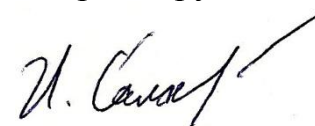


На правах рукописи



САЛАФУТДИНОВ Ильнур Ильдусович

**ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСИНТЕЗА БЕЛКОВ, ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ
И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК
ПУПОВИННОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ
РЕКОМБИНАНТНЫМИ НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология
03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саранск – 2012

Работа выполнена на базе ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» и ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Рустем Робертович Исламов

Научный консультант: доктор биологических наук, доцент
Альберт Анатольевич Ризванов

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Виктор Владимирович Валиуллин

доктор медицинских наук, профессор
Фрида Насыровна Гильмиярова

Ведущая организация:

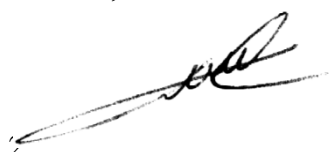
**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Учреждение Российской академии наук Государственный научный
центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем
РАН**

Защита диссертации состоится «16» марта 2012 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д.212.117.01 при ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева» по адресу: 430005, Республика Мордовия, г. Саранск, ул. Большевикская, 68.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева» (430005, Республика Мордовия, г. Саранск, ул. Большевикская, 68). Автореферат диссертации опубликован на официальном сайте ФГБОУ www.mrsu.ru; e-mail: dsovet@mrsu.ru

Автореферат разослан «____» февраля 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного Совета,
доктор биологических наук
профессор

 В.П. Балашов

Актуальность проблемы

Одной из важнейших задач в области регенеративной медицины является восстановление утраченных и поврежденных структур. Регенеративная медицина – бурно развивающаяся область современной биомедицинской науки, являющаяся своеобразным альянсом биотехнологии, клеточной биологии, биохимии генетики и медицины (Mason & Dunnill, 2008; Еремеева, 2009). В настоящее время с целью стимулирования регенерации тканей активно исследуют ряд подходов, таких как доставка в область повреждения различных терапевтических генов (ангиогенных, нейротрофических факторов, молекул адгезии, противовоспалительных факторов и др.) введением в целевые клетки рекомбинантных нуклеиновых кислот. В качестве средств доставки терапевтических генов для стимулирования регенерации изучают возможности стволовых и прогениторных клеток. Однако значительного прогресса в этом направлении пока не достигнуто, что обусловлено недостаточной изученностью функционирования этих клеток и отсутствием адекватных методических подходов (Lim et al., 2011). Определенный интерес в этом отношении представляют клетки пуповинной крови, которые уже более двадцати лет широко применяются для трансплантации пациентам с гематологическими и некоторыми другими заболеваниями (Gluckman et al., 1997; Wagner et al., 1996; Yang et al., 2010). Перспективность применения клеток пуповинной крови обусловлена доступностью материала, малой инвазивностью процедуры забора, низкой иммуногенностью, содержанием в крови различных типов клеток, способных дифференцироваться в клетки тканей, формируемых из различных зародышевых листков (Gluckman et al., 2000; Ballen et al., 2001; Космачева и др., 2008). Клетки пуповинной крови применяют как для аутологичной, так и аллогенной трансплантации (Eapen et al., 2010; Шаманская и др., 2010). К настоящему времени в мире проведено более 20 000 трансплантаций клеток пуповинной крови (Kurtzberg et al., 2009). Доклинические исследования показали эффективность применения клеток пуповинной крови при различных заболеваниях, в том числе при терапии инсульта, травматических поражений головного и спинного мозга, а также нейродегенеративных заболеваниях (Yang et al., 2010). Вместе с тем многие аспекты их поведения при трансплантации пациентам остаются неясными, что иногда приводит к нежелательным побочным эффектам (Perez et al., 2011).

Несмотря на большое количество экспериментальных работ и клинических исследований по использованию клеток пуповинной крови в качестве материала для трансплантации при терапии различных заболеваний, на сегодняшний день остается актуальной проблема эффективности применяемой клеточной терапии. Как один из способов повышения терапевтического потенциала трансплантируемых клеток рассматривается их генетическая модификация (Ikeda et al., 2004; Chen et al., 2005; Шевченко и др., 2010).

В то же время в литературе практически отсутствуют сведения о генетической модификации и применении генетически модифицированных моноклеарных клеток пуповинной крови. Альтернативным подходом для лечения нейродегенеративных заболеваний является применение биологически активных веществ, таких как различные факторы роста (Zacchigna et al., 2008; Завалишин и др., 2008). Возможными кандидатами для терапии этих заболеваний рассматриваются сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и основной фактор роста фибробластов (FGF2). Вот почему представляется актуальным исследование эффективности трансплантации клеток моноклеарной фракции пуповинной крови человека, трансфицированных генами *vegf* и/или *fgf2* для различных клинических ситуаций. Предлагаемые ростовые факторы являются ключевыми в процессах ангиогенеза, нейрогенеза и обладают выраженным синергетическим и нейропротекторным эффектом (Sabti et al., 2007; Islamov et al. 2004; Макаревич и др., 2010). Однако сведений о механизмах их действия на поврежденные ткани в организме явно недостаточно. Показано, что именно VEGF обеспечивает улучшение поведенческих функций, отодвигает начало заболевания и продлевает жизнь трансгенным мышам с фенотипом бокового амиотрофического склероза (Hwang et al., 2009; Azzouz et al., 2004). Можно предположить, что введение в организм клеток моноклеарной фракции пуповинной крови, генетически модифицированных *vegf* и *fgf2*, окажет позитивное влияние на процессы регенерации при нейродегенеративных заболеваниях. Все вышесказанное свидетельствует о том, что выяснение оптимальных векторных конструкций, генов и их комбинаций, выбор клеток-носителей, а также определение путей их доставки с целью терапии различных заболеваний человека, безусловно, являются актуальными и очень важными в решении проблем регенеративной медицины.

Цель работы: разработка и получение рекомбинантных нуклеиновых кислот на основе двухкассетных плазмидных векторов, обеспечивающих биосинтез сосудистого эндотелиального фактора роста и основного фактора роста фибробластов в моноклеарных клетках пуповинной крови человека.

Исходя из цели работы, были определены следующие **задачи исследования:**

1. Получить двухкассетные генетические конструкции на основе плазмидного вектора pBudCE4.1, обеспечивающего одновременную и независимую экспрессию мРНК генов и биосинтез рекомбинантных белков: различных изоформ сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF121, VEGF165 и VEGF189), основного фактора роста фибробластов (FGF2) и улучшенного зеленого флуоресцентного белка (EGFP).

2. Провести анализ экспрессии рекомбинантных генов в мультипотентных стволовых клетках из зачатков третьих моляров человека

(МСК из ЗТМ), в мононуклеарных клетках пуповинной крови человека и в клетках эмбриональной почечной линии 293Т человека (НЕК293Т), трансфицированных рекомбинантными нуклеиновыми кислотами.

3. Исследовать влияние различных изоформ сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF121, VEGF165 и VEGF189) и основного фактора роста фибробластов (FGF2), секретируемых генетически модифицированными клетками НЕК293Т, на пролиферацию эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) *in vitro*.

4. Получить мононуклеарные клетки пуповинной крови человека, генетически модифицированные двухкассетными плазмидными конструкциями, кодирующими гены *egfp*, *vegf* и/или *fgf2*, и исследовать их выживаемость, миграцию и дифференцировку после трансплантации трансгенным мышам с фенотипом бокового амиотрофического склероза.

Научная новизна работы

В работе впервые описаны созданные двухкассетные невирусные генетические конструкции, одновременно и независимо экспрессирующие гены факторов роста: комбинации изоформ сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и основного фактора роста фибробластов (FGF2). Несомненной новизной обладают данные, полученные методами полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, свидетельствующие об экспрессии мРНК клонированных генов, а также иммуноцитохимии и иммуноблотинга, свидетельствующие о биосинтезе рекомбинантных белков в генетически модифицированных клетках, трансфицированных рекомбинантными нуклеиновыми кислотами на основе двухкассетных плазмидных конструкций. Приоритетными следует признать результаты, полученные *in vitro* на модели ангиогенеза, где установлено, что генетически модифицированные клетки НЕК293Т секретируют VEGF и/или FGF2, что дозозависимо ускоряет пролиферацию эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC).

Впервые разработан метод генетической модификации мононуклеарных клеток пуповинной крови человека двухкассетными плазмидными конструкциями (получен патент на изобретение РФ №2431669), показана их способность к экспрессии мРНК клонированных генов с последующим биосинтезом рекомбинантных белков *in vitro* и *in vivo*. Принципиально новыми являются данные о том, что генетически модифицированные клетки пуповинной крови человека, трансплантированные трансгенным мышам с фенотипом бокового амиотрофического склероза, выживают, мигрируют в очаги нейродегенерации и дифференцируются в клетки, экспрессирующие маркеры эндотелия. Впервые показано, что клетки мононуклеарной фракции пуповинной крови человека, одновременно экспрессирующие мРНК генов *vegf* и *fgf2*, дифференцируются в астроцитоподобные клетки в спинном мозге мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Клетки, генетически модифицированные плазмидными конструкциями, несущими комбинации различных изоформ сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и основного фактора роста фибробластов (FGF2), экспрессируют высокий уровень мРНК клонированных генов и биосинтезируют рекомбинантные белки, что ускоряет пролиферацию эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) *in vitro*.

2. После трансплантации генетически модифицированные моноклеарные клетки пуповинной крови человека, синтезирующие рекомбинантные сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и основной фактор роста фибробластов (FGF2), мигрируют в спинной мозг трансгенных мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза и дифференцируются в клетки, экспрессирующие маркеры, характерные для эндотелиальных клеток и астроцитов.

Научно-практическая значимость

Настоящее исследование расширяет представления о возможностях применения методов генной и генно-клеточной терапии различных заболеваний человека. В рамках проведенного исследования предложен подход для создания невирусных генетических конструкций, экспрессирующих комбинации различных генов, что позволяет обеспечить эффективную адресную одновременную доставку нескольких терапевтических генов в клетки мишени. Нами показано, что двухкассетные плазмидные вектора осуществляют эффективный перенос терапевтических генов на примере сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и основного фактора роста фибробластов (FGF2) и могут быть использованы для разработки методов терапии дегенеративных заболеваний. Разработаны способы получения и применения препарата на основе генетически модифицированных клеток моноклеарной фракции пуповинной крови человека (подана заявка на получение патента на изобретение РФ №2009133970 и получен патент на изобретение РФ №2431669). Экспериментальные и методические подходы, используемые в работе, открывают перспективу для разработки биологически безопасных генно-клеточных препаратов для использования в регенеративной медицине.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены на следующих всероссийских и международных симпозиумах, конгрессах и конференциях: Proceedings of the First Interuniversity Conference on Modern Biology (Казань, 2008); I Всероссийский с международным участием конгресс студентов и аспирантов биологов «Симбиоз-Россия» (Казань, 2008); II Международная научно-практическая конференция «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, 2008); 13th Annual Symposium for Biology

Students of Europe «SymBioSE 2009» (Казань, 2009); Всероссийская научная школа-конференция для молодежи «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования» (Москва, 2009, 2010); V Международная (XIV Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых (Москва, 2010); Всероссийская научно-практическая конференция «Молодые ученые в медицине» (Казань, 2009, 2010, 2011); Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2010, 2011); IV Всероссийский симпозиум с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» (Санкт-Петербург, 2010); III Всероссийский с международным участием конгресс студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010», 2nd International student medical congress (Кошице, Словакия, 2010); Всероссийская научная школа-конференция «Стволовые клетки и регенеративная медицина» (Москва, 2010); Международная научно-практическая конференция «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург 2010); 4th International Congress Of Molecular Medicine (Стамбул, Турция, 2011).

Публикация результатов исследования.

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК для защиты кандидатских диссертаций и 19 тезисов-докладов на международных и всероссийских конференциях и конгрессах.

Структура и объем диссертационной работы

Материалы диссертационной работы изложены на 183 страницах машинописного текста. В работе приведено 48 рисунков и 13 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы (276 наименования) и приложения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Создание рекомбинантных генетических конструкций

Исходя из нуклеотидных последовательностей, представленных в базе данных GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank), были разработаны специфические праймеры для ПЦР-амплификации полных открытых рамок считывания генов *vegf* (5'-ccggtaccatgaactttctgctgtcttggg-3', 5'-tgctcgagtcaccgcctcggcttgtc-3'), *fgf2* (5'-gcggtaccatggtgggtgtcggg-3', 5'-cactcgagtcagctcttagcagacattggaag-3') и *egfp* (5'-tcggtaccatggtgagcaagggcgag-3', 5'-gtctcgagtattgtacagctcgtccatgcc-3'). 5'- и 3'-праймеры содержат адаптерные участки с уникальными сайтами рестрикции *KpnI* и *XhoI*, применяемые при клонировании генов в экспрессионный плазмидный вектор pcDNA 3.1(+) (Invitrogen). Затем кДНК генов различных изоформ *vegf* (*vegf121*, *vegf165*,

vegf189), *fgf2* и *egfp* субклонировали в экспрессионный плазмидный вектор pBudCE4.1(Invitrogen) (Sambrook et al., 2007). Конечное подтверждение получения интересующих нас плазмид осуществляли с помощью ДНК-секвенирования при использовании стандартных праймеров T7 и BGHrev (Watts & MacBeath, 2001).

Выделение нуклеиновых кислот

Для выделения плазмидной ДНК использовали набор Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Для выделения общей РНК из клеточных культур использовали набор MiniRNA kit (Qiagen). Выделения проводили согласно рекомендации фирмы производителя. Количество и чистоту оценивали спектофотометрически и в ходе электрофореза в агарозном геле (Sambrook, et al. 2007).

Культивирование эукариотических клеток

Клетки почек эмбриона человека (НЕК293Т) и мультипотентные стволовые клетки, выделенные из зачатков третьих моляров человека (МСК из ЗТМ), поддерживали на среде DMEM с добавлением 10% сыворотки крови плодов коровы (FBS) (Sigma) и пенициллин/стрептомицин (Sigma). Как было показано ранее, МСК из ЗТМ способны дифференцироваться в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях, что аналогично мезенхимным стволовым клеткам (Yalvac et al., 2010). Эндотелиальные клетки вены пуповины человека (HUVEC) поддерживали в среде DMEM/F12 (HyClone) с добавлением 15% FBS (HyClone), 1% смесь аминокислот (Invitrogen) пенициллин/стрептомицин (Invitrogen), рекомбинантного 5 нг/мл bFGF (Chemicon), 20 нг/мл EGF (Chemicon), 10 нг/мл VEGF (Chemicon), 10 нг/мл IGF, 1 мМ гидрокортизона, 5 ед/мл гепарина (Lagarkova et al., 2010). Все клеточные типы содержали в инкубаторе при 37 °С, во влажной атмосфере, при 5% CO₂. Пассирование клеток и замену питательных сред проводили по стандартным методикам (Pollard & John, 1997).

Выделение клеток мононуклеарной фракции пуповинной крови человека

Выделение клеток производили из свежих образцов крови при помощи седиментации в градиенте плотности фикола ($\rho = 1,077$ г/мл). Затем клетки отмывали фосфатно-солевым буфером, эритроциты лизировали в гипотоническом растворе и оставшиеся мононуклеарные клетки использовали для трансфекции (Hawley & Totowa, 2004).

Трансфекция клеток

Трансфекцию клеток линии НЕК293Т плазмидными конструкциями осуществляли коммерческими, синтетическими катионными липидами – TransFast (Promega), согласно предложенному протоколу производителя.

Трансфекцию клеток мононуклеарной фракции пуповинной крови человека и МСК из ЗТМ проводили с помощью электропорации в 4 мм электропорационных кюветах на приборе Gene Pulser Xcell Electroporation System (BioRad, USA). После воздействия электрического импульса клетки переносили в культуральный флакон и добавляли соответствующей среды с FBS в конечной концентрации 10% (Rizvanov et al., 2008; Yalvac et al., 2009).

Реакция обратной транскрипции

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием шестинуклеотидных рандом праймеров-гексамеров (Random6) (Синтол) и набора реагентов Omniscript Revers Transcriptase, согласно инструкции фирмы производителя (Qiagen). Продукты обратной транскрипции использовались для анализа с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Количественная оценка экспрессии мРНК генов с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ)

Количественный анализ уровня экспрессии мРНК генов проводили на приборе iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Каждая реакция включала в себя универсальный мастер микс для ПЦР, специфичные прямой и обратный праймеры, флуоресцентную пробу TagMan (Синтол) и целевую кДНК. Количество РНК было нормализовано по β -актину (Chintalgattu et al., 2003).

Иммуноцитохимический анализ

Иммуноцитохимический анализ проводили согласно стандартной методике (Oliver, et al., 2010). Культуру трансфицированных клеток НЕК293Т фиксировали в 4% растворе параформальдегида, затем блокировали 2% сывороткой козы. Стекла инкубировали с первичными антителами (АТ) к VEGF (1:50, humanized anti-VEGF monoclonal antibody (Avastin), Roche, USA), а затем с несущими флуоресцентную метку видоспецифичными вторичными антителами Alexa Fluor 488 (1:1000, goat anti-human IgG, Invitrogen).

Иммуноблоттинг

Клетки НЕК293Т, трансфицированные экспрессионными плазмидами, ресуспендировали в буфере для нанесения проб и использовали для электрофореза в 15% полиакриламидном SDS-PAGE геле. Белки переносили на PVDF мембрану (BioRad) и блокировали 5% раствором обезжиренного молока в фосфатно-солевом буфере. Мембраны инкубировали с первичными моноклональными анти-FGF2 (1:1000, Sigma) или анти-GFP (1:1000, Sigma) АТ и вторичными АТ, конъюгированными с пероксидазой хрена в разведении 1:3000 (Sigma). Анализ проводили с помощью набора DAB Substrate Kit (Vector) (Bolt & Mahoney, 1997).

Оценка активности митохондриальных дегидрогеназ в эндотелиальных клетках *in vitro*

Трансфекцию HEK293T двухкассетными плазмидами проводили с использованием реагента TransFast (Promega) в соответствии с рекомендациями производителя. Через 12 часов после трансфекции среду меняли на свежую. Спустя 48 часов после трансфекции среду собирали, полученный супернатант наносили на клетки HUVEC, рассеянных из расчета 5×10^3 клеток на лунку 96-луночного планшета, в комбинации со средой без факторов роста. Спустя 24 часа активность митохондриальных дегидрогеназ, характеризующих пролиферацию HUVEC, оценивали с помощью количественного МТТ-теста с использованием набора CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega). Для этого раствор МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолиум бромид) добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 60 минут при 37 °С. Измерение оптической плотности проводили с использованием планшетного спектрофотометра Ceres 900 HDi (Biotec) при длине волны 570 нм (Lee et al., 1997).

Трансгенные животные

Эксперименты *in vitro* выполнены на половозрелых трансгенных мышцах обоего пола, линии B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J (далее G93A-SOD1). Трансгенные мыши экспрессируют мутантный ген *sod1* (Gly93→Ala; глицин замещен на аланин в позиции 93) человека и характеризуются прогрессирующей дегенерацией мотонейронов, как при боковом амиотрофическом склерозе (БАС) человека. На фоне прогрессирования паралича скелетных мышц животные умирают через 4–6 недель после появления первых клинических признаков заболевания (Gurney et al., 1994).

Трансплантация генетически модифицированных клеток моноклеарной фракции пуповинной крови человека трансгенным животным

Все манипуляции с животными проводились в соответствии с правилами, рекомендованными Физиологической секцией Российского национального комитета по биологической этике (Генин и др., 2001) и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003. G93A-SOD1 мышам в возрасте от 22 до 28 недель (начальный этап развития заболевания) в стерильных условиях ретроорбитально трансплантировали 1×10^6 генетически модифицированных (pBud-EGFP, pBud-VEGF-EGFP, pBud-VEGF-FGF2 или pBud-EGFP-FGF2) клеток моноклеарной фракции пуповинной крови человека в 100 мкл физиологического раствора.

Иммуногистохимическое исследование

Через две недели после трансплантации клеток животных наркотизировали. Спинной мозг извлекали из позвоночного столба,

фиксируют в растворе параформальдегида. Иммуногистохимический анализ тканей животных проводили согласно описанной ранее методике (Rizvanov et al., 2008). Для приготовления криостатных срезов сегменты спинного мозга помещали в заливочную среду TBS (Triangle Biomedical Science, Durham, NC) и замораживали. Серийные продольные срезы толщиной 20 мкм помещали на предметные стекла. Для идентификации трансфицированных EGFP-позитивных клеток серийные продольные срезы помещали в среду, поддерживающую флуоресценцию (anti-quenching medium). Для обнаружения трансплантированных донорских клеток в тканях реципиента и с целью выяснения их фенотипа серийные продольные срезы спинного мозга подвергали двойному иммунофлуоресцентному окрашиванию с первичными АТ: к ядерному антигену человека – HNA (1:20; Chemicon, USA), к специфическому белку олигодендроцитов – OSP (1:2000; Abcam), к маркеру эндотелиальных клеток – CD34 (1:100; Abcam), к маркеру микроглиальных клеток – Iba1 (1:600; Biocare Medical), к маркеру астроцитов и швановских клеток – S-100 (1:2000; DakoCytomation) и к маркеру нейрональных клеток – TUJ1 (нейрональный β -III-тубулин) (1:2000; Covance). После этого слайды отмывали и инкубировали с видоспецифическими вторичными антителами (1:200; goat anti-mouse IgG конъюгированными с Cy3 или goat anti-rabbit IgG конъюгированными с Cy2, Millipore). Для визуализации клеточных ядер срезы дополнительно окрашивали раствором DAPI (Sigma). Окрашенные срезы заключали в среду, поддерживающую флуоресценцию, и изучали при помощи лазерного сканирующего микроскопа (Zeiss Axiovert 200M).

Программное обеспечение и статистическая обработка результатов

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с использованием он-лайн приложения NCBI Blast и пакета программ DNASTar Lasergene 5.03 (DNASTAR Inc. США). Создание праймеров проводили с использованием пакета программ PrimerSelect (DNA Star, США). Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2007. Статистическая достоверность разницы определялась с помощью t-критерия Стьюдента. Во всех статистических данных уровень достоверности был принят меньше 0,05 ($p < 0,05$). Данные представлены в виде арифметического среднего \pm стандартная ошибка среднего (С.О.) (Лакин, 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Создание рекомбинантных конструкций экспрессирующих гены *veg121*, *veg165*, *veg189*, *fgf2*, *egfp* и их комбинации

С целью дальнейшего развития понимания аспектов переноса функциональных генов и их комбинаций в клетки мишени с использованием невирусных систем доставки на первом этапе работы в результате ПЦР амплификации и последующих этапов клонирования были получены следующие двухкассетные экспрессионные плазмидные вектора: pBud-VEGF121-EGFP, pBud-VEGF165-EGFP, pBud-VEGF189-EGFP, pBud-VEGF121-FGF2, pBud-VEGF165-FGF2 (Рис. 1), pBud-VEGF189-FGF2, pBud-EGFP-FGF2, pBud-EGFP. Правильность получения рекомбинантных плазмид подтверждена рестрикционным анализом и автоматическим секвенированием.

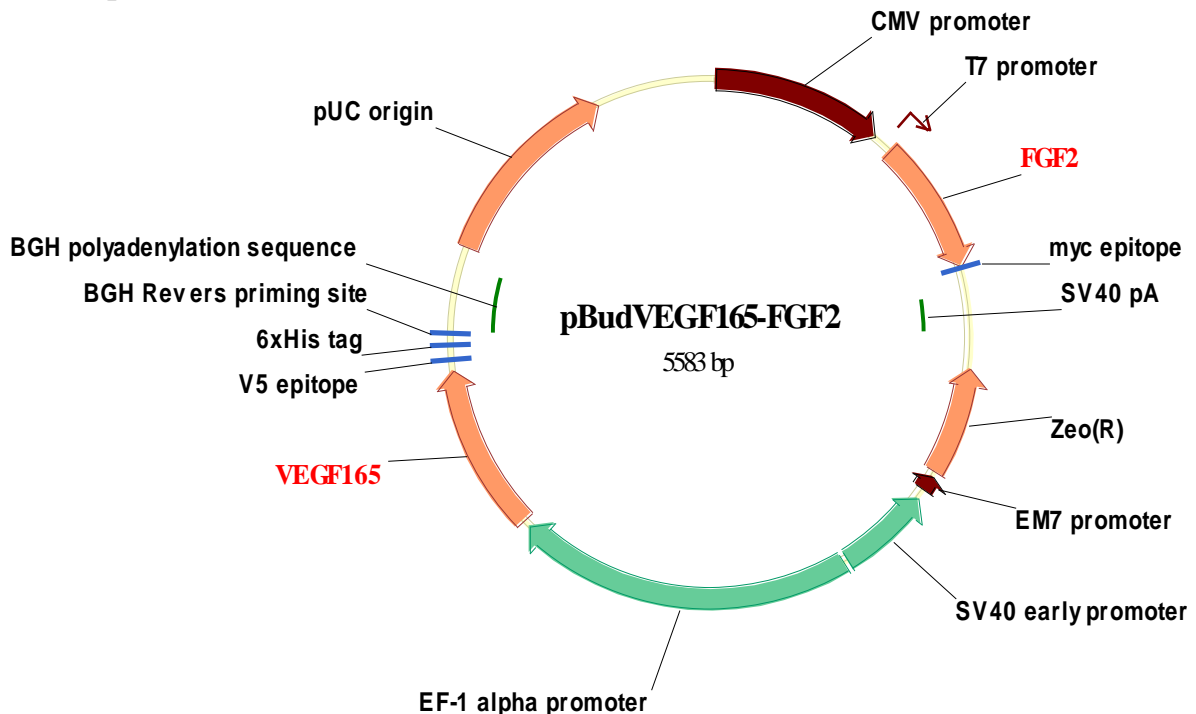


Рис. 1. Рестрикционная карта плазмиды pBudVEGF165-FGF2

Преимущество применения двухкассетного экспрессионного вектора, созданного на основе pBudCE4.1 (Invitrogen), обусловлено его способностью одновременно и независимо экспрессировать два рекомбинантных гена, расположенных под контролем двух сильных конституционно активных промоторов CMV и EF-1 α . Данный факт позволяет повысить эффективность доставки и гарантировать одновременную экспрессию в клетках-мишенях двух рекомбинантных генов, вместе с тем существенно минимизирует возможный иммуногенный и токсический эффект вводимого вектора как *in vitro*, так и *in vivo*.

Анализ экспрессии мРНК клонированных генов и биосинтеза рекомбинантных белков

С целью количественной оценки экспрессии мРНК клонированных генов в трансфицированных конструкциями pBud-VEGF121-EGFP, pBud-VEGF165-EGFP, pBud-VEGF189-EGFP, pBud-VEGF121-FGF2, pBud-VEGF165-FGF2, pBud-VEGF189-FGF2, pBud-EGFP-FGF2, pBud-EGFP МСК из ЗТМ мы провели ПЦР-РВ с использованием специфических параймеров и проб TaqMan. В ходе исследования было установлено, что трансфицированные клетки обладают повышенным уровнем экспрессии мРНК генов *fgf2* и *vegf*.

Уровень экспрессии мРНК гена *fgf2* увеличился от 200 до 500 раз в клетках, трансфицированных плазмидами, кодирующими соответствующую кДНК (pBud-VEGF121-FGF2, pBud-VEGF165-FGF2, pBud-VEGF189-FGF2), по отношению к нетрансфицированным клеткам. Уровень экспрессии мРНК гена *vegf* увеличился от 4 000 до 20 000 раз в клетках, трансфицированных плазмидами, кодирующими соответствующую кДНК (pBud-VEGF121-EGFP, pBud-VEGF165-EGFP, pBud-VEGF189-EGFP, pBud-VEGF121-FGF2, pBud-VEGF165-FGF2, pBud-VEGF189-FGF2) по отношению к нетрансфицированным клеткам. Увеличение количества мРНК в трансфицированных плазмидами клетках не обусловлено физическим воздействием (электропорации) на клетки, так как в контрольных клетках, трансфицированных плазмидой pBud-EGFP, мы не наблюдали статистически значимого увеличения экспрессии исследуемых генов.

В ходе флуоресцентной микроскопии показана экспрессия репортерного белка EGFP в клетках HEK293T, трансфицированных рекомбинантными плазмидами, несущими клонированный ген *egfp* (pBud-VEGF121-EGFP, pBud-VEGF165-EGFP, pBud-VEGF189-EGFP, pBud-EGFP-FGF2, pBud-EGFP). Данные результаты свидетельствуют в пользу того, что прошла генетическая модификация клеток HEK293T, а генетические конструкции стабильны и экспрессируют клонированный ген – *egfp*. При этом визуально около 80–90% клеток экспрессировали EGFP. Экспрессию наблюдали в течение 10 дней с момента трансфекции клеток.

Для определения биосинтеза рекомбинантного белка VEGF в трансфицированных клетках HEK293T мы провели иммуноцитохимическую реакцию с помощью моноклональных АТ к VEGF. В ходе анализа была выявлена положительная реакция с АТ к VEGF в трансфицированных образцах и отрицательная реакция в контрольном образце. Полученные данные позволяют утверждать, что произошла плазмидная трансфекция клеток HEK293T. Трансфицированные конструкциями pBud-VEGF121-FGF2, pBud-VEGF165-FGF2, pBud-VEGF189-FGF2 клетки биосинтезируют VEGF.

Лизаты клеток HEK293T, трансфицированные pBud-VEGF121-FGF2, pBud-VEGF165-FGF2, pBud-VEGF189-FGF2, pBud-EGFP-FGF2, pBud-EGFP-FGF2, pBud-EGFP, анализировали с помощью вестерн-блотинга и

моноклональных АТ к FGF2. Вестерн-блоттинг выявил специфический иммунопреципитат, соответствующий ожидаемой молекулярной массе белка FGF2 (18 кДа), которая отсутствовала в контроле.

Анализ экспрессии GFP с помощью вестерн-блоттинга и моноклональных АТ к GFP в клетках HEK293T, трансфицированных рекомбинантными плазмидами pBud-EGFP, pBud-VEGF121-EGFP, pBud-VEGF165-EGFP, pBud-VEGF189-EGFP, pBud-EGFP-FGF2, выявил экспрессию GFP (27 кДа). Эти данные коррелируют с результатами, полученными в ходе флуоресцентного анализа экспрессии репортерного гена *egfp* в трансфицированных клетках HEK293T. Результаты свидетельствуют в пользу того, что произошла плазмидная трансфекция и трансфицированные клетки экспрессируют белковые продукты генов *fgf2* и *egfp*.

Влияние биосинтеза и секреции рекомбинантных белков на пролиферацию клеток HUVEC *in vitro*

Для исследования функциональной активности конструкций и эффективности паракринной стимуляции ангиогенеза с помощью клеток, генетически модифицированных двухкассетными плазмидами, экспрессирующими разные изоформы генов *vegf* и *fgf2*, мы применили *in vitro* модель пролиферации HUVEC. Пролиферацию клеток оценивали по активности митохондриальных дегидрогеназ (МТТ-тест). Для этого мы добавляли культуральную среду клеток HEK293T, трансфицированных двухкассетными плазмидами, в культуру клеток HUVEC. При этом скорость пролиферации клеток HUVEC отражала стимулирующее действие растворимых факторов, попавших в среду в результате нормальной жизнедеятельности клеток, а также в результате экспрессии секретируемых рекомбинантных белков.

Показано, что генетическая модификация клеток двумя терапевтическими генами (различные изоформы *vegf* и *fgf2*) повышает пролиферацию HUVEC по сравнению с экспрессией одиночных ангиогенных факторов и по сравнению с нетрансфицированным контролем.

Специфичность биологического эффекта культуральной среды трансфицированных клеток HEK293T на пролиферацию HUVEC подтверждена экспериментом по серийному разведению среды. Установлено, что уменьшение доли культуральной среды HEK293T приводило к дозозависимому снижению скорости пролиферации клеток HUVEC (рис. 2.).

Трансфекция клеток мононуклеарной фракции пуповинной крови человека

Для выделения ядросодержащих клеток из образцов пуповинной крови ($n = 15$) использовали градиентное центрифугирование крови в плотности фиколла. В зависимости от первоначального объема цельной крови $64,8 \pm$

7,4 мл (50–81 мл) выход клеток колебался в широких пределах 0,3 – 1,3 x 10⁸ и в среднем составлял 0,7 x 10⁸ ядродержащих клеток в образце. Во всех использованных образцах количество жизнеспособных клеток составило не менее 97%.

Эффективность трансфекции (генетической модификации) клеток мононуклеарной фракции пуповинной крови человека оценивали по экспрессии репортерного гена – *egfp*. Экспрессию выявляли с помощью проточной цитометрии спустя 24 часа после трансфекции. При оценке числа трансфицированных клеток методом проточной цитометрии было установлено, что процент EGFP позитивных клеток находился в диапазоне от 25 до 30%, жизнеспособность клеток при этом составляет 60–70%.

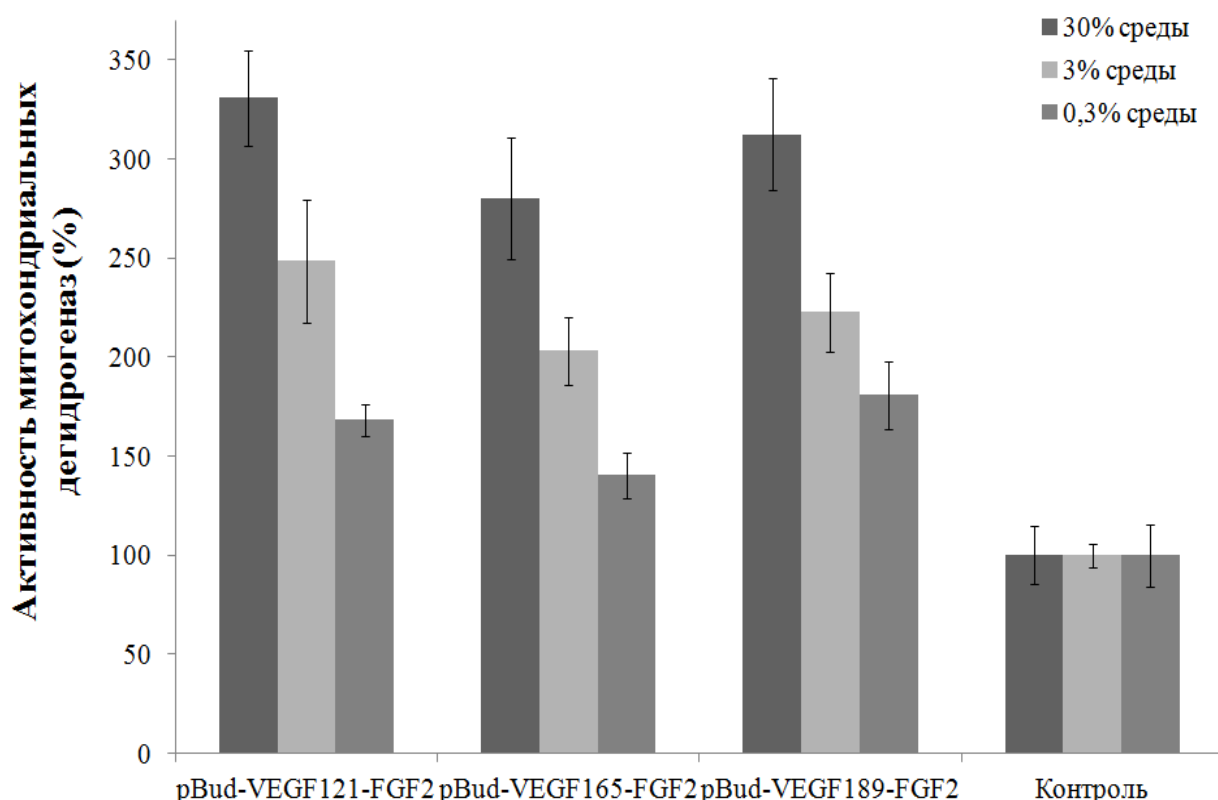


Рис. 2. Активность митохондриальных дегидрогеназ (МТТ-тест) в клетках HUVEC. Добавление культуральной среды (в конечной концентрации 30%, 3% и 0,3%), собранной с клеток НЕК293Т, трансфицированных различными плазмидами, повышает активность митохондриальных ферментов, что свидетельствует о стимулировании пролиферации клеток. Активность ферментов в клетках HUVEC при добавлении культуральной среды с нетрансфицированных клеток НЕК293Т (Контроль) принята за 100%

Оценка экспрессии мРНК рекомбинантных генов в генетически модифицированных клетках пуповинной крови человека с помощью ПЦР-РВ

Согласно данным ПЦР-РВ, трансфекция клеток пДНК pBud-VEGF165-FGF2 привела к значительному увеличению экспрессии мРНК гена *vegf* (в 74 000 раз) и *fgf2* (в 17 000 раз) по сравнению с

нетрансфицированным контролем – клетки мононуклеарной фракции пуповинной крови человека без генетической модификации (рис. 3).

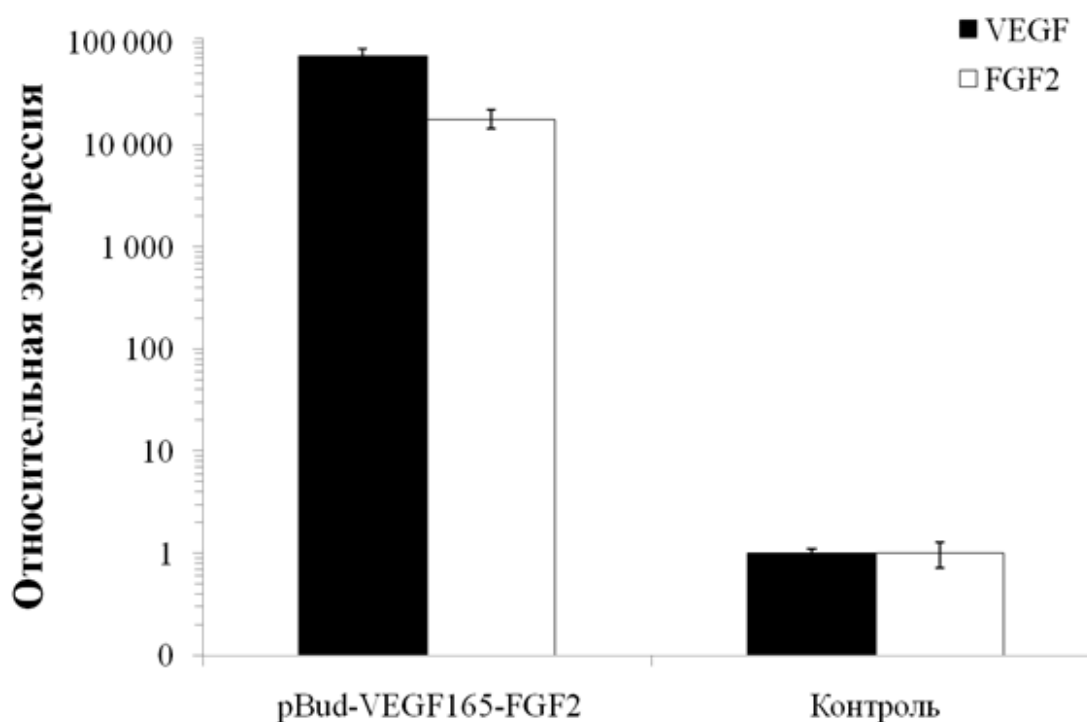


Рис. 3. Экспрессия мРНК генов *veg* и *fgf2* в мононуклеарных клетках пуповинной крови человека трансфицированных плазмидой pBud-VEGF165-FGF2. Относительный уровень экспрессии мРНК определяли с помощью ПЦР в режиме реального времени со специфичными праймерами и пробами TaqMan. Контроль – уровень экспрессии мРНК исследуемых генов в нетрансфицированных клетках. Количество РНК было нормализовано по β -актину. Данные получены из двух независимых экспериментов и представлены как среднее значение \pm С.О. Значение $p < 0,05$

Ксенотрансплантация генетически модифицированных мононуклеарных клеток пуповинной крови человека трансгенным животным с фенотипом бокового амиотрофического склероза

С целью повышения терапевтического эффекта мононуклеарные клетки пуповинной крови человека были подвергнуты генетической модификации плазмидными векторами, экспрессирующими VEGF (трансфекция pBud-VEGF-EGFP), FGF2 (трансфекция pBud-EGFP-FGF2) или обоими факторами одновременно (трансфекция pBud-VEGF-FGF2). Далее генетически модифицированные клетки трансплантировали трансгенным G93A-SOD1 мышам, в качестве контроля использовали клетки, трансфицированные плазмидой экспрессирующей EGFP (рис. 4).

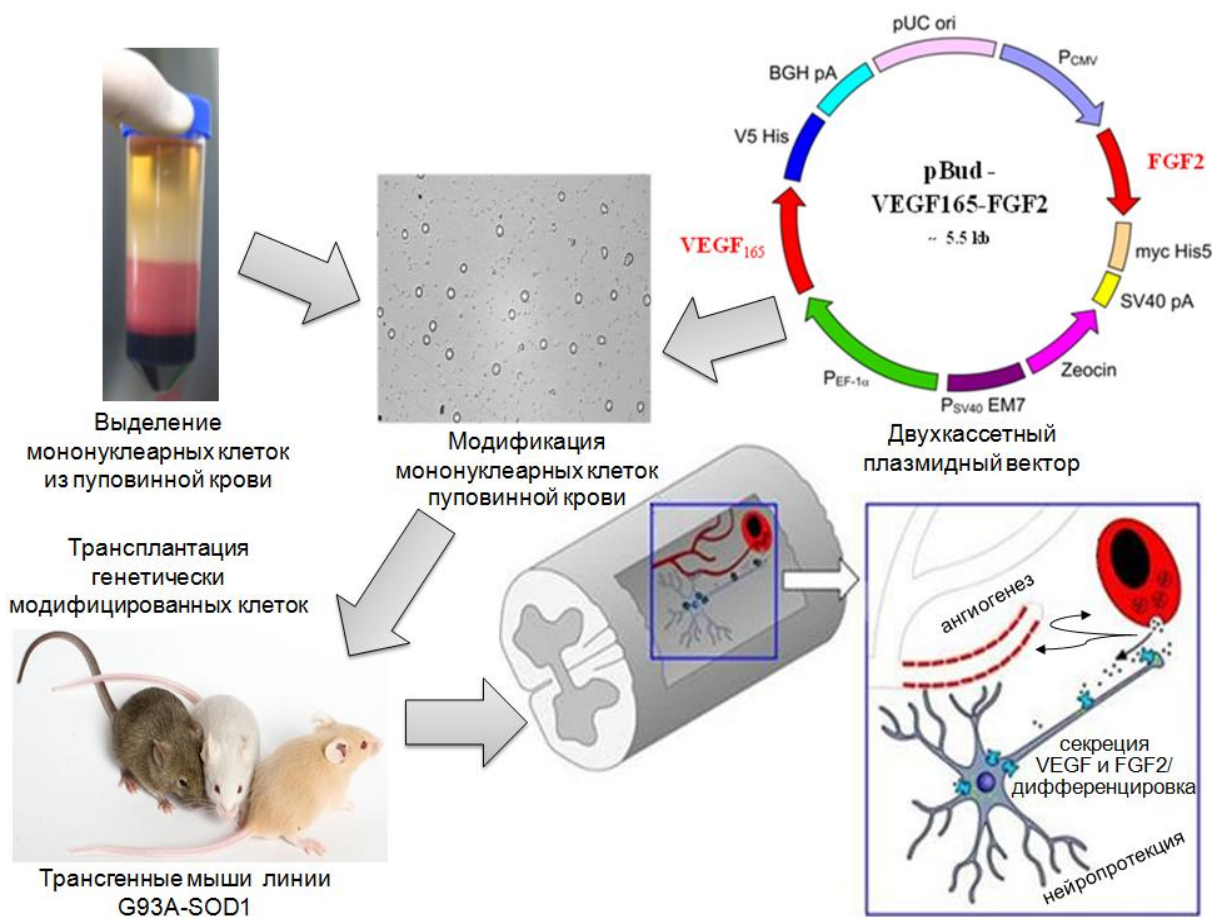


Рис. 4. Схема эксперимента по генетической модификации и трансплантации клеток пуповинной крови человека трансгенным мышам с фенотипом бокового амиотрофического склероза

Исследование срезов спинного мозга G93A-SOD1 мышей показало присутствие EGFP флуоресцирующих клеток в анализируемой нервной ткани (рис. 5 I). Таким образом, можно заключить, что трансплантированные генетически модифицированные мононуклеарные клетки пуповинной крови человека сохраняют свою жизнеспособность, по крайней мере в течение 14 дней с момента трансплантации клеток, активно мигрируют в нервную ткань головного и спинного мозга и при этом способны экспрессировать рекомбинантные белки.

В контрольной группе нами также было установлено, что трансплантированные мононуклеарные клетки, трансфицированные EGFP, проявляют фенотип CD34-позитивных эндотелиальных клеток (HNA⁺CD34⁺-клетки) (рис 5 II). В данной группе мы также обнаружили Iba1 позитивные клетки (HNA⁺Iba1⁺ клетки). При этом все выявленные HNA⁺ клетки были отрицательными по маркеру олигодендроцитов OSP (HNA⁺OSP⁻-клетки), белку S-100 (HNA⁺S-100⁻-клетки) и белку нейрональных клеток – нейрональный β-III-тубулин (TUJ1) (HNA⁺TUJ1⁻-клетки).

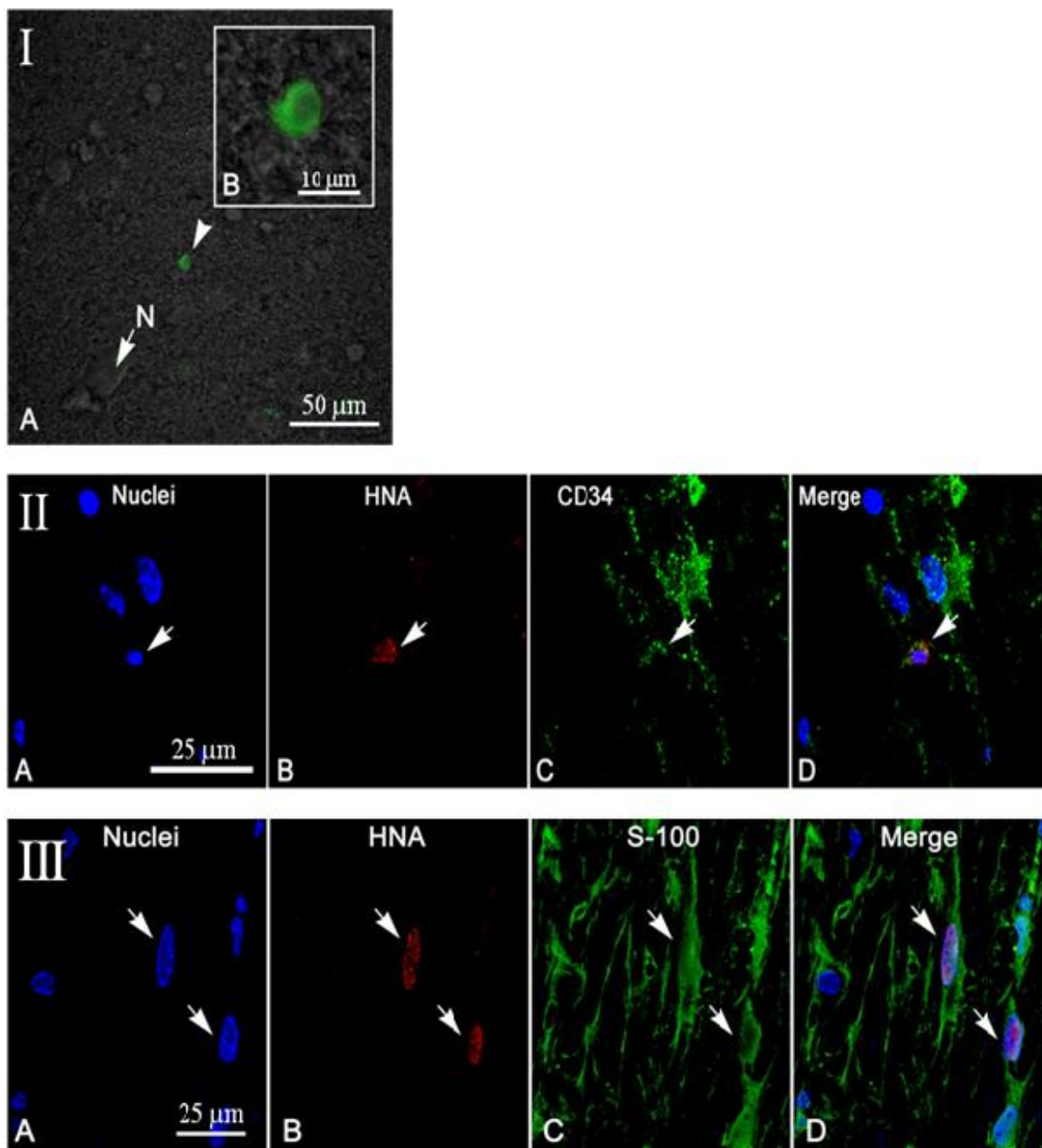


Рис. 5. Конфокальная микроскопия продольного среза спинного мозга трансгенной G93A-SOD мыши через 14 дней после трансплантации трансфицированных клеток.

I. А EGFP-положительная клетка (зеленая флуоресценция, отмечена стрелкой). Масштаб шкалы 50 мкм. В – клетка при большем увеличении. Масштаб шкалы 10 мкм, N – нейрон, отмечен стрелкой.

II. CD34-положительная мононуклеарная клетка (отмечена стрелкой), трансфицированная плазмидным вектором экспрессирующим EGFP, в сером веществе спинного мозга G93A-SOD мыши. А-D – иммунофлуоресцентное окрашивание с антителами против эндотелиального маркера CD34; А – ядра клеток, окрашенные раствором бис-бензида (синий); В – иммунофлуоресцентное окрашивание с антителами против ядерного антигена человека, HNA (красный). С – окрашивание антителами против эндотелиального маркера CD34 (зеленый). D – объединенная область

на панелях А-С, клетка, экспрессирующая ядерный антиген человека (HNA), маркер CD34, с окрашенным ядром. Масштаб шкалы А-Д, 25 мкм.

III. S-100-позитивные моноклеарные клетки (отмечены стрелкой), трансфицированные плазмидным вектором pBud-VEGF-FGF2, в сером веществе спинного мозга G93A-SOD1 мыши. А-Д – иммунофлуоресцентное окрашивание с антителами против маркера специфического белка астроцитарной глии S-100; А – ядра клеток, окрашенные раствором бис-бензида (синий); В иммунофлуоресцентное окрашивание с антителами против ядерного антигена человека, HNA (красный); С – окрашивание антителами против S-100 (зеленый). D – объединенная область на панелях А-С, клетка, экспрессирующая ядерный антиген человека (HNA), маркер S-100, с окрашенным ядром. Масштаб шкалы А-Д, 25 мкм.

Моноклеарные клетки, трансфицированные плазмидным вектором pBud-VEGF-EGFP, проявляли фенотип CD34-позитивных эндотелиальных клеток. Полученные данные морфологического анализа указывают на дифференцировку трансплантированных моноклеарных клеток в эндотелиальные клетки (HNA⁺CD34⁺ клетки). Также мы выявили CD34-негативные моноклеарные клетки (HNA⁺CD34⁻-клетки), которые в большинстве случаев находились в непосредственной близости от трансплантированных CD34-позитивных эндотелиальных клеток. Как предполагается, они дифференцируются в других направлениях или могут оставаться на стадии прогениторных клеток в стенке кровеносных сосудов.

При окрашивании срезов АТ в отношении к микроглиальному маркеру Iba1 мы не обнаружили Iba1-позитивных моноклеарных клеток пуповинной крови человека (HNA⁺Iba1⁻-клетки). Некоторые HNA⁺Iba1⁻ клетки находились в тесном контакте с Iba1-позитивными микроглиальными клетками мыши или были расположены обособлено от них. Аналогичный результат мы получили, анализируя срезы мозга, окрашенные с АТ к маркерам макроглии. Мы не зарегистрировали ни OSP-, ни S-100-позитивных моноклеарных клеток пуповинной крови человека. Часть HNA⁺OSP⁻ и HNA⁺S-100⁻ клеток располагалась вблизи олигодендроцитов и астроцитов мыши. Все выявленные HNA⁺-клетки не реагировали с АТ к маркеру белка ранних нейрональных клеток (HNA⁺TUJ1⁻-клетки).

В группе с трансплантацией моноклеарных клеток, трансфицированных плазмидным вектором pBud-VEGF-FGF2, в сером веществе спинного мозга мышей были обнаружены моноклеарные клетки пуповинной крови человека, экспрессирующие маркер специфического белка астроцитарной глии S-100 (HNA⁺S-100⁺-клетки) (рис. 5 III). Результаты указывают на дифференцировку трансплантированных моноклеарных клеток в макроглиальные клетки. В то же время выявленные HNA⁺-клетки не реагировали с АТ к маркеру олигодендроцитов (HNA⁺OSP⁻-клетки) и с АТ к белку ранних нейрональных клеток (HNA⁺TUJ1⁻-клетки).

В группе с трансплантацией моноклеарных клеток, трансфицированных плазмидным вектором pBud-EGFP-FGF2, были обнаружены моноклеарные клетки пуповинной крови человека,

проявляющие фенотип CD34-позитивных эндотелиальных клеток (HNA⁺CD34⁺-клетки). Все выявленные HNA⁺-клетки не реагировали с АТ к маркеру олигодендроцитов OSP (HNA⁺OSP⁻-клетки), с АТ к белку S-100 (HNA⁺S-100⁻-клетки) и с АТ к белку ранних нейрональных клеток (HNA⁺TUJ1⁻-клетки).

Полученные нами результаты по трансплантации генетически модифицированных мононуклеарных клеток пуповинной крови G93A-SOD1 мышам свидетельствуют о том, что трансплантированные клетки, в зависимости от типа экспрессионного вектора, в спинном мозге мышей могут дифференцироваться в клетки, морфологически напоминающие макрофаги, эндотелиальные клетки или астроциты. Так, EGFP-трансфицированные клетки, экспрессирующие репортерный ген, могут дифференцироваться в клетки микроглии или эндотелиальные клетки. Другими словами, мононуклеарные клетки пуповинной крови реализуют свой эндогенный потенциал, т.е. моноциты дифференцируются в макрофаги, а прогениторные эндотелиальные клетки в эндотелий. При этом после трансфекции плазмидным вектором pBud-VEGF-EGFP или pBud-EGFP-FGF2 пуповинные клетки также способны дифференцироваться в эндотелий. Ксенотрансплантация мононуклеарных клеток пуповинной крови человека, трансфицированных плазмидным вектором pBud-VEGF-FGF2, трансгенным G93A-SOD1 мышам обнаружила дифференцировку генетически модифицированных клеток в астроциты. Сверхэкспрессия VEGF и FGF2 в мононуклеарных клетках пуповинной крови человека стимулирует дифференцировку, пролиферацию и выживание прогениторных эндотелиальных клеток в спинном мозге G93A-SOD1 мышей. Целесообразность генетической модификации мононуклеарных клеток пуповинной крови человека геном фактора роста фибробластов – *fgf2* и сосудистого эндотелиального фактора роста – *vegf* подтверждается повышенной жизнеспособностью трансплантрованных клеток, поддержанием дифференцировки эндотелиальных клеток и их нейропротекторным действием на мотонейроны.

ВЫВОДЫ

1. Созданы двухкассетные генетические конструкции на основе плазмидного вектора pBudCE4.1, обеспечивающие одновременную и независимую экспрессию различных изоформ сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF121, VEGF165 и VEGF189), основного фактора роста фибробластов (FGF2) и улучшенного зеленого флуоресцентного белка (EGFP).

2. Показана экспрессия мРНК генов и биосинтез рекомбинантных белков различных изоформ сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF121, VEGF165 и VEGF189), основного фактора роста фибробластов (FGF2) и улучшенного зеленого флуоресцентного белка (EGFP) в мультипотентных стволовых клетках из зачатков третьих моляров человека,

моноклеарных клетках пуповинной крови человека и в клетках эмбриональной почечной линии 293Т человека (HEK293Т), трансфицированных рекомбинантными нуклеиновыми кислотами на основе двухкассетных плазмидных конструкций.

3. Генетически модифицированные клетки HEK293Т биосинтезируют и секретируют в культуральную среду различные изоформы сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF121, VEGF165 и VEGF189) и основного фактора роста фибробластов (FGF2), дозозависимо стимулируя пролиферацию эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVES).

4. Генетически модифицированные моноклеарные клетки пуповинной крови человека, экспрессирующие рекомбинантные гены *egfp*, *vegf* и/или *fgf2*, после трансплантации трансгенным мышам с фенотипом бокового амиотрофического склероза выживают, мигрируют и дифференцируются в различных направлениях:

а) клетки, модифицированные плазмидными векторами, экспрессирующими ген *egfp*, дифференцируются в клетки, несущие маркеры, характерные для микроглии (Iba1+) и эндотелиальных клеток (CD34+);

б) клетки, модифицированные двухкассетными плазмидными векторами, экспрессирующими гены *vegf* и/или *fgf2*, дифференцируются в клетки, несущие маркеры, характерные для эндотелиальных клеток (CD34+);

в) клетки, модифицированные двухкассетными плазмидными векторами, одновременно экспрессирующими гены *vegf* и *fgf2*, дифференцируются в клетки, несущие маркеры, характерные для астроцитов (S-100+).

Список основных публикаций по теме диссертации в журналах, рекомендованных ВАК для защиты диссертаций:

1. Салафутдинов И.И. Эффект одновременной экспрессии различных изоформ фактора роста эндотелия сосудов VEGF и основного фактора роста фибробластов FGF2 на пролиферацию эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVES / И.И. Салафутдинов, А.К. Шафигуллина, М.Э. Ялвач, Н.В. Кудряшова, М.А. Лагарькова, М.В. Шутова, С.Л. Киселев, Р.Ф. Масгутов, Р.И. Жданов, А.П. Киясов, Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов // Клеточная Трансплантология и Тканевая Инженерия. – 2010. – Т.5, №.2. – С. 62–67.

2. Rizvanov A.A. Genetically modified human umbilical cord blood cells expressing VEGF and FGF2 differentiate into glial cells after transplantation into amyotrophic lateral sclerosis (ALS) transgenic mice / A.A. Rizvanov, D.S. Guseva, I.I. Salafutdinov, N.V. Kudryashova, F.V. Bashirov, A.P. Kiyasov, M.E. Yalvac, I.M. Gazizov, M.S. Kaligin, M.A. Mukhamedyarov, A. Palotás, R.R. Islamov // Experimental Biology and Medicine. – 2011. – V.236, №1. – P. 91–98.

3. Yalvac M.E. Differentiation and Neuro-Protective Properties of Immortalized Human Tooth Germ Stem Cells / M.E. Yalvac, A. Yilmaz, D.

Mercan, S. Aydin, A. Dogan, A. Arslan, Z. Demir, I.I. Salafutdinov, A.K. Shafigullina, F. Sahin, A.A. Rizvanov, A. Palotas // *Neurochemical Research*. – 2011. – Vol. 36, №12. – P. 2227–2235.

Список основных докладов и материалов конференций по теме диссертации:

1. *Junusov D.S.* Expression of human vascular endothelial growth factor isoforms VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ and its effect mesenchymal stem cell migration *in vitro* / D.S. Junusov, I.I. Salafutdinov, A.K. Shafigullina, M.E. Yalvac, N.I. Lannik, A.P. Kiyasov, R.R. Islamov, A.A. Rizvanov // *Building the Future in Biology «Bionews»: Proceedings of the First Interuniversity Conference on Modern Biology*. – Kazan, 2008. – P. 50–51.

2. *Юнусов Д.Ш.* Клонирование изоформ VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ сосудистого эндотелиального фактора роста человека в двухкассетный экспрессионный плазмидный вектор pBudCE 4.1 / А.К. Шафигуллина, И.И. Салафутдинов, А.П. Киясов, Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов // I Всероссийский, с международным участием, конгресс студентов и аспирантов биологов «Симбиоз-Россия 2008»: Сборник статей. – Казань, 2008 – С.85.

3. Шафигуллина А.К. Генетически модифицированные клетки пуповинной крови дифференцируют в клетки эндотелия после трансплантации трансгенным мышам, экспрессирующим фенотип бокового амиотрофического склероза. / А.К. Шафигуллина, Д.И. Андреева, И.М. Газизов, Т.С. Йылмаз, М.С. Калигин, Д.С. Гусева, Д.Ш. Юнусов, Н.И. Ланник, И.И. Салафутдинов, А.П. Киясов, А.А. Ризванов, Р.Р. Исламов // I Всероссийский конгресс студентов и аспирантов биологов «Симбиоз-Россия 2008»: сб. статей. – Казань, 2008 – С. 85.

4. *Салафутдинов И.И.* Влияние экспрессии различных изоформ сосудисто эндотелиально фактора роста на миграцию мезенхимальных стволовых клеток *in vitro* / И.И. Салафутдинов, Д.Ш. Юнусов, А.К. Шафигуллина, М.Э. Ялвач, Н.И. Ланник, А.П. Киясов, Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов // *Материалы II Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии»*. – Казань, 2008. – С. 114.

5. *Юнусов Д.Ш.* Экспрессия изоформ сосудистого эндотелиального фактора роста человека VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ в культуре мезенхимальных стволовых клеток / Д.Ш. Юнусов, И.И. Салафутдинов, А.К. Шафигуллина, М.Э. Ялвач, Н.И. Ланник, А.П. Киясов, Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов // *Материалы II Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии»*. – Казань, 2008. – С. 144.

6. *Salafutdinov I.I.* Effect of recombinant VEGF and FGF2 expression on proliferation of HUVEC cells *in vitro* / I.I. Salafutdinov, D.S. Junusov, A.K. Shafigullina, S.L. Kiselev, M.E. Yalvac, F. Sahin, A.P. Kiyasov, R.R. Islamov, A.A. Rizvanov // *13th annual symposium for biology students of Europe «SymBioSE 2009»*. – Kazan, 2009. – P. 110.

7. Салафутдинов И.И. Трансфекция и экспрессия ангиогенного и нейропротекторного фактора VEGF и нейральной молекулы адгезии L1CAM в клетки мононуклеарной фракции пуповинной крови человека / И.И. Салафутдинов, А.К. Шафигуллина, Д.Ш. Юнусов, А.П. Киясов, А.А. Ризванов // XIV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молодые ученые в медицине». – Казань, 2009. – С. 174

8. Салафутдинов И.И. Стволовые клетки эктомезенхимы зачатка зуба мудрости человека для генно-клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний / И.И. Салафутдинов, А.К. Шафигуллина, А.А. Ризванов // Всероссийская научная школа-конференция для молодежи «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования». – Москва, 2009. – С. 60–61.

9. Халиков М.М. Трансплантация генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека при ишемии задней конечности крыс / М.М. Халиков, Р.Н. Мугинов, А.А. Ризванов, И.И. Салафутдинов, И.М. Газизов // V Международная (XIV Всероссийская) Пироговская научно медицинская конференция студентов и молодых ученых. – Москва, 2010. – С. 568.

10. Салафутдинов И.И. Особенности экспрессии рекомбинантного гена *gfp* в различных клеточных линиях *in vitro* в зависимости от типа плазмидного вектора / И.И. Салафутдинов, Н.В. Кудряшова, А.А. Ризванов // XV Всероссийская научно-практическая конференция «Молодые ученые в медицине». – Казань, 2010. – С. 294–295.

11. Салафутдинов И.И. Двухкассетные плазмидные конструкции для стимуляции терапевтического ангиогенеза / И.И. Салафутдинов, Н.В. Кудряшова, А.К. Шафигуллина, А.А. Ризванов // 14 международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2010. – С.175.

12. Шаймарданова Г.Ф. Посттравматическая регенерация спинного мозга крысы в условиях эктопической экспрессии генов VEGF и FGF2 в области повреждения / Г.Ф. Шаймарданова, Я.О. Рубашкина, И.И. Салафутдинов, А.А. Ризванов, Ю.А. Чельшев // IV Всероссийский симпозиум с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии». – Санкт-Петербург, 2010. – С. 136–137.

13. Салафутдинов И.И. Генетически модифицированные клетки пуповинной крови человека для терапии ишемических заболеваний / И.И. Салафутдинов, М.М. Халиков, Н.В. Кудряшова, И.М. Газизов // III Всероссийский, с международным участием, конгресс студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010». – Нижний Новгород, 2010. – С. 187.

14. Gazizov I.M. Transplantation of genetically modified cord blood stem cells in skin wound healing model in rats / I.M. Gazizov, I.I. Salafutdinov, T.S.

Yilmaz, A.A. Torondin // 2nd International student medical congress. – Kosice, Slovakia, 2010. – P. 40–41.

15. *Салафутдинов И.И.* Генно-клеточная терапия бокового амиотрофического склероза / И.И. Салафутдинов, Н.В. Кудряшова, А.К. Шафигуллина, Н.И. Ланник, Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов // Всероссийская научная школа-конференция «Стволовые клетки и регенеративная медицина». – Москва, 2010. – С. 65–66.

16. *Салафутдинов И.И.* Применение генетически модифицированных моноклеарных клеток пуповинной крови для регенерации кожных ран / И.И. Салафутдинов, Т.С. Ёылмаз, Н.В.Кудряшова, И.М.Газизов // Международная научно-практическая конференция «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине». – Санкт-Петербург, 2010. – Т.2 – С. 161–162.

17. *Салафутдинов И.И.* Применение генетически модифицированных моноклеарных клеток пуповинной крови человека для терапии бокового амиотрофического склероза / И.И. Салафутдинов, Д.С. Гусева, Н.В.Кудряшова, А.К. Шафигуллина, А.А. Ризванов // Материалы XVI Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине». – Казань, 2011. – С. 133–134.

18. *Салафутдинов И.И.* Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки для терапии нейродегенеративных заболеваний / И.И. Салафутдинов, Р.Ф. Масгутов, Г.А. Масгутова, В.Ю. Федотова, А.А. Ризванов // 15-я Пуштинская международная школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века»: сб. тезисов. – Пушкино, 2011. – С. 145.

19. *Rizvanov A.A.* Genetically Modified Umbilical Cord Blood Mononuclear Cells For Gene-Cell Therapy Of Amyotrophic Lateral Sclerosis / A.A. Rizvanov, D.S. Guseva, I.I. Salafutdinov, N.V. Kudryashova, A.K. Shafigullina, M.E. Yalvac, F. Sahin, A.P. Kiyasov, A.Palotas and R.R. Islamov // 4th International Congress Of Molecular Medicine. – Istanbul, Turkey, 2011. – P.499.

Патенты

1. Способ получения лекарственного препарата генетически модифицированных клеток. Авторы: Исламов Р.Р., Ризванов А.А., Блатт Н.Л., Газизов И.М., Ёылмаз Т.С., Калигин М.С., Киселев С.Л., Кудряшова Н.В., Ланник Н.И., Салафутдинов И.И., Шафигуллина А.К., Шахин Ф., Юнусов Д.Ш., Ялвач М.Э., Киясов А.П. Патент на изобретение №2431669.