

На правах рукописи

СМИРНИХИНА СВЕТЛАНА АНАТОЛЬЕВНА

**ОЦЕНКА ТРАНСФЕКЦИИ ГЕНА *VEGF121* В
МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА
НЕВИРУСНЫМИ МЕТОДАМИ**

03.02.07 – генетика

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва – 2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии медицинских наук Медико-генетическом научном центре РАМН

Научный руководитель: академик РАМН, доктор медицинских наук,
профессор
Бочков Николай Павлович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Румянцев Сергей Александрович

доктор медицинских наук,
Писарев Владимир Митрофанович

Ведущая организация: Институт молекулярной генетики Российской академии наук

Защита состоится «16» мая 2011 года в «___» часов на заседании Диссертационного совета Д 001.016.01 при Учреждении Российской академии медицинских наук Медико-генетическом научном центре РАМН по адресу: 115478, Москва, ул. Москворечье, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии медицинских наук Медико-генетического научного центра РАМН по адресу: 115478, Москва, ул. Москворечье, д.1.

Автореферат разослан «___» _____ 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета Д 001.016.01
по защите докторских и кандидатских диссертаций,
доктор медицинских наук, профессор

Зинченко Р.А.

Актуальность проблемы

Клеточная терапия с использованием мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека (МСК) считается одним из наиболее перспективных направлений медицины. МСК сейчас используют практически во всех областях медицины: от пластической хирургии до возмещения больших дефектов тканей и органов (Riordan N.H., 2009; Psaltis P.J., 2008; Yoshimura K., 2008; Schaffler A., 2007; Пальцев М.А., 2009).

Использование МСК в регенеративной медицине неслучайно. Эти клетки есть у каждого человека, и их достаточно просто выделить и культивировать. МСК содержатся в костном мозге, жировой ткани, пуповинной крови и почти во всех органах. При аллотрансплантации МСК относительно неиммуногенны и даже отмечено, что они могут незначительно подавлять иммунный ответ реципиента, что позволяет им длительно выживать после введения для оказания терапевтического эффекта (Le Blanc K., 2004).

Помимо всех выше перечисленных достоинств, МСК экспрессируют широкий спектр цитокинов и факторов роста, которые оказывают паракринные эффекты: осуществляют иммуномодуляцию и трофику (Sadan O., 2009), стимулируют гемопоэз *in vitro* (Pittenger M.F., 1999; Majumdar M.K., 1998; Парфенова Е.В., 2000). Также есть данные, что МСК оказывают проангиогенный эффект, причем у МСК, выделенных из жировой ткани, он выше, чем у МСК из костного мозга (Kim Y., 2007). Кроме того, МСК усиливают неоангиогенез за счет дифференцировки в эндотелиальные клетки и выделения множества ангиогенных факторов, таких как VEGF, bFGF и ангиопоэтин-1 (Al-Khaldi A., 2003; Lee J.B., 2006; Kaigler D., 2003; Бокерия Л.А., 2006). Все вышеперечисленное позволяет применять МСК для лечения ишемических состояний нижних конечностей и сердца.

Кроме того, есть данные о том, что введение в очаг ишемии генно-инженерных конструкций с факторами ангиогенеза, также может приводить к усиленному росту сосудов, что с успехом используется в комплексной терапии ишемических состояний (Константинов Б.А., 2005; Бочков Н.П., 2006; Бочков Н.П., 2010).

С целью большей стимуляции роста новых сосудов целесообразно совместить оба метода, т.е. трансплантировать МСК, трансфицированные генами ангиогенеза, в частности *VEGF*. В литературе описаны положительные примеры такого подхода. Наиболее безопасными методами трансфекции являются невирусные методы – липофекция и электропорация, так как лишены многих побочных эффектов вирусных методов (инсерционный мутагенез, иммунологические осложнения). В отношении трансфекции МСК имеются противоречивые сведения об эффективности невирусных

методов и о степени повышения уровня экспрессии трансгена. С целью разработки оптимальных протоколов трансфекции необходимо проведение серии экспериментов с использованием плазмиды с геном *VEGF*.

Цель и задачи исследования

Цель работы – оценка результативности трансфекции, динамики элиминации плазмиды с геном *VEGF* и экспрессии введенного гена в МСК человека двумя невирусными методами – липофекцией и электропорацией.

Задачи исследования:

1. Оценить результативность трансфекции и динамику элиминации плазмид в различных культурах МСК, трансфицированных липофекцией и электропорацией.
2. Охарактеризовать липофекцию и электропорацию по результативности и динамике элиминации плазмид из трансфицированных клеток.
3. Оценить уровни экспрессии гена *VEGF* в нетрансфицированных и трансфицированных обоими методами клетках.
4. Оценить уровень метилирования CMV-промотора введенной генетической конструкции.

Научная новизна

В настоящем исследовании проведена трансфекция плазмиды с геном *VEGF*. В работе показано, что результативность невирусных методов при трансфекции этой плазмиды в МСК не различается.

В работе выявлены культуральные различия в результативности трансфекции, динамике элиминации плазмид из клеток и в уровнях экспрессии гена *VEGF* как в трансфицированных, так и в нетрансфицированных клетках.

Впервые исследовано метилирование при транзиторной трансфекции МСК. Показано, что метилирование не вносит существенный вклад в снижение уровня экспрессии гена вводимой плазмиды.

Учитывая малоэффективные попытки лечения ишемических состояний с помощью МСК и генной терапии с использованием генно-инженерных конструкций с факторами ангиогенеза, проведена попытка разработки оптимальных условий трансфекции и дальнейшей трансплантации трансфицированных культур в ишемизированные ткани, необходимой для лучшей реваскуляризации ткани при клеточной терапии. В ходе работы определены наиболее эффективные подходы в трансфекции МСК плазмидой с геном *VEGF*.

Практическая значимость

Работа представляется базисной, направленной на оценку результативности невирусных методов трансфекции МСК. Результаты работы указывают на необходимость разработки подходов к уменьшению вариабельности результативности трансфекции МСК. Результаты работы необходимы для дальнейшего применения трансфицированных клеток в клеточной терапии, включая лечение ишемических состояний нижних конечностей.

Положения, выносимые на защиту

1. Между культурами МСК обнаружены индивидуальные различия в результативности трансфекции и динамике элиминации плазмид из клеток.
2. Определена динамика элиминации плазмид после липофекции и электропорации. Оба метода не отличаются друг от друга по результативности и динамике элиминации плазмид из трансфицированных клеток.
3. После трансфекции уровень экспрессии гена *VEGF* повышается в половине культур к 9-му дню.
4. Метилирование промотора плазмиды не оказывает существенного влияния на уровень экспрессии *VEGF*.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены на конференции молодых ученых при МГНЦ РАМН (Москва, 2009 г.), на конференции Stem Cells Europe (Эдинбург, 2009 г.), на VI съезде Российского общества медицинских генетиков (Ростов-на-Дону, 2010 г.), лабораторных и межлабораторных семинарах. Апробация проведена на базе МГНЦ РАМН 16 февраля 2011 года.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации

Работа выполнена на базе Учреждения Российской академии медицинских наук Медико-генетического научного центра РАМН. Автор проводил дифференцировку МСК в адипогенном и остеогенном направлении, трансфекцию, выделение образцов ДНК и РНК, анализ с помощью ПЦР в реальном времени, подготовку образцов к секвенированию, все расчеты и статистическую обработку полученных результатов. Автор участвовал в оптимизации всех методов трансфекции МСК, подборе праймеров для ПЦР, иммунофенотипировании МСК. Автор сформулировала выводы и опубликовала статьи, отражающие основные результаты диссертационной работы.

Публикации

Работа отражена в 6-ти печатных работах – 4 статьи и 2 тезисов в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России соискателям ученой степени кандидата медицинских наук.

Внедрение результатов работы в клиническую практику

Результаты диссертационной работы внедрены в практику в Учреждении Российской академии медицинских наук Медико-генетическом научном центре РАМН. Полученные результаты используются при разработке протоколов транзientной трансфекции мультипотентных стромальных клеток человека с целью получения ткане-инженерных конструкций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, выводов, обсуждения и списка литературы (141 источник, в том числе 12 в отечественных изданиях). Работа изложена на 96 страницах машинописного текста, иллюстрирована 12 таблицами и 15 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры клеток. Культуры МСК-1 и МСК-2 были выделены из жировой ткани доноров женского пола, полученной в ходе плановой хирургической операции. От доноров были получены информированные согласия на использование клеток в эксперименте. Кусочки жировой ткани трижды промывали раствором PBS, добавляли равный объем коллагеназы I (0,3 Ед/мл) и инкубировали 1 час при 37⁰С, периодически помешивая. После чего нейтрализовали фермент полной ростовой средой (15 мл) и центрифугировали 10 минут на 2 тыс. об/мин. Осадок ресуспендировали в ростовой среде и культивировали в чашках Петри или флаконах 25-см² в полной ростовой среде: DMEM/F12 (ПанЭко, Россия), 10% FBS (Perbio NuClone, США), гепарин 8 Ед/мл (ПанЭко, Россия), L-глутамин 2мМ (ПанЭко, Россия), FGF-b 10нг/мл (ПанЭко, Россия), пенициллин/стрептомицин (ПанЭко, Россия) – при температуре 37⁰С и содержании CO₂ 5%. После выделения клеток культуральную среду меняли через сутки и далее каждые 3-4 дня. Культуры МСК-3 – МСК-7 были любезно предоставлены лабораторией генетики стволовых клеток МГНЦ РАМН (руководитель – Д.В. Гольдштейн). Источник тот же – жировая ткань. Культивирование проводили в тех же условиях, что описаны выше.

Иммунофенотипирование и дифференцировка этих культур клеток проводилась там же.

Дифференцировка клеток в адипо- и остеогенном направлениях. МСК культивировали в полной ростовой среде до конфлюентности 60-70%, после чего в среду добавляли 100 мкМ индометацина, 1 мкМ дексаметазона, 0,5 мкМ 1-метил-3-изобутилксантина и 10 мкг/мл инсулина (факторы дифференцировки в адипогенном направлении) и культивировали 20 дней. Для остеогенной дифференцировки добавляли 50 мкМ L-аскорбиновой кислоты фосфата, 10 мМ бета-глицерофосфата и 100 нМ дексаметазона и культивировали 17 дней. Среду меняли каждые 3-4 дня. После культивирования дифференцированные в адипогенном направлении клетки были фиксированы в метаноле и окрашены красителем Oil Red O (3 мг/мл Oil Red O в 60%-ном растворе изопропанола) в течение 15 минут. Дифференцированные в остеогенном направлении клетки были фиксированы в метаноле и окрашены красителем Alizarin Red (2% Alizarin Red в 0.1M NH₄OH; pH 5.4) в течение 15 минут.

Иммунофенотипирование клеток. Клетки дважды промывали раствором PBS, добавляли 0,2% раствор ЭДТА в PBS и инкубировали 10 минут, ЭДТА нейтрализовали равным объемом полной ростовой среды и центрифугировали 5 минут при 1000 rpm. Клеточный осадок ресуспендировали в PBS до конечной концентрации 10 млн./мл. На 1 млн. клеток добавляли 5 мкл флюоресцентно окрашенных антител (CD44, CD73, CD105, CD14, CD19), перемешивали на вортексе и инкубировали 30 минут на льду. Далее промывали раствором PBS и центрифугировали 5 минут при 2000 rpm, ресуспендировали в 500 мкл 1%-ного формальдегида и оценивали флюоресценцию на проточном цитометре Flowmax (Partec, Германия).

Трансфекция. Трансфекцию проводили плазмидой с геном *VEGF121* (*pS450VEGF121*), регулируемым CMV-промотором, любезно предоставленной профессором Б.С. Народицким (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Гамалеи Минздравсоцразвития РФ). Условия трансфекции были оптимизированы с помощью плазмиды *pEYFP-C1* (Clontech, США). Клетки (4-7-ой пассаж) в количестве 10⁵ ресуспендировали в 100 мкл буфера для электропорации (Eppendorf, Германия) и проводили электропорацию – 400В/мм, 55мкс с использованием электропоратора Multiporator (Eppendorf, Германия), после чего рассеивали по лункам 6-ти луночных планшетов или во флаконы 25см². Липофекцию с помощью Унифектина-56 (Unifect Group, Россия) проводили в культурах клеток конфлюентных до 60-70%. Соотношение Унифектина и плазмиды – 12 Ед.:6 мкг на чашку Петри диаметром

10см или культуральный флакон 25см². После обоих способов трансфекции среду меняли на следующий день, далее каждые 3-4 дня.

Выделение ДНК. На 1-е, 3-и, 6-е и 9-е сутки после трансфекции клетки промывали дважды раствором PBS, добавляли раствор трипсин-ЭДТА (ПанЭко, Россия), инкубировали 10 минут при 37⁰С, добавляли равный объем полной ростовой среды и центрифугировали 5 минут при 1,5 тыс. об/мин. Осадок дважды промывали PBS и считали количество клеток в камере Горяева. Выделение ДНК проводили с помощью набора «ДНК-Сорб-АМ» (ИнтерЛабСервис, Россия) по рекомендованному производителем протоколу. Образцы растворяли в ТЕ-буфере и хранили при t -20⁰С.

Выделение РНК. Клетки снимали с флаконов и чашек Петри, как описано выше. К клеточной суспензии добавляли 2,5 мл тризола и 0,5 мл хлороформа, перемешивали на вортексе и центрифугировали 20 мин. при 4⁰С на 4000 об/мин. Верхнюю фазу переносили в новую пробирку, добавляли равный объем смеси фенол-хлороформ и также центрифугировали. Верхнюю фазу переносили в новую пробирку, добавляли равный объем ледяного изопропанола и инкубировали при -20⁰С не менее часа. Далее центрифугировали 20 минут при 4⁰С на 12 тыс об/мин. Осадок растворяли в 0,3 мл GTV-буфера, переносили в новую пробирку, добавляли равный объем ледяного изопропанола и инкубировали не менее 30 минут при -20⁰С, после чего центрифугировали 20 минут (4⁰С, 12 тыс об/мин). К осадку добавляли 1 мл 75%-ного этанола и инкубировали при комнатной температуре 15 минут, центрифугировали 10 минут (4⁰С, 12 тыс об/мин). Осадок подсушивали на воздухе и растворяли в 100 мкл MilliQ. После этого проводили обработку DNase (Promega, Германия) по рекомендованному производителем протоколу.

Отрицательные контроли трансфекции. Из нетрансфицированных образцов всех культур выделяли ДНК и РНК, как описано выше.

Синтез кДНК. Реакция обратной транскрипции проводилась с помощью фермента M-MuLV (СибЭнзим, Россия) по протоколу, рекомендованному производителем.

ПЦР в реальном времени. В реакционную смесь (25 мкл), содержащую 300 нМ праймеров, 200 мкМ дНТФ, 3 мкМ Mg²⁺, 1xSYBR Green I (Invitrogene, США) и 0,04 Ед. Таq-полимеразы, вносили по 5 мкл ДНК. ПЦР в реальном времени проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Условия реакции: 95⁰С – 3 мин, 45х(95⁰С – 5 сек, 60⁰С – 10 сек, 72⁰С – 20 сек). Использованные праймеры представлены в табл. 1.

Рестрикция HindIII и EcoRI. Образцы ДНК и контрольные образцы по 300 нг, подлежащие исследованию метилирования, обрабатывали рестриктазами HindIII (фланкирующей CMV-промотор) или EcoRI при 37⁰С в течение 1 часа. После

рестрикции все образцы, кроме положительных контролей, очищали с помощью набора «ДНК-Сорб-АМ» (ИнтерЛабСервис, Россия). Образцы растворяли в ТЕ-буфере.

Таблица 1. Праймеры, использованные для ПЦР в реальном времени

Ген	Праймер	Последовательность (5'-3')	Продукт (п.н.)
<i>GAPDH</i>	F	AAGGTCGGAGTCAACGGATTT	259
	R	CCAGCATCGCCCCACTTGA	
<i>VEGF</i>	F	CCTTGCTGCTCTACCTCCAC	75
	R	GATGATTCTGCCCTCCTCCTT	
<i>Actin β</i>	F	CCTGGCACCCAGCACAAT	144
	R	GGGCCGGACTCGTCATAC	

Положительный контроль метилирования. Разрезанную плазмиду обрабатывали метилазой *M.SssI* в присутствии S-аденозилметионина (Сибэнзим, Россия) и инкубировали 3 часа при 37⁰С, далее добавляли такое же количество фермента и S-аденозилметионина и продолжали инкубацию в течение 3-х часов в тех же условиях. Выделяли ДНК с помощью набора «ДНК-Сорб-АМ» (ИнтерЛабСервис, Россия). Образцы растворяли в ТЕ-буфере.

Бисульфитная конверсия. Бисульфитная конверсия ДНК проводилась наборами EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN) и EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, США) по рекомендованным протоколам с изменениями: конверсия проводилась в амплификаторе Mastercycler personal (Eppendorf, Германия) в режиме периодической денатурации и инкубации (денатурация – 5 мин. при 95⁰С, инкубация – 25 мин. при 60⁰С, денатурация – 5 мин. при 95⁰С, инкубация – 1 час 25 мин. при 60⁰С, денатурация – 5 мин. при 95⁰С, инкубация – 2 часа 55 мин. при 60⁰С). Степень бисульфитной конверсии определялась программой QUMA (<http://quma.cdb.riken.jp>) на основе полноты конверсии свободных цитозинового оснований.

ПЦР для секвенирования. Предсказание расположения CpG-островков в CMV-промоторе генетической конструкции и подбор праймеров производился с использованием программы MethPrimer, доступной по адресу в Интернете <http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>. ПЦР проводили с праймерами на CMV-промотор. 5 мкл конвертированной ДНК (в разведении 10⁻¹) смешивали с 200 нМ каждого праймера (F – 5'-TGTTTTTTGTTTGTGTGTTGGA-3', R – 5'-АТАССААААСАААСТСССАТТА-3') в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 200 мкМ дНТФ и 0,04 Ед. Таq-полимеразы. Условия ПЦР: 2 мин – 95⁰С, 5x(10 сек – 95⁰С,

30 сек – 62⁰С, 30 сек – 72⁰С), 55х(10 сек – 95⁰С, 30 сек – 58⁰С, 30 сек – 72⁰С), 2 мин – 72⁰С. Для контролей – 20 циклов.

Выделение образцов для последующего секвенирования. Образцы, подлежащие секвенированию, подвергали электрофорезу в 1,8%-ном агарозном геле (0,9 г агарозы (ПанЭко, Россия) на 50 мл 1хТВЕ, окрашенном бромидом этидия в концентрации 0,5 мкг/мл) в однократном растворе ТВЕ. После электрофореза ампликон вырезали из геля и выделяли набором DNA Extraction Kit (Fermentas, ЕС) по рекомендованному производителем протоколу.

Секвенирование. Проводилось на 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Нуклеотидные последовательности анализировали с использованием программы Sequence Scanner v.1.0 (Applied Biosystems, США).

Подсчет кДНК и мРНК гена VEGF. Относительное количество *VEGF* в МСК рассчитывалось как отношение относительных концентраций *VEGF* и *GAPDH*, полученных в ходе ПЦР в реальном времени. Относительная концентрация по каждому гену рассчитывалась по формуле:

$$\text{Relative Quantity}_{\text{sample (GOI)}} = E_{\text{GOI}}^{(C_{T(\text{MIN})} - C_{T(\text{sample})})}$$

где

E – эффективность праймеров. Этот показатель рассчитывался по формуле (% эффективности*0,01)+1, при 100%-ной эффективности реакции этот показатель равен 2;

$C_{T(\text{MIN})}$ – средний показатель $C(t)$ для образца с минимальным средним $C(t)$ для целевого гена;

$C_{T(\text{sample})}$ – средний показатель $C(t)$ для образца;

GOI – целевой ген.

За относительное количество гена *VEGF* в образце брали отношение $RQ_{\text{VEGF}}/RQ_{\text{GAPDH}}$ для каждой копии каждого образца. Всего на одну точку (т.е. образец ДНК, выделенный в определенный день после трансфекции) использовали 4 реплики.

Относительное количество мРНК *VEGF* в МСК рассчитывалось методом нормализованной экспрессии по генам *GAPDH* и *Actin β* по формуле:

$$\text{Normalized Expression}_{\text{sample (GOI)}} = \frac{RQ_{\text{sample (GOI)}}}{(RQ_{\text{sample (Ref 1)}} \times RQ_{\text{sample (Ref 2)}} \times \dots \times RQ_{\text{sample (Ref n)}})^{\frac{1}{n}}}$$

где

RQ – относительное количество образца;

Ref – референсный ген в эксперименте;

GOI – целевой ген.

Расчеты производились с использованием программного обеспечения CFX96 (Bio-Rad, США).

Статистическая обработка. В исследовании использовали средние, доверительные интервалы и анализ корреляции, полученные с использованием программы Statistica 6.0 (StatSoft) и Microsoft Excel (Microsoft, США). Результаты считали достоверными, если $p < 0,05$. В работе также использовали непараметрический метод оценки достоверности – метод Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мультипотентность и фенотип МСК

Для доказательства «стволовости» МСК проводили дифференцировку и иммунофенотипирование клеток. При культивировании МСК в среде с факторами дифференцировки в адипо- и остеогенном направлении через 20 и 17 дней, соответственно, были получены дифференцированные клетки (рис. 1).

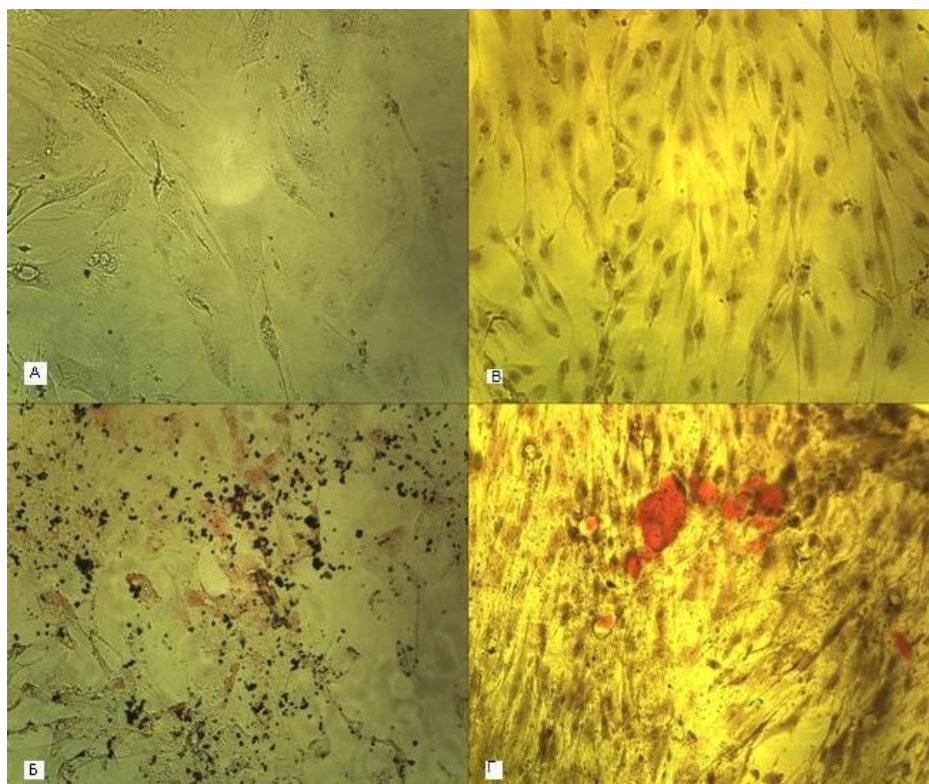


Рис. 1. Дифференцировка МСК. А – отрицательный контроль адипогенной дифференцировки; Б – дифференцировка в адипогенном направлении (окраска Oil Red O); В – отрицательный контроль остеогенной дифференцировки; Г – дифференцировка в остеогенном направлении (окраска Alizarin Red). Увеличение x100.

При окраске МСК антителами к поверхностным антигенам CD44, CD73, CD105, CD14, CD19 выявлено, что клетки экспрессируют на своей поверхности антигены, присущие МСК (табл. 2).

Таблица 2. Иммунофенотипирование МСК

Маркер	Позитивные клетки, %
CD44+	97
CD73+	97
CD105+	73
CD14-	0
CD19-	0

Таким образом, в наших исследованиях доказано, что клетки, выделенные из жировой ткани являются мультипотентными мезенхимными стромальными клетками, так как способны дифференцироваться в адипо- и остеогенном направлении и экспрессируют определенный, характерный для МСК, спектр поверхностных антигенов.

Результативность трансфекции

Эффективность трансфекции и функционирование плазмид с разными генами, по литературным данным, может отличаться (He J., 2005; Zhang X.Y., 2004). Поэтому, после отработки протокола трансфекции на плазмиде с репортерным геном, далее работа была сосредоточена на плазмиде с геном *VEGF*.

Под результативностью трансфекции в исследовании понимали уровень содержания ДНК гена *VEGF* (т.е. плазмидной ДНК) в МСК по отношению к геномной ДНК через сутки после трансфекции. Термин эффективность трансфекции предполагает знание процента трансфицированных клеток, и в данном случае использовать его некорректно.

Эффективность трансфекции в этом исследовании можно предполагать лишь косвенно на основе трансфекции этих же клеток плазмидой с геном желтого флюоресцентного белка (*eYFP*). При трансфекции МСК плазмидой с этим геном эффективность обоих методов составила 5-10%. Эти протоколы применяли для трансфекции плазмиды с геном *VEGF*. Вероятно, эффективность трансфекции для плазмиды с *VEGF* была не выше 10%.

Относительное количество плазмидной ДНК измеряли в образце ДНК, выделенном из трансфицированной или нетрансфицированной культуры. Для оценки элиминации плазмиды и экспрессии гена *VEGF* использовали одни и те же праймеры,

подобранные на кДНК гена, которая являлась вставкой в плазмиду. В образце ДНК, выделенном из трансфицированных клеток, амплификация проходила только с плазмидной ДНК, поэтому данные по содержанию плазмидной ДНК в образце, определенные таким образом, отражают действительное ее содержание.

Полученные данные по результативности трансфекции отражены на рис. 2. Как видно на гистограмме, культура МСК-4 не трансфицировалась ни одним из методов. Эта культура была одновременно трансфицирована с МСК-3, поэтому экспериментальную ошибку можно исключить. На наш взгляд, неэффективность обоих методов трансфекции в отношении МСК-4 можно объяснить индивидуальными особенностями либо донора, либо культуры клеток после ее выделения. Данная культура была исключена из анализа содержания плазмид в трансфицированных клетках.

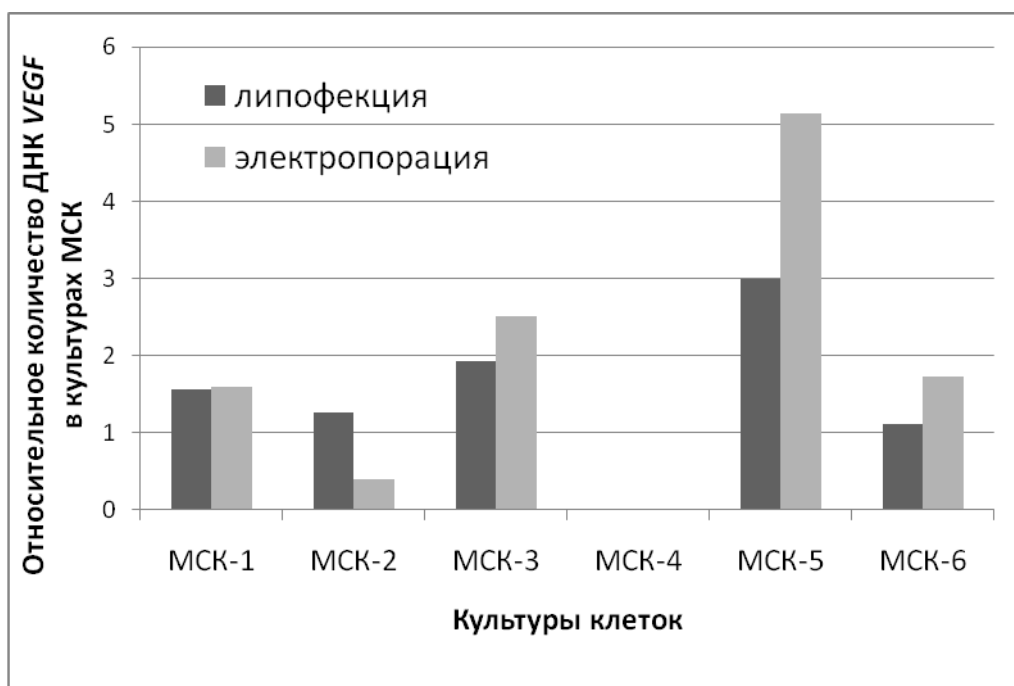


Рис. 2. Содержание ДНК VEGF в культурах МСК через сутки после трансфекции.

Результативность электропорации и липофекции невысокая, что может быть связано с низкой эффективностью обоих невирусных методов трансфекции или тем, что МСК являются трудно трансфицируемыми клетками. Возможно, дальнейшая оптимизация протоколов трансфекции поможет проводить более эффективное введение плазмиды в МСК.

Межкультуральные различия при трансфекции плазмиды с геном *VEGF*

При трансфекции МСК обоими методами выявлены культуральные различия в результативности трансфекции и динамике элиминации плазмид из клеток. Данные по относительному количеству плазмид в клетках разных культур в разные сроки после трансфекции представлены на рис. 3. Важно отметить, что все культуры МСК трансфицировали по одинаковым протоколам. Часто культуры трансфицировали в параллели, поэтому объяснить различное «поведение» культур можно лишь индивидуальными особенностями.

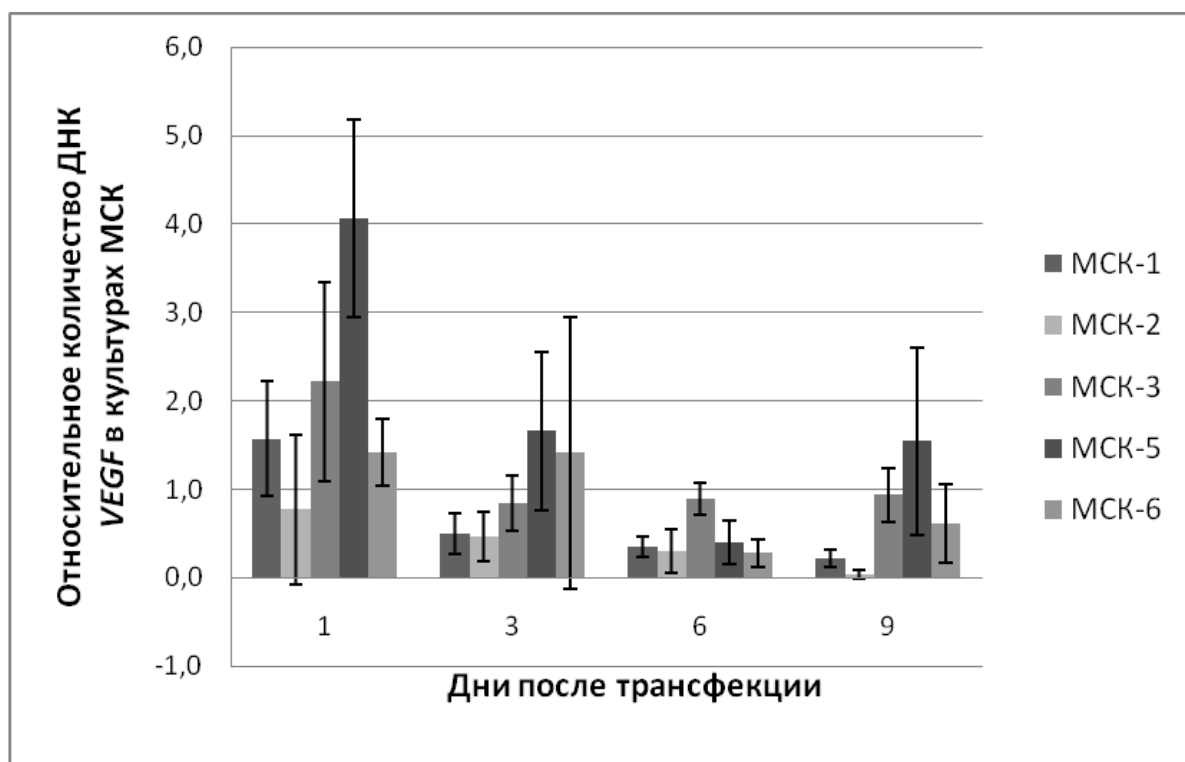


Рис. 3. Содержание ДНК *VEGF* в трансфицированных клетках на разные сроки после трансфекции (обобщенные данные по обоим методам трансфекции). Данные представлены как средние с доверительным интервалом.

По результатам исследования все культуры МСК можно условно разделить на плохо, хорошо и умеренно трансфицируемые. На рис. 3 отчетливо видно, что культура МСК-2 относится к плохо трансфицируемым. МСК-5 можно отнести к хорошо трансфицируемым культурам. Получены достоверные отличия этой культуры в результативности трансфекции от культур МСК-1, МСК-2 и МСК-6. Культуры МСК-1, МСК-3 и МСК-6 можно условно отнести к умеренно трансфицируемым.

Из данных, отраженных на рис. 3, можно предположить о существовании быстро и медленно элиминирующих культур. Так, на 6-ой день после трансфекции отмечено более медленное снижение *VEGF* в культуре МСК-3, по сравнению со всеми другими ($p < 0,05$). К 9-му дню различия этой культуры сохраняются только в отношении МСК-

1 и МСК-2. Содержание плазмид в клетках культуры МСК-5 также достоверно выше на 9-ый день, чем в культурах МСК-1 и МСК-2. Также обнаружены отличия между МСК-6 и МСК-2. Таким образом, культура МСК-3 показала себя как медленно элиминирующая плазмиду с геном *VEGF121*, а МСК-1 и МСК-2 – как быстро элиминирующие.

Культуры МСК отличаются друг от друга по результативности трансфекции и динамике элиминации плазмиды. Индивидуальные различия, на наш взгляд, не позволяют использовать один и тот же стандартный протокол трансфекции для всех культур. Возможно, дальнейшая оптимизация протоколов для каждой культуры клеток позволит получать большую результативность трансфекции.

Динамика элиминации плазмиды из МСК при липофекции и электропорации

С течением времени плазида элиминируется из клеток в соответствии с предположением о существовании быстро и медленно элиминирующих культур МСК. Однако даже на 9-ый день после липофекции плазида обнаруживается во всех культурах, в некоторых даже на сопоставимом уровне с 1-м днем.

При электропорации отмечены большие колебания в результативности трансфекции от 0,39 до 5,14 о.е. По этому показателю культура МСК-5 достоверно отличается от культур МСК-2 и МСК-6. В динамике элиминации прослеживаются культуры быстро и медленно элиминирующие плазмиды, однако элиминация происходит более быстрыми темпами, по сравнению с элиминацией при липофекции. К 9-му дню в двух культурах из пяти (МСК-2 и МСК-5) плазида не обнаруживается.

Таким образом, несмотря на явные различия культур между собой, при трансфекции в каждой культуре практически не выявляется различий в результативности и элиминации плазмиды при трансфекции разными методами.

Все культуры по каждому виду трансфекции представляли собой однородные группы, что позволило нам их объединять. Обобщенные данные отражены на рис. 4. Количество плазмид в трансфицированных клетках достоверно снижается к 3-му дню как при электропорации, так и при липофекции, далее содержание плазмид не различается.

Содержание плазмид в трансфицированных клетках во все сроки достоверно ($p < 0,05$) отличается от контрольных значений и не зависит от метода трансфекции. Как видно на гистограмме (рис. 4), по совокупным данным липофекция и электропорация не отличаются друг от друга ни в один из сроков после трансфекции, то есть результативность и динамика элиминации плазмид при использовании обоих методов сопоставима.

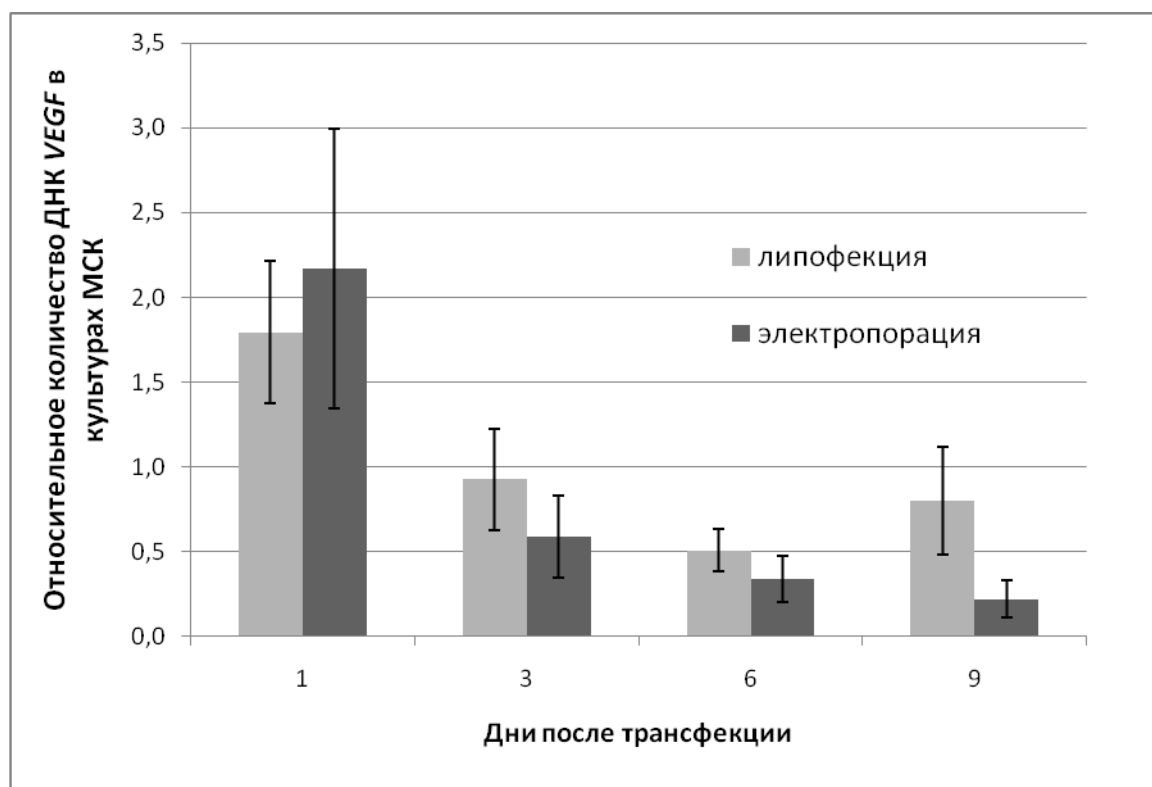


Рис. 4. Суммарные данные по всем культурам по содержанию плазмидной ДНК гена *VEGF* после трансфекции. Данные представлены как средние с доверительным интервалом.

Динамика экспрессии гена *VEGF*

Ген эндотелиального фактора роста сосудов в норме присутствует в геноме человека и экспрессируется. Такая экспрессия является базовой или контрольной. Совокупные данные по экспрессии *VEGF* в культурах МСК представлены в табл. 3.

Как следует из табл. 3, достоверных отличий в уровне экспрессии целевого гена для МСК-1 и МСК-2 не выявлено. В отличие от МСК-1, в МСК-2 наблюдаются колебания уровней экспрессии гена *VEGF* во всех трех группах, размахи колебаний намного превышают таковые в культуре МСК-1. Возможно, это объясняется индивидуальными различиями, так как культивирование проводилось одинаково для всех культур. При липофекции пик экспрессии приходится на 6-ой день, как и в контрольных образцах, для электропорации максимальный уровень отмечен на 3-ий день. Однако все различия, как и для культуры МСК-1, являются недостоверными.

В контрольных образцах МСК уровни экспрессии колеблются. Это можно объяснить тем, что в норме экспрессия *VEGF* колеблется в зависимости от различных условий, например, культивирования.

Таблица 3. Относительное содержание мРНК *VEGF* в культурах МСК на разных сроках после трансфекции

Культура	Метод	Содержание мРНК <i>VEGF</i> в культуре МСК ± ДИ			
		День 1	День 3	День 6	День 9
МСК-1	липофекция	1,12 ± 3,57	1,83 ± 2,37	1,76 ± 0,63	1,87 ± 0,94
	электропорация	6,06 ± 8,74	5,20 ± 5,35	4,69 ± 10,34	2,95 ± 16,16
	контроль	2,77 ± 3,3	1,19 ± 0,40	3,35 ± 3,35	4,41 ± 3,18
МСК-2	липофекция	1,32 ± 0,43	7,15 ± 17,70	11,89 ± 11,26	1,28 ± 0,83
	электропорация	3,33 ± 3,41	15,94 ± 27,17	5,20 ± 4,94	1,33 ± 0,76
	контроль	0,60 ± 0,21	1,23 ± 0,71	10,05 ± 22,29	2,32 ± 5,39
МСК-3	липофекция	6,24 ± 1,34*	1,48 ± 1,08	23,43 ± 7,50*	21,61 ± 17,71
	электропорация	8,35 ± 3,21*	2,43 ± 3,54	8,48 ± 11,25	16,08 ± 34,89*
	контроль	2,38 ± 1,99	2,28 ± 0,75	4,67 ± 2,31	6,73 ± 2,75
МСК-5	липофекция	0,57 ± 0,10	1,09 ± 0,66	0,73 ± 0,38	3,02 ± 0,72*
	электропорация	3,19 ± 1,17*	1,89 ± 1,48	0,47 ± 0,18	4,20 ± 2,53*
	контроль	1,11 ± 0,41	0,48 ± 0,20	0,51 ± 0,07	0,88 ± 0,32
МСК-6	липофекция	0,81 ± 0,47	0,79 ± 0,24*	1,21 ± 0,97	3,81 ± 2,84*
	электропорация	0,30 ± 0,09	0,09 ± 0,07	0,11 ± 0,10	1,39 ± 0,19*
	контроль	0,57 ± 0,47	0,18 ± 0,13	0,23 ± 0,22	0,65 ± 0,47

* $p < 0,05$, отличие от контрольного уровня

В культуре МСК-3, как и в МСК-2, отмечаются большие колебания уровней экспрессии *VEGF*, с преимущественным увеличением к 6-му и 9-му дням. При этом усиление экспрессии наблюдается как в трансфицированных, так и в нетрансфицированных клетках. Более того, базовый уровень экспрессии в контрольных образцах достоверно различен на 3-ий и 9-ый дни. Это еще раз подчеркивает тот факт, что экспрессия гена *VEGF* в норме колеблется в результате действия каких-либо эндо- или экзогенных причин. На наш взгляд, одной из причин может являться смена культуральной среды. Так, выделение РНК на 6-ой и 9-ый дни проводилось на 3-ий день культивирования после смены среды, тогда как при выделении на 3-ий день после трансфекции осуществлялось на 2-ой день после смены среды. Возможно, культивирование в обедненной факторами среде приводит к усиленной экспрессии определенных генов, в частности, гена *VEGF*. Для проверки этой гипотезы необходимо проведение дополнительных исследований.

Уровни экспрессии *VEGF* в МСК-3 после липофекции на 1-ый и 6-ой дни достоверно отличаются от контрольных. Также отмечено различие в уровне

экспрессии после электропорации на 1-ый и 9-ый дни. Полученные данные говорят в пользу того, что, скорее всего, трансфицированная в МСК-3 плазида увеличивает экспрессию гена *VEGF*, так как в тот же день контрольный уровень экспрессии ниже и объяснить усиление экспрессии какими-либо эндо- или экзогенными факторами нельзя, потому что они бы увеличили экспрессию и в контроле. Экспрессия *VEGF* в МСК-3 на 6-ой день после липофекции достоверно отличается от уровней экспрессии на 1-ый день после липофекции и электропорации.

В целом базовый уровень экспрессии в культуре МСК-5 ниже, чем в других, а колебания не такие выраженные. Вероятно, это обусловлено индивидуальными особенностями культуры. Экспрессия целевого гена на 1-ый день после электропорации и на 9-ый день после обоих методов трансфекции достоверно выше контрольных значений.

Для культуры МСК-6 получены достоверные различия в уровнях экспрессии *VEGF* от контрольных на 3-ий день после липофекции и на 9-ый день после электропорации и липофекции. Отмечено повышение экспрессии во всех трех группах к 9-му дню, для электропорации это повышение достоверное, относительно всех других дней.

При оценке корреляции между содержанием плазмид в клетках и уровнем экспрессии гена *VEGF* данных в пользу взаимосвязи этих параметров не получено. Корреляционный анализ проводили как с полученным уровнем экспрессии в трансфицированных клетках, так и с вычетом соответствующих контрольных значений экспрессии.

Полученное в работе небольшое повышение экспрессии *VEGF* и отсутствие корреляции «содержание плазмид – уровень экспрессии» может навести на мысль, что используемая в работе плазида содержит какой-либо дефект, приводящий к отсутствию или снижению транскрипции с нее. Однако плазида была проверена в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Гамалеи Минздравсоцразвития РФ и показала высокую активность при трансфекции куриных эмбрионов (Авдеева С.В., 2005).

Так же, как в данных по результативности трансфекции и элиминации, при анализе экспрессии *VEGF* отмечены большие индивидуальные различия. Лучше всего они видны на примере контрольных нетрансфицированных образцов (табл. 4).

Как видно из таблицы, на 1-ый день после культивирования колебания в уровне экспрессии составляют от 0,57 до 2,77 о.е., однако достоверных отличий нет. На 3-ий день разбросы значений уменьшаются, но уровень экспрессии *VEGF121* в культуре МСК-3 становится достоверно выше, чем в культурах МСК-5 и МСК-6. Эти же

различия можно наблюдать и в последующие дни. При этом уровни экспрессии на 6-ой и 9-ый дни в культурах МСК-1 и МСК-2 также повышаются, в отличие от культур МСК-5 и МСК-6, где экспрессия существенно не меняется. Вероятно, такое повышение экспрессии связано с индивидуальными особенностями культуры МСК-3. Похожие изменения для культуры МСК-3 обнаружены и в трансфицированных образцах.

Таблица 4. Относительное количество мРНК *VEGF* в контрольных образцах культур МСК в разные дни культивирования

Дни после трансфекции	Относительное количество мРНК <i>VEGF121</i> в культурах МСК, о.е.				
	МСК-1	МСК-2	МСК-3	МСК-5	МСК-6
1	2,77 ± 3,3	0,60 ± 0,21	2,38 ± 1,99	1,11 ± 0,41	0,57 ± 0,47
3	1,19 ± 0,40	1,23 ± 0,71	2,28 ± 0,75*	0,48 ± 0,20	0,18 ± 0,13
6	3,35 ± 3,35	10,05 ± 22,29	4,67 ± 2,31*	0,51 ± 0,07	0,23 ± 0,22
9	4,41 ± 3,18	2,32 ± 5,39	6,73 ± 2,75*	0,88 ± 0,32	0,65 ± 0,47

* $p < 0,05$, отличие от МСК-5 и МСК-6

Полученные данные по уровню экспрессии *VEGF* после трансфекции хорошо соотносятся с низкой результативностью обоих методов трансфекции для культур МСК. В клетки попадает мало плазмид, которые не могут привести к значимому увеличению экспрессии гена. С другой стороны, эффективность трансфекции тоже невысока, экспрессирующих клеток мало, поэтому суммарно уровень экспрессии в культуре клеток поднимается незначительно.

При анализе повышения уровня экспрессии гена *VEGF* возникает вопрос: не является ли это повышением экспрессии собственного гена МСК в ответ на какое-либо воздействие? Основными причинами могут быть:

1. Окислительный стресс на внеклеточную ДНК (например, плазмиду). Если этот факт имеет место, то экспрессия гена *VEGF* должна повышаться при трансфекции любой плазмиды, однако это не так. Из анализа литературы следует, что при трансфекции кератиноцитов плазмидой с *EGFP* экспрессия *VEGF* не повышается, в отличие от трансфекции этих же клеток плазмидой с *VEGF*. Трансфекцию проводили с помощью липофектамина (Rio M. D., 1999). С другой стороны, показано, что экспрессия эндогенного *VEGF* может повышаться при воздействии на TLR-рецептор 3 (Moon S. J., 2010). Данный тип рецепторов участвует в распознавании специфических компонентов микроорганизмов, приводя к сенсibilизации организма. В норме эти рецепторы реагируют только на патогены, такие как бактерии, грибы,

простейшие и вирусы. Поэтому маловероятно, что плаزمиды или реактивы для трансфекции активируют данные рецепторы.

2. Окислительный стресс как ответ на воздействие унифектина или электропорации. В ответ на такое влияние повышение экспрессии *VEGF* может происходить. Однако неясно, почему усиление происходит лишь на 9-ый день после трансфекции, а не сразу после воздействия на 1-ый день. Более того, культура МСК-4 была подвергнута обоим методам трансфекции, но неэффективно. Следовательно, в данной работе она может выступать неким контролем. Если бы экспрессия *VEGF* повышалась в ответ на действие самой процедуры трансфекции, то в этих «трансфицированных» клетках можно было наблюдать ее повышение. Однако усиление экспрессии отмечено только на 6-ой день после электропорации, а на 9-ый день экспрессия сопоставима с контрольным уровнем. Это может указывать на то, что экспрессия *VEGF* на 9-ый день повышается не из-за влияния самой трансфекции.

3. Повышение экспрессии в ответ на нахождение плазмиды в клетке. Эта причина маловероятна, так как трансфекция другими плазмидами, по данным литературы, не приводит к повышению экспрессии *VEGF* (Rio M. D., 1999).

4. Гипоксия. В норме гипоксия вызывает повышение экспрессии всех факторов, связанных с ангиогенезом, поэтому гипоксия может играть роль в повышении экспрессии *VEGF*. Все культуры клеток культивировали в условиях 20%-ного кислорода и 5%-ного углекислого газа. Культуры МСК-3 и МСК-4 культивировали в параллели, однако повышение экспрессии на 9-ый день отмечается лишь в МСК-3. Все трансфицированные клетки культивировали вместе с нетрансфицированными, но уровни экспрессии повысились лишь в трансфицированных клетках. Более того, гипоксией сложно объяснить повышение экспрессии лишь на 9-ый день, ведь клетки в таких же условиях культивировали на протяжении предыдущих 8-ми дней. Следовательно, гипоксия, скорее всего, не оказывает влияния на повышение уровня экспрессии *VEGF* в трансфицированных клетках на 9-ый день.

5. Усиление экспрессии *VEGF* под действием инсулина. Эту причину можно исключить, так как культивирование клеток проводили в среде без добавления инсулина.

6. Активация различных сигнальных путей под действие разных факторов. Например, активация пути NFκB при спонтанной остеогенной дифференцировке МСК. Или активация каскада реакций NFκB или ErbB под действием усиления экспрессии факторов роста клетками.

Основные причины, которые могли бы привести к повышению экспрессии

VEGF, в данной работе были исключены. Остались лишь маловероятные, выяснение которых требует проведения дополнительных исследований.

В работе удалось показать возможность повышения уровня экспрессии *VEGF* в культуре МСК в 5-6 раз после трансфекции такими безопасными методами, как липофекция и электропорация. Достаточно ли такого повышения экспрессии для регистрируемого и значимого терапевтического эффекта необходимо выяснять в исследованиях *in vivo*. Согласно литературным данным при аденовирусной трансфекции *VEGF165* в МСК и последующей трансплантации в зону ишемии, для терапевтического эффекта необходимо 15-тикратное превышение экспрессии в трансфицированных клетках, по отношению к контрольным значениям (Gao F., 2007). По другим данным, трансфекция эндотелиальных прогениторных клеток схожим вектором с *VEGF165* приводит лишь к 2-хкратному повышению экспрессии, но даже этого уровня достаточно для усиления роста сосудов (Meng Q.Y., 2010). Таким образом, результаты нашего исследования свидетельствуют о возможности разработки клинических протоколов подготовки трансфицированных невирусными методами МСК, способных продуцировать повышенные количества ангиогенных факторов.

Анализ метилирования промотора плазмиды

Данные по элиминации плазмиды из МСК указывают на то, что даже на 9-ый день в клетках определяется плазида, однако уровни экспрессии гена *VEGF* не везде повышаются. Более того, данных за корреляцию содержания плазмид в клетках и уровня экспрессии не получено. Поэтому возникает вопрос, не оказывает ли влияние на уровень экспрессии метилирование CMV-промотора. Известно, что метилирование играют ключевую роль в инактивации чужеродной ДНК.

Было проведено исследование метилирования CpG-островка CMV-промотора используемой генетической конструкции. В этом исследовании оценивали только метилирование в пределах выбранного CpG-островка.

Вопреки ожиданиям, сформированным после изучения литературы, усиление метилирования обнаружено не было. На рис. 5 представлена нуклеотидная последовательность образца ДНК, выделенного на 6-ой день после липофекции. На участке ДНК протяженностью 35 п.н. расположено 6 CpG-динуклеотидов, ни один из которых не метилирован. Данный участок выбран как показательный в качестве демонстрации того, как выглядели все последовательности образцов ДНК, выделенных из трансфицированных клеток на разных сроках.

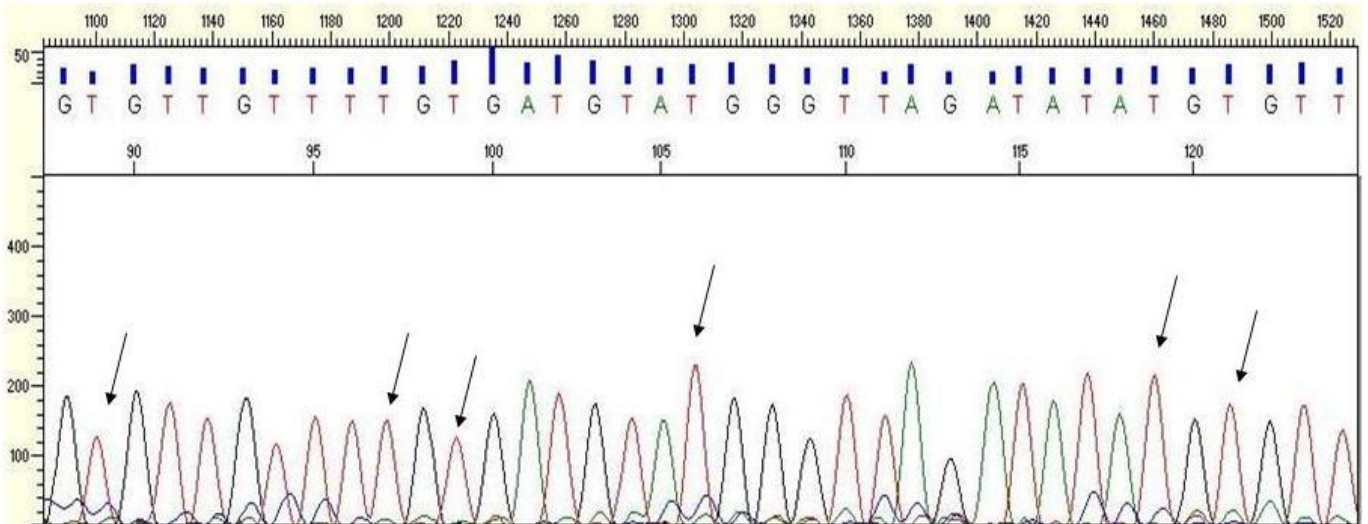


Рис. 5. Нуклеотидная последовательность образца ДНК, выделенного на 6-ой день после липофекции. Стрелками указано положение CpG-динуклеотидов.

В этом исследовании мы обнаружили лишь незначительное частичное метилирование нескольких CpG-пар (см. табл. 5).

Таблица 5. Метилирование CpG-динуклеотидов CMV-промотора после липофекции.

С – цитозин, Т – тимин

№ CpG-пары	1-ый день	3-ий день	6-ой день	Отрицательный контроль	Положительный контроль
2	Т	С	Т	Т	С
5	Т	Т	Т	Т	С
6	Т	Т	Т	Т	С
7	Т	Т	Т	Т	С
10	Т	Т	Т	Т	С
16	Т	Т	С	Т	С
17	Т	Т	Т	Т	С

Как следует из табл. 5, на 3-ий и 6-ой день после липофекции отмечено метилирование одного CpG-сайта (2-го и 16-го, соответственно). На наш взгляд, такой уровень метилирования не должен оказывать существенного влияния на экспрессию гена, который контролируется CMV-промотором.

В нашей работе проведена также оценка метилирования 4-х CpG-пар (2-ой, 5-ой, 6-ой и 7-ой) в CpG-островке CMV-промотора на 1-ый, 3-ий и 6-ой дни после электропорации. Степень бисульфитной конверсии для образцов от 1-го и 3-го дней составила 100%, для образца 6-го дня – 92,3%.

Данные по метилированию представлены в табл. 6.

Таблица 6. Метилирование CpG-динуклеотидов CMV-промотора после электропорации. С – цитозин, Т – тимин

№ CpG-пары	1-ый день	3-ий день	6-ой день	Отрицательный контроль	Положительный контроль
2	С	С	С	Т	С
5	Т	Т	Т	Т	С
6	Т	Т	Т	Т	С
7	Т	Т	С	Т	С

Как следует из табл. 6, CpG-динуклеотиды CMV-промотора лишь незначительно подвержены метилированию. Обращает на себя внимание тот факт, что метилирование обнаружено в том же 2-ом CpG-сайте, что и после липофекции. Оба раза в положении этого динуклеотида различали 2 пика (тиминовый и цитозиновый), что говорит в пользу частичного метилирования. Выявленный уровень метилирования, скорее всего, не должен отразиться на функционировании генетической конструкции.

Таким образом, на разных культурах, трансфицированных разными методами, нами получены результаты, свидетельствующие о незначительном частичном метилировании отдельных CpG-динуклеотидов. На наш взгляд, этих данных достаточно, чтобы сделать вывод о том, что метилирование CMV-промотора не играет существенной роли в низкой экспрессии гена *VEGF*.

Подводя итог всем исследованиям, проведенным в рамках этой работы, можно заключить, что липофекция и электропорация малоэффективны при трансфекции МСК плазмидой с геном *VEGF*. Эффективность этих методов не превышает 10%. В каждую клетку попадает небольшое количество плазмид, недостаточное для сильного повышения экспрессии гена *VEGF*. Однако в работе отмечено повышение уровня экспрессии *VEGF* в трансфицированных культурах к 9-му дню после трансфекции, что свидетельствует о функционировании введенной плазмиды. Полученное пятикратное повышение, по данным литературы, может быть достаточным для оказания терапевтического эффекта. Таким образом, даже такие малоэффективные методы трансфекции, как липофекция и электропорация, могут составить конкуренцию высокоэффективным вирусным методам трансфекции МСК. Очевидная безопасность первых в сочетании с терапевтически достаточным повышением экспрессии целевых генов заставляет продолжать разработки более эффективных вариантов их применения. Например, для усиления экспрессии трансфицированных

конструкций перспективным представляется использование полимеров. Так, показано, что применение полимера Плуроник Р85 при трансфекции увеличивает экспрессию трансгена в миоцитах, макрофагах и некоторых других клетках (Gaymalov Z.Z., 2009) за счет увеличения попадания плазмид в клетки и их транспорта (Pitard B., 2002) и за счет усиления транскрипции (Sriadibhatla S., 2006). Исследований по трансфекции МСК с полимерами не так много, но уже можно говорить об их противоречивости. При трансфекции МСК человека использование поликатионного полимера полиэтиленимина (PEI) существенно усиливает экспрессию хондрогенных факторов (Park J.S., 2011). По другим же сведениям, PEI более эффективны в отношении клеток HEK293, чем в МСК (Кудряшова Н.В., 2010). В любом случае, применение полимеров для трансфекции МСК – малоизученная область, требующая проведения многих разносторонних исследований.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены индивидуальные различия между культурами МСК в результативности трансфекции и динамике элиминации плазмид *pS450VEGF121* из клеток.
2. К 3-му дню количество плазмид, трансфицированных липофекцией и электропорацией, снижается ($p < 0,05$), после чего с 3-го по 9-ый день не изменяется.
3. Липофекция и электропорация не отличаются друг от друга по результативности и динамике элиминации плазмид из трансфицированных клеток.
4. Уровни экспрессии *VEGF* в половине культур МСК, трансфицированных липофекцией или электропорацией, повышаются; максимальный (в 5-6 раз) эффект наблюдается к 9-му дню.
5. Уровень экспрессии *VEGF* не связан со степенью метилирования промоторной области трансфицированной плазмиды введенного гена.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Смирнихина С. А., Лавров А. В. Методы оценки метилирования остатков цитозина в ДНК // **Молекулярная биология**. – 2009. – Т. 43, №3. – С. 387–391.
2. Смирнихина С. А., Лавров А. В. Оценка метилирования трансфицированной в мезенхимные стволовые клетки человека плазмиды с геном *VEGF121* // **Медицинская генетика** (тезисы докладов молодых ученых). – 2009. – Т. 8, № 12. – С. 31.
3. Смирнихина С. А., Лавров А. В. Эффективность электропорации и динамика элиминации плазмиды после трансфекции МСК человека // **Медицинская**

генетика (материалы VI съезда Российского общества медицинских генетиков). – 2010. – С. 167.

4. Лавров А. В., Смирнихина С. А. Гетерогенность ядер и пролиферативный потенциал МСК-подобных клеток в культуре стромально-васкулярной фракции жировой ткани // **Цитология**. – 2010. – Т. 52, № 8. – С. 616-620.

5. Смирнихина С. А. Экспрессия генов, трансфицированных в мезенхимные стволовые клетки человека // **Клеточная трансплантология и тканевая инженерия**. – 2010. – Т.5, № 4. – С. 16-23.

6. Смирнихина С. А., Лавров А. В., Бочков Н. П. Динамика элиминации плазмид и экспрессии гена *VEGF121*, трансфицированного в МСК человека разными методами // **Клеточные технологии в биологии и медицине**. – 2011. – № 1. – С. 17-21.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

кДНК – комплементарная ДНК

мРНК – матричная РНК

МСК – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки

п.н. – пара нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

b-FGF – фактор роста фибробластов β (от англ. fibroblast growth factor)

CMV – цитомегаловирус (здесь промотор плазмиды) (от англ. cytomegalovirus)

DsRed – ген красного флюоресцентного белка, выделенного из дискосомы (от англ. *Discosoma sp. red fluorescent protein*)

GAPDH – ген, кодирующий глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу (от англ. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

GFP – ген зеленого флюоресцентного белка (от англ. *green fluorescent protein*)

PEI – полиэтиленимин

VEGF121 – ген фактора роста эндотелия сосудов 121 (от англ. *vascular endothelial growth factor*)

YFP – ген желтого флюоресцентного белка (от англ. *yellow fluorescent protein*)