

А.В. ШАХБАЗОВ<sup>1</sup>, С.М. КОСМАЧЕВА<sup>2</sup>,  
Н.А. КАРТЕЛЬ<sup>1</sup>, М.П. ПОТАПНЕВ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск  
E-mail: shakhbazau@gmail.com

<sup>2</sup> Республиканский научно-практический центр гематологии  
и трансфузиологии, Минск

## ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ НА ОСНОВЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА : СТРАТЕГИИ И МЕТОДЫ



*Рассмотрены основные направления генетической модификации мезенхимальных стволовых клеток человека, а также наиболее распространенные методы доставки трансгена, в основном на примере мезенхимальных стволовых клеток костного мозга. Приведены результаты, полученные с применением различных методов трансфекции и основных типов рекомбинантных вирусов.*

© А.В. ШАХБАЗОВ, С.М. КОСМАЧЕВА, Н.А. КАРТЕЛЬ,  
М.П. ПОТАПНЕВ, 2010

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК), известные также как стромальные клетки костного мозга (КМ), являются плюрипотентной популяцией стволовых клеток взрослого организма, способных к дифференцировке в различные тканевые популяции (остеобласты, хондроциты, адипоциты, миобласты, гепатоциты и др. [1, 2]). МСК человека сохраняют способность к пролиферации и дифференцировке при культивировании *in vitro*, а также при реимплантации, что обуславливает их высокую значимость в клинической практике. В частности, показана возможность использования МСК в терапии инфаркта миокарда [3], инсульта [4], метахроматической лейкоцистозии [5] и др.

Терапевтический потенциал МСК может быть существенно расширен посредством введения в их геном одного либо нескольких трансгенов, которые обеспечивают выполнение нарушенных в организме реципиента функций, способствующих повышению стрессоустойчивости клеток и защите их от повреждающего действия иммунной системы реципиента. [6] Перспективы использования МСК как носителя терапевтических генов обуславливают необходимость оптимизации методов обеспечения эффективной доставки и стабильной экспрессии трансгенов.

Доставка трансгена в МСК, равно как и другие клеточные популяции, культивируемые *in vitro*, может осуществляться физическими методами (электропорация, биобаллистика, магнетофекция), химической трансфекцией с использованием различных ДНК-связывающих агентов, а также посредством векторов на основе рекомбинантных лентивирусов, аденовирусов, бакуловирусов и др. Химические и физические методы трансфекции МСК, как правило, обеспечивают транзистентный (за исключением протоколов, включающих селективный отбор) характер экспрессии трансгена. Их основными недостатками являются высокие показатели гибели клеток и относительно низкий выход трансфицированных клеток, т.е. эффективность трансфекции. Транзистентная трансфекция является оптимальной в ситуациях, не требующих долговременного функционирования трансгена и его встраивания в клеточный геном. В настоящее время получили развитие подходы с применением органических дендримеров, липосом и поликатионов различ-

ной структуры. Среди систем трансфекции МСК человека можно отметить нуклеофекцию — вариант электропорации, обеспечивающий, по данным Aluigi et al. [7], эффективность до 27,4 % с учетом существенно пониженной выживаемости. Нуклеофекция не влияет на иммунофенотип МСК КМ и их дифференцировочный потенциал. Для химических реагентов характерны несколько меньшие показатели эффективности — 3,6 % для реактива FUGENE6 и 5,4 % — для DOTAP [7], вместе с тем используемый нами Lipofectamine2000 достаточно стабильно дает выход трансфицированных МСК КМ взрослых доноров свыше 20 % [8].

Достаточно эффективным способом доставки трансгена в МСК является использование биологического механизма модификации клеточного генома — рекомбинантных вирусов. Для трансгенеза клеточных культур активно используются системы на основе онкоретровирусов, аденовирусов, лентивирусов, альфавирусов, герпесвирусов, бакуловирусов и ряда других. Для обеспечения стабильной долговременной экспрессии трансгена, как правило, используются системы на основе лентивирусов, онкоретровирусов либо адено-ассоциированных вирусов (AAV), поскольку они обеспечивают интеграцию трансгена в геном клетки-реципиента.

Необходимо отметить, что наработка рекомбинантных вирусов существенно превосходит химическую трансфекцию по трудоемкости. Одной из важных характеристик вирусной трансдукции является множественность инфекции (MOI, multiplicity of infection) — количество вирусных частиц на клетку-мишень, которое должно быть оптимальным либо достаточным для эффективной трансдукции. Так, если для лентивируса эффективная трансдукция МСК человека может быть достигнута при MOI = 10 (собственные данные; эффективность свыше 90 %), для бакуловируса этот показатель составляет 40 [9], для аденовируса может достигать 300 [10], а для адено-ассоциированного вируса — 1000–10000 [11, 12]. Использование вирусов также может быть сопряжено с риском активации иммунного ответа и рядом других побочных эффектов. В частности, потенциальными недостатками применения онкоретровирусов и лентивирусов в клинической

практике является случайная локализация встройки трансгена, способная вызвать определенную дестабилизацию генома, а также гипотетическая возможность реверсии к дикому типу вируса.

В последние годы все более широкое распространение получают векторы на основе лентивирусов и адено-ассоциированных вирусов (AAV), что обусловлено их широким спектром действия, низкой токсичностью и главное — способностью интегрировать трансген в хромосому, обеспечивая длительный срок экспрессии. AAV не является возбудителем каких-либо известных заболеваний и встраивает трансген в хорошо изученный локус AAVS1 на 19-й хромосоме. Stender et al. [12] показали возможность эффективного использования векторов на основе AAV для трансдукции МСК КМ человека, однако трансдукция МСК приемлемой эффективностью (до 65 %, [12]) была достигнута только повышением MOI до 10 000. В экспериментах указанных авторов экспрессия GFP в трансдуцированных клетках снижалась практически до нуля на 8-й день после трансдукции, тогда как наши данные свидетельствуют о стабильной экспрессии трансгена после AAV-трансдукции в течение не менее 1 мес. В то же время Kim et al. [11] осуществили трансдукцию МСК человека самокомплементарными AAV с эффективностью 66 % при MOI = 1000, что обеспечило стабильную экспрессию *in vivo* на протяжении 3 мес. В наших исследованиях эффективность трансдукции МСК КМ человека посредством AAV с MOI = 10 не превышала 4 %. Причиной этого может являться низкая концентрация на поверхности МСК рецепторов AAV — гепарин-сульфат протеогликана, особенности синтеза второй цепи ДНК вирусного генома и др. [13–15]. Вместе с тем существующие методы сортировки клеток посредством проточной цитометрии позволяют рассчитывать на обогащение популяции GFP-экспрессирующими трансдуцированными клетками, доводя их содержание при необходимости до 95 % и выше [16].

Ряд авторов описывают процедуру трансдукции МСК с использованием аденовирусного вектора, достоинством которого, несмотря на транзитный характер экспрессии трансгена, является большая пакующая способность

(до 36 кб). Поскольку МСК КМ человека считаются малочувствительными к трансдукции аденовирусами в силу недостатка Коксаки-аденовирусных рецепторов (CAR), обеспечение приемлемого уровня трансдукции достигается за счет различных модификаций поверхностных доменов белков аденовирусов [17]. Экспрессия трансгена в делящихся МСК при этом наблюдается до 3 нед с момента трансдукции [17]. В частности, полилизинная модификация С-конца фибринового домена позволила добиться более 95 % эффективности аденовирусной трансдукции при  $MOI = 300$  [10]. Группа Namada et al. [18] предложила использовать для трансдукции МСК КМ человека аденовирус с мутированным интегрин-связывающим мотивом RGD, что позволило обеспечить доставку трансгена BMP-2 с эффективностью, превышающей в 12 раз аналогичный показатель для дикого типа аденовируса [18]. Трансдукция МСК человека (КМ взрослых доноров) мутантным аденовирусом, несущим ген PIGF, который кодирует ростовой фактор плаценты, показала роль этого фактора в ангиогенезе и нейропротекции при церебральной ишемии [19]. Вместе с тем Hung et al. [20] сообщают об успешной (> 90 %) трансдукции немодифицированным аденовирусом недифференцированных МСК, отмечая снижение уровня экспрессии рецепторов CAR в процессе дифференцировки. Согласно данным Nixon et al. [21], описывающим экспрессию в МСК КМ гена инсулиноподобного фактора роста (IGF-1), оптимальная  $MOI$  для аденовирусной трансдукции МСК составляла 1000. Успешная аденовирусная трансдукция МСК КМ пациента, страдающего хронической миелоидной лейкемией (ХМЛ), была показана также Li et al. [22]. Гиперэкспрессия в МСК гена гамма-интерферона ( $hIFN-\gamma$ ) при  $MOI = 50$  привела к более чем пятикратному повышению апоптоза лейкемических клеток, что позволяет говорить о перспективности клинического применения упомянутого метода генной терапии ХМЛ [22].

Одной из многообещающих перспектив использования МСК КМ является направленный остеогенез, эффективность которого может быть существенно повышена генно-инженерными методами, в частности, экспрессией мор-

фогенных протеинов кости (BMP), в особенности остеогенным фактором BMP-2 [23–25]. Так, остеогенная дифференцировка и минерализация МСК была ускорена аденовирусной трансдукцией и экспрессией под CMV-промотором генов и в меньшей степени BMP-6 как в монослое, так и в альгинатном матриксе [26]. Kang et al. [27] для обеспечения остеогенной дифференцировки трансдуцировали МСК геном BMP-7. Трансфекция геном Smad8 линии МСК, экспрессирующей BMP-2, позволила также добиться морфологии и профиля экспрессии, характерных для клеток сухожилий [28].

Для трансдукции МСК человека геном BMP-2 успешно применялись также бакуловирусные векторы ( $MOI = 40$ ) [9]. Yi-Chen Ho et al. [29] показали, что МСК КМ и пуповинной крови человека могут быть трансдуцированы бакуловирусным вектором с эффективностью до 41,1 и 72,8 % соответственно, не теряя при этом способности к дифференцировке. Вместе с тем уровень и продолжительность экспрессии бакуловирусных векторов существенно варьирует на различных стадиях дифференцировки МСК. Показано, в частности, существенное снижение транскрипции трансгена в хондрогенных клетках-предшественниках в сравнении с адипогенными [30].

Одним из наиболее эффективных и удобных способов доставки трансгена в МСК является использование лентивирусных векторов, в частности на основе ВИЧ, обеспечивающее долговременную и стабильную экспрессию трансгена [31–33]. Так, доставка в МСК КМ гена ангиопоэтина Ang1 с помощью лентивирусного вектора и их последующая трансплантация на модели мышей привела к существенному снижению ЛПС-индуцированного повреждения легких [34]. Для трансдукции МСК человека ангиогенными факторами Ang1 и VEGF эффективно применяли также аденовирусные векторы [35]. Кроме того, лентивирусные векторы использовали для РНК-интерференции в МСК гена аденозин-киназы (АДК) как потенциального фактора терапии эпилепсии [36].

Ретровирусные векторы, также интегрирующие трансген в хромосому, используются для трансдукции активно делящихся типов клеток.

В частности, онко-ретровирусный вектор на основе MoMuLV позволил трансдуцировать МСК фетальной крови с эффективностью 80 % [37], в то же время эффективность трансдукции МСК фетальной крови лентивирусным вектором на основе ВИЧ-1 составила свыше 97 %. Кроме того, экспрессия трансгена в МСК при ретровирусной трансдукции упала до 48 % через 14 нед культивирования, тогда как при лентивирусной трансдукции 94 % клеток сохранили экспрессию GFP [37]. Hung et al. [38] также отметили снижение уровня экспрессии ретровирусного трансгена, тогда как согласно данным Lee [39], трансдуцированные ретровирусом МСК КМ взрослых доноров демонстрировали стабильную экспрессию IL-3 на терапевтическом уровне в течение не менее 6 мес. Ретровирусная трансдукция гена альфа-L-идуронидазы (IDUA) нормализовала уровень гликозаминогликанов в МСК КМ больного мукополисахаридозом IH [40]. Интродукция в МСК КМ гена *Indian hedgehog* (Ihh) также позволила значительно повысить уровень пролиферации ко-культивируемых ГСК [18]. Трансдукция МСК геном интерлейкина IL-7 обеспечила дозо-зависимый эффект на активацию и пролиферацию Т-лимфоцитов [41].

Пролиферация МСК, как и других первичных популяций, в культуре замедляется и со временем прекращается, что создает определенные ограничения на их использование в клиническом масштабе. В качестве решения упомянутой проблемы было предложено ввести в геном МСК иммортализирующие трансгены, например ген E6/E7 папилломавируса человека (HPV), большой антиген Т SV40, онкоген *ras* либо каталитическую субъединицу теломеразы человека hTERT [18]. В частности, МСК КМ, трансдуцированные геном hTERT, выращивали в культуре более 600 дней. Достигнуто было более 90 удвоений популяции с сохранением нормального кариотипа и длины теломер [18]. Ретровирусная трансдукция МСК КМ пожилого донора геном HPV16 E6/E7 также позволила получить иммортализованную линию без признаков неопластической трансформации [38]. Показано, что экспрессия указанных генов не влияет на дифференцировочный потенциал МСК [42]. Трансдукция МСК КМ ретровирусом, несущим гены Flt-3 лиганда и тром-

бопоэтина, обеспечивает длительную и стабильную поддержку роста гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток [43]. Аналогичными свойствами обладают иммортализованные МСК, трансдуцированные геном каталитической субъединицы теломеразы hTERT [18].

Генно-инженерная экспрессия в МСК КМ человека гена фактора VIII посредством ретровирусной трансдукции потенциально может способствовать эффективной терапии гемофилии А [44]. Введение в МСК КМ генов внутриклеточного домена рецептора Notch [45] либо *noggin* [46] способствовало расширению дифференцировочного потенциала трансгенных клеток, обеспечивая их дифференцировку в нейрональном направлении. Активно изучаются также свойства гиперэкспрессированных в МСК нейротрофинов. Трансплантация МСК, трансдуцированных геном нейротрофного фактора мозга (BDNF), показала повышенный защитный эффект трансгенных МСК в отношении ишемических повреждений мозга [18]. Аналогичный эффект показала интродукция в МСК человека трансгена GDNF, но не CNTF либо NT-3 [47]. Помимо стратегий, рассматривающих МСК в качестве клеток-мишеней для трансдукции, существуют также предложения использовать МСК как клетки-продуценты, в частности, рекомбинантных ретровирусов для трансплантации и последующей клеточно-генной терапии опухолей [48, 49].

Среди потенциальных негативных последствий генной терапии с использованием МСК можно указать риски, свойственные генной терапии в целом – иммуногенность вирусного вектора (например, в случае аденовируса) либо риск активации онкогенов и дестабилизации генома (в случае ретро- и лентивирусных векторов, интегрирующихся в геном). Также следует учитывать возможность инактивации трансгена в ходе дифференцировки клеток *in vivo*, упомянутую ранее [30, 38]. Эти риски дополняются опасностью онкотрансформации собственно стволовых клеток как при культуре *in vitro* (в особенности при использовании иммортализирующих трансгенов), так и при трансплантации *in vivo* (см. например [50]). Возможность подобных негативных последствий необходимо принимать во внимание при пла-

нировании клинического применения генной терапии с использованием стволовых клеток.

Технологии транзientной и стабильной экспрессии трангена находят свое применение в различных стратегиях генетической модификации МСК человека. В целом для трансдукции МСК человека были вполне успешно адаптированы различные типы рекомбинантных вирусов. Основными целями исследователей при этом являются обеспечение направленной дифференцировки МСК и улучшения функции получаемых клеток (например ангиогенеза), коррекция факторов отдельных патологий, контроль пролиферации клеток, а также ряд задач фундаментального характера. Развитие генно-терапевтических подходов на основе МСК позволит реализовать потенциал генной и тканевой инженерии в отношении терапии ряда заболеваний, а также расширить фундаментальное понимание принципов функционирования потенциально терапевтически полезных генов.

*A.V. Shakhbazov, S.M. Kosmacheva,  
N.A. Kartel, M.P. Potapnev*

GENE THERAPY BASED  
ON HUMAN MESENCHYMAL  
STEM CELLS:  
STRATEGIES AND METHODS

Major technologies of transient and stable transgene expression in hMSC are reviewed. Properties and efficiencies of recombinant lentiviruses, adenoviruses, AAV and baculoviruses used for hMSC transduction are compared. The aims of transgenesis include directed differentiation of hMSC, function improvement, correction of pathology factors and proliferation control, as well as many basic research challenges.

*A.V. Шахбазов, С.М. Космачева,  
Н.А. Картель, М.П. Потаннев*

ГЕННА ТЕРАПІЯ  
НА ОСНОВІ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ  
СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ:  
СТРАТЕГІЯ ТА МЕТОДИ

Узагальнено основні напрямки генетичної модифікації мезенхімальних стовбурових клітин людини, а також найбільш поширені методи доставки трансгена, в основному на прикладі мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку. Наведено результати, отримані із застосуванням різних методів трансферації та основних типів рекомбінантних вірусів.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Friedenstein A.J., Gorskaja J.F., Kulagina N.N.* Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs // *Exp. Hematol.* – 1976. – 4. – P. 267–274.
2. *Culture of human stem cells / Eds R.I. Freshney, G.N. Stacey, J.M. Auerbach.* – Hoboken : John Wiley & Sons, Inc., USA, 2007.
3. *Katritsis D.G., Sotiropoulou P.A., Karvouni E. et al.* Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium // *Catheter. Cardiovasc. Interv.* – 2005. – 65. – P. 321–329.
4. *Bang O.Y., Lee J.S., Lee P.H. et al.* Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients // *Ann. Neurol.* – 2005. – 57. – P. 874–882.
5. *Koc O.N., Day J., Nieder M. et al.* Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH) // *Bone Marrow Transplant.* – 2002. – 30. – P. 215–222.
6. *Prockop D.J.* Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues // *Science.* – 1997. – 276. – P. 71–74.
7. *Aluigi M., Fogli M., Curti A. et al.* Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells // *Stem Cells.* – 2006. – 24. – P. 454–461.
8. *Шахбазов А.В., Гончарова Н.В., Северин И.Н., Космачева С.М., Картель Н.А., Потаннев М.П.* Трансфекция мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека: катионные полимеры и липофекция // *Докл. НАН Беларуси.* – 2008. – 52, № 5. – С. 106–109.
9. *Chuang C.K., Sung L.Y., Hwang S.M. et al.* Baculovirus as a new gene delivery vector for stem cell engineering and bone tissue engineering // *Gene Ther.* – 2007. – 14. – P. 1417–1424.
10. *Mizuguchi H., Sasaki T., Kawabata K. et al.* Fiber-modified adenovirus vectors mediate efficient gene transfer into undifferentiated and adipogenic-differentiated human mesenchymal stem cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – 332. – P. 1101–1106.
11. *Kim S.J., Lee W.I., Heo H. et al.* Stable gene expression by self-complementary adeno-associated viruses in human MSCs // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – 360. – P. 573–579.
12. *Stender S., Murphy M., O'Brien T. et al.* Adeno-associated viral vector transduction of human mesenchymal stem cells // *Eur. Cell Mater.* – 2007. – 13. – P. 93–99.
13. *Ferrari F.K., Samulski T., Shenk T. et al.* Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors // *J. Virol.* – 1996. – 70. – P. 3227–3234.
14. *Hauck B., Zhao W., High K. et al.* Intracellular viral

- processing, not single-stranded DNA accumulation, is crucial for recombinant adeno-associated virus transduction // *J. Virol.* – 2004. – **78**. – P. 13678–13686.
15. *Summerford C., Samulski R.J.* Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions // *J. Virol.* – 1998. – **72**. – P. 1438–1445.
  16. *Meyer K., Irminger J.C., Moss L.G. et al.* Sorting human beta-cells consequent to targeted expression of green fluorescent protein // *Diabetes.* – 1998. – **47**. – P. 1974–1977.
  17. *Knaan-Shanzer S., van de Watering M.J. et al.* Endowing human adenovirus serotype 5 vectors with fiber domains of species B greatly enhances gene transfer into human mesenchymal stem cells // *Stem Cells.* – 2005. – **23**. – P. 1598–1607.
  18. *Hamada H., Kobune M., Nakamura K. et al.* Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy // *Cancer Sci.* – 2005. – **96**. – P. 149–156.
  19. *Liu H., Honmou O., Harada K. et al.* Neuroprotection by PIGF gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischaemia // *Brain.* – 2006. – **129**. – P. 2734–2745.
  20. *Hung S.C., Lu C.Y., Shyue S.K. et al.* Lineage differentiation-associated loss of adenoviral susceptibility and Coxsackie-adenovirus receptor expression in human mesenchymal stem cells // *Stem Cells.* – 2004. – **22**. – P. 1321–1329.
  21. *Nixon A.J., Brower-Toland B.D., Bent S.J. et al.* Insulinlike growth factor-I gene therapy applications for cartilage repair // *Clin. Orthop. Relat Res.* – 2000. – P. S201–S213.
  22. *Li X., Lu Y., Huang W. et al.* In vitro effect of adenovirus-mediated human Gamma Interferon gene transfer into human mesenchymal stem cells for chronic myelogenous leukemia // *Hematol. Oncol.* – 2006. – **24**. – P. 151–158.
  23. *Tsuda H., Wada T., Ito Y. et al.* Efficient BMP2 gene transfer and bone formation of mesenchymal stem cells by a fiber-mutant adenoviral vector // *Mol. Ther.* – 2003. – **7**. – P. 354–365.
  24. *Partridge K., Yang X., Clarke N.M. et al.* Adenoviral BMP-2 gene transfer in mesenchymal stem cells: in vitro and in vivo bone formation on biodegradable polymer scaffolds // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – **292**. – P. 144–152.
  25. *Cheng S.L., Lou J., Wright N.M. et al.* In vitro and in vivo induction of bone formation using a recombinant adenoviral vector carrying the human BMP-2 gene // *Calcif. Tissue Int.* – 2001. – **68**. – P. 87–94.
  26. *Zachos T.A., Shields K.M., Bertone A.L.* Gene-mediated osteogenic differentiation of stem cells by bone morphogenetic proteins-2 or -6 // *J. Orthop. Res.* – 2006. – **24**. – P. 1279–1291.
  27. *Kang Y., Liao W.M., Yuan Z.H. et al.* In vitro and in vivo induction of bone formation based on adeno-associated virus-mediated BMP-7 gene therapy using human adipose-derived mesenchymal stem cells // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2007. – **28**. – P. 839–849.
  28. *Hoffmann A., Pelled G., Turgeman G. et al.* Neotendon formation induced by manipulation of the Smad8 signalling pathway in mesenchymal stem cells // *J. Clin. Invest.* – 2006. – **116**. – P. 940–952.
  29. *Ho Y.C., Chung Y.C., Hwang S.M. et al.* Transgene expression and differentiation of baculovirus-transduced human mesenchymal stem cells // *J. Gene Med.* – 2005. – **7**. – P. 860–868.
  30. *Lee H.P., Ho Y.C., Hwang S.M. et al.* Variation of baculovirus-harbored transgene transcription among mesenchymal stem cell-derived progenitors leads to varied expression // *Biotechnol. Bioeng.* – 2007. – **97**. – P. 649–655.
  31. *Kallifatidis G., Beckermann B.M., Groth A. et al.* Improved lentiviral transduction of human mesenchymal stem cells for therapeutic intervention in pancreatic cancer // *Cancer Gene Ther.* – 2008. – **15**. – P. 231–240.
  32. *Van Damme A., Thorrez L., Ma L. et al.* Efficient lentiviral transduction and improved engraftment of human bone marrow mesenchymal cells // *Stem Cells.* – 2006. – **24**. – P. 896–907.
  33. *Zhang X.Y., La Russa V.F., Bao L. et al.* Lentiviral vectors for sustained transgene expression in human bone marrow-derived stromal cells // *Mol. Ther.* – 2002. – **5**. – P. 555–565.
  34. *Xu J., Qu J., Cao L. et al.* Mesenchymal stem cell-based angiopoietin-1 gene therapy for acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice // *J. Pathol.* – 2008. – **214**. – P. 472–481.
  35. *Klopper J., Lindenmaier W., Fiedler U. et al.* High efficient adenoviral-mediated VEGF and Ang-1 gene delivery into osteogenically differentiated human mesenchymal stem cells // *Microvasc. Res.* – 2008. – **75**. – P. 83–90.
  36. *Ren G., Li T., Lan J.Q. et al.* Lentiviral RNAi-induced downregulation of adenosine kinase in human mesenchymal stem cell grafts: a novel perspective for seizure control // *Exp. Neurol.* – 2007. – **208**. – P. 26–37.
  37. *Chan J., O'Donoghue K. et al.* Human fetal mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery // *Stem Cells.* – 2005. – **23**. – P. 93–102.
  38. *Hung S.C., Yang D.M., Chang C.F. et al.* Immortalization without neoplastic transformation of human mesenchymal stem cells by transduction with HPV16 E6/E7 genes // *Int. J. Cancer.* – 2004. – **110**. – P. 313–319.
  39. *Lee K., Majumdar M.K., Buyaner D. et al.* Human mesenchymal stem cells maintain transgene expression during expansion and differentiation // *Mol. Ther.* – 2001. – **3**. – P. 857–866.

40. Baxter M.A., Wynn R.F., Deakin J.A. et al. Retrovirally mediated correction of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with mucopolysaccharidosis type I // *Blood*. – 2002. – **99**. – P. 1857–1859.
41. Sportoletti P., Del Papa B., De Ioanni M. et al. Interleukin-7-engineered mesenchymal cells: in vitro effects on naive T-cell population // *Biol. Blood Marrow Transplant*. – 2006. – **12**. – P. 1250–1260.
42. Osyczka A.M., Noth U., O'Connor J. et al. Multilineage differentiation of adult human marrow progenitor cells transduced with human papilloma virus type 16 E6/E7 genes // *Calcif. Tissue Int.* – 2002. – **71**. – P. 447–458.
43. Xie C.G., Wang J.F., Xiang Y. et al. Marrow mesenchymal stem cells transduced with TPO/FL genes as support for ex vivo expansion of hematopoietic stem/progenitor cells // *Cell Mol. Life Sci.* – 2005. – **62**. – P. 2495–2507.
44. Van Damme A., Chuah M.K., Dell'Accio F. et al. Bone marrow mesenchymal cells for haemophilia A gene therapy using retroviral vectors with modified long-terminal repeats // *Haemophilia*. – 2003. – **9**. – P. 94–103.
45. Dezawa M., Kanno H., Hoshino M. et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation // *J. Clin. Invest.* – 2004. – **113**. – P. 1701–1710.
46. Kohyama J., Abe H., Shimazaki T. et al. Brain from bone: efficient «meta-differentiation» of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent // *Differentiation*. – 2001. – **68**. – P. 235–244.
47. Kurozumi K., Nakamura K., Tamiya T. et al. Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model // *Mol. Ther.* – 2005. – **11**. – P. 96–104.
48. Okada T., Ozawa K. Vector-producing tumor-tracking multipotent mesenchymal stromal cells for suicide cancer gene therapy // *Front Biosci.* – 2008. – **13**. – P. 1887–1891.
49. Silva F.H., Nardi N.B. From leading role to the backstage: mesenchymal stem cells as packaging cell lines for in situ production of viral vectors // *Med. Hypotheses*. – 2006. – **67**. – P. 922–925.
50. Amariglio N., Hirshberg A., Scheithauer B.W., Cohen Y. et al. Donor-Derived Brain Tumor Following Neural Stem Cell Transplantation in an Ataxia Telangiectasia Patient // *PLoS Medicine*. – 2009. – **6/2**. – P. 221–231.

Поступила 23.10.08