

Эффективная трансдукция стромальных клеток жировой ткани человека с помощью рекомбинантного аденоассоциированного вируса

Е.К. Шевченко¹, П.И. Макаревич², З.И. Цоколаева¹, Е.И. Ратнер¹, Е.В. Парфенова^{1,2}

¹ Институт экспериментальной кардиологии ФГУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи

² Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Effective Transduction of Human Adipose Stromal Cells by a Recombinant Adeno-Associated Virus

E.K. Shevchenko¹, P.I. Makarevich², Z.I. Tsokolaeva¹, E.I. Ratner¹, E.V. Parfionova^{1,2}

¹ The Institute of Experimental Cardiology of the FSI Russian Cardiology Research-and-Production Complex of the Federal Agency of High-Tech Medical Care

² The Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University

Наиболее перспективное направление в клеточной трансплантологии — использование генетически модифицированных клеток — своеобразный альянс клеточной и генной терапии. Стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ) благодаря возможности выделения их в большом количестве у пациентов при минимальном хирургическом вмешательстве, а также высокому уровню экспрессии ими различных митогенных, антиапоптотических и ангиогенных факторов могут стать важнейшим инструментом клеточной терапии сердечно-сосудистых заболеваний. В данной работе изучена возможность генетического модифицирования СКЖТ человека с помощью плазмидных конструкций и рекомбинантного аденоассоциированного вируса (рААВ).

СКЖТ человека выделяли из жировой ткани доноров, взятой при хирургической операции. Клетки на ранних пассажах трансфицировали плазмидой pcDNA3GFP, используя различные протоколы, а также трансдуцировали рААВ, несущим ген зеленого флуоресцентного белка (GFP), либо VEGF. Эффективность трансдукции клеток определяли микроскопическим анализом и методом проточной цитофлуориметрии. Уровень экспрессии трансгена анализировали с помощью иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга.

С помощью проточной цитофлуориметрии определили наличие в популяции СКЖТ клеток, которые несут на своей поверхности гепарансульфат протеогликан, рецептор, через который происходит связывание вируса с клеткой. Было показано, что 55–65% популяции СКЖТ экспрессируют данный белок. Эффективность трансдукции СКЖТ рекомбинантным вирусом, выраженная в процентном содержании флуоресцирующих, GFP-позитивных, клеток, составила $60 \pm 7\%$. Флуоресценцию GFP наблюдали, в течение месяца. Клетки, трансдуцированные вирусом с VEGF, секретируют в 20–30 раз больше белка по сравнению с немодифицированными клетками.

Впервые показана возможность использования рекомбинантного адено-ассоциированного вируса человека для эффективной доставки терапевтического гена в стромальные клетки жировой ткани человека.

Ключевые слова: стромальные клетки, трансдукция.

Введение

Одно из наиболее перспективных направлений развития клеточной трансплантологии связано с использованием генетически модифицированных клеток — своеобразный альянс клеточной и генной терапии. Этот подход позволяет объединить достоинства обеих методик и нейтрализовать их недостатки. Введение аутологических генетически модифицированных клеток, продуцирую-

щих, например, фактор роста, не вызывает такого сильного иммунного ответа организма, как в случае прямого введения в ткань гена этого фактора в вирусном векторе. При прямом переносе генетического материала с помощью плазмидных или вирусных векторов не всегда можно с уверенностью ожидать эффективной трансдукции клеток ткани. Кроме того, существует вероятность возможных побочных эффектов в результате

Despite the initial indications of positive therapeutic effects in cell therapy there are still limitations in numbers of autologous cell populations available without significant ex vivo expansion. Autologous adipose stromal cells (ASC) transplantation due to sufficient cell numbers, their multipotency and the ability to secrete angiogenic growth factors may become an alternative tool to treat cardiovascular diseases. In this study we investigated the ability to efficiently transfer gene into such cells using plasmid and recombinant adeno-associated virus (rAAV).

Human ASC were isolated from adipose tissue obtained from different donors during surgical operations. Low passaged cells were transduced using gene delivery system (Stratagene) based on recombinant adeno-associated virus (rAAV) serotype 2 encoding human vascular endothelial growth factor (VEGF) or green fluorescent protein (GFP). Transduction efficiencies and transgene expression level in ASCs were analyzed by quantitative flow cytometry and ELISA.

ASC population was analysed for heparan sulfate proteoglycan expression, the main cellular AAV binding receptor. It was found that 55–65% of human ASC population express this receptor. The efficiency of ASC transduction using AAV delivery system was found to be $60 \pm 7\%$. GFP expression was visible during a month. Relative to control, cells transduced by VEGF rAAV vector increased VEGF secretion level by at least 20–30 fold as compared to unmanipulated ASC.

Recombinant adeno-associated virus provides efficient tools for ex vivo modification of human ASCs.

Key words: stromal cells, transduction.

e-mail: e-shevchenko@mail.ru

трансдукции других типов клеток, не являющихся в конкретной задаче мишенями для генной манипуляции. Модифицируя клетки *ex vivo*, эффективность доставки в них генетической информации, экспрессии и секреции белка можно контролировать до введения в организм, что повышает эффективность и безопасность переноса генетического материала. Одной из проблем клеточной терапии, является то, что клетки для трансплантации не всегда можно получить в достаточном количестве. Модифицируя клетки можно добиться увеличения терапевтического эффекта при использовании меньшего количества клеток.

Простота получения достаточного количества клеток и возможность генетически модифицировать эти клетки *in vitro* имеют большое значение для клеточной терапии. Одним из перспективных источников клеточного материала является жировая ткань, а именно выделяемые из нее клетки стромально-васкулярной фракции, содержащие прогениторные мезенхимальные клетки — стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ). Эти клетки получают ферментативной обработкой жировой ткани с последующим культивированием прикрепившихся к пластику клеток. Существенным преимуществом СКЖТ является возможность получения их в большом количестве у пациентов при минимальном хирургическом вмешательстве. Пластичность СКЖТ проявляется в их способности к адипоцитарной, остеогенной, хондрогенной [1] и другим видам дифференцировки [2–4]. Их регенеративные свойства обусловлены экспрессией и секрецией различных митогенных, антиапоптотических и ангиогенных факторов [5, 6]. Получены экспериментальные данные о высоком ангиогенном потенциале этих клеток. Внутривенное или локальное введение СКЖТ человека способствует восстановлению кровотока и предотвращению развития дистального некроза ишемизированной конечности мыши [6, 7], а при подкожном введении в матриксе стимулируют развитие сосудистой сети в сформированных имплантатах [6, 8].

Наиболее эффективным инструментом генетической модификации клеток являются рекомбинантные вирусные векторы, среди которых особое внимание привлекают векторы на основе аденоассоциированного вируса. Этот вирус относится к семейству Парвовирусов, является одним из самых маленьких вирусов эукариот. Аденоассоциированный вирус не способен к автономной репликации, для его размножения необходима коинфекция клетки вирусом-помощником, например аденовирусом [9].

Векторы на основе аденоассоциированного вируса обладают рядом преимуществ, делающими их сравнительно безопасными и эффективными инструментами как для прямого переноса генетического материала, особенно в мышечную ткань, так и для непрямого переноса с помощью клеток.

Инвертированные концевые повторы вирусного генома являются единственными *cis*-элементами, необходимыми для репликации вируса. Все остальные белки, необходимые для репликации, действуют *in trans*. Таким образом, рекомбинантный аденоассоциированный вирус (рААВ) не содержит последовательностей вирусных белков, что делает его потенциально более безопасным, чем лентивирусные и аденовирусные векторы. Аденоассоциированные вирусы способны заражать как делящиеся, так и неделящиеся клетки [9, 10]. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус в клетке существует преимущественно в эпизомальном состоянии, а интеграция в хроматин происходит с очень низкой

вероятностью, что существенно снижает опасность инсерционного мутагенеза [11, 12]. Однако экспрессия трансгена сохраняется на протяжении месяцев. На сегодняшний день не выявлено ни одной болезни человека, связанной с заражением этими вирусами, что также является преимуществом по сравнению с другими вирусными векторами. Более того, благодаря природному инфицированию у 80–90% человеческой популяции в крови циркулируют нейтрализующие антитела к вирусу [13, 14]. Это, однако, ограничивает использование рААВ *in vivo*. К тому же данный вирус обладает ярко выраженным тропизмом к определенным типам клеток, что определяется наличием на их поверхности различных рецепторов [9, 15].

В работе изучена возможность генетического модифицирования стромальных клеток жировой ткани человека с помощью плазмидных генетических конструкторов с использованием различных трансфецирующих агентов и рААВ. Показана высокая эффективность трансдукции СКЖТ с помощью рекомбинантного аденоассоциированного вируса. В клетках, трансдуцированных вирусным вектором, кодирующим ген фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF), в десятки раз увеличилась секреция данного белка.

Материалы и методы

Выделение и культивирование стромальных клеток жировой ткани человека. СКЖТ человека выделяли из образцов подкожной жировой ткани, полученной во время хирургических операций у 10 пациентов женского пола в возрасте 48–60 лет. Для этого ткань гомогенизировали и подвергали ферментативной обработке, инкубируя в растворе, содержащем коллагеназу (200 ед/мл, Sigma, США) и диспазу (30 ед/мл, Invitrogen, США) в течение 90 мин при 37°C. Далее клеточную суспензию центрифугировали при 300 g в течение 5–10 мин. Осадок, представляющий собой стромально-васкулярную фракцию клеток, ресуспендировали в среде DMEM с 10% фетальной сыворотки быка (Invitrogen, США) и фильтровали через мембрану с диаметром поры 40 мкм. Суспензию клеток повторно центрифугировали, а полученный осадок ресуспендировали в среде культивирования Basic Media for Human Undifferentiated Mesenchymal Stem Cells (BMHUMSC, HyClone, США) с добавлением 10% Stem Cells Growth Supplement (SCGS, HyClone, США) и антибиотиков (100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, Invitrogen, США). Клетки высаживали на чашки Петри и культивировали в течение 36–48 ч. Неприкрепленные клетки отбирали, после чего на чашку наносили свежую среду культивирования. Смену среды проводили раз в 2–3 дня, при достижении 60–80% монослоя клетки рассаживали, используя растворы Версена (Биолот, РФ) и HyQtase (HyClone, США).

Трансфекция клеток. СКЖТ человека трансфецировали плазмидой pcDNA3-GFP. Для трансфекции клеток использовали реагенты Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США), Fugene 6 (Roche, США). Трансфекцию проводили по протоколам производителей, варьируя соотношение ДНК/трансфецирующий агент. Для кальций-фосфатной трансфекции 10 мкг плазмидной ДНК (в растворе с концентрацией 1 мг/мл) смешивали с 1 мл раствора 0,3M CaCl₂. Смесь ДНК/CaCl₂ по каплям добавляли к 1 мл раствора 2'CHBS (50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH = 7,10), инкубировали не более 3 минут и переносили в среду культивирования клеток, растущих на чашке Петри диаметром 100 мм. Через 6–8 ч меняли среду культивирования на свежую.

Проточная цитофлуориметрия. Методом проточной цитофлуориметрии с помощью клеточного анализатора MoFlo (DakoCytomation, США) определяли количество флуоресцирующих клеток в культуре, а также экспрессию СКЖТ человека гепарансульфат протеогликана. Для этого использовали антитела против человеческого CD138-PE (Dako Cytomation, США). Окрашивание клеток проводили по протоколу производителя.

Конструирование рекомбинантной вирусной плазмиды, кодирующей ген человеческого VEGF165. Ген VEGF165 человека (размер 600 п.о.) был вырезан с помощью рестриктаз Hind 3 и EcoR1 (Fermentas, Латвия) из плазмиды pcDNA3-hVEGF, полученной ранее в лаборатории. Также из плазмиды pCMV-Luc-KEB (предоставленной ООО «Мона», РФ) с помощью рестриктаз EcoR1 и Xho1 (Fermentas, Латвия) был вырезан участок гена люциферазы (1200 п.о.), который не содержит сайтов инициации трансляции и сайтов РНК-терминации. В дальнейшем VEGF165 и участок гена люциферазы в результате лигирования были клонированы в вирусный вектор pAAV-MCS (Stratagene, США), процессированный рестриктазами Hind3 и Xho1. Встраивание наряду с hVEGF участка гена люциферазы, в качестве буферной ДНК, необходимо для увеличения размера вставки. Размер вставки для данной вирусной системы должен быть 1000–3000 п.о., что является оптимальным для правильной инкапсидации вируса. Полученную плазмиду pAAV-hVEGF наращивали в бактериальных клетках DH5 α и выделяли с помощью наборов для выделения ДНК (Qiagen, США).

Продукция рекомбинантного аденоассоциированного вируса и трансдукция клеток. Для трансдукции СКЖТ человека использовали систему переноса генов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса, серотипа 2 – «AAV Helper-Free System» (Stratagene, США). Продукцию вируса осуществляли в клетках линии HEK-293T. Для этого клетки котрансфецировали плазмидами pAAV-RC, pHelper и pAAV-hrGFP (Stratagene). Для продукции вируса, несущего ген VEGF165, вместо плазмиды pAAV-hrGFP использовали pAAV-hVEGF. Трансфекцию осуществляли кальций-фосфатным методом. Для трансфекции клеток, растущих на 100-мм чашке Петри, использовали по 10 мкг каждой плазмиды. Через 54 ч после трансфекции клетки снимали раствором Версена и лизировали в 1 мл раствора PBS, содержащем 2мМ MgCl₂, подвергая их четырем раундам заморозки в жидком азоте и разморозки в водяной бане (37°C). В дальнейшем к лизату клеток добавляли фермент Benzonase (Merck, Германия) из расчета 50 единиц активности/мл и инкубировали 30 мин на водяной бане (37°C). После этого клеточный лизат центрифугировали при 5000g в течение 30 мин, надосадочную жидкость, содержащую вирусные частицы, отбирали. Полученный вирусный препарат хранили до использования при -70°C.

СКЖТ человека культивировали в среде BMHUMSC, 10% SCGS. При достижении 60–70% монослоя среду меняли на BMHUMSC с 1% SCGS, охлажденную до +4°C, добавляли вирусный препарат и инкубировали в течение 40–60 мин на льду. После этого к клеткам добавляли равный объем теплой среды BMHUMSC с 20% SCGS. Далее клетки культивировали без смены среды не менее 48 ч.

Приготовление кондиционной среды. Для получения кондиционной среды трансдуцированные и контрольные СКЖТ человека культивировали в среде BMHUMSC, 10% SCGS до стадии монослоя. Далее среду меняли

на BMHUMSC без SCGS и культивировали клетки в течение 48 ч, после чего кондиционную среду отбирали, центрифугировали при 300 g в течение 5–10 мин и центрифугировали с помощью центрифужных пробирок Amicon Ultra-4 (10000 кДа, Millipore, США) для дальнейшего анализа.

Иммуноблоттинг и иммуноферментный анализ (ELISA). Электрофорез образцов кондиционной среды объемом 20–24 мкл проводили в 13% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с последующим переносом белков на PVDF-мембрану (Millipore, США). Для иммунодетекции белка hVEGF использовали моноклональные антитела мыши (R&D Systems, США) и вторичные антитела козла к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Jackson, США). Визуализацию связанных антител проводили при помощи двухкомпонентной системы ECL (Amersham, США) с последующей экспозицией на рентгеновской пленке в течение 10–20 мин в зависимости от интенсивности свечения. Для положительного контроля использовался препарат рекомбинантного белка hVEGF (BD, США).

Количественное определение hVEGF в образцах культуральной среды проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа, используя набор фирмы R&D Systems, США.

Результаты

Трансфекция СКЖТ человека плазмидными векторами

Для того, чтобы оценить возможность использования плазмидных векторов для доставки генетической информации в клетки, мы проводили трансфекцию СКЖТ человека на ранних пассажах плазмидой, кодирующей ген зеленого флуоресцентного белка (GFP). В качестве трансфецирующих агентов использовали Lipofectamine 2000 и Eugene 6, варьируя соотношение ДНК/трансфецирующий агент в реакционной смеси. Процентное содержание GFP-позитивных клеток в культуре, оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии. Выживаемость клеток оценивали окрашиванием красителем трипановый синий. Все представленные методы трансфекции оказались малоэффективными для доставки плазмиды в СКЖТ человека. Наибольшее количество – около 10% GFP-позитивных клеток было получено при использовании Lipofectamine 2000 (рис. 1А). Данный результат был получен при смешивании 1–2 мкл Lipofectamine на 1 мкг ДНК в среде содержащей 10% сыворотки. Данный реагент, однако, обладал довольно сильным цитотоксическим действием (рис. 1Б). Eugene 6 не оказывал влияния на выживаемость СКЖТ, но был абсолютно неэффективен для трансфекции данной культуры клеток. Кальций-фосфатная трансфекция дала схожие с Lipofectamine 2000 результаты. Флуоресценция GFP после трансфекции клеток сохранялась не более 10–14 сут. Каких-либо различий в эффективности плазмидной трансфекции клеток на разных пассажах не было выявлено (данные не приведены).

Трансдукция СКЖТ человека рекомбинантным аденоассоциированным вирусом

В работе использовали вирусную систему компании Stratagene, основанную на человеческом аденоассоциированном вирусе второго серотипа. Известно, что данный аденоассоциированный вирус обладает ярко выраженным тропизмом к определенным типам клеток.

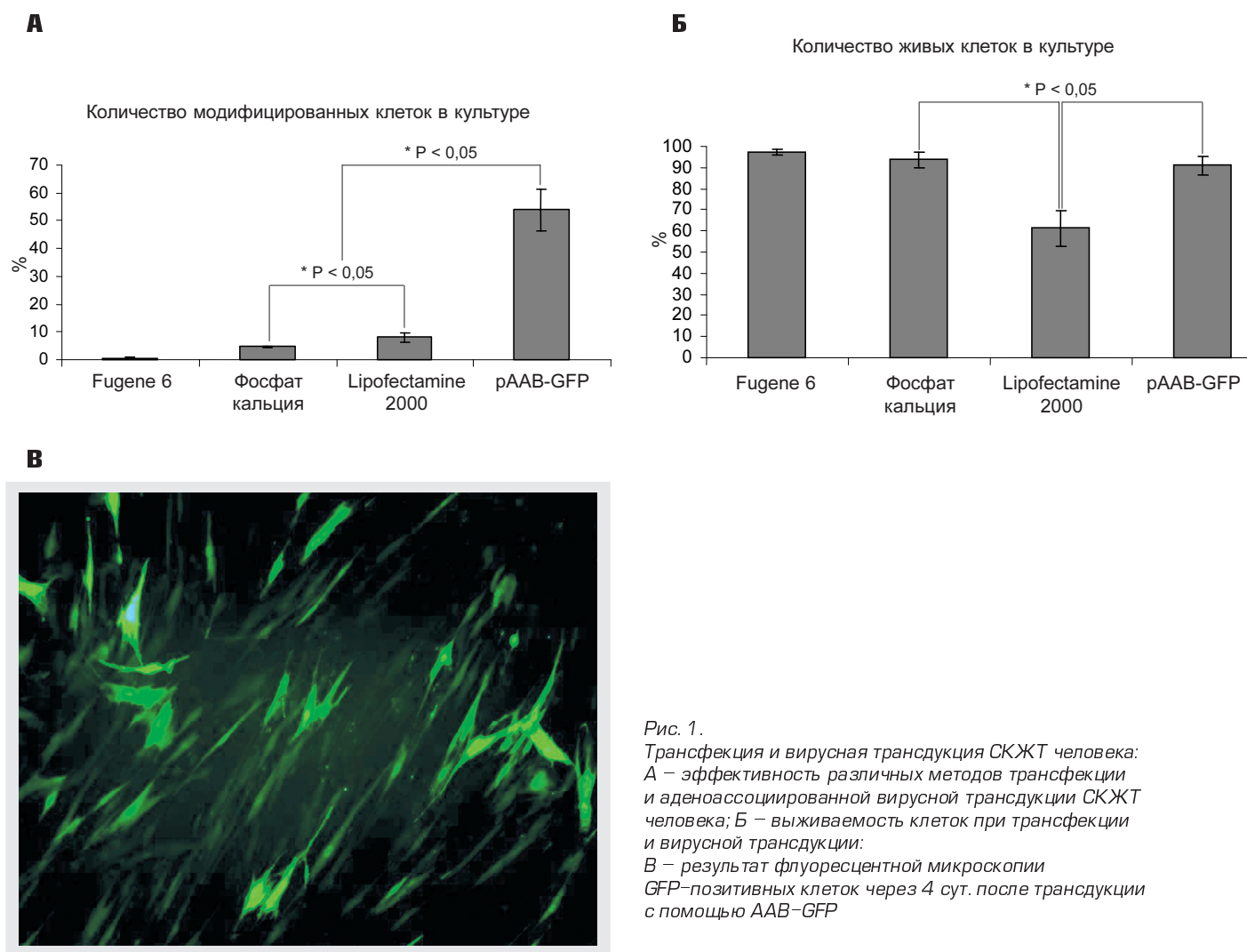


Рис. 1.
Трансфекция и вирусная трансдукция СКЖТ человека:
А – эффективность различных методов трансфекции
и аденоассоциированной вирусной трансдукции СКЖТ
человека; Б – выживаемость клеток при трансфекции
и вирусной трансдукции;
В – результат флуоресцентной микроскопии
GFP-позитивных клеток через 4 сут. после трансдукции
с помощью AAB-GFP

Это обусловлено экспрессией на поверхности клеток гепарансульфат протеогликана (HSPG) – клеточного рецептора, через который происходит связывание вируса с клеткой. Прежде чем использовать данную вирусную систему, мы проверили экспрессию данного белка на поверхности СКЖТ. Для этого проводили окрашивание клеток моноклональными фикоэритрин-конъюгированными антителами к CD138 (HSPG). С помощью проточной цитофлуориметрии подсчитывали число CD138-позитивных клеток. Было обнаружено, что 60–65% стромальных клеток жировой ткани экспрессируют этот рецептор.

Производство рAAB проводили по протоколу производителя в собственной модификации. При выделении вируса из клеток-упаковщиков дополнительно обрабатывали клеточный лизат ферментом Benzonase. Этот фермент неспецифически расщепляет молекулы ДНК и РНК на фрагменты длиной 2–5 нуклеотидов. Таким образом мы нивелировали эффект агрегации вирусных частиц и геномной клеточной ДНК, что повышало выход вируса. Для определения эффективности трансдукции СКЖТ человека использовали рекомбинантный аденоассоциированный вирус, кодирующий ген GFP (AAB-GFP). Уже на второй день после трансдукции обнаруживалась экспрессия флуоресцентного белка клетками в культуре (рис. 1В). Количество флуоресцирующих клеток определяли проточной цитофлуориметрией, и на 4-е сут. после трансдукции оно составляло 45–60% от общего

числа клеток (рис. 1А). Экспрессию GFP наблюдали, по крайней мере, в течение месяца, однако количество клеток, экспрессирующих этот белок, снижалось. Если через 4 сут. после трансдукции в культуре обнаруживалось около 55–60% флуоресцирующих клеток, то на 15-е и 30-е сут. их было уже около 40–45% и 20–25% соответственно.

Увеличение секреции VEGF модифицированными СКЖТ человека

Чтобы оценить возможность использования рAAB для увеличения секреции стромальными клетками жировой ткани человека терапевтических генов, был создан вирусный вектор, несущий ген человеческого VEGF165. Полученным рекомбинантным вирусом AAB-hVEGF инфицировали клетки 2-го пассажа. Через 5 сут. после трансдукции готовили кондиционные среды с трансдуцированными (VEGF-СКЖТ, GFP-СКЖТ) и немодифицированными СКЖТ. Качественную оценку секреции белка клетками в среду культивирования проводили методом иммуоблоттинга, предварительно концентрируя кондиционные среды (рис. 2А). Для количественного анализа секреции VEGF использовали метод ELISA (рис. 2Б). Было обнаружено, что количество VEGF, секретируемого в среду трансдуцированными клетками, в 20–30 раз превышает данный показатель в случае с контрольными клетками. Уровень секреции сохранялся практически на одном уровне, по крайней мере, в течение 30 сут.

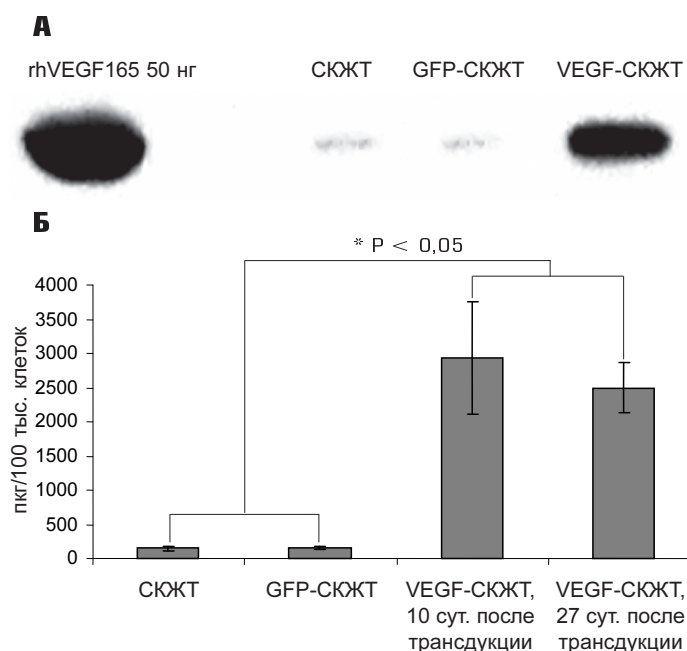


Рис. 2. Результаты оценки уровня секреции VEGF в среду культивирования трансдуцированными и немодифицированными стромальными клетками жировой ткани человека методом иммуноблоттинга (А) и ELISA (Б)

Обсуждение

В работе исследована возможность генетического модифицирования стромальных клеток жировой ткани человека. Проведена оценка эффективности плазмидной трансфекции клеток кальций-фосфатным методом, а также с использованием коммерческих трансфецирующих реагентов. Итоговый результат согласуется с боль-

шим количеством экспериментальных данных о низкой эффективности трансфекции большинства первичных культур клеток с помощью плазмидных конструкций. Для повышения эффективности модифицирования СКЖТ человека был использован рекомбинантный аденоассоциированный вирус. Этот вирус намного безопаснее аденовирусных, ретровирусных и лентивирусных векторов. Однако аденоассоциированные вирусы обладают тропизмом к определенным типам клеток. В данной работе впервые показана эффективная трансдукция СКЖТ человека с помощью аденоассоциированного вируса. С использованием rAAV удалось получить до 60% модифицированных клеток в культуре. При этом выживаемость клеток после вирусной трансдукции была не менее 90%. По сравнению с плазмидами экспрессия трансгена в результате трансдукции клеток с помощью rAAV была длительной и сохранялась, по крайней мере, в течение 30 сут. Трансдукция СКЖТ человека аденоассоциированным вирусом, кодирующим белок VEGF, позволила в десятки раз увеличить его секрецию клетками в среду культивирования.

Полученные в работе данные делают потенциально возможным использование модифицированных СКЖТ для аутологичной трансплантации, например при терапевтическом ангиогенезе. Суть метода заключается в стимуляции роста сосудов в ишемизированной ткани путем создания в ней повышенной концентрации ангиогенных факторов роста. Стромальные клетки жировой ткани, как известно, секретируют такие ангиогенные факторы, как HGF, TGF, VEGF, ангиопоэтин-1. Показано, что системное [5] или местное [2] введение мышам этих клеток, улучшает кровоток в ишемизированной конечности за счет увеличения числа сосудов. Как показано в данной работе, используя рекомбинантный аденоассоциированный вирус, можно увеличить секрецию этими клетками терапевтического фактора, такого как VEGF, что может усилить терапевтический эффект и увеличить его длительность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002; 13(12): p. 4279–95.
2. Planat-Benard V., Silvestre J.S., Cousin B. et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004; 109(5): 656–63.
3. Seo M.J., Suh S.Y., Bae Y.C. et al. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 328(1): 258–64.
4. Strem B.M., Zhu M., Alfonso Z. et al. Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury. *Cytotherapy* 2005; 7(3): 282–91.
5. Rehman J., Traktuev D., Li J. et al., Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004; 109(10): 1292–8.
6. Трактует Д.О., Т.В.А., Марч К.Л., Парфенова Е.В., Стромальные клетки жировой ткани — мультипотентные клетки с терапевтическим потенциалом для стимуляции ангиогенеза при ишемии тканей. *Кардиология* 2006. 46: 53–63.
7. Nakagami H., Maeda K., Morishita R. et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25(12): 2542–7.

8. Traktuev D.O., Prater D.N., Merfeld-Clauss S. et al. Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. *Circ Res*. 2009; 104(12): 1410–20.
9. Kwon I., Schaffer D.V. Designer gene delivery vectors: molecular engineering and evolution of adeno-associated viral vectors for enhanced gene transfer. *Pharm Res*. 2008; 25(3): 489–99.
10. Buning H., Perabo L., Coutelle O. et al. Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J Gene Med*. 2008; 10(7): 717–33.
11. Smith R.H. Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther*. 2008; 15(11): 817–22.
12. McCarty D.M., Young S.M., Samulski R.J. Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu Rev Genet*. 2004; 38: 819–45.
13. Peden C.S., Burger C., Muzyczka N. et al. Circulating anti-wild-type adeno-associated virus type 2 (AAV2) antibodies inhibit recombinant AAV2 (rAAV2)-mediated, but not rAAV5-mediated, gene transfer in the brain. *J Virol*. 2004; 78(12): 6344–59.
14. Moskalenko M., Chen L., van Roey M. et al. Epitope mapping of human anti-adeno-associated virus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. *J Virol*. 2000; 74(4): 1761–6.
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(2): 1438–45.

Поступила 16.01.2010