно практической конференции. – Казань, 2014. - С.286.

12. Измайлов А.А. Генно-клеточная терапия мышей с моделью бокового амиотрофического склероза генетически модифицированными мононуклеарными клетками человека, сверхэкспрессирующими нейрональную молекулу адгезии (NCAM) и глиальный нейротрофический фактор (GDNF) / А.А. Измайлов, З.З. Сафиуллов, В.Ю. Федотова и др. // Материалы 88-й всероссийской студенческой научно практической конференции. – Казань, 2014. - С.420.

13. Измайлов А.А. Генно-клеточная терапия трансгенных мышей с моделью бокового амиотрофического склероза при помощи генетически модифицированных мононуклеарных клеток пуповинной крови человека / А.А. Измайлов, З.З. Сафиуллов, Е.Е. Черенкова и др. // Вестник РГМУ, 2014. - №2. - С.260.

14. Гарифулин Р.Р. Исследование эффективности генно-клеточной терапии на основе поведенческой активности трансгенных G93A мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза / Р.Р. Гарифулин, З.З. Сафиуллов, А.А. Измайлов, Р.Р. Исламов // Материалы 89-й Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 70-летию победы в Великой Отечественной войне. – Казань, 2015. – С. 259.

15. Сафиуллов З.З. Анализ выживаемости генетически модифицированных мононуклеарных клеток пуповинной крови человека у G93A мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза / З.З. Сафиуллов, Р.Р. Гарифулин, А.А. Измайлов, Р.Р. Исламов // Материалы 89-й Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 70-летию победы в Великой Отечественной войне. – Казань, 2015. – С. 259.

**16. Islamov R.R. Symptomatic improvement, increased life-span and sustained cell homing in amyotrophic lateral sclerosis mouse model after transplantation of human umbilical cord blood cells genetically modified with adeno-viral vectors expressing a neuro-protective factor and a neural cell adhesion molecule / R.R. Islamov, A.A. Rizvanov, M.A. Mukhamedyarov // Current gene therapy. - 2015. - №15(3). – P. 266-276.**

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

μm (мкм) – микрометр

Ad5 (Adenovirus serotype 5) – аденовирус серотипа 5

BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) – мозговой нейротрофический фактор

CD34 – мембранный белок, играющий роль на ранних стадиях гемопоэза

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) – 4,6-диамидино-2-фенилиндол

EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) – усиленный зеленый флуоресцирующий белок

G93A – глицин замещен на аланин в позиции 93

GDNF (Glial cell Derived Neurotrophic Factor) – нейротрофический фактор, полученный из глиальных клеток

HNA (Human Nuclei Antigen) – ядерный антиген человека

Iba1 (Ionized calcium-binding adapter molecule 1) – молекула, связывающая ион кальция

IGF (Insulin-like Growth Factor) – инсулиноподобный фактор роста

NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule 1) – молекула адгезии нейрональных клеток 1

OSP (Oligodendrocyte Specific Protein) – специфический белок олигодендроцитов

PBS (Phosphate Buffered Saline) – натрий-фосфатный буфер

SOD1 (Superoxide Dismutase 1) – супероксиддисмутаза 1

АГ - антиген

АТ – антитело

БАС – боковой амиотрофический склероз

МККП – мононуклеарные клетки крови пуповины

ЦНС – центральная нервная система