

На правах рукописи



Салафутдинов Ильнур Ильдусович

**ГЕННО-КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ
ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ БОКОВОМ
АМИОТРОФИЧЕСКОМ СКЛЕРОЗЕ**

03.01.04 – биохимия
14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Казань – 2022

Работа выполнена на кафедре медицинской биологии и генетики ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и НИЛ OpenLab Генные и клеточные технологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный консультанты:

доктор медицинских наук, профессор

Рустем Робертович Исламов

доктор биологических наук, профессор

Ризванов Альберт Анатольевич

Официальные оппоненты:

Салмина Алла Борисовна

доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник и заведующий лабораторией экспериментальной нейроцитологии отдела исследований мозга ФГБНУ Научный центр неврологии Минобрнауки России

Балабаньян Вадим Юрьевич

доктор фармацевтических наук, доцент, ведущий научный сотрудник межфакультативной научно-исследовательской лаборатории трансляционной медицины факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Гильмутдинов Рустам Якубович

доктор биологических наук, профессор кафедры технологии животноводства и зоогигиены ФГБОУ ВО Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов»

Защита диссертации состоится «26» мая 2022 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета КФУ.03.07 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», по адресу: 420008 г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, ауд. 211.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 35.

Сведения о защите, автореферат и диссертация размещены на официальных сайтах ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (<https://vak.minobrnauki.gov.ru>) и ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (<http://kpfu.ru>).

Автореферат разослан «___» ____ 2022 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



Кравцова О.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Нейродегенеративные заболевания человека, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, лобно-височная деменция и боковой амиотрофический склероз (БАС) характеризуются прогрессирующей гибелью определенных типов клеток головного и/или спинного мозга (Erkkinen et al., 2018). Согласно данным всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), нейродегенеративные заболевания (НДЗ) являются основной причиной прогрессирующих деменций и находятся на четвертом месте в структуре инвалидизации населения. В настоящее время в мире насчитывается более 47 миллионов человек страдающих различными формами НДЗ (Poon et al., 2020; Xiang et al., 2021). Сложность этиопатогенеза и механизмов, ассоциированных с гибелью нейронов, а также противоречивые патофизиологические характеристики дебюта, прогрессии и завершения заболевания значительно затрудняют понимание процессов при НДЗ и, как следствие, разработки эффективных методов их лечения (Chen 2020; Oskarsson et al., 2015). Кроме того, ограниченный регенераторный потенциал в центральной нервной системе (ЦНС) и невозможность проникновения подавляющего большинства терапевтических средств через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) еще больше усложняют поиск новых средств лечения данных нозологий (Sivandzade and Cucullo, 2021). Стоит подчеркнуть, что число выявляемых случаев деменций, по прогнозам, удваивается каждые 20 лет, а стоимость терапии (симптоматического лечения), реабилитации и социального обеспечения вырастит до двух триллионов долларов США к 2030 году (Xiang et al., 2021; Первушина Е.В. и др. 2015; Белоусов и др. 2009). В силу этого вышеупомянутые аспекты делают НДЗ важной медико-социальной проблемой и являются вызовом для современной биомедицинской науки.

Очевидно, что для повышения качества жизни и оценки эффективности проводимой терапии пациентов с НДЗ необходимо детальное исследование молекулярных и клеточных основ патогенеза заболевания, что позволит раскрыть причины развития и прогрессии нейродегенеративных процессов, как в периферической, так и в центральной нервной системе. Особый интерес для диагностики НДЗ имеет поиск специфических малоинвазивных и релевантных маркеров, выявляемых на ранних стадиях болезни, когда потенциально существует возможно предотвратить массовую гибель нейронов или максимально ее сократить. Было показано, что системное воспаление играет важную роль в патогенезе БАС (De Marchi et al., 2021) и является одной из причин денервации скелетных мышц, развивающейся в ходе нейродегенеративного процесса (Kano et al., 2012). Так, например, концентрация ряда цитокинов и хемокинов значительно увеличивается в плазме

пациентов с БАС (Pinilla et al., 2021; Tortelli et al., 2020). В то же время результаты, полученные на модельных объектах противоречивы, и варьируют в зависимости от стадии заболевания и субъекта (Daulagala et al., 2019; Jeyachandran et al., 2015; Moreno-Martinez et al., 2019). Особый интерес представляют исследования изменения метаболомного профиля на фоне прогрессирования заболевания и терапевтического вмешательства, позволяющие оценить эффективность проводимой терапии (Kumar, Ghosh, and Singh 2013). Показано, что на уровень метаболитов при БАС значительное влияние оказывает период заболевания, а также индивидуальный генотип пациента (Lanznaster et al., 2020). При этом метаболиты могут быть как маркерами НДЗ, мишенями для воздействия, а также непосредственно, терапевтическими агентами (Goutman et al., 2020; Hor et al., 2021; Jia et al., 2021; Valbuena et al., 2019).

Помимо решения проблем понимания фундаментальных основ патогенеза НДЗ, необходимым является разработка и оценка новых эффективных методов их диагностики и лечения, базирующихся на данных патофизиологических исследований. В частности, установлено, что при развитии НДЗ происходит локальное снижение уровня ростовых и нейротрофических факторов (Henriques, 2010). При этом продемонстрировано, что некоторые трофические факторы способствуют выживанию клеток и проявляют выраженный нейропротекторный эффект на моделях дегенерации нейронов как *in vitro*, так и *in vivo* (Mukai et al., 2018; Гусева и др., 2013). В связи с этим перспективной стратегией сдерживания нейродегенерации может являться доставка в поражённые участки нервной ткани рекомбинантных генов, кодирующих проангиогенные молекулы (FGF, VEGF, ANG), нейротрофические факторы (BDNF, NGF, NT-3, NT-4/5, CNTF, GDNF), молекулы клеточной адгезии (L1-CAM, NCAM1), а также противовоспалительные цитокины (IL-4, IL-10, TGF β). Локальное увеличение концентрации таких терапевтических молекул повышает выживаемость нейронов, уменьшает выраженность воспалительных реакций, препятствует развитию астроглиоза, активирует клетки нейроглии, чем сдерживает развитие негативных патофизиологических и патоморфологических процессов и стимулирует процессы нейрорегенерации (Rossi et al., 2018). Кроме того, показано, что комбинации нескольких нейротрофических факторов может иметь более выраженный синергетический положительный эффект на различные типы нервных клеток (Islamov et al., 2015; Rizvanov et al., 2008).

Для доставки рекомбинантных терапевтических генов применяют разнообразные виды генно-инженерных систем (векторов), обеспечивающих синтез рекомбинантных белковых молекул (Bulcha et al., 2021). Одними из широко используемых типов векторов являются конструкции, созданные на основе репликативно-дефектных аденоовирусов

(www.clinicaltrials.gov). Аденовирусы способны к трансдукции различных клеточных типов нервной ткани, гемопоэтических, мезенхимальных клеток и обеспечивают экспрессию трансгенов без интеграции в геном, оставаясь в эпизомальной форме (Davidson 2000; Parambi et al., 2021). Кроме того, аденовирусные вектора показали свою безопасность и эффективность в большом количестве исследований, особенно в качестве векторных вакцин (Belikova et al., 2020; Zhu et al., 2020). Особый интерес представляет развитие методов генной терапии, обеспечивающих одновременную доставку нескольких трансгенов с помощью различных векторов или ко-экспрессию двух и более трансгенов с помощью одного вектора (Shaimardanova et al., 2019). Например, «саморасщепляющиеся» 2A-пептидные последовательности пикорновирусов используются для экспрессии нескольких полипептидов или субъединиц составного белка (Liu et al., 2017). Гены, расположенные под контролем общего промотора, синтезируются в эквимолярном количестве, а малый размер 2A-пептидных последовательностей позволяет существенно минимизировать затрачиваемую генетическую емкость векторных систем (Arber et al., 2013; Woodley et al., 2019). Возможность доставки в ЦНС одновременно двух и более трансгенов, кодирующих биологически активные молекулы с разными свойствами, позволит одновременно воздействовать на различные патофизиологические процессы при НДЗ.

С целью коррекции НДЗ, вместе с прямой доставкой генных конструкций (генная терапия *in vivo*), активно разрабатываются подходы доставки трансгенов с использованием клеточных носителей (генно-клеточная или клеточно-опосредованная генная терапия) (Staal et al., 2019). Данная методология предполагает трансплантацию клеток, модифицированных *ex vivo* с помощью генетических векторов, несущих рекомбинантные гены (Aiuti et al., 2002). Трансплантация генетически модифицированных клеток, *a priori*, оказывается более эффективной по сравнению с введением немодифицированных клеток или только генетических векторов (Ohashi et al., 2021). Кроме того, доставка генов на клеточных носителях исключает неуправляемую, разноплановую трансдукцию различных клеточных типов реципиента, цитотоксический эффект и иммуногенность генетического вектора, сопутствующие при генной терапии *in vivo*. Для внедрения данной технологии в клинику требуются дальнейшие фундаментальные исследования, в частности, необходимо уточнить целесообразность выбора того или иного типа клеток для генетической модификации, обосновать использование конкретных терапевтических генов (комбинаций генов) и адекватного вектора для их доставки в клетки-мишени. Особое внимание должно быть уделено исследованию безопасности генно-клеточного препарата.

В качестве средств доставки терапевтических генов для стимулирования регенерации изучают возможности стволовых, прогениторных и зрелых дифференцированных клеток (Gowing et al., 2017; Naldini et al., 2011; Petrich et al., 2020). Определенный интерес в этом отношении представляют мононуклеарные клетки крови пуповины (МККП) человека, которые уже более тридцати лет используют для трансплантации пациентам с гематологическими и некоторыми другими соматическими заболеваниями (Gluckman et al., 1997; Wagner et al., 1996; Yang et al., 2010). Целесообразность применения МККП человека обусловлена доступностью материала, малой инвазивностью процедуры забора, минимальным риском для донора, низкой иммуногенностью, содержанием в пуповинной крови различных типов стволовых и прогениторных клеток, способных дифференцироваться в специализированные клетки организма, отсутствием законодательных, этических и религиозных запретов для трансплантации клеток пуповинной крови человека (Ballen et al., 2001; Gluckman et al., 1997; Waller-Wise et al., 2011; Космачева и др., 2008). Клетки пуповинной крови применяют как для аутологичной, так и для аллогенной трансплантации, при этом реализована возможность объединения нескольких пулов клеток (Eapen et al., 2010; Шаманская и др., 2010), а также длительного хранения клеточного материала до трансплантации (Kim et al., 2021). В мире проведено более 40,000 трансплантаций клеток пуповинной крови (Rafii et al., 2021). Доклинические и клинические исследования продемонстрировали положительное влияние клеток пуповинной крови при различных заболеваниях, в том числе для терапии инсульта, травматических поражений головного и спинного мозга, а также НДЗ (Yang et al., 2010). Несмотря на достигнутые результаты актуальной остается проблема эффективности использования клеток пуповинной крови человека (Rizk et al., 2017).

В связи с этим для повышения терапевтического потенциала МККП человека, рассматривается стратегия их генетической модификации, как с целью увеличения адресной миграции в участки нейродегенерации различной этиологии, так и для доставки трансплантируемыми клетками генов, кодирующих специфические ростовые и трофические факторы, оказывающие локальное нейропротекторное действие (Chen et al., 2005; Ikeda et al., 2004; Шевченко и др., 2010). В то же время показана возможность направленной дифференцировки трансплантированных МККП в клетки, проявляющие фенотип микроглии и эндотелиальных клеток, и в зависимости от модификации, в астроциты (Koh et al., 2008; Rizvanov et al., 2011).

Таким образом, для решения имеющихся фундаментальных и прикладных задач необходимо комплексное исследование патофизиологических процессов при БАС с целью

разработки таргетных генных и генно-клеточных систем для сдерживания гибели мотонейронов и стимулирования нейрорегенерации.

Цель работы: Анализ патогенетических механизмов гибели мотонейронов спинного мозга при боковом амиотрофическом склерозе и их коррекция путем доставки рекомбинантных генов, кодирующих проангиогенные, нейропротекторные факторы и молекулу клеточной адгезии с помощью *ex vivo* модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека.

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

1. Создать и охарактеризовать экспрессионные рекомбинантные конструкции, разработанные на основе репликативно-дефектного аденоовириуса пятого серотипа, содержащие гены ростовых факторов (VEGF165 и/или FGF2, GDNF, SDF1 α) и нейрональной молекулы клеточной адгезии (NCAM1).

2. Изучить белковый профиль и ультраструктуру рекомбинантных аденоовириусных частиц, собранных на базе репликативно-дефектного аденоовириуса пятого серотипа.

3. Проанализировать транскриптомный, протеомный и секретомный профиль мононуклеарных клеток крови пуповины человека, модифицированных рекомбинантными аденоовириусами.

4. Проанализировать иммуногенные свойства рекомбинантных белков, экспрессируемых мультицистронным аденоовириусным вектором Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2 *in vivo*.

5. Исследовать ультраструктурные изменения, секретомный профиль и фенотип мононуклеарных клеток крови пуповины человека, модифицированных комбинацией аденоовириусов Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1.

6. Исследовать способность мононуклеарных клеток крови пуповины человека, одновременно трансдуцированных комбинацией аденоовириусов Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1, индуцировать ангиогенез на модели подкожной имплантации модифицированных клеток в составе белкового матрикса у иммунодефицитных мышей.

7. Исследовать патофизиологические и патоморфологические изменения в центральной и периферической нервной системе, метаболомный профиль и нарушения двигательной активности у трансгенных SOD1-G93A мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза на фоне прогрессирования заболевания.

8. Оценить способность модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека мигрировать, выживать, дифференцироваться и экспрессировать

рекомбинантные белки в спинном мозге трансгенных SOD1-G93A мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза.

9. Проанализировать влияние ксенотрансплантации модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека на изменения в профиле цитокинов и метаболитов у трансгенных SOD1-G93A мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза.

10. Выяснить влияние ксенотрансплантации модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека на двигательную активность и выживаемость трансгенных SOD1-G93A мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза.

Научная новизна работы

В работе впервые комплексно описаны патофизиологические изменения, наблюдаемые на уровне ультраструктуры периферического нерва, спинного мозга и метаболомного профиля у трансгенных SOD1-G93A (линия B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J (G1)) мышей с моделью бокового амиотрофического склероза на фоне прогрессии заболевания.

На основе аденоовириуса пятого серотипа созданы и охарактеризованы генетические конструкции, экспрессирующие гены факторов роста (Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF, Ad5-FGF2, и Ad5-SDF1 α) и нейрональную молекулу клеточной адгезии (Ad5-NCAM1). С применением 2A-пептидных последовательностей пикорновириусов впервые создана мультицистронная генетическая конструкция Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2, обеспечивающая одновременную экспрессию VEGF165 и FGF2. Несомненной новизной обладают данные, свидетельствующие о ко-транскрипции, биосинтезе и расщеплении рекомбинантных VEGF165 и FGF2 в клетках генетически модифицированных Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2. Впервые показано отсутствие иммунного ответа на P2A-пептидный антиген у лабораторных животных при внутривенном введении рекомбинантного аденоовириуса Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2.

К новым результатам можно отнести предложенную методологию создания генно-клеточных терапевтических систем на основе изолированных МККП человека, модифицированных аденоовириусами и их комбинациями, экспрессирующими терапевтические белки и молекулу клеточной адгезии.

Приоритетными следует признать результаты, полученные в ходе транскриптомного, протеомного и секретомного профилирования МККП модифицированных Ad5-VEGF165 или Ad5-GFP, свидетельствующие об отсутствии

значимого влияния трансдукции и экспрессии трансгена на «ландшафт» синтезируемых клеткой мРНК и белков.

Принципиально новыми являются данные о том, что генетически модифицированные МКПП человека, трансплантированные трансгенным мышам с фенотипом бокового амиотрофического склероза (БАС), выживают, проникают через ГЭБ, мигрируют в очаги нейродегенерации и дифференцируются в клетки, экспрессирующие маркеры эндотелия и микроглии. При этом трансплантированные модифицированные клетки синтезируют рекомбинантные белки в спинном мозге мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза.

Несомненной новизной обладают результаты, свидетельствующие об изменении метаболомного профиля, более высокой двигательной активности и наибольшей продолжительности жизни у трансгенных B6S JL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J мышей, которым трансплантировали МКПП человека, одновременно модифицированных Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1.

Ключевым моментом научной новизны исследования является тот факт, что в ходе выполнения диссертационного исследования разработана концепция получения и тестирования генно-клеточного препарата на основе модифицированных МКПП человека для сдерживания прогрессии нейродегенеративных заболеваний, в первую очередь БАС. Примененные методы и подходы могут быть использованы для терапии других социально-значимых заболеваний человека, в частности травматических поражений центральной и периферической нервной системы, ишемических инсультов и др.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В ходе прогрессии заболевания у трансгенных мышей линии B6S JL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J с фенотипом бокового амиотрофического склероза, ультраструктурные изменения в центральной и периферической нервной системе коррелируют с изменениями в метаболомном профиле.

2. Модификация мононуклеарных клеток крови пуповины человека рекомбинантными адено-вирусами, экспрессирующими нейротрофические и ростовые факторы в комбинации с нейрональной молекулой клеточной адгезии, является безопасной и не изменяет транскриптомный, протеомный, секретомный и фенотипический профиль клеток.

3. Мононуклеарные клетки крови пуповины человека, синтезирующие рекомбинантные белки сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), глиального нейротрофического фактора (GDNF) и нейрональной молекулы клеточной адгезии 1 (NCAM1), мигрируют в спинной мозг трансгенных B6S JL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J

мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза, секретируют рекомбинантные белки, улучшают функциональные показатели и продлевают жизнь подопытных животных.

Теоретическая и практическая ценность работы

Данное исследование расширяет имеющиеся представление о безопасности генно-клеточных препаратов и эффективности их применения для генной терапии нейродегенеративных заболеваний человека. В рамках проведенного исследования предложен подход для создания генно-клеточных систем, экспрессирующих комбинации терапевтических генов и молекулы клеточной адгезии, что позволяет обеспечить эффективную доставку нескольких терапевтических генов в клетки мишени. Показано, что созданные аденоизильтровые вектора осуществляют эффективный перенос терапевтических генов сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF165, изоформа 165), основного фактора роста фибробластов (FGF2), глиального нейротрофического фактора (GDNF) и нейрональной молекулы клеточной адгезии 1 (NCAM1) и могут быть использованы для разработки протоколов клеточно-опосредованной генной терапии социально значимых заболеваний человека.

Разработаны способы получения и применения генно-клеточного препарата на основе генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека, одновременно экспрессирующих VEGF, GDNF и NCAM1 для терапии БАС. Экспериментальные и методические подходы, используемые в работе, открывают перспективу для разработки и создания биологически безопасных генно-клеточных препаратов для использования в регенеративной медицине.

Связь работы с базовыми научными программами

Исследования по теме работы проведены в период с 2011 по 2021 гг. в соответствии с НИР Казанского государственного медицинского университета и Казанского федерального университета. Работа финансировалась государственным контрактом ФЦП Федерального Агентства по Науке и Инновациям 02.512.11.2052 «Клеточная терапия генетически модифицированными стволовыми клетками пуповинной крови трансгенных мышей G93A, экспрессирующих фенотип бокового амиотрофического склероза»; государственным контрактом ФЦП Федерального Агентства по Науке и Инновациям 02.740.11.0302 «Исследование фундаментальных механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний и разработка современных технологий для их лечения»; грантом РФФИ 12-04-31580 «Особенности модуляции секретома клеток в ответ на экзогенные генетические факторы»; грантом РФФИ 16-04-01567 «Исследование молекулярных и клеточных механизмов индукции ангиогенеза генетически

модифицированными CD34+ клетками человека»; грантом РФФИ 18-44-160029 р_а «Модуляция транскриптома и секретома мононуклеарных клеток крови пуповины человека рекомбинантными адено вирусами»; субсидией выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности 0671-2020-0058.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены на следующих всероссийских и международных симпозиумах, конгрессах и конференциях: III международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2013); I научно-практическая конференция студентов и молодых ученых Института фундаментальной медицины и биологии «Современные проблемы фундаментальной медицины и биологии» (Казань, 2013); VI ежегодный международный симпозиум «Актуальные вопросы генных и клеточных технологий» (Москва, 2013); международная научно-практическая конференция «Современные проблемы науки и образования» (Сочи, 2013); международная конференция «Scientific research and their practical application. Modern state and ways of development» (Киев, 2013); международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы науки и образования» (Москва, 2014); IV международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и практической медицине» (Казань, 2014); XIX международная Пущинская школа – конференция молодых ученых (Пущино, 2015); 26th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) (Lausanne, Switzerland, 2018); VI Всероссийском медицинском форуме студентов и молодых учёных с международным участием «Белые цветы» (Казань, 2019); IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019); 53, 54, 55 Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation (2019, 2020, 2021); ASH Annual Meeting (2017, 2018, 2020).

Публикация результатов исследования

По материалам диссертации опубликовано 26 печатных работ, в том числе 16 статей в научных журналах, индексируемых в базе данных Scopus и Web of Science, 4 патента на изобретение и 10 тезисов докладов на международных и всероссийских конференциях и конгрессах.

Место выполнения работы

Экспериментальные данные получены автором в период с 2012 по 2021 годы во время работы на кафедре медицинской биологии и генетики Казанского государственного медицинского университета (д.м.н., профессор Исламов Р.Р.) и НИЛ OpenLab «Генные и

клеточные технологии» Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета (д.б.н., профессор Ризванов А.А.)

Структура и объем диссертационной работы

Материалы диссертационной работы изложены на 344 страницах машинописного текста. В работе приведено 7 таблиц и 85 рисунков, которые включают микрофотографии световой, конфокальной и электронной микроскопии. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, включающего 585 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Создание рекомбинантных генетических конструкций. В работе методом гомологичной рекомбинации на основе плазмида pAd/CMV/V5-Dest (Fermentas) конструировали рекомбинантные плазмидные аденоовирусные вектора, экспрессирующие гены зеленого флуоресцентного белка (GFP), глиального нейротрофического фактора (GDNF), фактора стромальных клеток 1 альфа (SDF1 α), нейрональной молекулы клеточной адгезии 1 (NCAM1), сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF165) и/или основного фактора роста фибробластов (FGF2). Правильность сборки рекомбинантных плазмидных конструкций подтверждали рестрикционным анализом и секвенированием по Сэнгеру.

Аденовирусы. Рекомбинантные частицы аденоовирусов человека пятого серотипа (Ad5) получали с помощью трансфекции клеток линии HEK293A плазмидной ДНК предварительно гидролизованной эндонуклеазой по сайту PacI. Наработку препаративного количества Ad5 проводили повторным инфицированием HEK293A вирусным стоком с последующей очисткой и концентрированием их в градиенте плотности хлорида цезия. Титр сконцентрированных и диализованных Ad5 определяли по оптической плотности (A260) и в teste на бляшкообразование.

Выделение клеток мононуклеарной фракции пуповинной крови человека. Выделение клеток производили из свежих образцов пуповинной крови при помощи седиментации в градиенте плотности фиколла. Клетки отмывали фосфатно-солевым буфером, эритроциты лизировали в гипотоническом растворе. Оставшиеся мононуклеарные клетки использовали для модификации. Клетки мононуклеарной фракции пуповинной крови человека после выделения поддерживали на среде RPMI-1640

(Sigma) с добавлением 10% FBS (Sigma) и смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (100 ЕД/мл; 100 мкг/мл) (Sigma).

Трансдукция мононуклеарных клеток крови пуповины человека.

Генетическую модификацию мононуклеарных клеток крови пуповины (МККП) человека рекомбинантными аденоовирусами и их комбинациями осуществляли непосредственно после выделения клеток. МККП человека инфицировали рекомбинантными диализированными аденоовирусами с множественностью инфекции (Multiplicity of infection, MOI) 10.

Микроскопическое исследование. Микроскопию клеток проводили с помощью инвертированного микроскопа Ziess Z1 AxioObserver, (CarlZeiss, Германия). Эффективность трансфекции оценивали через 72 часа, по количеству GFP позитивных клеток в ходе флуоресцентной микроскопии.

Выделение нуклеиновых кислот. Выделение РНК из клеточных культур и фрагментов тканей осуществляли с использованием реагента TRIzol согласно протоколу фирмы производителя (Thermo Fisher Scientific).

Количественная оценка экспрессии мРНК генов с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Количественный анализ экспрессии целевых мРНК генов (*vegf*, *gdnf*, *egfp*, *ncam1*, *fgf2*, *sdf1a*, *CD31*, *VE-Cad*, *Vwf*) проводили с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) на оборудовании CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad, США). Для каждого гена-мишени результаты были получены в ходе трех независимых экспериментов в трех проворностях. Количество РНК было нормализовано по количеству кДНК гена «домашнего хозяйства». Уровень экспрессии генов в немодифицированных клетках принимали за единицу.

Иммуноцитохимический анализ. Трансфицированные культуры клеток фиксировали охлажденным метанолом. Клетки отмывали трис-буферным раствором TBS. Проницаемость клеточных мембран нарушали, добавляя 0,1% раствор TritonX-100, неспецифическое связывание антител (АТ) блокировали 5% бычьим альбумином (Sigma). Инкубацию с первичными антителами проводили в течение часа. Вторичные АТ конъюгированные с флуоресцентной меткой добавляли в разведении 1:1000. Ядра клеток окрашивали флуоресцентным красителем DAPI (Invitrogen, США). Клетки промывали и заключали в среду Mowiol (Sigma). Анализ окрашенных препаратов проводили на инвертированном флуоресцентном микроскопе AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Иммуноблоттинг. Методом вестерн-блоттинга определяли содержание и расщепление белков в лизатах клеток, модифицированных рекомбинантными конструкциями. Экстракцию белков проводили в лизирующем RIPA-буфере.

Денатурированный белковый экстракт (30 мкг) разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Сепарированные белки переносили на PVDF-мембрану (BioRad, USA). После инкубации мембранны с первичными и вторичными антителами белки-мишени выявляли непрямым иммунопероксидазным методом. Визуализацию иммунопротипиков выполняли с помощью системы Gel Doc XRS+. Для каждого белка-мишени результаты были получены в ходе не менее двух независимых экспериментов.

Иммуноферментный анализ. Концентрацию рекомбинантных белков VEGF, NCAM1, GDNF и FGF2 в клеточных лизатах и супернатантах трансдуцированных и нативных клеток определяли с помощью наборов Human FGF2 (DuoSet, DY233), Human NCAM1/CD56 (DuoSet, DY2408), Human VEGF (DuoSet, DY293B) и Human GDNF (DuoSet, DY212) согласно протоколам рекомендованных фирмой-производителем.

Мультиплексный анализ. Анализ цитокинов, хемокинов, факторов роста проводили с использованием коммерчески доступных флуорофор конъюгированных микросфер по технологии xMap (Luminex). Панели мультианалитов Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Screening, 48-Plex (BioRad) и MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Panel I, 41-plex (Millipore) были использованы для анализа анализаторов, содержащихся в супернатантах генетически модифицированных клеток. Панель Bio-PlexPro™ Mouse Chemokine Panel 33-Plex была использована для анализа хемокинов в сыворотке крови SOD1-G93A мышей. Измерения были выполнены на мультиплексном анализаторе Luminex®200™ detectionsystem (Millipore). Концентрации анализаторов были рассчитаны с использованием стандартных кривых, с применением программного обеспечения Luminex IS 2.3 (Millipore). Все исследования проводили минимум в двух проворностях.

Двумерный гель-электрофорез. Изолированные белковые лизаты окрашивали флуоресцентными красителями. Изоэлектрическое фокусирование белков проводили с использованием IPG-стріпів (ReadyStrip™ IPG Strips, Bio-Rad) длиной 17 см с градиентом pH 3-10, с использованием PROTEAN i12 IEF (Bio-Rad) по стандартному протоколу изменения напряжения. Полоски геля переносили на поверхность градиентного полиакриламидного геля (9-16%) (20x20 см). Второе направление электрофореза проводили в трис-глициновом буфере при охлаждении. После проведения электрофоретического разделения флуоресцентно-окрашенные белки визуализировали с помощью Typhoon FLA-9500 Imager (GE Healthcare) (Romanova et al., 2020).

Трансмиссионная электронная микроскопия. Микроскопия рекомбинантных адено-вирусов. Очищенные частицы репликативно-дефектных Ad5 контрастировали 1% фосфорновольфрамовой кислотой. После блокирования и сушки частицы исследовали на микроскопе Hitachi HT7700 Exalens (Hitachi, Япония). Микроскопия генетически

модифицированных клеток и тканей. Образцы генетически модифицированных МККП человека, седалищного нерва и спинного мозга трансгенных SOD1-G93A мышей последовательно фиксировали в 2,5%-ном растворе глутаральдегида, приготовленном на 100 мМ фосфатном буфере (рН 7,3) и в 1%-ном тетраоксиде осмия (OsO₄). Дегидратацию проводили в спиртах возрастающей концентрации. Материал пропитывали в смеси эпоксидной смолы и окиси пропилена. Образцы заливали в эпоксидную среду. Ультратонкие срезы (1 мкм) изготавливали с помощью стеклянного ножа на ультрамикротоме (Leica EM, Германия) и монтировали на медные сетки. Образцы контрастировали в 2%-ном растворе уранилацетата и визуализировали с помощью микроскопа Hitachi HT7700 Exalens (Hitachi, Япония).

Протеомное профилирование рекомбинантных аденоовирусов. Белковое профилирование рекомбинантных аденоовирусов проводили с использованием квадруполь -времяпролетного масс-спектрометра Maxis Impact (Bruker), сопряженного сnanoхроматографической системой UltiMate 3000 Nano LC (Thermo Scientific). Данные интерпретировали с помощью поисковой машины Mascot (Matrix Science Inc.). Для идентификации tandemных масс-спектров использовали базы данных SwissProt (www.uniprot.org).

Транскриптомное профилирование генетически модифицированных клеток. С использованием платформы Illumina и методов массового параллельного секвенирования проведено исследование транскриптома нативных и генетически модифицированных МККП человека (Kukurba, 2015). Целевые мРНК были обогащены из выделенной и охарактеризованной totalной РНК с использованием набора NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB, #E7490 S). Библиотеки кДНК из образцов мРНК были приготовлены с помощью набора NEBNext Ultra II Directional RNA library prep with sample purification beads (NEB, #E7765 S). Последовательности полученных ДНК-библиотек были определены в системе секвенирования NextSeq 500 от Illumina с использованием набора NextSeq 500/550 High Output v2.5 Kit (150 cycles). После оценки качества считывания, полученные риды были выровнены на проаннотированный транскриптом GRCh38 человека с использованием программы Kallisto (Bray et al., 2016). Дифференциально экспрессированные транскрипты и гены были аннотированы с помощью пакета R «sleuth» (www.r-project.org, www.rdocumentation.org/packages/sleuth).

Таргетное метаболомное профилирование. Метаболиты в сыворотке крови подопытных животных исследовали по протоколу, описанному ранее (Li et al., 2017; Naviaux et al., 2019). Метаболиты экстрагировали смесью холодного метанола:ацетонитрила. Пробирки центрифугировали, отбирали органический экстракт.

Анализ экстрактов проводили с использованием ВЭЖХ системы Agilent 1260, совмещенной с tandemным тройным квадрупольным масс-спектрометром с линейной ионной ловушкой QTRAP 6500 plus (Sciex) в режиме мониторинга множественных реакций.

Животные и экспериментальные модели. Все манипуляции с подопытными животными проводили в соответствии с правилами, рекомендованными Физиологической секцией Российского национального комитета по биологической этике, и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 "Об утверждении правил лабораторной практики". Животные содержались в отдельных клетках, согласно общепринятым лабораторным правилам, со стандартным суточным режимом, без ограничения доступа к воде и пище.

Исследование иммуногенности 2A-пептидных препаратов. Исследования активации иммунного ответа на 2A-пептид вируса ящура, а также аденоовирусные белки проводили на белых шестимесячных лабораторных мышах. Предварительно, у подопытных животных осуществляли забор венозной крови с последующим получением сыворотки, которая служила отрицательным контролем. Первой группе животных внутримышечно вводили по 3×10^9 вирусных частиц Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2. Второй группе животных вводили конъюгат 2A-пептида, конъюгированный по сульфидрильной группе N-концевого цистеина гемоцианином фиссуреллы. Согласно 100% гомологии C-концевого участка 2A-пептидов был синтезирован 9-членный аминокислотный пептид CG-9 (CGDVEENPG). С помощью конъюгации по сульфидрильной группе с белком гемоцианина лимфы улитки (Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)) был получен комплекс, который позволил проводить иммунизацию животных с целью наработки специфичных анти-2A-пептидных антител. Конъюгат пептида в концентрации один мг/мл вводили внутрибрюшинное с полным адьювантом Фрейнда в общем объеме 200 мкл/животное. Конечная концентрация 2A-антитела составила 25 мкг/животное. Забор крови проводили через 28 дней после первого введения. Через 14 дней после повторного введения проводили финальный забор крови. Методом иммуноферментного анализа (ИФА) была оценена иммуногенность 2A-пептидных препаратов в составе аденоовирусной конструкций, а также эффективность экспрессии белков аденоовируса и VEGF *in vivo*. Планшеты покрывали 10 мкг антигена. В качестве которых выступал конъюгат 2A-пептида, или лизат клеток HEK293A, модифицированных Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2. Блокировали неспецифическое связывание. Лунки планшета покрывали 100 мкл сыворотки. Проводили инкубацию с первичными антителами. В качестве положительного контроля использовали антитела кролика, а также синтезированные АТ к пептиду CGDVEENPG, конъюгированные с KLH (Genscript). Далее инкубировали со вторичными

АТ против тяжелой и легкой цепи иммуноглобулинов кролика и/или мыши. Детекцию иммунопреципитата проводили с использованием 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина.

Ксенотрансплантация генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека трансгенным мышам с фенотипом бокового амиотрофического склероза. Эксперименты по трансплантации генетически модифицированных МККП выполнены на половозрелых трансгенных мышах, линии B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J (SOD1-G93A). 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 человека.

Животным (самки и самцы) в возрасте от 22 до 28 недель (начальный этап развития заболевания) ретроорбитально, трансплантировали генетически модифицированные МККП человека – 2×10^6 клеток в 100 мкл физиологического раствора. В зависимости от комбинации использованных генов, животные были разделены на группы (Таблица 1).

Таблица 1. Экспериментальные группы животных с трансплантацией генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека

№	Группа животных	Вводимый препарат
1	Контроль	Физиологический раствор (0,9% NaCl)
2	МККП	Нативные (немодифицированные) мононуклеарные клетки крови пуповины человека (МККП)
3	МККП-Ad5-GFP	МККП, трансдуцированные аденоовирусом Ad5-EGFP
4	МККП-Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2	МККП, трансдуцированные аденоовирусом Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2
5	МККП-Ad5-VEGF165-NCAM1	МККП, одновременно трансдуцированные аденоовirusами Ad5-VEGF165 и Ad5-NCAM1
6	МККП-Ad5-GDNF-NCAM1	МККП, одновременно трансдуцированные аденоовirusами Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1
7	МККП-Ad5-VEGF165-GDNF	МККП, одновременно трансдуцированные аденоовirusами Ad5-VEGF165 и Ad5-GDNF
8	МККП-Ad5-VEGF165-GDNF-NCAM1	МККП, одновременно трансдуцированные аденоовirusами Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1

Иммунофлуоресцентное исследование. Животных эвтаназировали внутрибрюшинным введением 16%-ного раствора пентобарбитала натрия. Спинной мозг (СПМ) извлекали из позвоночного столба, фиксировали в растворе параформальдегида. Иммуногистохимический анализ тканей животных проводили согласно описанной ранее

методике (Rizvanov et al., 2008). В целях криопротекции фиксированную ткань насыщали 30% раствором сахарозы в 0,1 М какодилатном буфере. Для приготовления криостатных срезов сегменты СПМ помещали в заливочную среду TBS (Triangle Biomedical Science, Durham) и замораживали в 2-метил-бутане. Серийные продольные срезы толщиной 20 мкм помещали на предметные стекла. Для обнаружения трансплантированных донорских клеток в тканях реципиента, выяснения экспрессии ими рекомбинантных факторов и для определения их фенотипа серийные продольные срезы СПМ подвергали двойному иммунофлуоресцентному окрашиванию с первичными АТ: к ядерному антигену человека – HNA (1:20; Chemicon), к специальному 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 шванновских клеток – S-100 (1:2000; DakoCytomation), к маркеру нейроныальных клеток – TUJ1 (нейроныальный β-III-тубулин) (1:2000; Covance), к сосудистому эндотелиальному фактору роста – VEGF (1:150; Santa Cruze), к глиальному нейротрофическому фактору – GDNF (1:150; Santa Cruze), к основному фактору роста фибробластов – FGF2 (1:100; Santa Cruz), к нейроныальной молекуле клеточной адгезии 1 – NCAM1 (1:100; Сорбент), к каспазе-3 (1:1000; Sigma-Aldrich), к аквапорину 4 – Aqp4 (1:200; Santa Cruz) и к октамер-связывающему белку 6 – Oct6 (1:200; Invitrogen). После окрашивания антителами стекла отмывали и инкубировали с видоспецифическими вторичными антителами. Для визуализации клеточных ядер срезы дополнительно окрашивали DAPI (4,6-диамино-2-фенилиндол) (Sigma). Окрашенные срезы заключали в среду, поддерживающую флуоресценцию, и визуализировали при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 780 Meta (Carl Zeiss). Для оценки количества мигрировавших МККП человека в СПМ G93A-SOD1 мышей подсчитывали HNA-позитивные клетки в 100 поперечных срезах поясничного отдела СПМ.

Поведенческие тесты. К моменту исследования и трансплантации генетически модифицированных МККП человека подопытные G93A-SOD1 мыши не имели клинических проявлений заболевания (отсутствие признаков двигательных нарушений). Каждая мышь тестировалась дважды в неделю с момента трансплантации клеток до окончания эксперимента. Перед проведением исследования, в течение двух недель, животных обучали прохождению тестов. Тест силы хватки. Подопытным животным, удерживая за хвост, позволяли вцепиться всеми лапками в горизонтально расположенную металлическую решетку. После этого решетка медленно переворачивается, таким образом, что мыши оказываются перевернутыми вниз головой. Фиксируется период времени до тех пор, пока животное не отцепится от решетки, тест состоит из трех попыток, где выбирается

наибольший результат. Тест «открытое поле» проводили в установке «Открытое поле» (Stanford, 2007). В центр арены помещается подопытное животное и в течение трех минут подсчитывается число пересеченных линий – горизонтальная активность, количество стоек животного на задних лапах (вертикальная активность), количество заглядываний в отверстия – исследовательская (поисковая) активность.

Программное обеспечение и статистическая обработка результатов. Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с использованием онлайн приложения NCBI Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) и пакета программ DNASTAR Lasergene. Создание праймеров проводили с использованием пакета программ PrimerSelect (DNA Star, США). Для графического представления рестрикционных карт плазмид использовали программу SnapGene® software (www.snapgene.com).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.1 (GraphPad Software). Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с тестами Тьюки использовался для сравнения результатов между контролем и образцами, t-критерий Стьюдента использовался для расчета статистической разницы между двумя сравниваемыми группами. Результаты представлены в виде средней±стандартная ошибка (\pm С.О). Во всех статистических данных уровень достоверности был принят меньше 0,05 ($p<0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Создание рекомбинантных конструкций на основе аденоовириуса человека пятого серотипа, несущих гены проангиогенных и нейротрофических факторов и нейрональной молекулы клеточной адгезии

С целью дальнейшего развития понимания аспектов переноса функциональных генов и их комбинаций в клетки мишени с использованием вирусных систем доставки рекомбинантных генов на первом этапе исследования в ходе последовательных этапов ПЦР-амплификации, клонирования, сайт специфической рекомбинации и последующей продукции вирусных частиц были получены и наработаны репликативно-дефектные аденоовириусы: Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF, Ad5-NCAM1, Ad5-FGF2, Ad5-SDF1 α , Ad5-GFP и Ad5-VEGF165-FuP2a-FGF2.

Экспрессия рекомбинантных генов генетически модифицированными мононуклеарными клетками крови пуповины человека

Эффективность генетической модификации МККП человека Ad5-GFP оценивали по экспрессии клетками репотерного белка – GFP. Показано, что модифицированные клетки синтезируют мРНК GFP (Рисунок 1 А) и его белковый продукт. В частности, в ходе

микроскопического анализа были выявлены GFP позитивные МККП (Рисунок 1 В). Стоит также подчеркнуть, что *ex vivo* экспрессия GFP МККП человека визуализировалась в течение 30 дней после проведенной генетической модификации. Методами проточной цитометрии показано, что процент GFP позитивных МККП человека при заражении Ad5-GFP с MOI10 достигает $28 \pm 2,3\%$ (Рисунок 1 С).

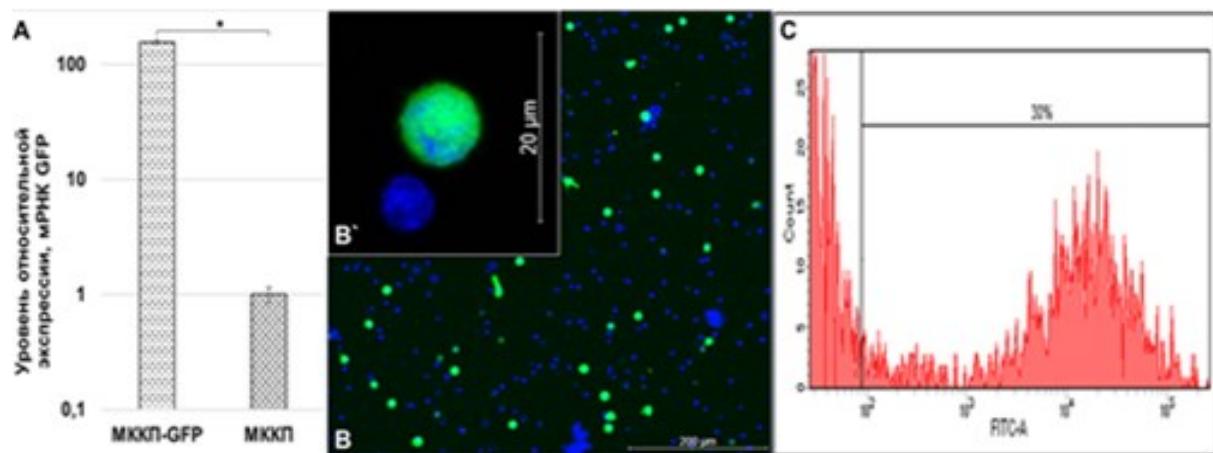


Рисунок 1. Экспрессия рекомбинантного зеленого флуоресцентного белка (GFP) генетически модифицированными мононуклеарными клетками крови пуповины человека модифицированных аденоовирусом – Ad5-GFP, 72 ч после трансдукции. А. Относительный уровень содержания мРНК GFP в МККП человека, трансдуцированных Ad5-GFP. В. Флуоресцентная микроскопия модифицированных МККП человека. Масштаб шкалы 200 мкм. В'. Представлено увеличенное изображение МККП человека, экспрессирующей GFP. Масштаб шкалы 20 мкм. GFP позитивные клетки (зеленые), ядра клеток окрашены Hoechst 33342 (синие). С. Проточная цитометрия МККП человека, трансдуцированных Ad5-GFP. Гистограмма распределения интенсивности флуоресценции GFP в выделенной популяции клеток.

Валидация экспрессии мРНК и белков VEGF165, FGF2, GDNF, SDF1 α , NCAM1, в культуре модифицированных (трансдуцированных) Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF, Ad5-NCAM1, Ad5-FGF2, и Ad5-SDF1 α МККП человека была осуществлена с использованием ПЦР-РВ и вестерн-блоттинга. Показано достоверное увеличение уровня экспрессии мРНК, исследуемых генов, и соответствующих рекомбинантных белков в модифицированных клетках, по сравнению с контролем.

Транскриптомное профилирование мононуклеарных клеток крови пуповины человека, модифицированных Ad5-VEGF165

В исследовании был охарактеризован суммарный транскриптомный профиль мРНК (RNAseq) модифицированных МККП человека. Всего было создано и проаннотировано 18 библиотек кДНК, полученных от шести индивидуальных образцов (доноров) разделенных на три группы: 1) немодифицированные клетки (нативные); 2) клетки, модифицированные Ad5-GFP и 3) клетки, модифицированные Ad5-VEGF165. Биоинформационные методы анализа

выявили наличие $2,4\text{--}2,8 \times 10^6$ парных прочтений. Последующий анализ главных компонент, продемонстрировал, что образцы, представляющие группы сравнения (модифицированные и немодифицированные клетки) не различаются между собой. При этом показано, что исследуемые образцы группируются согласно источнику их получения (выделения). Данный аспект свидетельствует о том, что вклад индивидуальной вариабельности образцов важнее, нежели генетическая модификация и экспрессия ими трансгена. В то же время не было выявлено значительных отличий в суммарном профиле экспрессируемых генов между группами МККП человека, модифицированных Ad5-GFP или Ad5-VEGF165 (Рисунок 2).

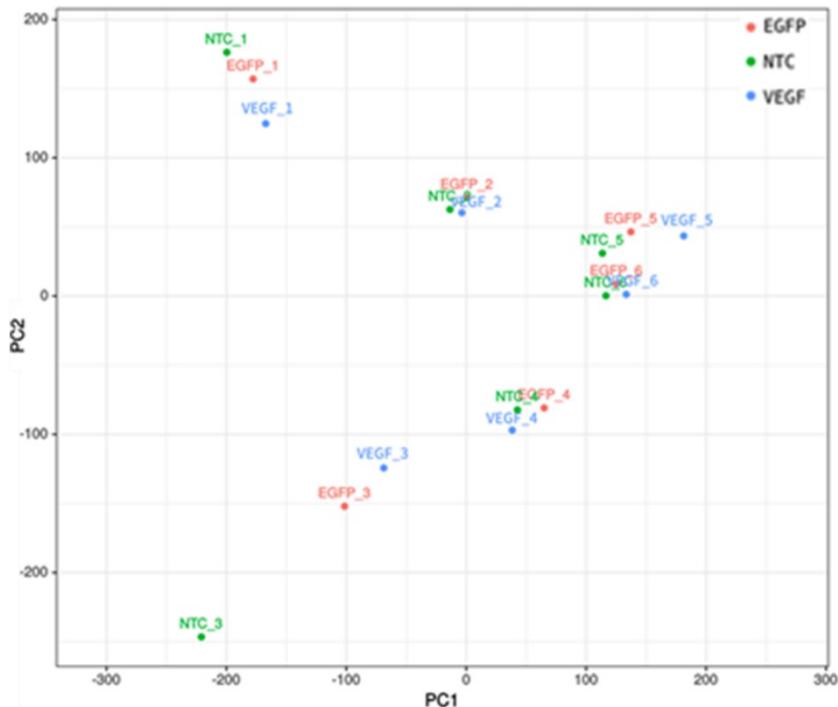


Рисунок 2. Анализ главных компонент (PCA). NTC – немодифицированные мононуклеарные клетки крови пуповины (МККП) человека (зеленый), EGFP – МККП, модифицированные Ad5-GFP (красный), VEGF – мононуклеарные клетки крови пуповины человека, модифицированные Ad5-VEGF165 (синий). 1-6 индивидуальные доноры.

Дополнительные исследования позволили установить, что МККП человека экспрессируют мРНК различных цитокинов, хемокинов, факторов роста и металопротеиназ. Установлена значительная неоднородность между пулами-образцов, что свидетельствует в пользу индивидуальной вариабельности между донорами и, следовательно, внутри популяции в целом (Рисунок 3). В ходе биоинформационического анализа было обнаружено присутствие большого количества мРНК генов гемоглобина, что может свидетельствовать о присутствии в образцах юных ядерных эритроцитов (ретикулоцитов), не элиминируемых в процессе выделения мононуклеарных клеток из пуповинной крови. Генетическая модификация не приводит к глобальному изменению в профиле транскриптов (мРНК) модифицированных клеток. Однако, оценка экспрессии GFP ожидаемо демонстрирует появление его транскриптов после

модификации МККП человека аденоовирусом – Ad5-GFP. Полученные результаты коррелировали с данными флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. При оценке экспрессии VEGF в МККП, трансдуцированных Ad5-VEGF165, было установлено повышение его экспрессии по сравнению с нетрансдуцированными МККП, а также с клетками трансдуцированными Ad5-GFP.

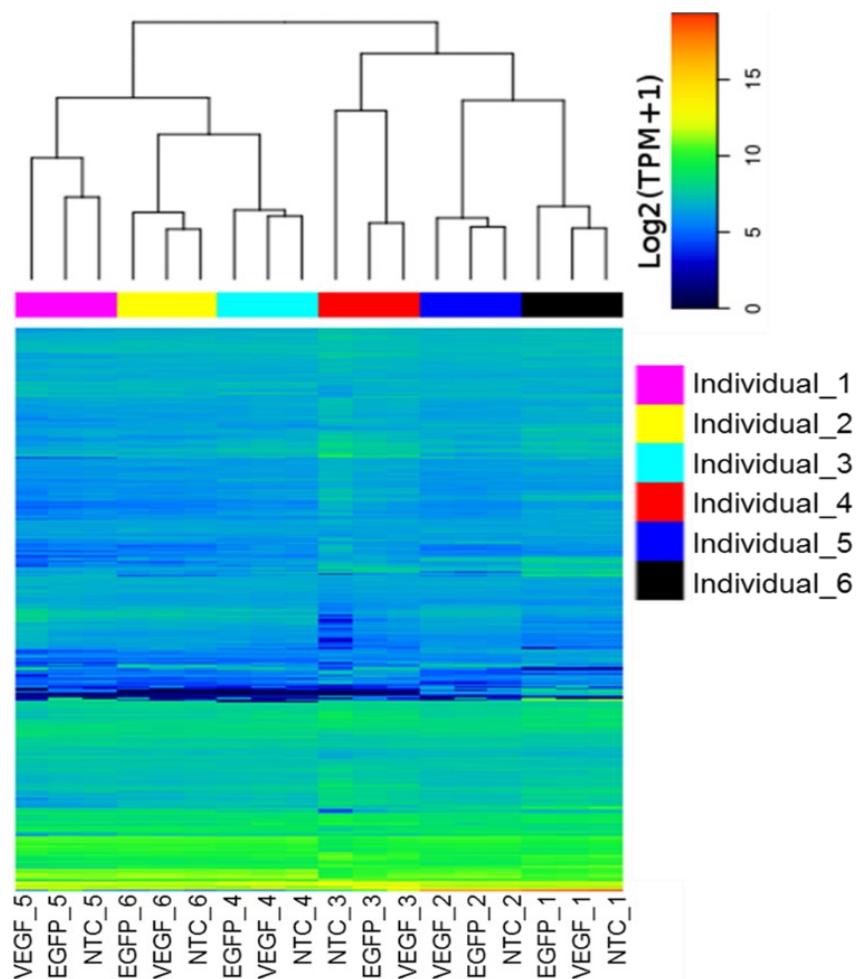


Рисунок 3. Тепловая карта транскриптомного анализа генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины (МККП) человека. Представлены данные по первым 1760 генам, экспрессия которых была не менее 100 транскриптов на миллион (TPM). VEGF – МККП человека, модифицированные аденоовирусом Ad5-VEGF165, EGFP – МККП, модифицированные Ad5-GFP, NTC – немодифицированные МККП человека, 1-6 (Individual) – отдельные доноры.

Секретомное и протеомное профилирование мононуклеарных клеток крови пуповины человека, модифицированных Ad5-VEGF165

Для исследования влияния генетической модификации на секрецию клетками цитокинов, хемокинов и факторов роста использовали платформу Luminex xMAP (Merck Millipore) и панель мультианалитов 48-plex BioRad (США). Было показано, что немодифицированные МККП человека секретируют широкий диапазон цитокинов,

хемокинов и факторов роста. Генетическая модификация МККП человека рекомбинантным аденоизирующим вирусом Ad5-GFP не влияет на профиль секреции секретируемых модифицированными клетками анализаторов. Аналогичные результаты были получены при оценке секреторного профиля МККП человека, трансдудированных рекомбинантными аденоизирующими вирусами Ad5-VEGF165. В то же время, по сравнению с нативными МККП и клетками модифицированными Ad5-GFP, МККП человека, трансдудированные Ad5-VEGF165 значительно увеличивают секрецию рекомбинантного VEGF. Полученные результаты коррелируют с данными транскриптомного профилирования. Кроме того, они также свидетельствуют в пользу того факта, что аденоизирующий вектор и экспрессия трансгена не влияют на общий секретомный профиль клеток. При этом образцы МККП человека, полученные от отдельных индивидуумов, имели различные профили секреции исследованных цитокинов, хемокинов и факторов роста (Рисунок 4). Профилирование протеома генетически модифицированных МККП человека, с использованием двумерного разностного гель-электрофореза (2D-DIGE), не выявило значительных изменений в профиле синтезируемых клетками белков. Таким образом, генетическая модификация МККП человека не влияет на профиль визуализированных белков.

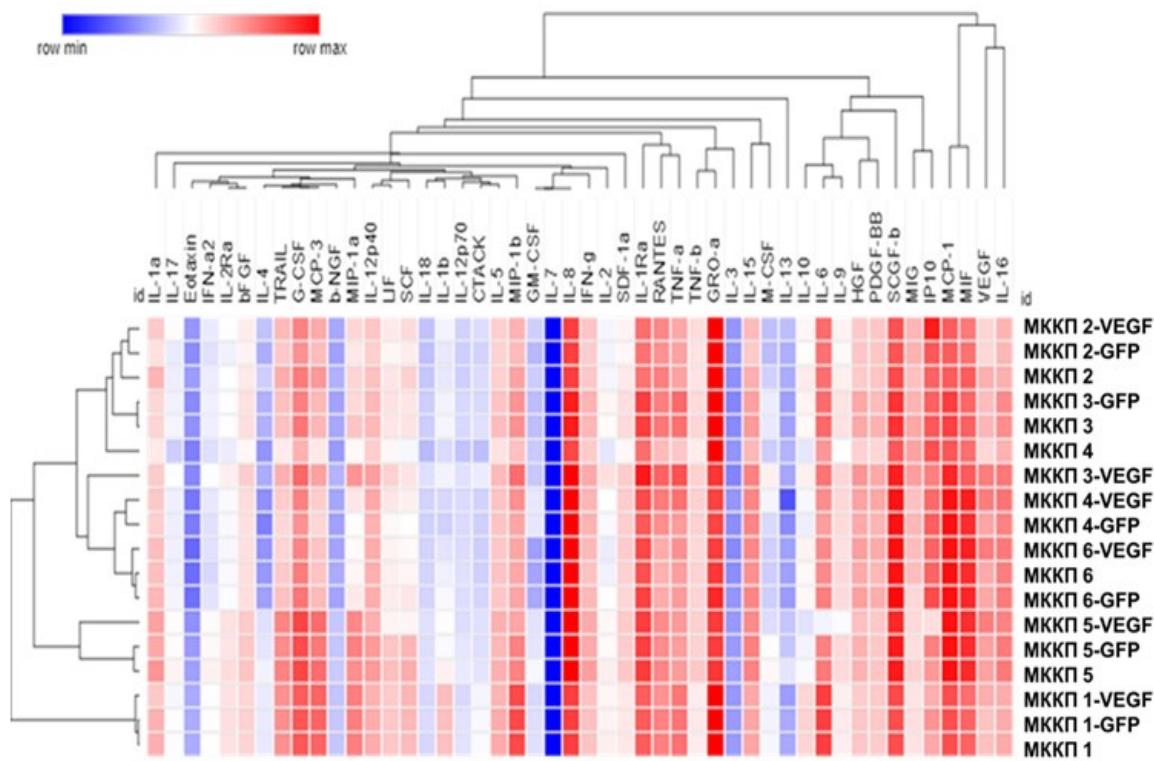


Рисунок 4. Тепловая карта представленности цитокинов, хемокинов и факторов роста в супернатантах собранных с генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины (МККП) человека. МККП-VEGF – МККП человека, модифицированные Ad5-VEGF165, МККП-EGFP – МККП, модифицированные Ad5-GFP, МККП – немодифицированные МККП человека, 1-6 – отдельные (индивидуумы) доноры.

Экспрессия трансгенов мононуклеарными клетками крови пуповинной человека, одновременно модифицированных тремя аденоовирусами

Валидация ко-экспрессии мРНК генов VEGF165, GDNF и NCAM1 в культуре модифицированных (трансдуцированных) МККП человека была осуществлена с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Показано достоверное увеличение синтеза модифицированными клетками целевых мРНК рекомбинантных генов. В частности, увеличение экспрессии мРНК для VEGF составило $141,2 \pm 1,34$ раз, для GDNF в $116,81 \pm 0,65$ раз и в $118,2 \pm 0,5$ раз для NCAM1 по сравнению с контролем, в качестве которого были использованы аналогичные, но нетрансдуцированные МККП человека (Рисунок 5).

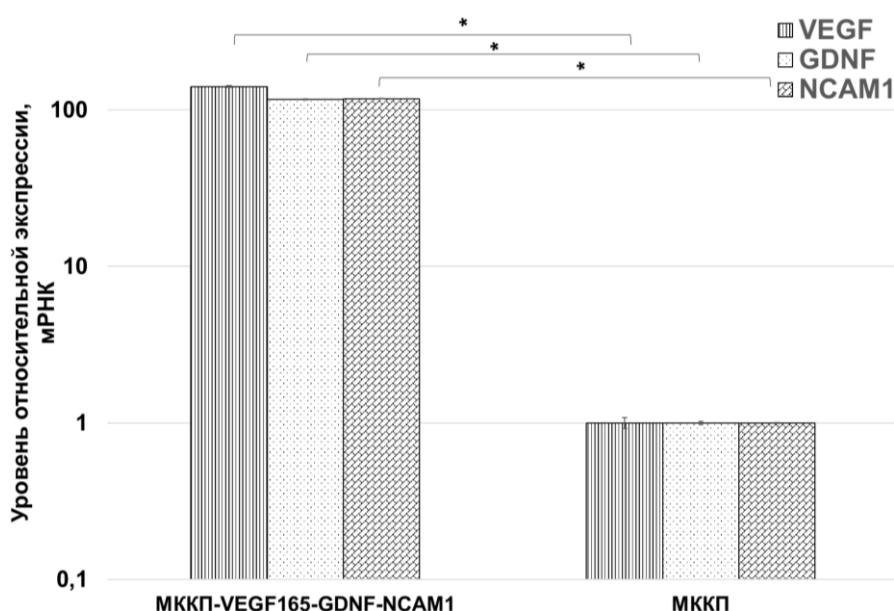


Рисунок 5. Количественный анализ уровня мРНК рекомбинантных генов в мононуклеарных клетках крови пуповины человека, одновременно трансдуцированных комбинацией аденоовирусов Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и NCAM1. МККП – контроль, уровень экспрессии мРНК исследуемых генов в нетрансдуцированных клетках, принят за единицу. Количество мРНК нормализовано по гену β -актина. Данные получены из трех независимых экспериментов и представлены как среднее значение \pm С.О. Значение (*) $p < 0,05$.

Верификация одновременного синтеза рекомбинантных белков VEGF, GDNF и NCAM1 генетически модифицированными (трансдуцированными) МККП человека проведен с использованием иммуноферментного анализа. В ходе исследования супернатантов, собранных после культивирования генетически модифицированных клеток, было установлено 60-кратное увеличение секреции модифицированными клетками VEGF, а также 20-кратное увеличение секреции GDNF. Увеличение экспрессии

NCAM1 было детектировано в клеточных лизатах модифицированных МККП человека. Наблюдалось 10-кратное увеличение его синтеза МККП человека, одновременно трансдуцированных комбинацией трех аденоовирусов Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1 (Рисунок 6).

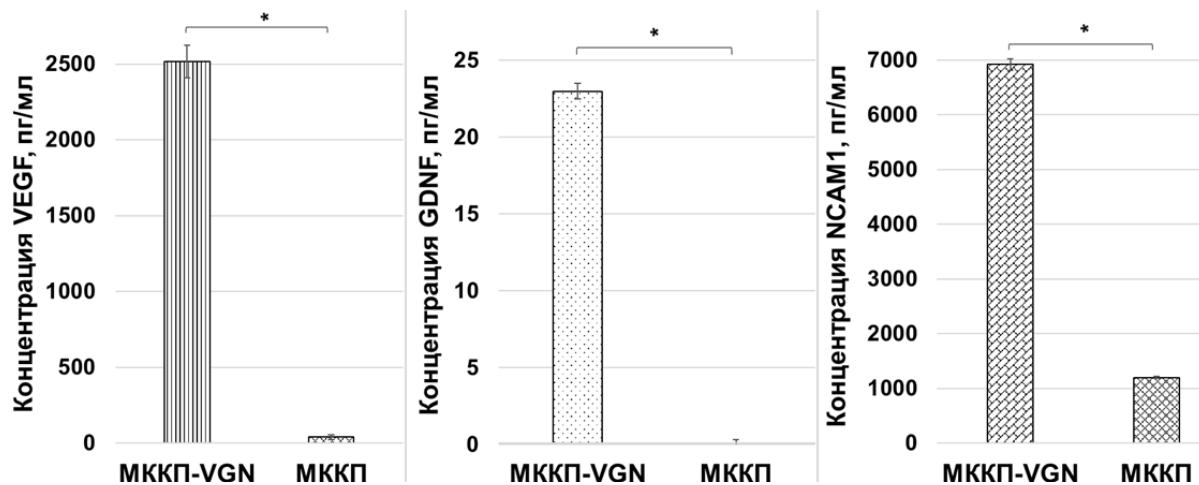


Рисунок 6. Концентрация рекомбинантных белков, синтезируемых мононуклеарными клетками крови пуповины человека одновременно трансдуцированных комбинацией аденоовирусов Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad-NCAM1. VEGF – концентрация секретируемого сосудистого эндотелиального фактора роста человека, GDNF – концентрация секретируемого глиального нейротрофического фактора роста, NCAM1 – концентрация нейрональной молекулы клеточной адгезии 1, в клеточных лизатах. МККП – контроль, нетрансдуцированные клетки. Данные получены из трех независимых экспериментов в двух проворностях и представлены как среднее значение \pm С.О. Значение (*) $p < 0,05$

Цитокиновое профилирование МККП человека, модифицированных тремя аденоовирусами

В ходе анализа было установлено, что немодифицированные МККП человека синтезируют и секретируют широкий диапазон цитокинов, хемокинов и факторов роста. Генетическая модификация МККП человека рекомбинантным аденоовирусом Ad5-GFP и экспрессия клетками GFP не влияет на профиль исследованных анализаторов. МККП человека, одновременно трансдуцированные рекомбинантными аденоовирусами Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1, также сохраняют качественный и количественный профиль исследуемых факторов (Рисунок 7). Однако, по сравнению с нативными и клетками модифицированными Ad5-GFP, наблюдается увеличение экспрессии рекомбинантного VEGF (Рисунок 7). Представленные результаты коррелируют с данными ПЦР-РВ (Рисунок 5) и ИФА (Рисунок 6).

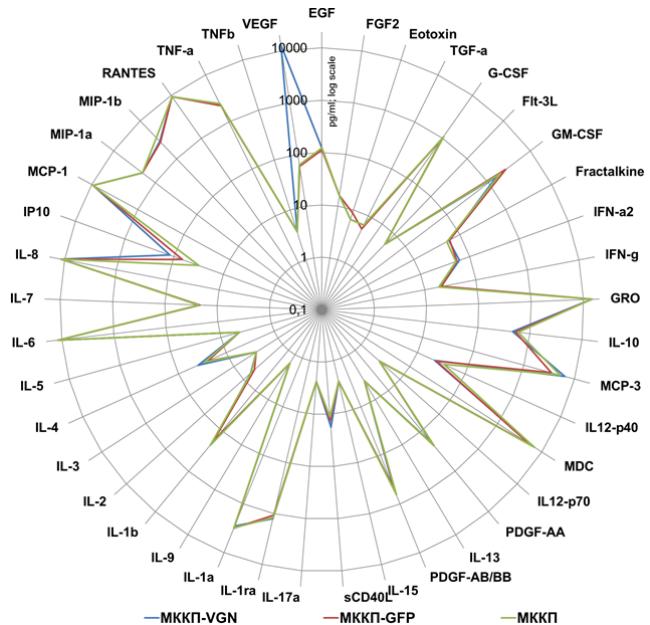


Рисунок 7. Радиальная сравнительная диаграмма содержания цитокинов, хемокинов и факторов роста в супернатантах собранных с генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины (МККП) человека. МККП-VGN – МККП, модифицированные Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1. МККП-EGFP – МККП, модифицированные Ad5-GFP, МККП – немодифицированные МККП человека.

Фенотипирование мононуклеарных клеток пуповинной крови человека трансплантированных SOD1-G93A мышам

Наличие трансплантированных МККП человека в СПМ трансгенных SOD1-G93A мышей оценивали при помощи флуоресцентной микроскопии. Во всех экспериментальных группах, которым трансплантировали МККП человека, были обнаружены HNA-позитивные клетки (МККП, визуализированные антителами против человеческого ядерного антигена), локализованные как в белом, так и в сером веществе СПМ SOD1-G93A мышей. Важно отметить, что HNA-позитивные клетки были обнаружены на разных стадиях заболевания, как на асимптоматической стадии, так и на терминальной стадии заболевания. Иммунофенотипирование HNA-позитивных клеток с применением маркеров, характерных для нервных клеток (нейрональная форма β -III тубулина), астроцитов (S100) или олигодендроцитов (OSP), не обнаруживает признаков принадлежности (дифференцировки) трансплантированных МККП человека ни к одному из клеточных типов ЦНС в СПМ SOD1-G93А мышей. Через две недели после трансплантации немодифицированных МККП человека были обнаружены эндотелиальные HNA+CD34+-клетки в сосудах СПМ SOD1-G93A мышей. Среди трансплантированных МККП человека также были документированы Iba1-позитивные клетки (HNA+Iba1+-клетки), что может свидетельствовать о том, что МККП в СПМ трансгенных SOD1-G93A мышей дифференцируются в клетки микроглии. Выявленные

HNA+Iba1+-клетки имели небольшое тело овальной формы с небольшими короткими отростками. Таким образом, МККП человека в СПМ трансгенных SOD1-G93A мышей могут дифференцироваться в эндотелиальные клетки и клетки микроглии за счет реализации эндогенного потенциала. В частности, прогениторные эндотелиальные клетки в составе популяции МККП дифференцируются в эндотелий, а моноциты приобретают характеристики микроглии.

Экспрессия рекомбинантных белков модифицированными мононуклеарными клетками крови пуповины человека *in vivo*

В группе трансгенных SOD1-G93A мышей после трансплантации МККП человека, одновременно модифицированных тремя аденоизвестами Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1, в сером веществе СПМ были выявлены HNA-позитивные клетки, экспрессирующие рекомбинантные белки (Рисунок 8). Обнаруженные HNA-позитивные клетки с диаметром 8-10 мкм имели округлую форму и большое ядро, окружённое тонким ободком цитоплазмы. Полученные результаты свидетельствуют о способности МККП человека, трансдукционных тремя аденоизвестами, после внутривенной инфузии мигрировать в СПМ SOD1-G93A мышей, выживать и продуцировать рекомбинантные белки VEGF, GDNF и NCAM1.

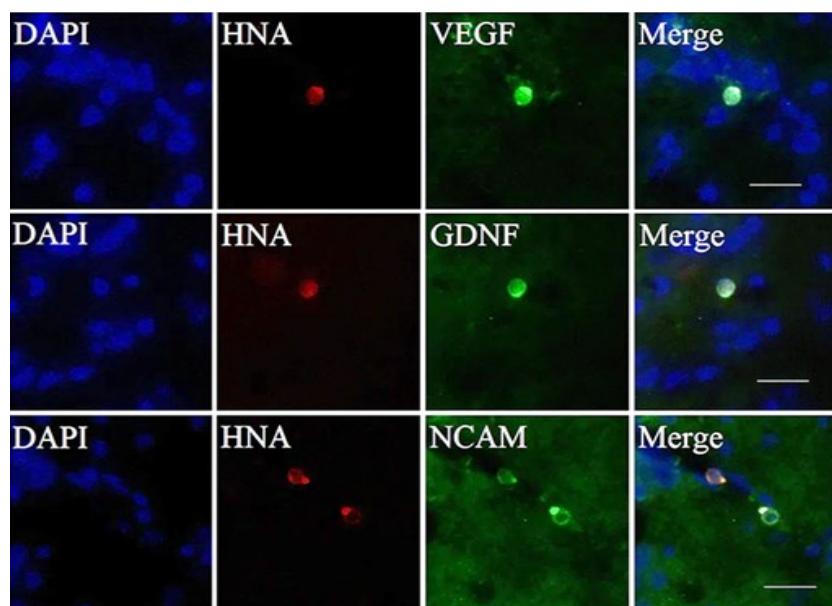


Рисунок 8. Экспрессия рекомбинантных белков генетически модифицированными мононуклеарными клетками крови пуповины человека в поясничном отделе спинного мозга SOD1-G93A мышей через 28 дней после трансплантации клеток. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание демонстрирует HNA+-клетки, экспрессирующие VEGF, GDNF или NCAM1. Верхняя панель – HNA+/VEGF+-клетки; Средняя панель – HNA+/GDNF+-клетки; Нижняя панель – HNA+/NCAM+-клетки; HNA – ядерный антиген человека (красный); VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста (зеленый); GDNF – глиальный нейротрофический фактор (зеленый); NCAM1 – нейрональная молекула клеточной адгезии (зеленый). Ядра клеток – DAPI (синий). Масштаб шкалы 20 мкм.

Распределение модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека в спинном мозге трансгенных SOD1-G93A мышей

На 7-8 неделе в СПМ трансгенных SOD1-G93A мышей после трансплантации МККП человека, одновременно модифицированных Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1, оценивали количество клеток, экспрессирующих ядерный антиген человека (HNA). В ходе проведенного морфометрического анализа в поясничном отделе СПМ трансгенных SOD1-G93A мышей было обнаружено увеличение числа HNA-позитивных клеток в группе МККП-VEGF165+GDNF+NCAM1, по сравнению с группой с введением МККП-GFP (Рисунок 9).

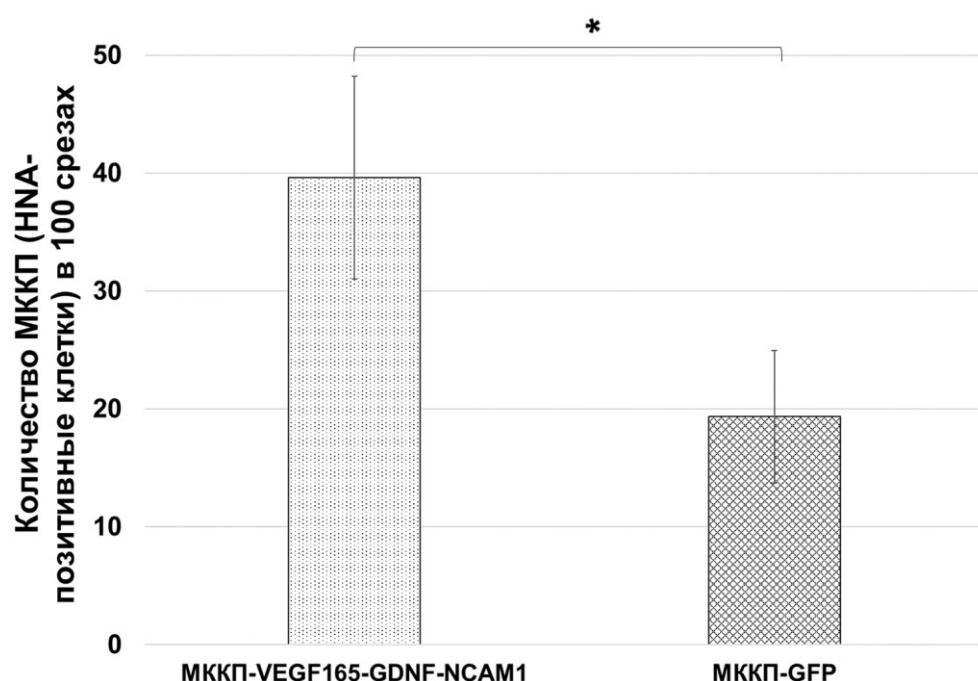


Рисунок 9. Количество HNA-позитивных клеток, выявленных в поперечных срезах спинного мозга трансгенных SOD1-G93A мышей после ретроорбитальной трансплантации мононуклеарных клеток крови пуповины человека. МККП-VEGF165-GDNF-NCAM1 – МККП, одновременно трансдуцированные Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1; МККП-GFP – МККП, трансдуцированные Ad5-GFP. Количество HNA-позитивных клеток было исследовано в 100 срезах от каждой SOD1-G93A мыши ($n = 3$) (*) $P < 0,05$.

Влияние трансплантированных генетически модифицированных мононуклеарных клеток на поведенческие реакции и выживаемость трансгенных SOD1-G93A мышей

Эффективность трансплантации модифицированных МККП человека на развитие заболевания у трансгенных SOD1-G93A мышей оценивали с помощью поведенческих тестов: «открытое поле» и «силы хватки». У асимптомных мышей из всех трех групп (введение физиологического раствора, МККП-GFP или МККП-

VEGF165+GDNF+NCAM1) за двое суток до трансплантации МККП были получены схожие результаты. Так, у мышей из контрольной группы (введение физиологического раствора) тест «открытое поле» показал следующее результаты: горизонтальная активность – $70,9 \pm 2,7$, вертикальная активность – $10,2 \pm 2,1$, исследовательская активность – $6,3 \pm 1,4$. Поведенческий тест на силу хватки составил $56,6 \pm 4,2$ секунд.

Через четыре недели, после введения физиологического раствора или трансплантации МККП человека, трансдуцированных Ad5-GFP по сравнению с группой, которой трансплантировали МККП человека, одновременно трансдуцированные Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1, наблюдали резкое снижение вертикальной активности в teste «открытое поле» и продолжительности нахождения в перевернутом состоянии в teste «силы хватки». В то же время горизонтальная и исследовательская активность мышей с БАС в открытом поле существенно не различались через четыре недели во всех экспериментальных группах, по сравнению с таковыми у асимптомных мышей (Рисунок 10).

К восьмой неделе показатели «открытого поля» (вертикальная активность, горизонтальная активность и исследовательская активность) продолжали снижаться. В то же время данные показатели были значительно лучше в группе SOD1-G93A мышей с трансплантацией МККП человека, одновременно трансдуцированных Ad5-VEGF, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1, по сравнению с контрольной группой (введение физиологического раствора) и группой с трансплантацией МККП человека, трансдуцированных Ad-GFP. В teste на силу хватки наблюдалось заметное сокращение времени эксперимента во всех трех группах. В целом, в группе мышей с трансплантацией МККП-VEGF-GDNF-NCAM1 симптомы заболевания прогрессировали медленнее. Сравнительная оценка продолжительности жизни SOD1-G93A мышей из трех экспериментальных групп показала, что выживаемость мышей в группе МККП-VEGF165-GDNF-NCAM1 была на четыре недели выше по сравнению с контрольной группой (введение физиологического раствора) и на две недели – по сравнению с группой МККП-GFP.

Проведенный анализ поведенческих реакций трансгенных SOD1-G93A мышей продемонстрировал более медленную скорость развития симптомов заболевания и более высокую выживаемость мышей с трансплантацией МККП человека, одновременно модифицированных тремя адено-вирусами Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1.

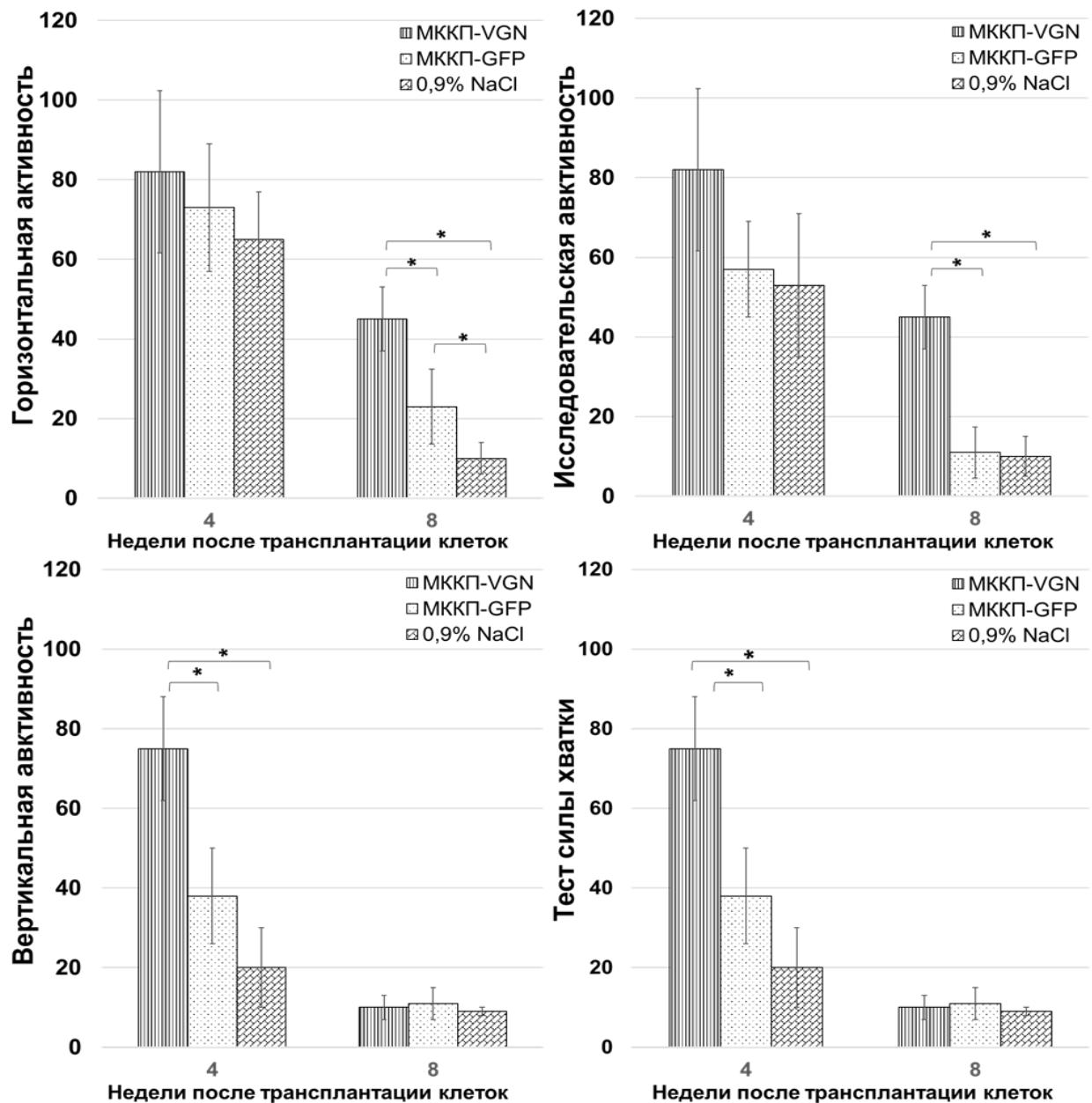


Рисунок 10. Характеристики поведенческих тестов SOD1-G93А мышей через четыре и восемь недель после трансплантации генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека. Представлены средние значения со стандартным отклонением; (*) отмечены статистически значимые различия между группами подопытных мышей ($P<0,05$). Экспериментальные группы: MKKP-VGN – MKKP человека, одновременно трансдуцированные Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1, MKKP-GFP – MKKP человека, трансдуцированные Ad5-GFP, и группа с ведением физиологического раствора (0,9% NaCl).

Динамика изменений уровней хемокинов на фоне прогрессии симптомов бокового амиотрофического склероза и проводимой генно-клеточной терапии у SOD1-G93А мышей

В сыворотке крови трансгенных SOD1-G93А мышей на различных стадиях заболевания было проанализировано 33 хемокина. В аннотированной нами модели мы не

обнаружили достоверных изменений в профиле проанализированных анализов (BCA1, CTACK, ENA78, Eotaxin, Eotaxin2, Fractalkine, GM-CSF, I309, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-16, IP-10, I-TAC, KC, MCP-1, MCP-3, MCP-5, MDC, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2; MIP-3 α , RANTES, MIP-3 β , SCYB16, SDF1 α , TARC, TECK, TNF- α) и не выявили признаков системного воспалительного процесса при прогрессии заболевания. Аналогичные результаты были получены и на фоне трансплантации МККП человека, одновременно трансдудцированных Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1. Группа SOD1-G93A мышей с трансплантацией МККП-VEGF165-GDNF-NCAM1 не отличалась по профилю проанализированных хемокинов от мышей, находящихся на асимптомной, симптоматической и терминальной стадиях заболевания (Рисунок 11).

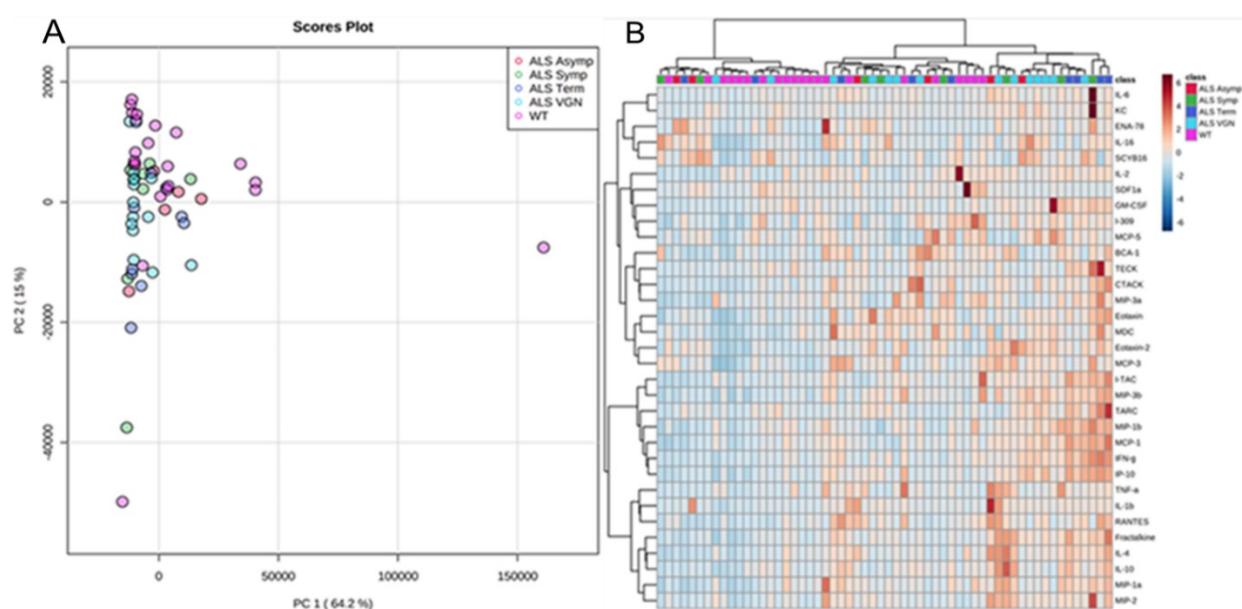


Рисунок 11. Анализ хемокинов в сыворотке крови трансгенных SOD1-G93A мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза. А. Анализ основных компонентов (PCA) образцов сыворотки крови подопытных животных. В. Тепловая карта концентрации хемокинов. Каждая колонка отражает данные изменений концентрации определённого цитокина в отдельно взятом образце. ALS Asymp – трансгенные мыши до развития клинических проявлений. ALS Symp – трансгенные мыши с клиническими проявлениями заболевания. ALS Term – трансгенные мыши на заключительной стадии заболевания. VGN – мыши с трансплантацией МККП человека, одновременно трансдудцированных Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1, WT – нетрансгенные мыши.

Динамика изменений уровней отдельных метаболитов на фоне прогрессии симптомов бокового амиотрофического склероза и проводимой терапии у SOD1-G93A мышей

В ходе таргетного масс-спектрометрического анализа идентифицировано 342 метаболита, ассоциированных с 43 различными биохимическими путями. При этом 67 из них

показали значимые корреляции с прогрессией симптомов у SOD1-G93A мышей. Наибольшая положительная корреляция была выявлена для аденоцина и N-глицил-L-пролина, негативная для глюкозоамина, глюкозы и гликоловой кислоты. С прогрессированием заболевания были обнаружены изменения в уровнях метаболитов микробиома, наблюдалось увеличение содержания 2-гидроксифенилуксусной кислоты, индола, метилфенилуксусной кислоты, п-аминогиппуровой кислоты, шикимовой кислоты, индоксилсульфата и имидазолуксусной кислоты.

Исследование метаболомного профиля подопытных животных показало значительное отличие в представленности сывороточных метаболитов у разных исследованных групп (Рисунок 12 А). В частности, мыши дикого типа, по сравнению с трансгенными SOD1-G93A мышами, имели свой уникальный метаболомный профиль. В то же время SOD1-G93А мыши, находящиеся на разных стадиях заболевания, по профилю исследованных метаболитов также отличались друг от друга. Трансгенные мыши с трансплантацией МККП человека, трансдуцированных Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1, также имели свой уникальный «метаболомный фенотип», приближающий их к асимптомным SOD1-G93A мышам. При анализе результатов было выделено 16 метаболитов, которые достоверно различались между исследованными группами. Обнаруженные метаболиты являлись производными различных классов химических веществ: аминов, аминокислот, липидов, нуклеотидов, органических кислот, стероидов, сахаров и витаминов. Мыши дикого типа имели повышенные уровни инозина, 5-метилтиоаденоцина и дезоксиаденоцина (Рисунок 12 В, розовые области), по сравнению с трансгенными SOD1-G93A мышами. Группа SOD1-G93A мышей на терминальной стадии имели отличия в профилях альфа-токоферола, 24,25-дигидроланостерола, инозина, сингозина, глицериновой кислоты, карнозина, пирофосфата, гликоловой кислоты, глюкозамина и гомогентизиновой кислоты, по сравнению с асимптомными мышами (Рисунок 12 В, синие области). Трансплантация генетически модифицированных МККП приводила к изменению в уровнях альфа-токоферола, 24,25-дигидроланостерола, инозина, сингозина, глицериновой кислоты, что соответствует профилю мышам, находящихся на асимптомной стадии заболевания (Рисунок 12 В, черные области). Альфа-токоферол, 24,25-дигидроланостерол, инозин, сингозин, глицериновая кислота изменяются в группе SOD1-G93A мышей на терминальной стадии по сравнению с группой мышей на асимптомной стадии заболевания.

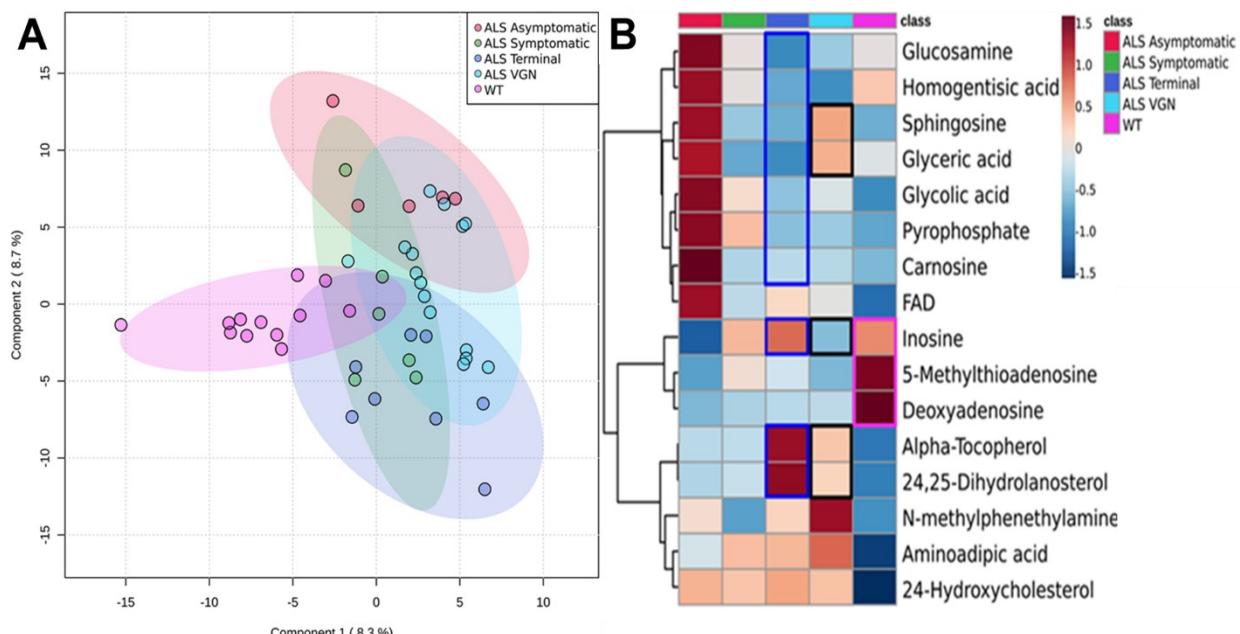


Рисунок 12. Таргетное метаболомное профилирование сыворотки крови трансгенных SOD1-G93А мышей с фенотипом БАС. А. Анализ основных компонентов (PCA), показывающий расхождение подопытных групп мышей, в зависимости от линии, клинической стадии заболевания и проводимой терапии. В. Тепловая карта средней представленности метаболитов достоверно изменяющихся в группах сравнения. ALS Asymp – трансгенные мыши до развития клинических проявлений, ALS Symp – трансгенные мыши с клиническими проявлениями заболевания, ALS Term – трансгенные мыши на терминальной стадии заболевания. VGN – мыши с трансплантацией МККП человека, одновременно трансдудицированных Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1, WT – нетрансгенные мыши.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нейродегенеративные заболевания сопровождаются широким спектром патофизиологических и патоморфологических изменений в центральной и периферической нервной системе. Центральным патогенетическим звеном которых является гибель определенных типов нейронов, дегенерация аксонов, разрыв коммуникаций в нейронных сетях и как следствие, нарушение функций иннервируемых органов.

В данной работе было проведено комплексное исследование механизмов, лежащих в основе патогенеза бокового амиотрофического склероза у трансгенных мышей линии B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J, а также предпринята попытка их купирования с помощью трансплантации генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека, сверхэкспрессирующих рекомбинантные молекулы-стимуляторы нейрорегенерации. Показано, что в процессе развития заболевания у трансгенных SOD1-G93A мышей, помимо дегенеративных изменений в центральной нервной системе

(спинной мозг), происходят динамические ультраструктурные изменения в периферической нервной системе (седалищный нерв).

Важным аспектом проведенного исследования явилось выявление метаболитов сыворотки крови, динамически изменяющихся с нарастанием дегенеративного процесса в нервной системе, и которые могут быть потенциальными прогностическими маркерами заболевания. Кроме того, в ходе исследования было обнаружено, что ряд выявленных метаболитов ассоциированы с микробиомом кишечника, что может свидетельствовать об участии микроорганизмов и их метаболитов в модуляции патогенеза БАС у мышей.

С целью сдерживания нейродегенерации и стимулирования нейрорегенерации, перспективной стратегией является применение генных, клеточных и генно-клеточных подходов. Современные методы генной терапии направлены на подавление или усиление экспрессии гена-мишени, т.е. представляют собой патогенетические подходы лечения заболеваний человека. Различные векторные системы применяют для доставки генов, продукты которых могут оказать выраженный терапевтический эффект при определенном патологическом процессе. В настоящее время для терапии НДЗ активно исследуют возможности использования различных типов стволовых клеток взрослого организма для доставки в область повреждения рекомбинантных генов, кодирующих терапевтические молекулы, поддерживающих выживание нейронов и стимулирующих регенерацию нервной ткани. При этом рекомбинантные белки способны значительно повысить терапевтический потенциал трансплантируемых стволовых клеток. Критерием для трансплантации МККП с целью стимуляции регенерации нервной ткани является их пригодность как для алло-, так и для аутотрансплантации у человека, их низкая иммуногенность, доступность, простота получения и возможность длительного хранения в криобанках. Кроме того, в пуповинной крови обнаружены и охарактеризованы стволовые и прогениторные клетки, способные давать начало специализированным клеткам разных тканей, в том числе и нейрональной.

В связи с этим для нейропротекции и стимулирования регенерации в центральной и периферической нервной системе трансплантация генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека является перспективной стратегией клеточно-опосредованной генной терапии нейродегенеративных заболеваний. При этом возможно использовать различные генетические системы для модификации мононуклеарных клеток перед трансплантацией, выбирать гены и их комбинации, варианты по срокам, количеству и способу трансплантации клеток (непосредственно в область травмы, в кровоток, в биоматрикс и др.).

Настоящее исследование является продолжением и расширением научного поиска молекулярно-генетических методов коррекции нейродегенеративных заболеваний и направлено на создание генно-инженерных конструкций, получение генетически модифицированных мононуклеарных клеток пуповинной крови и их тестирование в протоколах клеточно-опосредованной генной терапии трансгенных мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза.

В ходе представленного исследования созданы плазмидные генно-инженерные конструкции pAd5-VEGF165, pAd5-GDNF, pAd5-NCAM1, pAd5-FGF2, pAd5-SDF1 α , и pAd5-VEGF165-FuP2A-FGF2. На их базе синтезированы и охарактеризованы репликативно-дефектные аденоовириусы пятого серотипа. Проведено микроскопическое и протеомное (белковое) профилирование синтезированных аденоовириусных частиц. Исследованы иммуногенные свойства рекомбинантных белков в составе Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2. В ходе которого показано, что интегрирующая последовательность пикарновириусов (FuP2A) не вызывает иммунного ответа.

В соответствии с поставленной целью исследования нами было проведено выделение и генетическая модификация МККП человека, созданными аденоовириусами и их комбинациями. Показано, что эффективность трансдукции МККП достигает 30% (MOI 10), при этом модифицированные клетки синтезируют мРНК клонированных генов и синтезируют рекомбинантные белки. Кроме того, на модели подкожных имплантов Матригеля, иммунодефицитным мышам, продемонстрирована биологическая активность МККП человека, одновременно модифицированных Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1, в отношении индукции ангиогенеза *in vivo*.

Одной из важных характеристик генно-клеточного препарата является его биологическая безопасность. В настоящей работе было установлено, что трансдукция МККП Ad5-VEGF165 (MOI 10) и экспрессия клетками рекомбинантного белка VEGF не влияет на транскриптомный, секретомный и протеомный профиль модифицированных клеток.

Модификация МККП человека может быть полезна в трёх аспектах. Во-первых, для повышения жизнеспособности трансплантированных клеток в тканях реципиента. Во-вторых, для доставки специфических ростовых, трофических, противовоспалительных факторов в область нейродегенерации. В-третьих, для направленной дифференцировки трансплантированных клеток в специфические клеточные типы ЦНС. Важно отметить, что МККП способны проникать через гематоэнцефалический барьер, а сигнальные молекулы, секреции погибающими нервными клетками, способны стимулировать хоуминг и привлекать в ЦНС трансплантированные МККП человека.

В настоящем исследовании для сдерживания нейродегенеративных процессов у трансгенных мышей B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J с фенотипом БАС были использованы генетически модифицированные МККП человека. Результаты по трансплантации МККП человека, трансдуцированных Ad5-GFP, показали, что модифицированные клетки мигрируют в нервную ткань спинного мозга и сохраняют способность к экспрессии рекомбинантного белка – GFP. Аналогичные результаты были показаны и для МККП человека, модифицированных аденоовирусами (комбинациями аденоовирусов), экспрессирующих терапевтические белки. МККП, модифицированные Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2, также мигрируют в места нейродегенерации и дифференцируются астроцитоподобные клетки (HNA+VEGF+Aqp4+). Результаты по трансплантации МККП человека, одновременно модифицированных Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1, показали, что рекомбинантные белки VEGF, GDNF и NCAM1 смещают измененный профиль сывороточных метаболитов в сторону характерную для здоровых (асимптомных) мышей, способствуют улучшению двигательной и исследовательской активности, а также увеличивают продолжительность жизни трансгенных SOD1-G93A мышей с моделью БАС. Впервые продемонстрирована корреляция между изменениями в профиле сывороточных метаболитов после трансплантации модифицированных МККП человека с когнитивными функциями и выживаемостью трансгенных мышей. Данные проведенного исследования позволяют предположить, что целесообразность генно-клеточных подходов для терапии БАС подтверждается улучшением поведенческих реакций и увеличением продолжительности жизни подопытных животных. Дальнейшие разработки и тестирования генно-клеточных препаратов, нацеленных на коррекцию механизмов развития БАС, позволят потенциально раскрыть новые подходы для лечения других нейродегенеративных заболеваний человека, имеющих аналогичные и/или частично совпадающие патогенетические проявления.

Таким образом, в ходе развития БАС у трансгенных SOD1-G93A мышей наблюдаются прогрессирующие структурные дегенеративные изменения в периферической и центральной нервной системе, коррелирующие с изменениями в профиле сывороточных метаболитов. Ксенотрансплантация генетически модифицированных МККП человека, экспрессирующих рекомбинантные белки VEGF, GDNF и NCAM1, является эффективной стратегией для коррекции патологических нарушений в нервной системе и стимулирования нейрогенерации.

ВЫВОДЫ

1. Созданные, синтезированные и очищенные репликативно-дефектные аденоовириусы представляют собой безоболочечные частицы икосаэдрической симметрии диаметром 90-100 нм, белковый профиль которых соответствует аденоовириусу пятого серотипа и представлен коровыми, капсидными и вершинными белками.

2. Генетические конструкции, созданные на основе репликативно-дефектного аденоовириуса пятого серотипа, обеспечивают эффективную экспрессию сосудистого эндотелиального фактора роста (Ad5-VEGF165), глиального нейротрофического фактора роста (Ad5-GDNF), основного фактора роста фибробластов (Ad5-FGF2) и нейрональной молекулы клеточной адгезии (Ad5-NCAM1) в клетках эмбриональной почечной линии 293T человека и в мононуклеарных клетках крови пуповины человека *in vitro*.

3. Трансдукция мононуклеарных клеток крови пуповины человека репликативно-дефектным аденоовириусом пятого серотипа Ad5-VEGF165 (MOI 10) обеспечивает синтез и секрецию VEGF и не влияет на транскриптомный, протеомный и секретомный профиль генетически модифицированных клеток *in vitro*.

4. Мультицистронная конструкция Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2, содержащая 2A-пептидную последовательность пикорновириусов (p2A) и фуриновую протеазу (Fu), обеспечивает эффективный синтез, пост-трансляционный гидролиз и секрецию модифицированными клетками полипептидов VEGF165 и FGF2. Наличие фуриновой протеазы (Fu) способствует удалению p2A последовательностей, что обуславливает отсутствие иммунного ответа на белки пикорновириуса.

5. Мононуклеарные клетки крови пуповины человека, одновременно трансдуцированные комбинацией аденоовириусов Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1, в равном соотношении продуцируют рекомбинантные белки, сохраняют ультраструктуру, фенотип и секретомный профиль.

6. Мононуклеарные клетки крови пуповины человека, одновременно трансдуцированные комбинацией аденоовириусов Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1, трансплантированные иммунодефицитным мышам в составе белкового матрикса, стимулируют васкуляризацию подкожных имплантов.

7. С прогрессией заболевания у трансгенных SOD1-G93A мышей обнаруживаются нарастающие ультраструктурные патоморфологические изменения в периферической (седалищный нерв) и центральной (спинной мозг) нервной системе, которые коррелируют с изменениями в метаболомном профиле и не находят отражение в профиле исследованных сывороточных цитокинов, хемокинов и факторов роста.

8. Мононуклеарные клетки крови пуповины человека, модифицированные Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2, после трансплантации трансгенным SOD1-G93A мышам с моделью бокового амиотрофического склероза выживают, мигрируют в спинной мозг, синтезируют рекомбинантные белки (VEGF165 и FGF2) и дифференцируются в клетки, экспрессирующие маркеры, характерные для астроцитов и шванновских клеток – Oct6 и Aqp4.

9. Мононуклеарные клетки крови пуповины человека, трансдуцированные аденоизиусными векторами Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF, Ad5-NCAM1 и их комбинациями, выживают, мигрируют в спинной мозг трансгенных SOD1-G93A мышей с моделью бокового амиотрофического склероза и синтезируют рекомбинантные белки VEGF165, GDNF и NCAM1. При этом клетки, экспрессирующие терапевтические рекомбинантные гены, совместно с нейрональной молекулой клеточной адгезии (NCAM1) имеют повышенный миграционный потенциал и жизнеспособность.

10. Трансплантация мононуклеарных клеток крови пуповины человека, одновременно трансдуцированных Ad5-VEGF165, Ad5-GDNF и Ad5-NCAM1, трансгенным SOD1-G93A мышам с моделью бокового амиотрофического склероза не влияет на профиль сывороточных цитокинов и хемокинов, модулирует профиль метаболитов в сторону здоровых (асимптомных) мышей, улучшает показатели поведенческих тестов и продлевает жизнь подопытных животных.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Мухамедьяров М.А. Оценка эффективности комбинированной терапии бокового амиотрофического склероза в модели на mSOD1 трансгенных мышах / М.А. Мухамедьяров, Е.О. Петухова, **И.И. Салафутдинов**, М.С. Кузнецов, З.З. Сафиуллов, Р.Р. Исламов, А.Л. Зефиров // Гены и клетки / Genes and Cells (до 2013 г. название - Клеточная трансплантология и тканевая инженерия). – 2020. – Т.15. №.3. – С.55-58 (10.23868/202011008)

2. Сафиуллов З.З. Адресная миграция и выживание генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека после трансплантации G93A мышам с моделью бокового амиотрофического склероза / З.З. Сафиуллов, Е.Е. Гаранина, А.А. Измайлова, Р.Р. Гарибулин, В.Ю. Федотова, **И.И. Салафутдинов**, А.А. Ризванов, Р.Р. Исламов // Гены и клетки / Genes and Cells (до 2013 г. название - Клеточная трансплантология и тканевая инженерия). – 2015. – Т.10. №.4. – С.86-89.

3. Исламов Р.Р. Исследование экспрессии рекомбинантных терапевтических генов в мононуклеарных клетках крови пуповины, трансдуцированных тремя аденоизиусными векторами, кодирующими нейротрофические факторы GDNF и VEGF и молекулу нейрональной адгезии NCAM / Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов, Е.Е. Черенкова, Я.О. Мухамедшина, **И.И. Салафутдинов**, З.З. Сафиуллов, А.А. Измайлова, М.А. Мухамедьяров, Д.С. Гусева // Гены и клетки / Genes and Cells (до 2013 г. название -

Клеточная трансплантология и тканевая инженерия). – 2014. – Т.9. №3-2. – С.204-208.

4. Mukhamedyarov M.A. Analysis of the Efficiency of Gene-Cell Therapy in Transgenic Mice with Amyotrophic Lateral Sclerosis Phenotype / M.A. Mukhamedyarov, A.A. Rizvanov, Z.Z. Safiullov, A.A. Izmailov, G.A. Sharifullina, V.V. Solovyeva, V.Yu. Fedotova, **I.I. Salafutdinov**, E.E. Cherenkova, F.V. Bashirov, M.S. Kaligin, S.R. Abdulkhakov, M.M. Shmarov, D.Yu. Logunov, B.S. Naroditsky, A.P. Kiyasov, A.L. Zefirov, R.R. Islamov // Bulletin of Experimental Biology and Medicine (USA, рус. сост. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины + Клеточные технологии в биологии и медицине). – 2013. – Т.154. №4. – С.558-561.

5. Кудряшова Н.В. Мононуклеарные клетки пуповинной крови человека, трансфицированные двухкассетными плазмидами (vegf + нейротрофический фактор) для терапии бокового амиотрофического склероза / Н.В. Кудряшова, Д.С. Гусева, **И.И. Салафутдинов**, Ф.В. Баширов, А.П. Киясов, А.А. Ризванов, Р.Р. Исламов // Гены и клетки / Genes and Cells (до 2013 г. название - Клеточная трансплантология и тканевая инженерия). – 2012. – Т.7. №3. – С.92-97.

6. Ризванов А.А. Доклинические исследования терапии бокового амиотрофического склероза с помощью генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины / А.А. Ризванов, Д.С. Гусева, **И.И. Салафутдинов**, Ф.В. Баширов, А.П. Киясов, Р.Р. Исламов // Гены и клетки / Genes and Cells (до 2013 г. название - Клеточная трансплантология и тканевая инженерия). – 2012. – Т.7. №2. – С.63-70.

7. **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 HUVEC / 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 // Гены и клетки / Genes and Cells (до 2013 г. название - Клеточная трансплантология и тканевая инженерия). – 2010. – Т.5, №2. – С.62-67.

8. Salafutdinov I.I. Influence of recombinant codon-optimized plasmid DNA encoding VEGF and FGF2 on co-induction of angiogenesis / **I.I. Salafutdinov**, I.M. Gazizov, D.K. Gatina, R.I. Mullin, A.A. Bogov, R.R. Islamov, A.P. Kiassov, R.F. Masgutov, A.A. Rizvanov // Cells. – 2021. - V.10, №2. – Номер статьи 432. (14 стр.) (10.3390/cells10020432).

9. Islamov R.R. Gene-modified leucoconcentrate for personalized ex vivo gene therapy in a mini pig model of moderate spinal cord injury / R.R. Islamov, F.V. Bashirov, M.E. Sokolov, A.A. Izmailov, F.O. Fadeev, V.A. Markosyan, M.A. Davleeva, O.V. Zubkova, M.M. Smarov, D.Yu. Logunov, B.S. Naroditsky, **I.I. Salafutdinov**, A.A. Rizvanov, R.G. Turaev // Neural Regeneration Research – 2021. – V.16, №.2. – P.357-361. (10.4103/1673-5374.290902)

10. Markosyan V. Preventive Triple Gene Therapy Reduces the Negative Consequences of Ischemia-Induced Brain Injury after Modelling Stroke in a Rat / V. Markosyan, Z. Safiullov, A. Izmailov, F. Fadeev, M. Sokolov, M. Kuznetsov, D. Trofimov, E. Kim, G. Kundakchyan, A. Gibadullin, **I. Salafutdinov**, L. Nurullin, F. Bashirov, R. Islamov // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – V.21, №.18. – Номер статьи 6858 (26 стр.). (10.3390/ijms21186858)

11. Solovyeva V.V. In Vitro Angiogenic Properties of Plasmid DNA Encoding SDF-1 and VEGF165 Genes / V.V. Solovyeva D.S. Chulpanova, L.G. Tazetdinova, **I.I. Salafutdinov**, I.Y. Bozo, A.A. Isaev, R.V. Deev, A.A. Rizvanov // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2020. – V.190, №3. – P.773-788. (10.1007/s12010-019-03128-5).

12. Izmailov A.A. Spinal cord molecular and cellular changes induced by adenoviral vector- and cell-mediated triple gene therapy after severe contusion / A.A. Izmailov, T.V. Povysheva, F.V. Bashirov, M.E. Sokolov, F.O. Fadeev, R.R. Garifulin, B.S. Naroditsky, D.Y. Logunov, **I.I. Salafutdinov**, Y.A. Chelyshev, R.R. Islamov, I.A. Lavrov // Frontiers in Pharmacology. – 2017. – V.8. NOV. – Номер статьи 813 (13 с.). (10.3389/fphar.2017.00813)

13. Islamov R.R. Tandem Delivery of Multiple Therapeutic Genes Using Umbilical

Cord Blood Cells Improves Symptomatic Outcomes in ALS / R.R. Islamov, A.A. Rizvanov, V.Y. Fedotova, A.A. Izmailov, Z.Z. Safiullov, E.E. Garanina, **I.I. Salafutdinov**, M.E. Sokolov, M.A. Mukhamedyarov, A. Palotás // Molecular Neurobiology. – 2017. – V.54, №6. – P.4756-4763. (10.1007/s12035-016-0017-x)

14. Garanina E.E. Construction of recombinant adenovirus containing picorna-viral 2A-peptide sequence for the co-expression of neuro-protective growth factors in human umbilical cord blood cells / E.E. Garanina, Y.O. Mukhamedshina, **I.I. Salafutdinov**, A.P. Kiyasov, L.M. Lima, H.J. Reis, A. Palotás, R.R. Islamov, A.A. Rizvanov // Spinal Cord. – 2016. – V.54, №6. – P.423-430. (10.1038/sc.2015.162)

15. Islamov R.R. Symptomatic improvement, increased life-span and sustained cell homing in amyotrophic lateral sclerosis 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, **I.I. Salafutdinov**, E.E. Garanina, V.Y. Fedotova, V.V Solovyeva, Y.O. Mukhamedshina, Z.Z. Safiullov, A.A. Izmailov, D.S. Guseva, A.L. Zefirov, A.P. Kiyasov, A. Palotás // Current Gene Therapy. – 2015. – V.15, №3. – P.266-276. (10.2174/1566523215666150126122317)

16. Rizvanov A.A. Genetically modified human umbilical cord blood cells expressing vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor 2 differentiate into glial cells after transplantation into amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice / A.A. Rizvanov, D.S. Guseva, **I.I. Salafutdinov**, N.V. Kudryashova, F.V. Bashirov, A.P. Kiyasov, M.E. Yalvaç, I.M. Gazizov, M.S. Kaligin, F. Sahin, M.A. Mukhamedyarov, A. Palotás, R.R. Islamov // Experimental Biology and Medicine. – 2011. – V.236, №.1. – P.91-98. (10.1258/ebm.2010.010172)

Научные монографии:

1. Gatina D.Z., Garanina E.E., Zhuravleva M.N., Synbulatova G.E, Mullakhmetova A.F., Solovyeva. V.V., Kiyasov A.P., Rutland C.S., Rizvanov A.A., **Salafutdinov I.I.** Proangiogenic Effect of 2A-Peptide Based Multicistronic Recombinant Constructs Encoding VEGF and FGF2 Growth Factors / Arteriogenesis and Therapeutic Angiogenesis / Ed. by P. Quax, E.Deindl. – Basel, Switzerland: MDPI, 2022. – 230 p. ISBN-10: 3036527168. (doi: 10.3390/books978-3-0365-2717-8) – P.191-206.

2. Гусева Д.С., Ризванов А.А., Салафутдинов И.И., Мухамедшина Я.О., Сафиуллов З.З., Измайлов А.А., Киясов А.П., Исламов Р.Р. Лечение бокового амиотрофического склероза с помощью генетически модифицированных мононуклеарных клеток крови пуповины / Избранные главы фундаментальной и трансляционной медицины: коллективная монография / отв. ред. Р.И. Жданов - Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2014. - 592 с. - ISBN 987-5-00019-266-5. - С.440-451.

Патенты на изобретения:

1. Исламов Р.Р., Маркосян В.А., Соколов М.Е., Измайлов А.А., Фадеев Ф.О., Кузнецов М.С., Китаева Э.А., Давлеева М.А., Гарифулин Р.Р., **Салафутдинов И.И.** Баширов Ф.В. Сафиуллов З.З. Способ превентивной генной терапии для сдерживания гибели нейронов при ишемическом инсульте головного мозга: патент на изобретение № RU 2748940 С2, 18.05.2020.

2. Исламов Р.Р., Соколов М.Е., Баширов Ф.В., Маркосян В.А., Измайлов А.А., Фадеев Ф.О., Кузнецов М.С., Лисюков А.Н., Сафиуллов З.З., Китаева Э.А., **Салафутдинов И.И.**, Шмаров М.М., Народицкий Б.С. Средство для сдерживания гибели нейронов при ишемическом инсульте головного мозга и способ клеточно-опосредованной генной терапии ишемического инсульта головного мозга средством сдерживания гибели нейронов при ишемическом инсульте головного мозга: патент на изобретение № RU 2676701 С1, 10.01.2019.

3. Исламов Р.Р., Соколов М.Е., Баширов Ф.В., Маркосян В.А., Измайлов А.А., Фадеев Ф.О., Кузнецов М.С., Лисюков А.Н., Газизов И.М., Логунов Д.Ю., **Салафутдинов И.И.**, Давлеева М.А., Шмаров М.М., Народицкий Б.С., Бачерикова Н.А., Тураев Р.Г. Способ изготовления средства для клеточно-опосредованной генной терапии и средство

для клеточно-опосредованной генной терапии: патент на изобретение № RU 2716013 C2, 05.03.2020.

4. Исламов Р.Р., Ризванов А.А., Блатт Н.Л., Газизов И.М., Йылмаз Т.С., Калигин М.С., Киселёв 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. Способ получения лекарственного препарата генетически модифицированных клеток: патент на изобретение № RU 2431669 C2, 20.10.2011.

Тезисы докладов в изданиях, индексируемых базами данных Scopus и Web of Science:

1. Salafutdinov I. Metabolic signatures in a mouse model of progressing amyotrophic lateral sclerosis / **I. Salafutdinov**, A.Laikov, L.Lopuhov, M.Markelova, G.Synbulatova, D.Gatina, E.Petukhova, M. Mukhamedyarov, S.Khaiboullina, A.Rizvanov, R.Islamov // European Journal of Clinical Investigation. – 2021. – V.51. Supplement 1. Special Issue SI. Meeting Abstract P12.02. – P.114-115.

2. Islamov I.R. A Simple, Safe and Effective Approach for Personalized Precision Ex Vivo Gene Therapy Based on Autoinfusion of Gene-Modified Leucoconcentrate (GML) Prepared from Routine Unit of Patient's Peripheral Blood /Islamov R.I., M.E. Sokolov, Z.Z Safiullov, M.A. Davleeva, R.R. Garifulin, F.V. Bashirov, **I.I. Salafutdinov**, A.A Rizvanov, O.V Zubkova, M.M Smarov, D.Yu Logunov, B.S. Naroditskyi, R.G. Turaev // Blood. – 2020. – V.136. Supplement 1. - Meeting Abstract 4809. – P.31. (10.1182/blood-2020-133805)

3. Salafutdinov I.I., Transcriptomic Landscape of Umbilical Cord Blood Mononuclear Cells after Genetic Modification / **I.I Salafutdinov**, D.Z. Gatina, M. I Markelova, E. E. Garanina, S. Yu. Malanin, I. M Gazizov, S.Khaiboullina, A. A. Rizvanov, R.R Islamov // Blood. – 2020. – V.136. Supplement 1. - Meeting Abstract 4809. – P.33-34 (doi.org/10.1182/blood-2020-133805

4. Salafutdinov I. Transcriptome sequencing gene engineering of human umbilical cord blood mononuclear cells / **I. Salafutdinov**, D.Gatina, M.Markelova, E.Garanina, S.Malanin, A.Rizvanov, S.Khaiboullina, R.Islamov // European Journal of Clinical Investigation. – 2020. – V.50. Supplement 1. Special Issue SI. Meeting Abstract 54ASM-0099. – P.90-91.

5. Salafutdinov I. Evaluating the levels of cytokines and peripheral nerve disorders in mouse model amyotrophic lateral sclerosis / **I. Salafutdinov**, R. Ben Taleb, D. Gatina, E. Garanina, V. Syromiatnikova, E. Petukhova, M. Mukhamedyarov, A. Rizvanov, S. Arhipova // European Journal of Clinical Investigation. – 2020. – V.50. Supplement 1. Special Issue SI. Meeting Abstract 54ASM-0099. – P.71-72.

6. Salafutdinov I. Cytokine Secretion Profiling of human umbilical cord blood mononuclear cells transduced with adenoviral vectors carrying therapeutic genes / **I.Salafutdinov**, D.Gatina, E.Garanina, S.Khaiboullina, S.Mikhail, A.Rizvanov, R.Islamov // European Journal of Clinical Investigation. – 2019. – V.49. Supplement 1. Meeting Abstract P159-T. – P.167.

7. Bashirov F.V. Umbilical Cord Blood Mononuclear Cells for Ex-Vivo Gene Therapy / F.V Bashirov, **I.I. Salafutdinov**, M.E. Sokolov, A.A Izmailov, V.A. Markosyan, F.O Fadeev, A.A.Rizvanov, R.I. Islamov // Blood. – 2018. – V.132. Supplement 1. - Meeting Abstract 4809. – P. 5797. (10.1182/blood-2020-133805)

8. Garanina E. Cytokine profiling of human umbilical cord plasma and human umbilical cord blood mononuclear cells / E. Garanina, D. Gatina, E.V. Martynova, A. Rizvanov, S. Khaiboullina, **I. Salafutdinov** // Blood. – 2017. – V.130. Supplement 1. - Meeting Abstract 4809. – P. 4814. (.1182/blood.V130.Suppl_1.4814.4814)

9. Garanina E.E. Modulation of the umbilical cord blood cells secretome using recombinant adenovirus encoding VEGF165 / E.E. Garanina, D.Z. Gatina, E.V. Martynova, S.F.

Khaiboullina, A.A. Rizvanov, **I.I. Salafutdinov** // Human Gene Therapy. – 2017. –Volume 28. Issue 12. Meeting Abstract C. A101-A101.

Публикации в иных изданиях:

1. Лайков А.В. Протеомное профилирование для оценки и тестирования рекомбинантных аденоовирусов / А.В. Лайков, Ю.Д. Романова, Д.З. Гатина, **И.И. Салафутдинов**, // Гены и клетки. – 2019. – Т.14. Приложение: Материалы IV Национального конгресса по регенеративной медицине, Москва, 20-23 ноября 2019 г. – С.133.

Список сокращений

Ad5 – аденоовirus пятого серотипа

Aqp4 – аквапорин 4

CD34 – мембранный белок, играющий роль на ранних стадиях гемопоэза

DAPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндол

FBS – сыворотка крови плодов коровы

FGF2 – фактор роста фибробластов2

GDNF – нейротрофический фактор, полученный из глиальных клеток

GFP – зеленый флуоресцирующий белок

HEK293A – клетки эмбриональной почечной линии 293A человека,

HNA – человеческий ядерный антиген

Iba1 – ионизированная, связывающая кальций, молекула 1

NCAM1 – нейрональная молекула клеточной адгезии 1

Oct6 – октамер-связывающий белок 6

OSP – специфический белок олигодендроцитов

PCA – анализ основных компонентов

RPMI1640 – среда для культивирования клеток №1640, разработанная в Институте раковых исследований Розвелла Парка

S100 – белок S100

SDF1 α – фактора стромальных клеток 1 альфа

SOD1 – супероксиддисмутаза 1

SOD1-G93A – трансгенные мыши экспрессирующие фенотипом БАС

TUJ1 – нейрональный β III-тубулин

VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста

БАС – боковой амиотрофический склероз

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

МККП – мононуклеарные клетки крови пуповины

мкм – микрометр; нм – нанометр

НДЗ – нейродегенеративные заболевания

РНК – рибонуклеиновая кислота

СПМ – спинной мозг

ЦНС – центральная нервная система

Адрес для отзывов на автореферат: 420008, Казань, ул. Кремлевская, д.18, Казанский федеральный университет, отдел аттестации научно-педагогических кадров и Ученому секретарю диссертационного совета КФУ.03.07 к.б.н., доцент Кравцовой О.А., E-mail:

okravz@yandex.ru

E-mail автора: sal.ilnur@gmail.com