УДК 577:611.013(048.8) DOI: 10.15372/SSMJ20180403

НАПРАВЛЕННОЕ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК: ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Анастасия Викторовна КОРЕЛЬ, Сергей Борисович КУЗНЕЦОВ

Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России
630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17

Стволовые клетки разделяют на эмбриональные и стволовые клетки взрослого организма. Актуальность использования стволовых клеток в клинической практике в последние годы получает новые подтверждения, однако способы получения эмбриональных стволовых клеток для медицинских целей вызывают этическое неприятие. Альтернативой стволовым клеткам служат индуцированные плюрипотентные клетки, мультипотенциальные и сравнимые по свойствам с эмбриональными стволовыми клетками, но с дополнительными преимуществами: их получение позволяет исключить многие этические проблемы, связанные с использованием эмбрионального материала, их применение снижает риск иммунного отторжения. Возможность перепрограммирования соматических клеток в плюрипотентные стволовые клетки открывает огромные перспективы для регенеративной медицины. Применение метода направленного перепрограммирования позволяет получать из индуцированных стволовых клеток пациента практически любые типы клеток для аутологичной клеточной терапии. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки также могут использоваться для моделирования заболеваний человека и скрининга лекарственных средств. Тем не менее существует еще ряд препятствий, которые необходимо преодолеть, прежде чем использование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток войдет в повседневную практику. В настоящем обзоре рассматриваются история создания индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и последние достижения в области перепрограммирования соматических клеток, а также проблемы, которые необходимо преодолеть, чтобы применять эту стратегию в клинической практике.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, дифференцировка, соматические и эмбриональные стволовые клетки.

Стволовые клетки представляют собой особое подмножество клеток в организме, самообновляющихся и поддерживающихся в недифференцированном состоянии и способных превращаться в различные типы клеток [10]. По способности к самовоспроизведению и пластичности стволовые клетки можно разделить на две основные категории, а именно: эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и неэмбриональные стволовые клетки взрослого организма. Самовоспроизведение является способностью клеток претерпевать неограниченное число делений при сохранении недифференцированного состояния, а пластичность описывается как способность клеток одного ствола дифференцироваться в различные клеточные типы. ЭСК, обладающие тотипотентностью, получают из эмбрионов на ранних стадиях развития. Они могут бесконечно долго делиться в определенных условиях с сохранением недифференцированного состояния (самообновляться) и дифференцироваться в клетки тканей всех зародышевых листков, а также в клетки тканей околоплодных оболочек или клетки плаценты [24]. В течение нескольких дней после оплодотворения эти тотипотентные клетки созревают и образуют более специализированные клетки, называемые плюрипотентными, последние на стадии бластоцисты могут дифференцироваться во все типы клеток, кроме клеток внезародышевых органов (плаценты и желточного мешка) [8, 27].

Тканеспецифичные стволовые клетки взрослого организма являются недифференцированными клетками, находящимися в постнатальных тканях. Эти специализированные клетки считаются мультипотентными, у них ограниченные возможности к самовоспроизведению и тканеспецифической дифференцировке [8]. Эти муль-

Корель А.В. *– к.б.н., старший научный сотрудник лабораторно-экспериментального отдела,*
e-mail: akorel@niito.ru
Кузнецов С.Б. *– к.б.н., старший научный сотрудник лабораторно-экспериментального отдела,*
e-mail: sergei_kuznetsov@yahoo.com

типотентные стволовые клетки являются источником новых клеток в тканях их локализации и отличаются друг от друга степенью своей потентности. Особенностью стволовых клеток взрослого организма является их «пластичность»: будучи клетками одной ткани, они могут дифференцироваться в клетки другой ткани в зависимости от условий, определяющих их рост и дифференцировку. Стволовые клетки взрослого организма могут быть выделены из различных источников, и часто называются по ткани их происхождения: стволовые клетки костного мозга, полученные из жировой ткани стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки [4, 25, 38].

ЭСК мышей были первым типом плюрипотентных клеток, выделенных на ранних эмбриональных стадиях. В 1981 г. Эванс и Кауфман [10] и Мартин [23], независимо друг от друга, описали успешное введение в культуру клеток, полученных из внутренней клеточной массы бластоцисты мыши. В 1998 г. Томсон и его коллеги выделили ЭСК из бластоцисты человеческих эмбрионов, полученных методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) для клинических целей [43]. Таким способом были созданы первые культивируемые линии ЭСК человека. Томсон предложил три критерия, которые определяли бы ЭСК приматов: (I) выделение из преимплантационного или пери-имплантационного эмбриона; (II) продолжительная пролиферация клеток в недифференцированном состоянии, (III) стабильное развитие в нормальный эмбрион с образованием производных всех трех зародышевых листков, даже после длительного культивирования клеток *in vitro* [43]. Однако способ получения этих клеток оказался существенным препятствием в развитии технологий ЭСК. Общественные и религиозные организации сочли не этичным использовать человеческие эмбрионы в качестве источника получения стволовых клеток, хотя не возражали против уничтожения лишних эмбрионов после ЭКО. Тем не менее во многих странах были приняты законы, запрещающие использование ЭСК даже в исследовательских целях.

Перепрограммированные (индуцированные) соматические клетки (ИПСК) также демонстрируют способность к самовозобновлению и дифференцировке в клетке тканей всех трех зародышевых листков в условиях *in vivo* и *in vitro*. Таким образом, ИПСК также считаются плюрипотентными стволовыми клетками; через сложные механизмы управления они ответственны за рост, репарацию и функционирование тканей. Плюрипотентность и высокие регенеративные свойства делают их подходящими для клеточной терапии, тестирования лекарств и моделирования заболеваний. Тем не менее развитие технологий в области ЭСК ограничено этическими проблемами, такими как источники их получения и методы выделения.

Поиски методов перепрограммирования соматических клеток в мульти- или плюрипотентные клетки велись давно, когда стало понятно, что гены, отвечающие за свойства ЭСК, присутствуют во всех соматических клетках организма, но находятся в неактивном состоянии. Понимание этого и появление методов воздействия на гены внутри живой клетки привели к идее выявить гены, необходимые и достаточные для поддержания клетки в плюрипотентном состоянии. Целью таких исследований было выяснить, возможно ли дифференцированную соматическую клетку вернуть в недифференцированное состояние, заставив те «спящие» гены снова работать? Открытия в областях молекулярной и клеточной биологии за последние два десятка лет привели к разработке способа получения ИПСК методом перепрограммирования генома дифференцированных клеток [5]. Последующие исследования подтвердили способность ИПСК к самовозобновлению и дифференцировке во многие типы клеток как в *in vitro,* так и в *in vivo* условиях. И такие клетки позволят обойти множество этических проблем и моральных конфликтов, связанных с использованием ЭСК в клинической практике [39]. Действительно, использование ИПСК в регенеративной медицине является перспективным для преодоления этических проблем, связанных с использованием ЭСК, и обеспечивает потенциально неограниченный источник клеток для регенераторной медицины.

ИПСК. Плюрипотентность может быть восстановлена в терминально-дифференцированных клетках даже на поздних стадиях онтогенеза различными методами. В 1958 г. Гурдон с соавторами [14] с помощью техники ядерной трансплантации, первоначально описанной Бригс и Кинг [3], показали, что ядра клеток эпителия кишечника головастиков после пересадки в энуклеированные икринки лягушки могут начать делиться как зигота и развиться в нормальных и здоровых головастиков, демонстрируя тем самым успешное перепрограммирование диплоидного ядра соматической клетки. Это была первая попытка замены ядра яйцеклетки, в которой присутствуют побуждающие/или поддерживающие плюрипотентность ключевые факторы, ядром соматической клетки. После развития такой яйцеклетки до ранней эмбриональной стадии можно было получить ЭСК и ввести их в культуру. Данный эксперимент лег в основу будущих открытий в геномном перепрограммировании, а

также технологии клонирования многоклеточных организмов.

В 2006 г. Яманака и Такахаши [39] продемонстрировали метод перепрограммирования генома соматической клетки и приведение его в плюрипотентное состояние с помощью эктопической экспрессии четырех генов: *Oct4* (Octamer-Binding Transcription Factor 4), *Sox2* (Sex Determining Region Y box 2), *Klf4* (Kruppel-like factor 4) и *c-Myc* (Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog). Для трансфекции этих генов в ядра соматических клеток был использован ретровирусный вектор, а четыре гена стали известны как «факторы Яманаки», или «факторы OSKM» («Yamanaka factors», или «OSKM factors»). В отличие от перепрограммирования генома с помощью ядерного переноса, плюрипотентные стволовые клетки с OSKM можно было получать непосредственно из дифференцированных соматических клеток, и этот метод описан как «прямое» перепрограммирование. В 2012 г. Яманака получил Нобелевскую премию за открытие ИПСК и призвал ученых отказываться от использования ЭСК для решения задач регенеративной медицины. Эти искусственно полученные плюрипотентные клетки обладают молекулярными и функциональными характеристиками, аналогичными характеристикам ЭСК, но их использование не противоречит этическим нормам. Кроме того, ИПСК потенциально могут обеспечить получение неограниченного количества аутологичных клеток для клеточной терапии, моделирования заболеваний человека, выявления новых терапевтических линий и тестирования новых методов лечения. Ниже приводятся методы и стратегии перепрограммирования.

Техники перепрограммирования. В организмах млекопитающих, в том числе человека, большое разнообразие тканей и типов соматических клеток с терминальной дифференцировкой, например: фибробласты, клетки крови, кератиноциты, гепатоциты, клетки желудочно-кишечного тракта и другие. Кроме клеток нормальных тканей существуют клетки новообразований (опухолей), и все типы клеток потенциально могут быть использованы для получения ИПСК [13, 19, 21, 29, 37, 41, 49]. В настоящее время существует ряд подходов для перепрограммирования соматических клеток, но только некоторые из них эффективны.

Интегративные методы. Первые линии индуцированных плюрипотентных клеток были получены методом трансдукции факторов OSKM с помощью ретровирусного вектора в мышиные фибробласты [39]. Суть метода состоит в том, что гены, кодирующие факторы OSKM, были интегрированы в геном модифицированного ретровируса, и этим вирусом «заражались» фибробласты. Геном вируса встраивался в геном фибробластов, и гены факторов OSKM начинали экспрессироваться в клетках. Запускался каскад биохимических реакций, которые превращали клетку с нулевой потенцией в индуцированную плюрипотентную клетку. И это превращение было подтверждено строгим скринингом 24 факторов, связанных с плюрипотентностью. Ретровирусная трансдукция для получения ИПСК была успешно использована для нескольких типов клеток мыши и человека: фибробласты, нервные стволовые клетки, кератиноциты, адипоциты, гепатоциты и клетки крови. Эффективность перепрограммирования клеток человека составляет от 0,01 до 0,02 % [40]. Альтернативным подходом к трансдукции факторов OSKM для получения ИПСК является использование системы лентивирусов. Этот метод дает более высокую эффективность (0,1–2 %), чем ретровирусная трансдукция, его недостатком является интеграция вирусного генома в геном клетки хозяина, что может приводить к злокачественной трансформации [28].

Неинтегративные методы на основе ДНК. Как показано ранее, одним из основных недостатков стратегий перепрограммирования является интеграция вирусных векторов, используемых для переноса факторов перепрограммирования в геном соматической клетки. Генная конструкция на основе вирусного вектора может встраиваться в геном клетки в любом его месте и нарушать работу каких-то генов, что может привести к нестабильности генома и вызвать злокачественную трансформацию клетки [7]. Например, исследования на мышах показали, что у химерных животных, полученных с участием ИПСК, часто развиваются опухоли в результате реактивации онкогена *c-Myc* [22, 30]. Хотя прямое перепрограммирование было достигнуто и без участия гена *c-Myc*, три оставшихся интегральных фактора перепрограммирования также могут вызывать опухоли [7, 45]. Таким образом, чтобы использовать ИПСК для лечения человека, их перепрограммирование должно быть осуществлено с использованием неинтегрирующих стратегий. В связи с этим разработано несколько неинтегрирующих вирус-опосредованных методов перепрограммирования ИПСК. Наиболее привлекательным оказался метод использования дефектных по репликации аденовирусных векторов, экспрессирующих факторы OSKM, но не встраивающихся в хромосомную ДНК [15]. Несмотря на то, что они не интегрируются в геном клетки, экспрессия генов, которые они привносят, может длиться в течение нескольких дней, обеспечивая достаточное количество времени

для запуска процесса перепрограммирования соматических клеток в плюрипотентное состояние. Этот способ в основном используется для создания ИПСК из клеток печени и фибробластов [31, 48]. Такие аденовирусные векторы имеют более низкую эффективность трансдукции по сравнению с ретровирусными аналогами [31], поэтому необходима дальнейшая оптимизация эффективности протоколов перепрограммирования.

Метод получения ИПСК из стромальных клеток жировой ткани человека при использовании невирусных векторов, содержащих миникольцевую ДНК с кассетой генов *Lin28*, *Nanog*, *Sox2*, *Oct4* и *GFP* (зеленый флуоресцентный белок), имел эффективность трансдукции около 0,005 % [17]. Другим неинтегративным способом перепрограммирования соматических клеток в ИПСК является использование эписомальных плазмид [6, 26], которые применяются для получения ИПСК из пуповинной крови и клеток периферической крови [32]. В этом методе используются специально сконструированные плазмиды, содержащие элементы, например EBNA1/OriP, позволяющие экспрессию привнесенных генов без встраивания в геном клетки, а также размножение плазмиды и передачу ее дочерним клеткам при делении. Для трансфекции может одновременно использоваться несколько плазмид, содержащих отдельные гены OSKM, либо одна плазмида со всем набором генов.

Неинтегративные методы без использования ДНК. Одноцепочечная РНК вируса Сендай (SV) является привлекательной альтернативой плазмидам на основе ДНК для получения индуцированных стволовых клеток, поскольку геномный материал не проникает в ядро клетки-хозяина, не встраивается в геном хозяина и может быть легко удален методом негативной селекции антителами. Фузаки и соавторы [12] сообщили об эффективной индукции фибробластов человека в ИПСК с помощью конструкции на основе РНК генома вируса Сендай. Вирус Сендай является одним из наиболее подходящих кандидатов для подобных процедур, так как эффективность получения ИПСК составляет около 0,1 %, что сравнимо с использованием лентивирусных конструкций, но при этом отсутствует интеграция в геном клетки.

Другой способ избежать введения чужеродного генетического материала в геном перепрограммируемых клеток состоит в использовании микроРНК (микроРНК-трансфекция) [36]. МикроРНК представляют собой один из ключевых регуляторов экспрессии генов при установлении и поддержании уникальных клеточных типов. Было определено, что несколько классов микроРНК высокоспецифично экспрессируются в ЭСК и регулируются основными факторами транскрипции Oct4, Sox2 и Klf4. Одним из таких классов микроРНК является кластер mir-302/367, которыми обогащены плюрипотентные клетки *in vivo* и *in vitro*. Использование для перепрограммирования mir-302/367, либо самостоятельно, либо в сочетании с факторами Яманаки (Oct4, Sox2, c-Myc и Klf4), привело к созданию индуцированных плюрипотентных стволовых клеток при высокой эффективности трансфекции. Такой способ получения плюрипотентных стволовых клеток представляет собой безопасный и эффективный метод для создания ИПСК с «нулевым следом». Кроме того, этот метод соматического перепрограммирования клеток с использованием синтетических микроРНК обеспечивает пониженную иммуногенную реакцию. Известно, что цитозольная доставка микроРНК в клетки млекопитающих может быть достигнута путем электропорации или путем комплексообразования РНК с катионным носителем для облегчения поглощения эндоцитозом [1, 9, 16]. Уоррен с соавторами [44] сосредоточились на последнем подходе, полагая, что это позволит повторять трансфекцию для поддержания экспрессии эктопического белка в течение дней и недель, необходимых для перепрограммирования клеток. Они модифицировали РНК, заменив некоторые нуклеотиды на их аналоги, что увеличило время полураспада РНК, и добились высокой эффективности трансфекции. Ежедневная трансфекция модифицированной РНК обеспечивала устойчивую экспрессию белков без существенного ухудшения жизнеспособности культуры клеток при умеренном уменьшении кинетики роста, которая во многом была связана с трансфекционным реагентом.

Очищенные OSKM-белки представляют собой еще один привлекательный «не-ДНК» метод перепрограммирования. Зои с соавторами [50] продемонстрировали возможность получения стабильных ИПСК из фибробластов человека путем прямой доставки четырех белков факторов перепрограммирования (OSKM) с эффективностью 0,001 %. Линии ИПСК человека, полученные при помощи этих рекомбинантных белков, успешно существовали более 35 пассажей и дифференцировались в производные всех трех зародышевых листков как в лабораторных, так и в естественных условиях. В своем обзоре Ли с коллегами [20] показали, что одной из основных трудностей такого метода перепрограммирования клеток является внутриклеточная доставка белков OSKM из-за их ограниченной способности проникать через клеточную мембрану. Однако многочисленные исследования позволили

найти оптимальное решение этой проблемы. Новые методы перепрограммирования, основанные на трансдукции белка, не связаны с интеграцией вирусов в геном, что дает возможность создавать безопасные и последовательные ИПСК. Однако низкая эффективность этих методов была одной из самых больших проблем. Насколько нам известно, только около девяти исследовательских групп сообщили о получении ИПСК через трансдукцию белка, и эти исследования были ограничены только клетками мыши и человека.

Клинико-терапевтическое применение ИПСК. Получение аутологичных плюрипотентных клеток для регенерации ткани и клеточной трансплантационной терапии было недостижимой целью регенеративной медицины со времени открытия стволовых клеток. Регенеративные свойства плюрипотентных клеток делают их идеальным инструментом для клеточной терапии. Однако из-за того, что стволовые клетки получали из эмбрионов, из-за отсутствия эффективных протоколов дифференцировки, а также из-за иммунной несовместимости между клетками и организмом реципиента использование ЭСК в клеточной терапии было ограничено. После того, как были разработаны механизмы перепрограммирования дифференцированных клеток в плюрипотентные, их все чаще стали использовать в качестве альтернативы ЭСК. Стало возможным получать плюрипотентные клетки из клеток самого пациента, что сняло этические проблемы использования ЭСК. Кроме того, простота и скорость наращивания необходимого количества клеток *in vitro* и отсутствие иммунного конфликта делают ИПСК более предпочтительными для клеточной трансплантационной терапии.

Важно, что возраст организма, у которого берутся клетки для получения ИПСК, не принципиален. При восстановлении плюрипотентности теломеры в ядрах клеток восстанавливаются до оптимальной длины. Ривера с соавторами [35] показали, что длина теломер в индуцированных стволовых клетках регулируется активностью теломераз (ферментов, удлиняющих теломеры), с одной стороны, и белков XRCC3 и Nbs1, обрезающих излишне длинные теломеры, – с другой. Поэтому появляется возможность применять клеточную терапию даже к пожилым пациентам без опасения, что лимит Хейфлика их клеток будет исчерпан и теломеры станут слишком короткими за время манипуляций с клетками. Кроме того, появились методы направленной дифференцировки ИПСК и получения из них клеток нужного типа для терапии. Например, установлено, что кардиомиоциты, полученные из человеческих ИПСК, функционально равнозначны полученным из ЭСК [11]. Ву с соавторами [46] продемонстрировали потенциал ЭСК в модели лечения гемофилии у мышей. ИПСК, полученные от мышей другой линии, были дифференцированы в гепатоциты, продуцирующие фактор свертывания крови IX, как в естественных условиях, так и *in vitro*. Гепатоциты, полученные из индуцированных плюрипотентных клеток и пересаженные мышам с гемофилией, показали улучшение свертывающей активности фактора IX на 2–3 %, демонстрируя существенное облегчение течения болезни.

В лаборатории Сеттон [42] ИПСК человека подвергали действию различных факторов роста и культуральных сред для стимулирования образования необходимых маркеров и дальнейшего полного превращения в клетки хорды. Далее ученые использовали аналогичную методику для развития полученных клеток в клетки пульпозного ядра. В прошлых проектах исследователи пытались получить из ИПСК человека различные типы дифференцированных клеток костной, хрящевой, нервной и жировой тканей. Сеттон и ее группа пошли другим путем, разработав методику, позволяющую сначала создать хорду – хрящевидную структуру, которая формируется на самых ранних этапах развития, превращаясь в дальнейшем в позвоночник.

Аутологичные ИПСК являются потенциальным источником клеток всех типов для решения проблем регенеративной медицины. Более того, они широко используются в биологических и медицинских исследованиях как модели генетических заболеваний. ИПСК, полученные от пациентов с известными генетическими нарушениями, могут быть источниками клеточных линий для проведения таких исследований. Использование ИПСК при моделировании болезни позволяет создавать множественные линии различных типов, изучение которых необходимо для понимания этиологии заболевания и определения набора лекарственной терапии.

Известно достаточно большое количество исследований, подтверждающих, что использование ИПСК для моделирования болезни дает уникальную возможность имитировать патологическое состояние человека в лабораторных условиях, что в свою очередь позволяет исследовать заболевания и разработать адекватные лекарственные средства для его лечения [18, 34, 47]. Использование ИПСК в качестве источника дифференцированных клеток позволяет дополнить исследования новым инструментом и преодолеть разрыв между животными моделями, которые могут быть неточными или нетрансляционными, и клиническими исследованиями на человеке,

которые являются чрезвычайно дорогостоящими, трудоемкими и строго регламентируемыми. В этом контексте использование ИПСК для моделирования патологий и разработки лекарств являет собой прорыв в современной фармакологии.

Несмотря на все преимущества ИПСК, несмотря на то, что в многочисленных исследованиях убедительно показан потенциал применения технологии ИПСК в трансляционной медицине, все еще существуют серьезные проблемы, препятствующие массовому применению этих клеток в клинической медицине. В первую очередь это проблемы, связанные с перепрограммированием соматических клеток взрослого организма. Долгосрочные эффекты индуцированного плюрипотентного состояния все еще не ясны. Соматические клетки за время жизни организма накапливают в своих геномах изменения, которые могут отразиться на свойствах полученных из них плюрипотентных клеток. Перепрограммирование может активировать онкогены, из-за чего возрастает риск возникновения опухолей или тератокарцином из пересаженных пациенту индуцированных плюрипотентных клеток. Совсем недавно [33] Паске с соавторами показали, что мужские и женские клетки по-разному ведут себя во время и после перепрограммирования. Объясняется это различием в количестве Х-хромосом. В женских клетках их две, но одна не активна. Гипометилирование в масштабе всего генома в женских клетках влияет на многие геномные ориентиры, включая энхансеры и области контроля импринтинга, и сопровождается реактивацией неактивной Х-хромосомы. Во время культивирования перепрограммированных клеток процесс метилирования ДНК усиливается, целый ряд генов становятся вновь неактивными, как и одна из Х-хромосом. В мужских клетках таких драматических изменений при перепрограммировании не происходит. Эти различия следует учитывать при клинико-терапевтических процедурах.

Хотя методы направленной дифференцировки плюрипотентных клеток существуют, но отсутствие надежных и эффективных протоколов дифференцировки создает препятствие для использования ИПСК в клеточной терапии, поскольку остается не нулевая вероятность присутствия клеток нежелательного типа в клеточном трансплантате. На преодоление этих проблем направлены усилия многочисленных исследовательских коллективов и в нашей стране, и за рубежом. С появлением ИПСК возникла и возможность редактировать их геном и возвращать пациенту уже исправленные клетки. На недавнем ежегодном саммите AAAS (The American Association for the Advancement of Science) [2] был сделан доклад о достижении в этой области. Цель исследования заключалась в том, чтобы исправить мутацию, ответственную за серповидноклеточную анемию, тогда откорректированные стволовые клетки будут дифференцироваться в нормальные клетки крови, включая эритроциты. Исследователи отбирали стволовые клетки и гемопоэтические клетки-предшественники с поверхностным клеточным маркером CD34. Затем клетки изменяли с помощью технологии редактирования геномов CRISPR/Cas9 и специального шаблона ДНК для исправления мутации. Ученые вводили полученные клетки в костный мозг иммунодефицитных мышей и спустя 19 недель наблюдали, сколько отредактированных стволовых клеток прижилось. Результаты показали, что их уровень все это время оставался стабильным. Хотя ученые использовали стволовые клетки костного мозга, но потенциально также можно использовать и ИПСК.

Открытие способов получения ИПСК сильно изменило научное представление о биологии стволовых клеток. Это открытие является замечательным достижением в биологии и медицине. Доступность источника клеток, легкость их выделения, способность к быстрому и надежному размножению *in vitro*, ЭСК-подобные характеристики, отсутствие иммунного конфликта делают ИПСК идеальной заменой ЭСК в трансляционной медицине. Из-за отсутствия этических ограничений и легкодоступной донорской ткани эти клетки могут широко использоваться в исследовательских работах для лучшего понимания природы ИПСК. В первую очередь такие исследования необходимы для выявления различий в геномах ИПСК и ЭСК и поиска путей и методов для сведения этих различий к минимуму [15]. Остается неясным, эффективно ли методы перепрограммирования подавляют гены родительских соматических клеток, активируя ЭСК-гены. Эффекты «неполного» перепрограммирования не до конца изучены, но считается, что они позволяют получать разные уровни дифференцировки и потенции ИПСК. Остаются не до конца понятыми долгосрочные риски использования индуцированных клеток в клинической медицине. Однако это непонимание будет уменьшаться со временем, поскольку технология очень молодая. По мере совершенствования протоколов перепрограммирования и направленной дифференцировки клеток использование ИПСК в трансплантационной медицине, а также в моделировании болезней и тестировании лекарств будет расширяться. Современные клеточные технологии моделируют фенотипические проявления болезней, однако степень повторяемости всех факторов за-

болевания по-прежнему не высока. Повысить ее сможет использование индуцированных плюрипотентных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ИПСК обладают огромным потенциалом для использования их в биологических и медицинских исследованиях, а также в клинической медицине. После решения ряда проблем, связанных с биологией этих клеток, ИПСК могут стать мощным инструментом в репарационной и регенеративной медицине.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Audouy S., Hoekstra D*. Cationic lipid-mediated transfection in vitro and in vivo (review) // Mol. Membr. Biol. 2001. 18. (2). 129–143.

2. *Bao G*. CRISPR/Cas9-based genome editing for treating sickle cell disease // Abstr. AAAS Annual Meeting, Austin, February 15-19, 2018. https://aaas.confex.com/aaas/2018/meetingapp.cgi/Paper/21361.

3. *Briggs R., King T.J*. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1952. 38. (5). 455–463.

4. *Bunnell B.A., Flaat M., Gagliardi C., Patel B., Ripoll C*. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation // Methods. 2008. 45. (2). 115–120.

5. *Chin M.H., Mason M.J., Xie W., Volinia S., Singer M., Peterson C., Ambartsumyan G., Aimiuwu O., Richter L., Zhang J., Khvorostov I., Ott V., Grunstein M., Lavon N., Benvenisty N., Croce C.M., Clark A.T., Baxter T., Pyle A.D., Teitell M.A., Pelegrini M., Plath K., Lowry W.E*. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures // Cell Stem Cell. 2009. 5. 111–123.

6. *Chou B.K., Mali P., Huang X., Ye Z., Dowey S.N., Resar L.M., Zou C., Zhang Y.A., Tong J., Cheng L*. Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures // Cell Res. 2011. 21. (3). 518–529.

7. *Cieslar-Pobuda A., Knoflach V., Ringh M.V., Stark J., Likus W., Siemianowicz K., Ghavami S., Hudecki A., Green J.L., Łos M.J*. Transdifferentiation and reprogramming: Overview of the processes, their similarities and differences // Biochim. Biophys. Acta. 2017. 1864. (7). 1359–1369.

8. *De Vries W.N., Evsikov A.V., Brogan L.J., Anderson C.P., Graber J.H., Knowles B.B., Solter D*. Reprogramming and differentiation in mammals: motifs and mechanisms // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2008. 73. 33–38.

9. *Elango N., Elango S., Shivshankar P., Katz M.S*. Optimized transfection of mRNA transcribed from a d(A/T)100 tail-containing vector // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. 330. (3). 958–966.

10. *Evans M.J., Kaufman M.H*. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // Nature. 1981. 292. 154–156.

11. *Fu J.D., Stone N.R., Liu L., Delgado-Olguin P., Ding S., Bruneau B.G., Srivastava D*. Direct reprogramming of human fibroblasts toward a cardiomyocyte-like state // Stem Cell Reports. 2013. 1. (3). 235–247.

12. *Fusaki N., Ban H., Nishiyama A., Saeki K., Hasegawa M*. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome // Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci. 2009. 85. 348–362.

13. *Gopalakrishnan S., Hor P., Ichida J.K*. New approaches for direct conversion of patient fibroblasts into neural cells // Brain Res. 2017. 1656. 2–13.

14. *Gurdon J.B., Byrne J.A*. The first half-century of nuclear transplantation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. 100. (14). 8048–8052.

15. *He T.C., Zhou S., da Costa L.T., Yu J., Kinzler K.W., Vogelstein B*. A simplified system for generating recombinant adenoviruses // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. 95. 2509–2514.

16. *Holtkamp S., Kreiter S., Selmi A., Simon P., Koslowski M., Huber C., Türeci O., Sahin U*. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells // Blood. 2006. 108. (13). 4009–4017.

17. *Jia F., Wilson K.D., Sun N., Gupta D.M., Huang M., Li Z., Panetta N.J., Chen Z.Y., Robbins R.C., Kay M.A., Longaker M.T., Wu J.C*. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells // Nat. Methods. 2010. 7. (3). 197–199.

18. *Jungverdorben J., Till A., Brustle O*. Induced pluripotent stem cell-based modeling of neurodegenerative diseases: a focus on autophagy // J. Mol. Med. 2017. 95. (7). 705–718.

19. *Kumano K., Arai S., Hosoi M., Taoka K., Takayama N., Otsu M., Nagae G., Ueda K., Nakazaki K., Kamikubo Y., Eto K., Aburatani H., Nakauchi H., Kurokawa M*. Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples // Blood. 2012. 119. (26). 6234–6242.

20. *Li X., Zhang P., Wei C., Zhang Y*. Generation of pluripotent stem cells via protein transduction // J. Dev. Biol. 2014. 58. 21–27.

21. *Liu H., Zhaohui Y., Kim Y., Sharkis S., Jang Y.Y.* Generation of endoderm-derived human induced pluripotent stem cells from primary hepatocytes // Hepatology. 2010. 51. (5). 1810–1819.

22. *Markoulaki S., Hanna J., Beard C., Carey B.W., Cheng A.W., Lengner C.J., Dausman J.A., Fu D., Gao Q., Wu S., Cassady J.P., Jaenisch R.* Transgenic mice with defined combinations of drug-inducible reprogramming factors // Nat. Biotechnol. 2009. 27. 169–171.

23. *Martin G.R.* Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. 78. 7634–8.

24. *Maureen L.* Condic totipotency: What it is and what it is not // Stem Cells Dev. 2014. 23. (8). 796–812.

25. *Mendez-Ferrer S., Scadden D.T., Sanchez-Aguilera A.* Bone marrow stem cells: Current and emerging concepts // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2015. 1335. 32–44.

26. *Meraviglia V., Zanon A., Lavdas A.A., Schwienbacher C., Silipigni R., Di Segni M., Chen H.S., Pramstaller P.P., Hicks A.A., Rossini A.* Generation of induced pluripotent stem cells from frozen buffy coats using non-integrating episomal plasmids // J. Vis. Exp. 2015. 100. e52885.

27. *Mitalipov S., Wolf D.* Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2009. 114. 185–199.

28. *Nakhaei-Rad S., Bahrami A.R., Mirahmadi M., Matin M.M.* New windows to enhance direct reprogramming of somatic cells towards induced pluripotent stem cells // Biochem. Cell Biol. 2012. 90. (2). 115–123.

29. *Novak A., Shtrichman R., Germanguz I., Segev H., Zeevi-Levin N., Fishman B., Mandel Y.E., Barad L., Domev H., Kotton D., Mostoslavsky G., Binah O., Itskovitz-Eldor J.* Enhanced reprogramming and cardiac differentiation of human keratinocytes derived from plucked hair follicles, using a single excisable lentivirus // Cell. Reprogram. 2010. 12. (6). 665–678.

30. *Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S.* Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells // Nature. 2007. 448. 313–7.

31. *Okita K., Nakagawa M., Hyenjong H., Ichisaka T., Yamanaka S.* Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors // Science. 2008. 322. (5903). 949–953.

32. *Okita K., Yamakawa T., MatsumuraY., Sato Y., Amano N., Watanabe A., Goshima N., Yamanaka S.* An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells // Stem Cells. 2013. 31. 458–466.

33. *Pasque V., Karnik R., Chronis C., Petrella P., Langerman J., Bonora G., Song J., Vanheer L., Sadhu Dimashkie A., Meissner A., Plath K.* X Chromosome dosage influences DNA methylation dynamics during reprogramming to mouse iPSCs // Stem Cell Reports. 2018. 10. (5). 1537–1550.

34. *Rajaei B., Shamsara M., Amirabad L.M., Massumi M., Sanati M.H.* Pancreatic endoderm-derived from diabetic patient-specific induced pluripotent stem cell generates glucose-responsive insulin-secreting cells // J. Cell. Physiol. 2017. 232. (10). 2616–2625.

35. *Rivera T., Haggblom C., Cosconati S., Karlseder J.* A balance between elongation and trimming regulates telomere stability in stem cells // Nat. Struct. Mol. Biol. 2017. 24. (1). 30–39.

36. *Sandmaier S.E.S., Telugu B.P.L.* MicroRNA-mediated reprogramming of somatic cells into induced pluripotent stem cells // Cell. Reprogram. 2015. 1330. 29–36.

37. *Seki T., Yuase S., Fukuda K.* Generation of induced pluripotent stem cells from a small amount of human peripheral blood using a combination of activated T cells and Sendai virus // Nat. Protocols. 2012. 7. 718–728.

38. *Shizuru J.A., NegrinR. S., Weissman I.L.* Hematopoietic stem and progenitor cells: Clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system // Annu. Rev. Med. 2005. 56. 509–538.

39. *Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // Cell. 2007. 131. (5). 861–872.

40. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. 2006. 126. 663–676.

41. Takahashi K., Yamanaka S. A developmental framework for induced pluripotency // Development. 2015. 142. 3274–3285.

42. Tang R., Jing L., Willard V.P., Wu C., Guilak F., Chen J., Setton L.A. Differentiation of human induced pluripotent stem cells into nucleus pulposus-like cells // Stem Cell Res. Ther. 2018. 9. 61.

43. *Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // Science. 1998. 282. 1145–1147.

44. *Warren L., Manos P.D., Ahfeldt T., Loh Y.H., Li H., Lau F., Ebina W., Mandal P.K., Smith Z.D., Meissner A., Daley G.Q., Brack A.S., Collins J.J., Cowan C., Schlaeger T.M., Rossi D.J.* Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA // Cell Stem Cell. 2010. 7. (5). 618–30.

45. *Wernig M., Meissner A., Cassady J.P., Jaenisch R.* c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts // Cell Stem Cell. 2008. 2. 10–12.

46. *Wu Y.M., Huang Y.J., Chen P., Hsu Y.C., Lin S.W., Lai H.S., Lee H.S.* Hepatocyte-like cells derived from mouse induced pluripotent stem cells produce functional coagulation factor IX in a

hemophilia B mouse model // Cell Transpl. 2016. 25. (7). 1237–1246.

47. *Xie M., Tang S.B., Li K., Ding S*. Pharmacological reprogramming of somatic cells for regenerative medicine // Acc. Chem. Res. 2017. 50. (5). 1202–1211.

48. *Yu J., Hu K., Smuga-Otto K., Tian S., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A*. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences // Science. 2009. 324. (5928). 797–801.

49. *Zang X., Gruz F.D., Remotti F., Matushasky I.* Terminal differentiation and loss of tumorigenicity of human cancers via pluripotency-based reprogramming // Oncogene. 2013. 32. 2249–2260.

50. *Zhou H., Wu S., Joo J.Y., Zhu S., Han D.W., Lin T., Trauger S., Bien G., Yao S., Zhu Y., Siuzdak G., Schöler H.R., Duan L., Ding S*. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins // Cell Stem Cell. 2009. 4. (5). 381–384.

DIRECTED RE-PROGRAMMING OF SOMATIC CELLS: ADVANTAGES AND LIMITATIONS OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS (REVIEW)

Anastasiya Viktorovna KOREL, Sergey Borisovich KUZNETSOV

Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsivyan of Minzdrav of Russia 630091, Novosibirsk, Frunze str., 17

Stem cells are divided into embryonic and adult stem cells. The relevance of the use of stem cells in clinical practice has received new evidence in recent years however, the methods of obtaining stem cells for medical purposes cause ethical rejection. An alternative to the stem cells is the induced pluripotent cells. These cells are multipotential and comparable with features of embryonic stem cells but with additional advantages: their preparation allows to avoid many ethical problems associated with the use of embryonic material, their use reduces the risk of immune rejection. The possibility of somatic cells reprogramming into pluripotent stem cells opens the great prospects for regenerative medicine. An applying of directional reprogramming method makes possible to obtain practically any cell type from induced stem cells of the patient to use in autologous cell therapy. Induced pluripotent stem cells can also be used to model the human diseases and for screening of medicines. However, there are still a number of obstacles that need to be overcome before the use of induced pluripotent stem cells will be involved to routine clinical practice. This review examines the history of the creation of induced pluripotent stem cells and recent advances in the reprogramming of somatic cells, as well as the challenges that need to be overcome in order to apply this strategy in clinical practice.

Key words: induced pluripotent stem cells, differentiation, somatic and embryonic stem cells.

Korel A.V. *– candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory experimental department, e-mail: akorel@niito.ru*
Kuznetsov S.B. *– candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory experimental department, e-mail: sergei_kuznetsov@yahoo.com*