

УДК 576

# Клеточные подходы к лечению инсулинзависимого диабета

М. А. Борисов<sup>1,3</sup>, О. С. Петракова<sup>1,2\*</sup>, И. Г. Гвазава<sup>1,3</sup>, Е. Н. Калистратова<sup>2</sup>, А. В. Васильев<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

<sup>3</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

\*E-mail: PetrakovaOl@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.10.2015

Принята к печати 11.03.2016

**РЕФЕРАТ** В настоящее время в мире насчитывается более 350 миллионов больных сахарным диабетом. По данным Всемирной организации здравоохранения в течение ближайших 20 лет этот показатель превысит 500 миллионов. Инсулинзависимый сахарный диабет, или сахарный диабет первого типа, – это эндокринное заболевание, вызванное аутоиммунной реакцией, разрушающей инсулинпродуцирующие  $\beta$ -клетки, расположенные в островках Лангерганса поджелудочной железы, что приводит к нехватке инсулина. Наиболее доступным видом терапии при сахарном диабете остается введение экзогенного инсулина. Это помогает регулировать уровень глюкозы в крови и существенно увеличивает ожидаемую продолжительность жизни пациентов. Однако остаются долгосрочные осложнения, связанные с системным характером болезни и ее влиянием на все виды обмена веществ. Избежать этих осложнений можно при помощи методов, способных обеспечить лучший контроль над уровнем глюкозы в крови. В настоящий момент усилия регенеративной медицины направлены на поиск именно такого метода лечения. В данном обзоре рассмотрена классическая методика трансплантации донорских островков Лангерганса. Описаны также такие новые перспективные методы, как использование плюрипотентных стволовых и коммитированных клеток и клеточное репрограммирование. Обсуждаются молекулярно-генетические механизмы панкреатической дифференцировки. Большое внимание уделяется методам доставки трансплантатов и материалам, используемым для их создания.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** дифференцировка, клеточная терапия, поджелудочная железа, сахарный диабет, экспрессия генов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; МКМ – межклеточный матрикс; МСК – мезенхимные стволовые клетки; оЛ – островки Лангерганса; ПЖ – поджелудочная железа; ПСК – плюрипотентные стволовые клетки; СД1Т – сахарный диабет первого типа; ЭР – эмбриональное развитие; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Для изучения возможностей дифференцировки клеток *in vitro* в панкреатическом направлении необходимо понимать процесс панкреатического органогенеза. Многочисленные исследования в этой области, проводимые в основном на мышинных моделях, помогли гораздо лучше понять процессы развития и выявить стадии формирования различных органов (таблица).

Поджелудочная железа (ПЖ), в которой происходит синтез и секреция ряда гормонов и ферментов, играет критически важную роль в обмене веществ. В поджелудочной железе выделяют экзо-

кринную и эндокринную части. Экзокринная часть состоит из ацинарных клеток, секретирующих пищеварительные ферменты: амилазы, липазы, протеазы и нуклеазы, которые выводятся в протоки ПЖ, формирующие ветвящуюся структуру, состоящую из эпителиальных клеток [1]. Эндокринные клетки сгруппированы в мельчайшие островки, называемые островками Лангерганса (оЛ), состоящие из клеток пяти подтипов:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  и РР, которые продуцируют гормоны глюкагон, инсулин, соматостатин, грелин и панкреатический полипептид соответственно.

Поджелудочная железа – это производное энтодермы. После закладки энтодерма формирует эмбриональную кишку, которая затем под действием

Временная шкала развития поджелудочной железы человека *in vivo* [6, 7]

Стадия	Стволовая клетка	Энтодерма	Эмбриональная кишка	Панкреатическая энтодерма	Клетка-предшественник	β-клетка
Дни ЭР	6	14	21–28	30–33	45+	55+
Маркеры	Oct4 <sup>+</sup> Sox2 <sup>+</sup>	Sox17 <sup>+</sup> Foxa2 <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> Sox7 <sup>-</sup> Pdgfra <sup>-</sup>	Sox17 <sup>+</sup> Foxa2 <sup>+</sup>	Pdx1 <sup>+</sup> Nkx6.1 <sup>+</sup> Ptf1a <sup>+</sup> Ki67 <sup>+</sup> Sox9 <sup>+</sup> Sox17 <sup>-</sup>	Ngn3 <sup>+</sup> Pdx1 <sup>+</sup> Nkx6.1 <sup>+</sup> Ptf1a <sup>-</sup>	Ins <sup>+</sup> Nkx6.1 <sup>+</sup> Mafa <sup>+</sup> Gcg <sup>-</sup> Sox9 <sup>-</sup>

факторов роста, секретируемых соседними тканями, разделяется на отделы. ПЖ формируется из двух листов эпителия дорсально и вентрально от головной кишки, располагаясь между желудком и двенадцатиперстной кишкой [2, 3]. Дорсальный отросток получает сигналы от хорды и спинной аорты [4], вентральный отросток находится под влиянием сигналов прилегающей сердечной мезенхимы и мезодермы боковой пластины [5].

Однако при инъекции факторов роста фибробластов (FGF) и морфогенетического белка кости (BMP) в эмбриональные экспланты энтодермы направление дифференцировки можно изменить с панкреатического на гепатоцитарное. С другой стороны, уменьшение зависимого от белка p300 ацетилирования гистона, ассоциированного с активацией генов, обеспечивает обратный переход к панкреатической дифференцировке [8]. Далее, на 11.5 день ЭР мыши вентральная и дорсальная части увеличиваются в размерах и сливаются в единый орган [9]. В это время пролиферация панкреатического эпителия стимулируется преимущественно мезенхимными клетками, секретирующими факторы роста (12.5 день ЭР мыши) [10]. Дальнейшее развитие ведет к разветвлению эпителиальных протоков. Параллельно этим процессам предшественники эндокринных клеток отслаиваются от эпителия и собираются в оЛ. На стадии 16.5 ЭР появляются моногормональные инсулинсекретирующие клетки, формируются ацинусы [11]. ПЖ взрослого человека содержит примерно 1 млн оЛ [12]. В процессе дифференцировки эндокринной ткани прогениторные клетки оЛ коэкспрессируют различные гормоны. В ходе дальнейшего созревания клетки превращаются в моногормональные [13, 14]. На моделях грызунов показано, что первыми эндокринными клетками являются глюкагонсекретирующие, которые можно обнаружить примерно на 9.5 день эмбрионального развития [15, 16]. С течением времени появляются клетки, коэкспрессирующие инсулин и глюкагон, а отдельные инсулинсекретиру-

ющие β- и глюкагонсекретирующие α-клетки наблюдаются с 14-го дня. Вскоре развиваются соматостатинсекретирующие δ-клетки, а PP-секретирующие клетки можно наблюдать на 18-й день эмбрионального развития [14, 15].

Все эндокринные клетки происходят из прогениторных клеток ПЖ, экспрессирующих Pdx1. В ходе развития ПЖ Pdx1 экспрессируется и эндокринными, и экзокринными прогениторными клетками, но по окончании развития его можно наблюдать только в β- и δ-клетках [16]. Развитие эндокринных клеток регулируется фактором транскрипции Ngn3, ингибирование которого на 11.5 день эмбрионального развития ПЖ приводит к значительному снижению уровня эндокринной дифференцировки [17].

Генетические манипуляции позволили лучше понять функции факторов транскрипции, влияющих на генерацию различных типов эндокринных клеток ПЖ. В число этих факторов входят Sox9, Pdx1, Ngn3, Ia-1, Pax4, Arx, Nkx2.2, Nkx6.1, Nkx6.2, Pax6 и Mafa.

Sox9 экспрессируется в Pdx1<sup>+</sup>-клетках эпителия ПЖ, начиная с 9-го дня ЭР. На 14.5 день ЭР его экспрессия ограничена недифференцированными клетками с низким уровнем Pdx1 и полностью отсутствует в гормонсекретирующих клетках. В постнатальный период Sox9 локализован в центральноацинарных клетках и некоторых эпителиальных клетках протоков [19]. Некоторые наблюдения подтверждают, что Sox9 является маркером прогениторных клеток ПЖ: его экспрессия не меняется у мышей с нокаутом *Ngn3* и *Nkx6.1*. У трансгенных мышей с искусственно поддерживаемыми в прогениторном состоянии клетками-предшественниками экспрессия Sox9 остается аномально стабильной. Sox9 коэкспрессируется с проэндокринным транскрипционным фактором Ngn3 на 15.5 день ЭР, но отсутствует в клетках, экспрессирующих маркеры Nkx2.2 и Isl-1, характерные для зрелых оЛ. Точечная делеция Sox9 в прогениторных клетках Pdx1<sup>+</sup> приводит к снижению количества эндокринных клеток одновременно с преждевремен-

ной дифференцировкой в клетки, экспрессирующие глюкокагон и Isl-1. Таким образом, активность Sox9 необходима для поддержания прогениторных клеток в пролиферативном состоянии и предотвращения их преждевременной дифференцировки [20, 21].

Как и Sox9, Pdx1 экспрессируется на 8.5 сутки ЭР в дорсальной и вентральной энтодерме, за эпителием желудка и двенадцатиперстной кишки. Позднее экспрессия Pdx1 ограничивается  $\beta$ -клетками, в которых он контролирует глюкозозависимую секрецию инсулина [22–24]. Показано, что зрелые панкреатические клетки происходят из прогениторов Pdx1<sup>+</sup> [25]. Это подтверждается панкреатическим агенезом у мышей с дефицитом Pdx1 [26]. Инактивация Pdx1 на различных стадиях развития, а также в зрелых  $\beta$ -клетках показала его необходимость для определения и поддержания фенотипа  $\beta$ -клеток [27, 28]. Более того, установлено [29], что инактивация Pdx1 в  $\beta$ -клетках на поздних стадиях ЭР приводит к уменьшению пролиферации инсулинпродуцирующих клеток с одновременным увеличением ее у глюкокагонпродуцирующих клеток. Эти результаты позволяют предположить, что Pdx1 необходим для возникновения и поддержания  $\beta$ -клеток, а также для регулирования числа эндокринных клеток на поздних стадиях ЭР [29].

В отличие от Pdx1, Ngn3 воздействует только на дифференцировку эндокринной ткани. Он детектируется с 8.5 дня ЭР, достигает максимума на 15.5 день и поддерживается на низком уровне в зрелых эндокринных клетках. Ngn3 необходим для спецификации всех энтероэндокринных и эндокринных линий [25, 30, 31]. Инактивация Ngn3 в зрелых Pdx1<sup>+</sup>-клетках приводит к ухудшению функций оЛ [32], а усиление его экспрессии активирует дифференцировку эндокринных клеток [33, 34]. Эктопическая экспрессия Ngn3 в Pdx1<sup>+</sup>-клетках ведет к преждевременному старту эндокринной дифференцировки, в результате которой образуются только глюкокагонпродуцирующие клетки [35, 36]. Показано, что экспрессия Ngn3 проходит две отдельные временные волны, коррелирующие с первым и вторым переходом, описанными Pictet и соавт., генерируя ранне- и позднеформирующиеся эндокринные клетки с различным потенциалом развития [37, 38]. Ранние Ngn3<sup>+</sup>-клетки, согласно [39], дают начало  $\alpha$ -клеткам. Активация Ngn3 на более поздних стадиях развития индуцирует возникновение  $\beta$ - и PP-клеток после 11.5 дня ЭР и  $\delta$ -клеток после 14.5 дня ЭР, в то время как индукция формирования  $\alpha$ -клеток прогрессивно снижается [39].

Фактор транскрипции Ia-1 является мишенью для Ngn3 и принимает участие в дифференцировке эндокринных клеток. При мутациях по Ia-1 эндо-

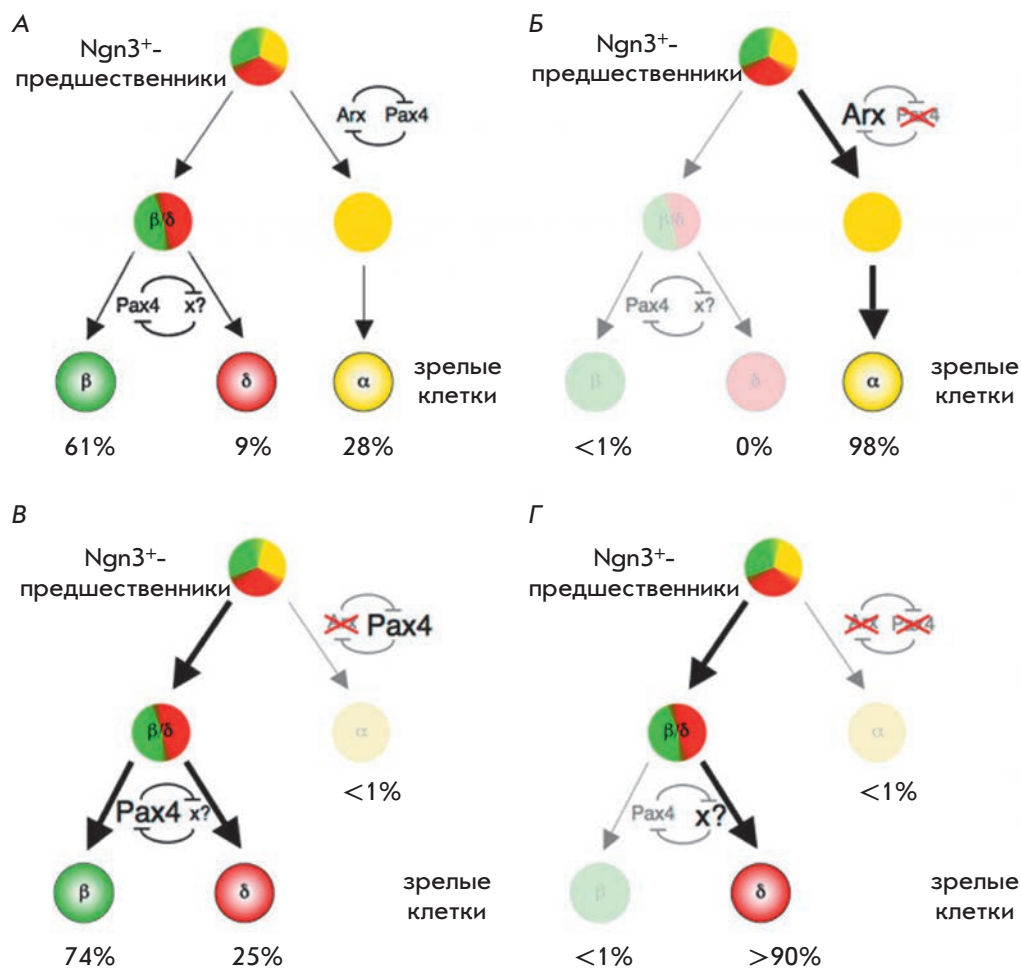
кринные клетки наблюдаются, но большая их часть не секретирует гормоны [40]. В отличие от Ngn3, эктопическая экспрессия Ia-1 в протоковых клетках недостаточна для индукции эндокринной дифференцировки. В то же время коэкспрессия Ngn3 и Ia-1 значительно усиливает эффективность индукции эндокринной дифференцировки по сравнению с эктопической экспрессией только Ngn3 [41].

Arx и Pax4 играют ключевые роли в специализации подтипов эндокринных клеток. Arx выступает промотором дифференцировки  $\alpha$ - и PP-клеток, в то время как Pax4 индуцирует  $\beta$ - и  $\delta$ -линии (рис. 1). При дефиците Pax4  $\beta$ - и  $\delta$ -клетки ПЖ не развиваются, при этом увеличивается количество  $\alpha$ -клеток [42]. С другой стороны, потеря Arx ведет к увеличению числа  $\beta$ - и  $\delta$ -клеток с исчезновением  $\alpha$ -популяции [43]. Более тщательный анализ показал антагонизм факторов Arx и Pax4. Одновременный нокаут Pax4 и Arx приводит к исчезновению  $\beta$ - и  $\alpha$ -клеток, увеличению популяции  $\delta$ -клеток, в то время как количество PP-клеток остается неизменным [44]. Из этого был сделан вывод, что Pax4 не входит в число факторов, необходимых для спецификации  $\beta$ -/ $\delta$ -клеток, а, подавляя экспрессию Arx, действует как ингибитор появления  $\alpha$ -клеток.

На ранних стадиях развития Nkx2.2 играет существенную роль в спецификации  $\beta$ -клеток. В то же время в зрелых оЛ Nkx2.2 служит маркером  $\alpha$ -,  $\beta$ - и PP-клеток. У мышей с нокаутом гена *Nkx2.2* наблюдается потеря  $\alpha$ -клеток, а также снижение числа  $\beta$ - и PP-клеток, при том, что количество  $\delta$ -клеток остается неизменным [45, 46].

Nkx6.1, еще один маркер панкреатического эпителия, впервые детектируется на 9.5 день ЭР. Изначально он экспрессируется в Ngn3<sup>+</sup> эндокринных клетках-предшественниках, а в дальнейшем только в зрелых  $\beta$ -клетках, в которых регулирует процесс секреции инсулина [47, 48]. У мышей с нокаутом гена *Nkx6.1* значительно снижено число зрелых  $\beta$ -клеток, в то время как другие подтипы островковых клеток развиваются нормально [47]. Nkx6.2, паралог Nkx6.1, имеет сходные паттерны экспрессии, но не экспрессируется в зрелых  $\beta$ -клетках [49, 50]. Мыши, мутантные по *Nkx6.2*, имеют нормальный фенотип. В то же время у животных с недостатком Nkx6.1 и Nkx6.2 возникают изменения, сходные с проявлениями мутации *Nkx6.1*, но при этом значительно снижено число глюкокагонпродуцирующих клеток. Это позволяет говорить о более широком влиянии Nkx-факторов на формирование  $\alpha$ -клеток [49].

Еще один член семейства Pax, Pax6, играет важную роль в дифференцировке островковых клеток. Pax6 экспрессируется во всех эндокринных гормон-



**Рис. 1.** Схема спецификации эндокринных клеток в процессе развития поджелудочной железы. А – прогениторная эндокринная клетка с потенциалом превращения в α-клетку или во вторую прогениторную клетку с потенциалом превращения в β- или δ-клетку, экспрессирующая Arx и Pax4. Б – изменение спецификации при недостатке Pax4. В – изменение спецификации при недостатке Arx. Г – изменение спецификации при недостатке Pax4 и Arx (по [18])

продуцирующих клетках. Pax6 необходим для развития всех четырех подтипов эндокринных клеток и формирования правильно структурированных оЛ, как показано с помощью нокаута гена *Pax6* у мышей [51, 52].

Представители семейства генов *Maf* (*Mafa*, *Mafb* и *cMaf*) влияют на конечную дифференцировку β- и α-клеток. Так, *Mafa* прямо действует на промотор гена инсулина и трансактивирует его [53–55]. Экспрессия *Mafa* инициируется на 13.5 день ЭР и ограничена инсулин<sup>+</sup>-клетками в течение эмбриогенеза и последующей жизни [56]. У мышей с недостатком *Mafa* развивается сахарный диабет первого типа с сильным снижением уровня инсулина и аномальной архитектурой оЛ. Изолированные инсулин<sup>+</sup>-клетки с дефицитом *Mafa* не способны к глюкозозависимой секреции инсулина [57]. Кроме того, эктопическая экспрессия *Mafa* в энтодерме куриных эмбрионов, а также в культурах непанкреатических клеток достаточна для инициации секреции инсулина [58].

Таким образом, в результате изучения роли основных генов, вовлеченных в спецификацию различных эндокринных клеток, установлена сложность механизмов их регуляции. Для оптимизации программ дифференцировки клеток *in vitro* необходимо изучать *in vitro* и *in vivo* генез инсулинпродуцирующих β-клеток.

### ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ДОНОРСКИХ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА

Трансплантация поджелудочной железы позволяет добиться восстановления нормального уровня глюкозы [59]. Однако подобная операция подвергает пациента определенным рискам и вызывает необходимость иммуносупрессии на протяжении последующей жизни.

Трансплантация аллогенных изолированных островковых клеток позволяет избежать полостной операции. В 1983 году человеческие оЛ пересадили крысам с экспериментальным диабетом [60]. Первая трансплантация аллогенных оЛ человеку была про-



ведена в 1990 году [61]. Эффективность этого метода оставалась крайне низкой до 2000 года. Вероятно, это было связано с технологиями выделения островков, недостаточным их количеством в трансплантате и жесткой иммуносупрессией. Использование разработанного Shapiro и соавт. [62] протокола Эдмонта позволило снизить аллоиммунную реакцию и повысить выживаемость пересаженных островков [62–64]. Удалось добиться независимости от введения экзогенного инсулина. Кроме того, использование этого метода позволило нормализовать уровень гликированного гемоглобина HbA1c [65]. При выделении островков из ПЖ по протоколу Эдмонта используют специфические ферменты. Выделенные клетки вводят в воротную вену печени через катетер, в результате чего клетки задерживаются в венозных синусах печени реципиента, где снабжаются кровью и осуществляют глюкозозависимую секрецию инсулина. Важнейший компонент этого протокола – комбинация иммуносупрессоров. В течение короткого времени сразу после трансплантации пациенту вводят даклизумаб, чтобы предупредить начальное отторжение. Использование второго компонента, сиролимуса, позволяет избежать использования токсичных для островковых клеток стероидных препаратов. Третий компонент, такролимус, применяется в малых дозах, что снижает его негативное воздействие на оЛ. Современные методики иммуномодуляции позволяют продлить время жизни трансплантата и сохранить донорские оЛ до 5 лет [66–68]. Однако риски, вызываемые длительной иммуносупрессией, а также острый дефицит донорского материала не позволяют широко использовать этот метод.

Сходство инсулина человека и свиньи [69, 70], а также применение инсулина в терапии диабета до появления рекомбинантного человеческого инсулина [71], позволило рассматривать свиные островковые клетки в качестве материала для трансплантата. Для защиты от отторжения используют различные методики инкапсуляции. В компании Living Cell Technologies изучается безопасность и эффективность трансплантации инкапсулированных свиных оЛ больным (СД1Т) без применения иммуносупрессии (<http://www.lctglobal.com>). Показано отсутствие признаков воспаления или фиброза, а также снижение уровня гликированного гемоглобина у пациентов при уменьшении дневной дозы инсулина [72–74].

Активно изучается применение инкапсулированных человеческих островковых клеток [73, 75–78], однако, при снижении или полном отсутствии необходимости в иммуномодуляции остается проблема нехватки доноров.

В качестве материалов для изготовления капсул применяют как водорастворимые полимеры (альги-

нат), так и водонерастворимые [79]. Несмотря на водорастворимость, альгинатные капсулы остаются стабильными в течение нескольких лет [78, 80–84]. Создание двухслойных капсул позволяет снизить пористость мембраны капсулы, что продлит время ее жизни и улучшит иммунозащитные свойства. Возможна также модификация мембраны поли-L-лизинном и полиорнитинном, но это снижает механическую стабильность, что, в свою очередь, уменьшает время жизни капсулы [79, 85, 86].

Немаловажен выбор места для трансплантации. Для адекватного функционирования трансплантата необходим достаточно высокий уровень васкуляризации. К сожалению, найти подходящую область для инкапсулированных трансплантатов достаточно сложно из-за их относительно крупных размеров. Места, пригодные для пересадки неинкапсулированных образцов, такие, как печень и селезенка, не подходят, так как не могут принять капсулы достаточно большого размера (диаметром от 600 мкм). С помощью относительно простой лапароскопии можно поместить капсулу в брюшную полость. Однако это не оптимальное расположение, поскольку вызывает существенный иммунный ответ. В ответ на трансплантат клетки мезотелия брюшной полости продуцируют, в том числе и опосредованно, – через сигналы от макрофагов, фактор некроза опухоли- $\alpha$ , интерлейкины-1 $\beta$  и -10, а также другие цитокины [87]. Лучшие результаты получены при введении как инкапсулированных, так и неинкапсулированных трансплантатов под капсулу почки или подкожно [88]. Подобная локализация вызывала лишь незначительную клеточную иммунную реакцию при высокой жизнеспособности трансплантированных островков и достаточном уровне секреции инсулина [89].

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК

Плюрипотентные стволовые клетки способны дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых листков, что дает возможность получить из них и инсулинпродуцирующие клетки для терапии сахарного диабета. Известны два типа ПСК: ЭСК, получаемые из внутренней клеточной массы бластоцисты, и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, получаемые перепрограммированием соматических клеток в плюрипотентные. Первыми ЭСК культивировали Thomson и соавт. [90], что положило начало перепрограммированию соматических клеток [91]. Дифференцировочный потенциал, пролиферативные свойства, морфология и профиль экспрессии генов у ЭСК и ИПСК схожи, что позволяет использовать ИПСК без этических ограничений, связанных с разрушением эмбрионов [92, 93]. Аутологичные ИПСК

человека не элиминируются иммунной системой при пересадке, но остается опасность, что полученные инсулинпродуцирующие клетки будут отторгнуты тем же аутоиммунным механизмом, который привел к появлению сахарного диабета.

И ЭСК, и ИПСК способны к дифференцировке *in vitro* в инсулинпродуцирующие клетки [94–98]. Дифференцировка ПСК в инсулинпродуцирующие клетки проходит, как и при нормальном развитии ПЖ, в несколько стадий, первая из которых – индукция энтодермы. В ЭСК экспрессируется большое количество маркеров энтодермы, например Sox17, Foxa2, Sxcr4, при этом отсутствует экспрессия Sox7 [95, 96, 99–102]. Дифференцировка ЭСК и ИПСК в энтодерму инициируется сигналами Nodal и Wnt [95, 99, 103, 104]. В свою очередь, Nodal активируется белком из семейства TGF- $\beta$  – активином A, в концентрации 50–100 нг/мл, наиболее эффективном для дифференцировки [105, 106]. Долю дифференцированных клеток можно увеличить при одновременном воздействии активина A и некоторых ингибиторов (вортманнин, CHIR99021 [107], бутират натрия [96]) и активаторов Wnt-сигналов, таких, как CHIR9902 [108]. Кроме того, эффективность дифференцировки можно повысить при использовании малых молекул, таких, как IDE1 и IDE2 [109]. Как известно, из энтодермы происходят как панкреатические клетки, так и гепатоциты. Для дальнейшей панкреатической дифференцировки *in vitro* клетки обрабатывают антагонистами TGF- $\beta$  и BMP4, такими, как SU5402 и Noggin, которые подавляют дифференцировку в гепатоцитарном направлении [101].

Вторая стадия панкреатической дифференцировки ПСК – культивирование в присутствии дорсоморфина или его гомолога 1, которые способствуют развитию Pdx1<sup>+</sup>-клеток-предшественников [96, 99, 109]. Последующие стадии, позволяющие превратить клетки-предшественники в полноценные инсулинпродуцирующие клетки, пока ясны не до конца. При попытке провести дифференцировку *in vitro* использовали такие факторы, как никотинамид, инсулиноподобный фактор роста 1 и гепатоцитарный фактор роста [96, 101, 103]. Дальнейшую дифференцировку Pdx1<sup>+</sup>-клеток индуцировали индолактамом V и усиливали ретиноевой кислотой [108]. Показано также, что способность ПСК дифференцироваться в эндокринные клетки сильно зависит от плотности посева в культуре [110, 111]. Однако в клетках, дифференцированных *in vitro*, часто синтезируются несколько гормонов, такие клетки имеют незрелый фенотип, не реагирующий на уровень глюкозы [103, 112, 113]. В связи с этим часто трансплантируют клетки-предшественники, чтобы дальнейшая дифференцировка прошла *in vivo* [99, 105, 114–117]. В опытах

как на здоровых мышах [99, 105], так и на мышах с диабетом, индуцированным стрептозотоцином [114], из ЭСК развивались функциональные инсулинпродуцирующие клетки. Более того, показано, что даже инкапсулированные клетки-предшественники могут дифференцироваться в зрелые инсулинпродуцирующие клетки, способные к эффективной секреции инсулина у мышей с диабетом [118].

В революционной работе Pagliuca и соавт. [119] разработан протокол дифференцировки, позволяющий получать функциональные инсулинпродуцирующие клетки. Дифференцировка ПСК человека осуществляется в течение 28–33 дней с применением большого набора факторов роста и малых молекул. В результате получены инсулинпродуцирующие клетки, способные к глюкозозависимой секреции инсулина на уровне, сопоставимом с уровнем в зрелых  $\beta$ -клетках. Эти клетки содержали инсулиновые гранулы, обладающие ультраструктурой, присущей  $\beta$ -клеткам, и были способны нормализовать уровень глюкозы при трансплантации мышам с экспериментальным диабетом [119].

Обнаружено, что фактор освобождения кортикотропина, белок Ucn3, экспрессируется в  $\beta$ -клетках на высоком уровне и регулирует глюкозозависимую секрецию инсулина [120]. При дифференцировке *in vitro*, однако, Ucn3 не экспрессируется [121]. В то же время в зрелых и незрелых  $\beta$ -клетках уровень экспрессии Ucn3 различается более чем в 7 раз. Таким образом, созревание клеток *in vivo* важно для их функциональности. Это предполагает существование в местах трансплантации некоторых специфических сигналов, которые запускают дифференцировку и созревание  $\beta$ -клеток.

### МЕТОД ПРЯМОГО ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ

Технологии репрограммирования, разработанные для получения ИПСК, могут использоваться и в других целях. Методика прямого перепрограммирования основана на применении генетических конструкций для репрограммирования клеток различного типа в целевые, минуя их возвращение в плюрипотентное состояние. Как и при получении ИПСК, в методе прямого перепрограммирования используются технологии интеграции ДНК (в большинстве случаев с помощью вирусных векторов). В частности, экспрессия гена *Pdx1*, искусственно вызванная в печени мышей с диабетом, привела к появлению инсулин<sup>+</sup>-клеток вблизи кровеносных сосудов. Конверсия, однако, была неполной. Это заставило искать другие гены, действующие синергично и между собой, и с *Pdx1*. Кроме того, начались поиски клеток, подходящих для репрограммирования. Многообещающими оказались протоковые клетки. Еще в 1980-е годы было

показано, что  $\beta$ -клетки могут возникать из протоковых клеток ПЖ. Экспрессия *Pdx1* в протоках ПЖ человека индуцирует экспрессию инсулина [122]. Внутривентрикулярное введение рекомбинантного *Pdx1* снижало уровень гипергликемии у мышей со стрептозотоциновым диабетом [123]. Протоковые клетки взрослых мышей, трансдуцированные аденовирусом, несущим *Pdx1*, *Pax4*, *Ngn3* и *NeuroD*, начинали активно вырабатывать инсулин [124].

Согласно последним исследованиям, ацинарную ткань ПЖ мыши также можно перепрограммировать с помощью искусственной экспрессии генов: возможна индукция дифференцировки ацинарных клеток в протоковые с последующим превращением в островковые [125]. Большое количество ацинарных клеток в ПЖ делает их удобным источником для получения  $\beta$ -клеток. Ацинарные клетки могут дифференцироваться *in vitro* в инсулинпродуцирующие клетки при культивировании в среде с низким содержанием сыворотки с добавлением эпидермального фактора роста и никотинамида. При этом возрастает также экспрессия других гормонов, включая глюкагон, соматостатин и панкреатический полипептид [126]. Ацинарные клетки человека при определенных условиях культивирования могут трансформироваться в структуры, подобные протокам. Добавление дексаметазона индуцирует ацинарно-протоковый переход клеток, но, к сожалению, не дифференцировку в инсулинпродуцирующие клетки [127]. Показано, что при гипергликемии увеличивается инфильтрация ацинарной ткани Т-клетками и индуцируется дифференцировка ацинарных клеток либо в  $\beta$ -клетки, либо в структуры, подобные протокам, из которых могут в дальнейшем формироваться  $\beta$ -клетки [128]. Ацинарно-островковую дифференцировку у крыс можно вызвать обработкой дексаметазоном [129]. Согласно последним исследованиям, ацинарную ткань ПЖ мыши также можно перепрограммировать с помощью искусственной экспрессии генов *Pdx1*, *Ngn3* и *Mafa*. У опытных животных снизился уровень гипергликемии, хотя полного выздоровления не произошло. Возможно, это связано с отсутствием агрегации полученных клеток и с отсутствием у них синхронной глюкозозависимой секреции инсулина [130–132]. Эти результаты подтверждены и в опытах *in vitro*, проведенных на линии ацинарных клеток AR42J, а затем на экзокринных клетках ПЖ человека [133, 134]. Дополнительно стоит отметить, что в опытах *in vivo* перепрограммирование проходит лучше при более сильном иммунном ответе на введение вирусного вектора, используемого для доставки генов [135].

Основная физиологическая роль  $\alpha$ -клеток заключается в секреции глюкагона – антагониста инсули-

на, играющего важную роль в поддержании уровня глюкозы. Переход  $\alpha$ -клеток в  $\beta$ -клетки наблюдается при эктопическом повышении экспрессии *Pax4*. Этому процессу также способствовал *Ngn3* [136]. Усиленная экспрессия *Pdx1*, контролируемая промотором *Ngn3*, на ранних стадиях эмбрионального развития приводит к смещению соотношения между  $\alpha$ - и  $\beta$ -клетками в сторону  $\beta$ -клеток [137]. Подобный переход не индуцируется активацией *Pdx1* на более поздних стадиях. При лигировании выводного протока большое число новообразованных  $\beta$ -клеток происходило из  $\alpha$ -клеток в течение 2 недель [138]. Судя по всему, превращение  $\alpha$ -клеток в  $\beta$ -клетки возможно только в моделях с практически полным уничтожением изначальной популяции  $\beta$ -клеток [138, 139]. В эксперименте с частичным разрушением  $\beta$ -клеток подобный переход не обнаружен [140].

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОММИТИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Использование ЭСК не только этически неоднозначно, но имеет и другие негативные стороны. Например, трансплантаты как из ЭСК, так и из ИПСК могут обладать опухолевой активностью, обусловленной присутствием недифференцированных плюрипотентных клеток. Кроме того, необходимым остается применение иммуномодулирующей терапии для регулирования аллогенных реакций [141, 142]. Использование постнатальных стволовых клеток позволит обойти все эти проблемы [143–146].

Доступным источником стволовых клеток является кожа. Клетки-предшественники кожи впервые были описаны Тома и соавт. [147]. Они обладают широким диапазоном дифференцировки, позволяющим получать функционально различные типы клеток *in vitro* (клетки глии, гладкой мускулатуры, адипоциты). Описан эффективный метод криоконсервации клеток-предшественников кожи, дающий возможность создания клеточного банка. Таким образом, кожа рассматривается в качестве перспективного источника аутологичных клеток, способных к дифференцировке и длительному хранению [148]. Из клеток-предшественников кожи *in vitro* получены клетки, способные к глюкозозависимой секреции инсулина и С-пептида. Дифференцированные клетки экспрессировали характерные для  $\beta$ -клеток маркеры, такие, как *Pdx1*, *Nkx2.2*, *Pax4*, *NeuroD* и *Isl-1* [149].

Наиболее часто упоминаемые в контексте регенеративной медицины ПСК – это мезенхимные стволовые клетки (МСК), в большом количестве представленные в большинстве тканей организма [150]. Их успешно культивируют *in vitro*, они достаточно эффективно дифференцируются в костную, хрящевую и жировую ткани [151]. Предполагается, что для диф-



ференцировки в инсулинпродуцирующие клетки наиболее подходят МСК жировой ткани, полученные при операции на веке, поскольку они происходят из клеток нервного гребня. Подобное происхождение имеют и МСК из периодонтальной связки [152–154]. Однако их не удается достаточно эффективно приблизить к фенотипу  $\beta$ -клеток *in vitro*. Несколько обособленно стоят МСК из пуповинной крови. Исследование, проведенное Prabakar и соавт., выявило у них сходные с ЭСК характеристики, а также сходство их дифференцировки в панкреатическом направлении [155]. Другой вариант терапии – прямое введение недифференцированных МСК, при котором наблюдали различную степень регенерации [153, 154, 156, 157]. Подобная реакция организма обусловлена иммуномодуляторными, противовоспалительными, проангиогенными и трофическими свойствами МСК. Более выраженной способностью к регуляции иммунитета обладают гемопоэтические стволовые клетки, которые успешно использовали для «перезагрузки» иммунитета при диабете [158, 159]. Мультипотентные стволовые клетки, полученные из пуповинной крови, по неподтвержденным результатам могут заниматься так называемым «обучением» иммунитета. Лимфоциты больных сахарным диабетом первого типа циркулируют в устройстве с высеянными мультипотентными стволовыми клетками пуповинной крови здоровых доноров. После реинфузии «обученных» лимфоцитов наблюдали снижение симптомов сахарного диабета первого типа [160, 161].

Существует гипотеза, что повреждение ПЖ вызывает активацию факультативных клеток-предшественников, которая ведет к увеличению количества  $\beta$ -клеток. Показано, что в ПЖ мыши  $\beta$ -клетки регенерируют из протоковых клеток-предшественников [161]. Кроме того, в большой выборке больных хроническим панкреатитом и бессимптомным фиброзом ПЖ выявлен неогенез из комплексных островково-протоковых структур, которые представляют собой ассоциацию эндокринной части ПЖ с протоками [162]. У мышей со стрептозотоциновым диабетом обнаружено два типа предшественников  $\beta$ -клеток, экспрессирующих Glut2 и Pdx1/соматостатин. Этим клеткам приписывают протоковое происхождение [163, 164]. Изучение зародышевых ПЖ *in vitro* показало, что новые инсулинпродуцирующие клетки могут происходить из эпителия протоков. Протоки ПЖ, взятые у свиньи в неонатальный период, в особых условиях культивирования экспрессируют инсулин и маркеры предшественников эндокринных клеток [165]. В протоковой ткани ПЖ человека, культивируемой в течение 3–4 недель, наблюдали эндокринные клетки, прорастающие в трехмерных протоковых кистах. Эти клетки экспрессировали

как инсулин, так и другие гормоны оЛ. Это говорит о том, что они находятся в состоянии дифференцировки. Кроме того, в полученных таким образом клетках секреция инсулина была глюкозозависимой [161]. Показано также, что Pdx1 может значительно ускорять дифференцировку протоковых эпителиальных клеток в инсулинпродуцирующие клетки *in vitro* [166]. В результате исследований *in vivo* на мышах с индуцированным стрептозотоциновым диабетом установлено, что протоковые клетки экспрессируют инсулин на ранних стадиях воспаления, а затем экспрессия прекращается [167]. Это может говорить о том, что начальное воспаление при сахарном диабете первого типа индуцирует регенерацию  $\beta$ -клеток. Возможно, новообразованные  $\beta$ -клетки более уязвимы для апоптоза. Экспрессия фактора некроза опухоли- $\alpha$  в  $\beta$ -клетках мыши вызывала хронический инсулит, а не диабет. Это происходило с одновременным развитием внутриостровковых протоков с встроенными в их стенки  $\beta$ -клетками, что может говорить о способности к регенерации [168]. Сходным образом трансгенные мыши, экспрессирующие интерферон- $\gamma$ , были защищены от стрептозотоцинового диабета, который сопровождался увеличенной регенерацией протоковых клеток и неогенезом оЛ [169]. Экспрессия Pdx1 и Msx2 в протоках ПЖ таких трансгенных мышей предполагает ассоциацию этих факторов с дифференцировкой протоковых клеток в этой модели [170]. У людей с аутоиммунным хроническим панкреатитом разрушение  $\beta$ -клеток Т-клетками вызывает дифференцировку  $\beta$ -клеток из протоковых клеток ПЖ [171]. У больных сахарным диабетом первого типа после одновременной пересадки ПЖ и почки обнаружены инсулинпродуцирующие Pdx1<sup>+</sup>-протоковые клетки.

На мышах с индуцированным аллоксаном диабетом показано, что при *in vivo* воздействии EGF и CNTF новые инсулинпродуцирующие клетки образуются преимущественно из ацинарных клеток [172]. С помощью технологии Cre/LoxP проследили судьбу ацинарных и протоковых клеток и выяснили, что около 40% новообразованных инсулинпродуцирующих клеток происходят из ацинарных клеток и только 4% – из других типов клеток. Это доказывает существование трансдифференцировки в ПЖ млекопитающих.

Ряд работ посвящен поиску непанкреатического источника клеток, способных синтезировать инсулин. Один из таких источников – большие слюнные железы. Показано, что в поднижнечелюстной слюнной железе крысы экспрессируется мРНК препроинсулинов I и II [173]. Иммуногистохимическими методами инсулин обнаружен в околоушной слюнной железе крысы [174]. Установлено, что при диабете



поднижнечелюстные слюнные железы выполняют компенсаторную функцию [175]. У мышей со стрептозотоциновым диабетом после трансплантации поднижнечелюстной слюнной железы под капсулу почки наблюдалась нормализация уровня глюкозы в крови [176]. Клетки, полученные из поднижнечелюстной слюнной железы человека и животных (мышь, крыса, свинья), легко культивируются [177–179]. В трехмерных условиях культивирования они приобретают способность синтезировать глюкагон, альбумин или инсулин [177, 178]. При сферическом культивировании в присутствии никотинамида клетки слюнной железы человека приобретали способность к глюкозозависимой секреции С-пептида [179]. Клетки поднижнечелюстной слюнной железы крысы, экспрессирующие  $\alpha\beta 1/c\text{-Kit}$ , сохраняли морфологию, пролиферативную активность и мультипотентность, присущую стволовым клеткам, более 92 пассажей. В присутствии активина А, эксендина 4 и ретиноевой кислоты эти клетки экспрессировали панкреатические маркеры, такие, как Pdx1, инсулин, панкреатический полипептид и Ngn3 [180].

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МАТРИКСОВ ДЛЯ 3D-СТРУКТУР

Широко известно, что использование трехмерных структур для культивирования клеток имеет некоторые преимущества перед традиционным двумерным культивированием. Клетки содержатся в условиях, более близких к нативным, сохраняют контакты с матриксом и между собой, ускоряется процесс дифференцировки [181]. Такие системы приближают условия культивирования клеток к условиям *in vivo*. Эти утверждения справедливы и для культивирования панкреатических клеток *in vitro* и их доставки *in vivo*.

Высевание клеток на пористый матрикс увеличивает их жизнеспособность и функции изолированных оЛ *in vitro*, улучшает результаты трансплантаций. Например, островковые клетки ПЖ крысы были почти вдвое более жизнеспособны и секретировали в 4 раза больше инсулина при культивировании на пористом матриксе из полигликолевой кислоты, чем при 2D-культивировании [182]. При культивировании инсулинпродуцирующих клеток линии RIN-m5F на созданном методом электроспиннинга матриксе из сополимера молочной и гликолевой кислот PLGA с порами, заполненными коллагеном типа I, секреция инсулина повышалась вдвое [183].

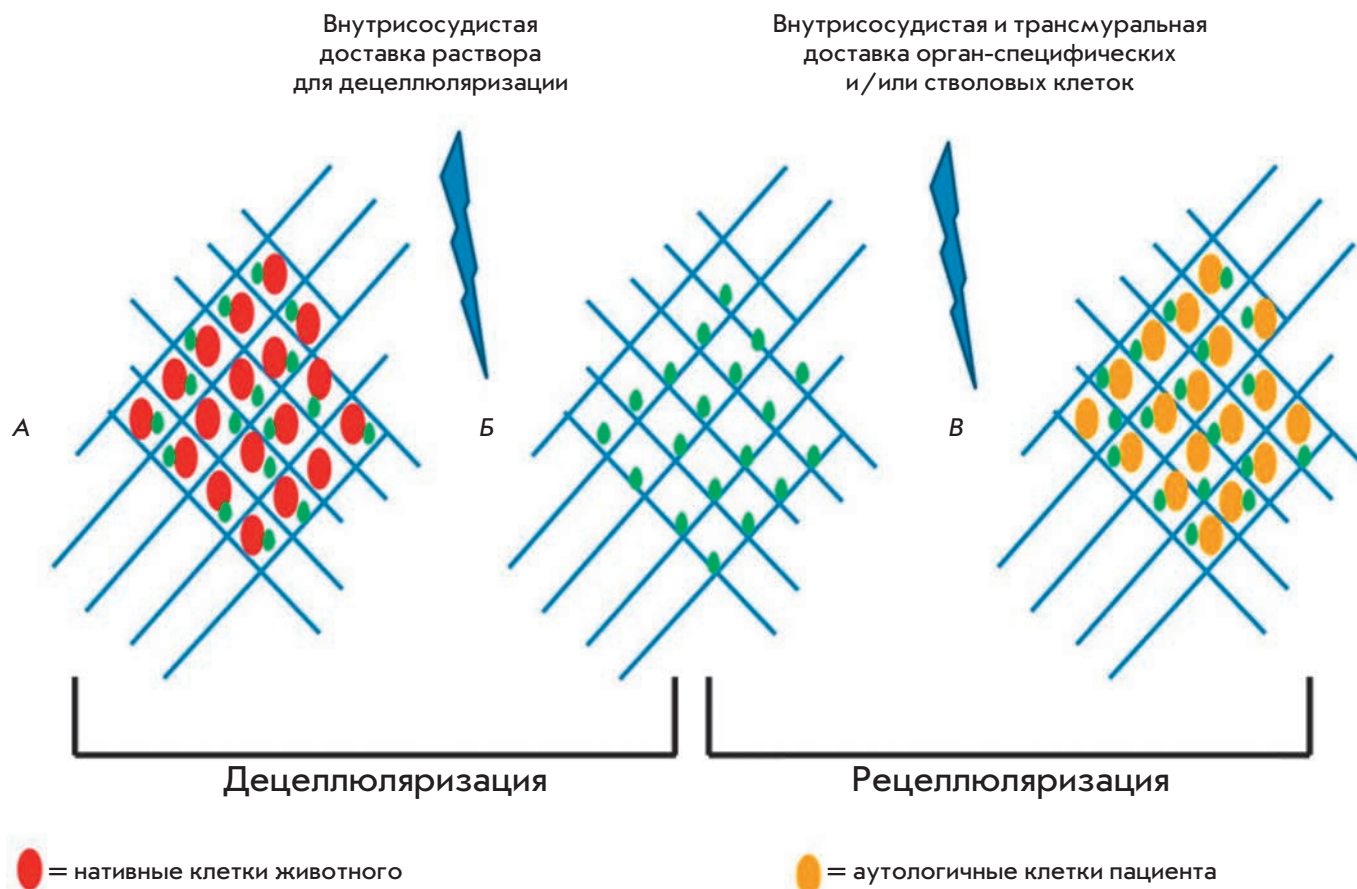
Еще одно преимущество пористых матриксов – возможность кокультивирования нескольких типов клеток для создания условий, повторяющих нативные структуры ткани. Так, кокультивирование островковых клеток мыши, клеток эндотелия пупо-

вины человека и фибробластов крайней плоти человека на матриксе из PLLA/PGLA увеличило выживаемость островковых клеток на 75%. Кроме того, включение фибробластов и эндотелиальных клеток увеличило экспрессию таких маркеров, как Gcg, Pdx1, Nkx6.1 и Glut2. В полтора раза увеличилась секреция инсулина [184].

Очевидно, что биоматериалы создают трехмерную структуру для культивирования клеток, однако все больше говорят о фундаментальном влиянии нативного межклеточного матрикса (МКМ) на состояние клеток. Его роль заключается не только в механической поддержке: МКМ влияет на адгезию клеток, молекулярный состав, клеточные взаимодействия и связывание факторов роста. Кроме того, его механическая жесткость и деформируемость вносят существенный вклад в процессы дифференцировки, пролиферации, выживания, полярности и миграции клеток [185].

Наиболее полно охарактеризованы такие компоненты МКМ, как ламинины – семейство из 15–20 гликопротеинов [186], каждый из которых независимо усиливает секрецию инсулина [187]. Ламинины влияют на клетки, связываясь с интегринами – белками клеточной мембраны, отвечающими за адгезию и передачу внешних сигналов цитоскелету [188]. 3D-структура нативного МКМ определяет топографию эндокринных клеток, что, как показано, влияет на секреторную активность [189]. Более того, составляющие элементы, такие, как коллагены, гликопротеины, гликозаминогликаны независимо предотвращают апоптоз  $\beta$ -клеток, вызванный потерей клеточной адгезии [189–195]. Обнаружено, что компоненты МКМ усиливают секрецию инсулина, даже в отсутствие глюкозы [196]. МКМ способен связывать, запасать и регулировать активность факторов роста, включая TGF- $\beta 1$ , который влияет на развитие, функционирование и регенерацию оЛ [197, 198].

При разработке материалов для создания искусственных 3D-матрикса их поверхность модифицируют прикреплением молекул, составляющих часть нативного МКМ. Однако на данный момент более перспективным считают использование децеллюляризации МКМ (рис. 2) [200–204]. Современные подходы позволяют удалить клеточный материал, ДНК и поверхностные антигены при сохранении структурной целостности МКМ [205]. Получена децеллюляризованная свиная ПЖ с сохранением всех важных структурных компонентов, включая различные типы коллагена, эластин, фибронектин и ламинин [206]. Децеллюляризованная ткань служит матриксом для посадки клеток с целью восстановления клеточной части органа. На данный момент удалось успешно рецеллюляризовать МКМ таких органов,



**Рис. 2.** Схема технологии децеллюляризации-рецеллюляризации. А – интактный орган, состоящий из клеточного компонента (красные эллипсы) и МКМ (синяя сеть), а также факторов роста (зеленые точки). Б – ацеллюлярный орган после освобождения от клеточного материала. В – рецеллюляризованный аутологичными клетками орган (желтые эллипсы) (по [199])

как печень [207], дыхательные пути [208], мочевой пузырь [209], молочная железа [210]. Это позволяет надеяться на положительный результат и в случае ПЖ.

### ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

Современные методы лечения при СД1Т ограничены и не элиминируют долговременные осложнения. Заметен прогресс в исследованиях, связанных с попытками восстановления инсулинпродуцирующей функции ПЖ. Классические методы трансплантации сталкиваются с нехваткой доноров и рисками, связанными с необходимостью иммуносупрессии. Последние могут быть преодолены с помощью технологий инкапсуляции, однако нерешенными остаются такие проблемы, как недостаточная продолжительность жизни клеток и совмещение достаточного числа клеток для обеспечения нормогликемии с раз-

мерами трансплантата, не вызывающими затруднений в движении или какого-либо дискомфорта. Способность некоторых типов клеток, например МСК и гемопоэтических клеток, к регулировке иммунитета может оказаться весьма полезной для предотвращения повторного аутоиммунного уничтожения  $\beta$ -клеток.

Тщательного анализа требует выбор типа клеток. ЭСК и ИПСК могут дифференцироваться в панкреатические клетки-предшественники и/или инсулинпродуцирующие клетки. Использование аллогенных ЭСК, однако, также требует иммуносупрессии либо инкапсулирования. Применение аутологичных ИПСК ограничивается экономической целесообразностью получения своей линии для каждого отдельного пациента и сложностью дифференцировочных протоколов. Кроме того, велика вероятность последующего рецидива, связанного с отторжением, вызван-

ного аутоиммунным механизмом, который и привел к появлению СД1Т. Остается нерешенным и вопрос туморогенной активности оставшихся в трансплантате недифференцированных ПСК.

На данный момент перспективным кажется совмещение различных подходов: полученные от будущего реципиента ИПСК дифференцируют до панкреатических клеток-предшественников, которые затем культивируют в 3D-условиях с элементами МКМ и аутологичными МСК. Или для «перезагрузки» иммунной системы пациента используют гемопоэтические стволовые клетки, а новые инсулинпродуцирующие клетки получают с помощью прямого перепрограммирования. Однако применение этих подходов требует тщательного анализа и оценки возможных рисков, связанных с биологической безопасностью методик и туморогенной активностью используемых клеток.

Многообещающим современным методом является прямое перепрограммирование клеток. Однако недостаточное изучение безопасности этого способа получения инсулинпродуцирующих клеток пока

не позволяет говорить о переносе прямого перепрограммирования в практическую плоскость.

Положительный эффект культивирования в трехмерных условиях описан в многочисленных работах. Кроме того, возможность кокультивирования клеток позволяет получить трансплантаты, наиболее близкие к нативному органу. Перспективным выглядит использование децеллюляризованного МКМ, однако для понимания эффектов использования данных структур в организме необходимы опыты *in vivo*.

Коммитированные клетки пока не удается с достаточной эффективностью приблизить к фенотипу  $\beta$ -клеток *in vitro*. Таким образом, основной задачей клеточной биологии остается поиск доступного источника клеток, способных к эффективной дифференцировке в инсулинпродуцирующие клетки и глюкозозависимой секреции инсулина. ●

*Исследование выполнено за счет гранта  
Российского научного фонда  
(проект № 14-50-00029).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Githens S., Schexnayder J.A., Moses R.L., Denning G.M., Smith J.J., Frazier M.L. // *In vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 1994. V. 30A. P. 622–635.
2. Lammert E., Cleaver O., Melton D. // *Science*. 2001. V. 294. P. 564–567.
3. Field H.A., Dong P.D.S., Beis D., Stainier D.Y. // *Dev. Biol.* 2003. V. 261. P. 197–208.
4. Hebrok M., Kim S.K., Melton D.A. // *Genes Dev.* 1998. V. 12. P. 1705–1713.
5. Kumar M., Jordan N., Melton D., Grapin-Botton A. // *Dev. Biol.* 2003. V. 259. P. 109–122.
6. Riedel M.J., Asadi A., Wang R., Ao Z., Warnock G.L., Kieffer T.J. // *Diabetologia*. 2012. V. 55. № 2. P. 372–381.
7. Jennings R.E., Berry A.A., Kirkwood-Wilson R., Roberts N.A., Hearn T., Salisbury R.J., Blaylock J., Piper Hanley K., Hanley N.A. // *Diabetes*. 2013. V. 62. № 10. P. 3514–3522.
8. Pan F.C., Wright C. // *Dev. Dyn.* 2011. V. 240. P. 530–565.
9. Villasenor A., Chong D.C., Henkemeyer M., Cleaver O. // *Development*. 2010. V. 137. P. 4295–4305.
10. Bhushan A., Itoh N., Kato S., Thiery J.P., Czernichow P., Bellusci S., Scharfmann R. // *Development*. 2001. V. 128. P. 5109–5117.
11. Landsman L., Nijagal A., Whitchurch T.J., VanderLaan R.L., Zimmer W.E., MacKenzie T.C., Hebrok M. // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. e1001143.
12. McClenaghan N.H. // *Exp. Physiol.* 2007. V. 92. № 3. P. 481–496.
13. Peck A.B., Cornelius J.G., Schatz D., Ramiya V.K. // *J. Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*. 2002. V. 9. № 6. P. 704–709.
14. Teitelman G., Alpert S., Polak J.M., Martinez A., Hanahan D. // *Development*. 1993. V. 118. № 4. P. 1031–1039.
15. Herrera P.L., Huarte J., Sanvito F., Meda P., Orci L., Vassalli J.D. // *Development*. 1991. V. 113. № 4. P. 1257–1265.
16. Shao S., Fang Z., Yu X., Zhang M. // *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 384. № 4. P. 401–404.
17. Prasadan K., Tulachan S., Guo P., Shiota C., Shah S., Gittes G. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. V. 396. № 4. P. 1036–1041.
18. Kordowich S., Mansouri A., Collombat P. // *Mol. Cell Endocrinol.* 2010. V. 323. № 1. P. 62–69.
19. Seymour P.A., Freude K.K., Tran M.N., Mayes E.E., Jense J., Kis R., Schere G., Sande M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 6. P. 1865–1870.
20. Seymour P.A., Freude K.K., Dubois C.L., Shih H.P., Patel N.A., Sander M. // *Dev. Biol.* 2008. V. 323. № 1. P. 19–30.
21. Lynn F.C., Smith S.B., Wilson M.E., Yang K.Y., Nekrep N., German M.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 25. P. 10500–10505.
22. Ohlsson H., Karlsson K., Edlund T. // *EMBO J.* 1993. V. 12. P. 4251–4259.
23. Stoffers D.A., Heller R.S., Miller C.P., Habener J.F. // *Endocrinology*. 1999. V. 140. P. 5374–5381.
24. Guz Y., Montminy M.R., Stein R., Leonard J., Gamer L.W., Wright C.V., Teitelman G. // *Development*. 1995. V. 121. P. 11–18.
25. Gu G., Brown J.R., Melton D.A. // *Mech. Dev.* 2003. V. 120. P. 35–43.
26. Offield M.F., Jetton T.L., Labosky P.A., Ray M., Stein R.W., Magnuson M.A., Hogan B.L., Wright C.V. // *Development*. 1996. V. 122. P. 983–995.
27. Ahlgren U., Jonsson J., Jonsson L., Simu K., Edlund H. // *Genes Dev.* 1998. V. 12. P. 1763–1768.
28. Holland A.M., Gonez L.J., Naselli G., Macdonald R.J., Harrison L.C. // *Diabetes*. 2005. V. 54. P. 2586–2595.
29. Gannon M., Ables E.T., Crawford L., Lowe D., Offield M.F., Magnuson M.A., Wright C.V. // *Dev. Biol.* 2008. V. 314. P. 406–417.
30. Gradwohl G., Dierich A., Lemeur M., Guillemot F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 1607–1611.
31. Jenny M., Uhl C., Roche C., Duluc I., Guillermin V., Guillemot F., Jensen J., Kedinger M., Gradwohl G. // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 6338–6347.



32. Wang S., Jensen J.N., Seymour P.A., Hsu W., Dor Y., Sander M., Magnuson M.A., Serup P., Gu G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 24. P. 9715–9720.
33. Schwitzgebel V.M., Scheel D.W., Connors J.R., Kalamaras J., Lee J.E., Anderson D.J., Sussel L., Johnson J.D., German M.S. // *Development*. 2000. V. 127. P. 3533–3542.
34. Heremans Y., van De Casteele M., In't Veld P., Gradwohl G., Serup P., Madsen O., Pipeleers D., Heimberg H. // *J. Cell. Biol.* 2002. V. 159. P. 303–312.
35. Apelqvist A., Li H., Sommer L., Beatus P., Anderson D.J., Honjo T., Hrabe De Angelis M., Lendahl U., Edlund H. // *Nature*. 1999. V. 400. P. 877–881.
36. Grapin-Botton A., Majithia A.R., Melton D.A. // *Genes Dev*. 2001. V. 15. P. 444–454.
37. Villasenor A., Chong D.C., Cleaver O. // *Dev. Dyn.* 2008. V. 237. P. 3270–3279.
38. Pictet R.L., Clark W.R., Williams R.H., Rutter W.J. // *Dev. Biol.* 1972. V. 29. P. 436–467.
39. Johansson K.A., Dursun U., Jordan N., Gu G., Beermann F., Gradwohl G., Grapin-Botton A. // *Dev. Cell*. 2007. V. 12. P. 457–465.
40. Gierl M.S., Karoulias N., Wende H., Strehle M., Birchmeier C. // *Genes Dev*. 2006. V. 20. P. 2465–2478.
41. Mellitzer G., Bonne S., Luco R.F., van De Casteele M., Lenne-Samuel N., Collombat P., Mansouri A., Lee J., Lan M., Pipeleers D., et al. // *EMBO J*. 2006. V. 25. P. 1344–1352.
42. Sosa-Pineda B., Chowdhury K., Torres M., Oliver G., Gruss P. // *Nature*. 1997. V. 386. P. 399–402.
43. Collombat P., Mansouri A., Hecksher-Sorensen J., Serup P., Krull J., Gradwohl G., Gruss P. // *Genes Dev*. 2003. V. 17. P. 2591–2603.
44. Collombat P., Hecksher-Sorensen J., Broccoli V., Krull J., Ponte I., Mundiger T., Smith J., Gruss P., Serup P., Mansouri A. // *Development*. 2005. V. 132. P. 2969–2980.
45. Prado C.L., Pugh-Bernard A.E., Elghazi L., Sosa-Pineda B., Sussel L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 2924–2929.
46. Sussel L., Kalamaras J., Hartigan-O'Connor D.J., Meneses J.J., Pedersen R.A., Rubenstein J.L., German M.S. // *Development*. 1998. V. 125. P. 2213–2221.
47. Sander M., Sussel L., Connors J., Scheel D., Kalamaras J., Dela Cruz F., Schwitzgebel V., Hayes-Jordan A., German M. // *Development*. 2000. V. 127. P. 5533–5540.
48. Oster A., Jensen J., Edlund H., Larsson L.I. // *J. Histochem. Cytochem.* 1998. V. 46. P. 717–721.
49. Henseleit K.D., Nelson S.B., Kuhlbrodt K., Hennings J.C., Ericson J., Sander M. // *Development*. 2005. V. 132. P. 3139–3149.
50. Pedersen J.K., Nelson S.B., Jorgensen M.C., Henseleit K.D., Fujitani Y., Wright C.V., Sander M., Serup P. // *Dev. Biol.* 2005. V. 288. P. 487–501.
51. St-Onge L., Sosa-Pineda B., Chowdhury K., Mansouri A., Gruss P. // *Nature*. 1997. V. 387. P. 406–409.
52. Sander M., Neubüser A., Kalamaras J., Ee H.C., Martin G.R., German M.S. // *Genes Dev*. 1997. V. 11. № 13. P. 1662–1673.
53. Zhao L., Guo M., Matsuoka T.A., Hagman D.K., Parazoli S.D., Poutout V., Stein R. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 11887–11894.
54. Matsuoka T.A., Zhao L., Artner I., Jarrett H.W., Friedman D., Means A., Stein R. // *Cell. Biol.* 2003. V. 23. P. 6049–6062.
55. Aramata S., Han S.L., Yasuda K., Kataoka K. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2005. V. 1730. P. 41–46.
56. Matsuoka T.A., Artner I., Henderson E., Means A., Sander M., Stein R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 2930–2933.
57. Zhang C., Moriguchi T., Kajihara M., Esaki R., Harada A., Shimohata H., Oishi H., Hamada M., Morito N., Hasegawa K., et al. // *Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 25. P. 4969–4976.
58. Artner I., Hang Y., Guo M., Gu G., Stein R. // *J. Endocrinol.* 2008. V. 198. P. 271–279.
59. Frank A., Deng S., Huang X., Velidedeoglu E., Bae Y.S., Liu C., Abt P., Stephenson R., Mohiuddin M., Thambipillai T., et al. // *Ann. Surg.* 2004. V. 240. № 4. P. 631–640.
60. Блюмкин В.Н., Скалецкий Н.Н., Попов В.Л., Шальнев Б.И., Данилов М.И. // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 1983. № 5. С. 89–91.
61. Scharp D.W., Lacy P.E., Santiago J.V., McCullough C.S., Weide L.G., Falqui L., Marchetti P., Gingerich R.L., Jaffe A.S., Cryer P.E. // *Diabetes*. 1990. V. 39. № 4. P. 515–518.
62. Shapiro A.M., Ricordi C., Hering B.J., Auchincloss H., Lindblad R., Robertson R.P., Secchi A., Brendel M.D., Berney T., Brennan D.C. // *N. Engl. J. Med.* 2006. V. 355. № 13. P. 1318–1330.
63. Ryan E.A., Lakey J.R., Rajotte R.V., Korbitt G.S., Kin T., Imes S., Rabinovitch A., Elliott J.F., Bigam D., Kneteman N.M., et al. // *Diabetes*. 2001. V. 50. № 4. P. 710–719.
64. Дедов И.И., Балаболкин М.И., Клебанова Е.М. // *Сахарный диабет*. 2004. № 2. С. 34–41.
65. Shamooh H., Duffy H., Fleischer N., Engel S., Saenger P., Strelzyn M., Litwak M., Wylie-Rosett J., Farkash A., Geiger D., et al. // *N. Engl. J. Med.* 1993. V. 329. № 14. P. 977–986.
66. Bellin M.D., Barton F.B., Heitman A., Harmon J.V., Kandaswamy R., Balamurugan A.N., Sutherland D.E., Alejandro R., Hering B.J. // *Am. J. Transplant.* 2012. V. 12. № 6. P. 1576–1583.
67. Shapiro A.M. // *Curr. Diab. Rep.* 2011. V. 11. № 5. P. 345–354.
68. Calafiore R., Basta G. // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2013. № 4. P. 67–68:84–92.
69. O'Connell P.J., Cowan P.J., Hawthorne W.J., Yi S., Lew A.M. // *Curr. Diab. Rep.* 2013. V. 13. № 5. P. 687–694.
70. Graham M.L., Schuurman H.J. // *Xenotransplantation*. 2013. V. 20. № 1. P. 5–17.
71. Burman K.D., Cunningham E.J., Klachko D.M., Burns T.W. // *Mol. Med.* 1973. V. 70. № 6. P. 363–366.
72. Skinner S.J.M., Tan P.L.J., Garkavenko O., Muzina M., Escobar L., Elliott R.B. // *InTech*. 2011. V. 11. P. 391–408.
73. Elliott R.B., Escobar L., Tan P.L., Muzina M., Zwaan S., Buchanan C. // *Xenotransplantation*. 2007. V. 14. № 2. P. 157–161.
74. Elliott R.B., Technologies L.C. // *Curr. Opin. Organ Transplant*. 2011. V. 16. № 2. P. 195–200.
75. Soon-Shiong P. // *Drug Deliv. Rev.* 1999. V. 35. P. 259–270.
76. Tuch B.E., Keogh G.W., Williams L.J., Wu W., Foster J.L., Vaithilingam V., Philips R. // *Diabetes Care*. 2009. V. 32. P. 1887–1889.
77. Basta G., Montanucci P., Luca G., Boselli C., Noya G., Barbaro B., Qi M., Kinzer K.P., Oberholzer J., Calafiore R. // *Diabetes Care*. 2011. V. 34. P. 2406–2409.
78. Strautz R.L. // *Diabetologia*. 1970. V. 6. P. 306–312.
79. De Vos P., Hamel A.F., Tatarkiewicz K. // *Diabetologia*. 2002. V. 45. P. 159–173.
80. Soon-Shiong P., Heintz R.E., Merideth N., Yao Q.X., Yao Z., Zheng T., Murphy M., Moloney M.K., Schmehl M., Harris M., et al. // *Lancet*. 1994. V. 343. P. 950–951.
81. De Vos P., De Haan B., van Schilfgaarde R. // *Biomaterials*. 1997. V. 18. P. 273–278.
82. De Vos P., De Haan B.J., Wolters G.H., Strubbe J.H., van Schilfgaarde R. // *Diabetologia*. 1997. V. 40. P. 262–270.
83. De Vos P., van Straaten J.F., Nieuwenhuizen A.G., de Groot M., Ploeg R.J., De Haan B.J., van Schilfgaarde R. // *Diabetes*. 1999. V. 48. P. 1381–1388.
84. Duvivier-Kali V.F., Omer A., Parent R.J., O'Neil J.J., Weir G.C. // *Diabetes*. 2001. V. 50. P. 1698–1705.
85. Strand B.L., Ryan T.L., In't Veld P., Kulseng B., Rokstad



- A.M., Skjak-Brek G., Espevik T. // *Cell Transplant.* 2001. V. 10. P. 263–275.
86. King A., Sandler S., Andersson A. // *J. Biomed. Mater. Res.* 2001. V. 57. P. 374–383.
87. Yao V., McCauley R., Cooper D., Platell C., Hall J.C. // *Surg. Infect.* 2004. V. 5. P. 229–236.
88. Dufrane D., Steenberghe M.Y., Goebbels R.M., Saliez A., Guiot Y., Gianello P. // *Biomaterials.* 2006. V. 27. P. 3201–3208.
89. Vêriter S., Mergen J., Goebbels R.M., Aouassar N., Grégoire C., Jordan B., Levêque P., Gallez B., Gianello P., Dufrane D. // *Tissue Eng. Part A.* 2010. V. 16. P. 1503–1513.
90. Thomson J.A., Marshall V.S. // *Curr. Top. Dev. Biol.* 1998. V. 38. P. 133–165.
91. Takahashi K., Yamanaka S. // *Cell.* 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
92. Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., et al. // *Science.* 2007. V. 318. P. 1917–1920.
93. Rao M., Condit M.L. // *Stem Cells Dev.* 2008. V. 17. P. 1–10.
94. Maehr R., Chen S., Snitow M., Ludwig T., Yagasaki L., Goiland R., Leibel R.L., Melton D.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 15768–15773.
95. Zhang D., Jiang W., Liu M., Sui X., Yin X., Chen S., Shi Y., Deng H. // *Cell Res.* 2009. V. 19. P. 429–438.
96. Jiang J., Au M., Lu K., Eshpeter A., Korbitt G., Fisk G., Majumdar A.S. // *Stem Cells.* 2007. V. 25. P. 1940–1953.
97. Chen S., Borowiak M., Fox J.L., Maehr R., Osafune K., Davidson L., Lam K., Peng L.F., Schreiber S.L., Rubin L.L., et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2009. V. 5. P. 258–265.
98. Tateishi K., He J., Taranova O., Liang G., D'Alessio A.C., Zhang Y. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 31601–31607.
99. Kroon E., Martinson L.A., Kadoya K., Bang A.G., Kelly O.G., Eliazar S., Young H., Richardson M., Smart N.G., Cunningham J., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 443–452.
100. D'Amour K.A., Agulnick A.D., Eliazar S., Kelly O.G., Kroon E., Baetge E.E. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 1534–1541.
101. Mfopou J.K., Chen B., Mateizel I., Sermon K., Bouwens L. // *Gastroenterology.* 2010. V. 138. P. 2233–2245.
102. Johansson M., Ståhlberg A., Ameri J., Sand F.W., Norrman K., Semb H. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 3. e4794.
103. D'Amour K.A., Bang A.G., Eliazar S., Kelly O.G., Agulnick A.D., Smart N.G., Moorman M.A., Kroon E., Carpenter M.K., Baetge E.E. // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. P. 1392–1401.
104. McLean A.B., D'Amour K.A., Jones K.L., Krishnamoorthy M., Kulik M.J., Reynolds D.M., Sheppard A.M., Liu H., Xu Y., Baetge E.E., et al. // *Stem Cells.* 2007. V. 25. P. 29–38.
105. Shim J.H., Kim S.E., Woo D.H., Kim S.K., Oh C.H., McKay R., Kim J.H. // *Diabetologia.* 2007. V. 50. P. 1228–1238.
106. Kubo A., Shinozaki K., Shannon J.M., Kouskoff V., Kennedy M., Woo S., Fehling H.J., Keller G. // *Development.* 2004. V. 131. P. 1651–1662.
107. Takeuchi H., Nakatsuji N., Suemori H. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 4488.
108. Kunisada Y., Tsubooka-Yamazoe N., Shoji M., Hosoya M. // *Stem Cell Res.* 2012. V. 8. P. 274–284.
109. Borowiak M., Maehr R., Chen S., Chen A.E., Tang W., Fox J.L., Schreiber S.L., Melton D.A. // *Cell Stem Cell.* 2009. V. 4. P. 348–358.
110. Bose B., Shenoy S.P., Konda S., Wangikar P. // *Cell Biol. Internat.* 2012. V. 36. P. 1013–1020.
111. Gage B.K., Webber T.D., Kieffer T.J. // *PLoS One.* 2013. V. 8. e82076.
112. Basford C.L., Prentice K.J., Hardy A.B., Sarangi F., Micallef S.J., Li X., Guo Q., Elefanty A.G., Stanley E.G., Keller G., et al. // *Diabetologia.* 2012. V. 55. P. 358–371.
113. Micallef S.J., Li X., Schiesser J.V., Hirst C.E., Yu Q.C., Lim S.M., Nostro M.C., Elliott D.A., Sarangi F., Harrison L.C., et al. // *Diabetologia.* 2012. V. 55. P. 694–706.
114. Rezanian A., Bruin J.E., Riedel M.J., Mojibian M., Asadi A., Xu J., Gauvin R., Narayan K., Karanu F., O'Neil J.J., et al. // *Diabetes.* 2012. V. 61. P. 2016–2029.
115. Rezanian A., Bruin J.E., Xu J., Narayan K., Fox J.K., O'Neil J.J., Kieffer T.J. // *Stem Cells.* 2013. V. 31. P. 2432–2442.
116. Schulz T.C., Young H.Y., Agulnick A.D., Babin M.J., Baetge E.E., Bang A.G., Bhoumik A., Cepa I., Cesario R.M., Haakmeester C., et al. // *PLoS One.* 2012. V. 7. e37004.
117. Kirk K., Hao E., Lahmy R., Itkin-Ansari P. // *Stem Cell Res.* 2014. V. 12. P. 807–814.
118. Bruin J.E., Rezanian A., Xu J., Narayan K., Fox J.K., O'Neil J.J., Kieffer T.J. // *Diabetologia.* 2013. V. 56. P. 1987–1998.
119. Pagliuca F.W., Millman J.R., Gürtler M., Segel M., Van Dervort A., Ryu J.H., Peterson Q.P., Greiner D., Melton D.A. // *Cell.* 2014. V. 159. № 2. P. 428–439.
120. Xie R., Everett L.J., Lim H.W., Patel N.A., Schug J., Kroon E., Kelly O.G., Wang A., D'Amour K.A., Robins A.J., et al. // *Stem Cell.* 2013. V. 12. P. 224–237.
121. Blum B., Hrvatin S.S., Schuetz C., Bonal C., Rezanian A., Melton D.A. // *Nat. Biotechnol.* 2012. V. 30. P. 261–264.
122. Noguchi H., Kaneto H., Weir G.C., Bonner-Weir S. // *Diabetes.* 2003. V. 52. P. 1732–1737.
123. Koya V., Lu S., Sun Y.P., Purich D.L., Atkinson M.A., Li S.W., Yang L.J. // *Diabetes.* 2008. V. 57. № 3. P. 757–769.
124. Noguchi H., Xu G., Matsumoto S., Kaneto H., Kobayashi N., Bonner-Weir S., Hayashi S. // *Cell Transplant.* 2006. V. 15. № 10. P. 929–938.
125. Kopinke D., Murtaugh L.C. // *BMC Dev. Biol.* 2010. V. 10. № 38. doi:10.1186/1471-213X-10-38.
126. Okuno M., Minami K., Okumachi A., Miyawaki K., Yokoi N., Toyokuni S., Seino S. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007. V. 292. P. 158–165.
127. Lardon J., Huyens N., Rooman I., Bouwens L. // *Virchows Arch.* 2004. V. 444. P. 61–65.
128. Lipsett M., Finegood D.T. // *Diabetes.* 2002. V. 51. P. 1834–1841.
129. Desai B.M., Oliver-Krasinski J., De Leon D.D., Farzad C., Hong N., Leach S.D., Stoffers D.A. // *J. Clin. Invest.* 2007. V. 117. P. 971–977.
130. Zhou Q., Brown J., Kanarek A., Rajagopal J., Melton D.A. // *Nature.* 2008. V. 455. № 7213. P. 627–632.
131. Cabrera O., Berman D.M., Kenyon N.S., Ricordi C., Berggren P.O., Caicedo A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 7. P. 334–339.
132. Konstantinova I., Nikolova G., Ohara-Imaizumi M., Meda P., Kucera T., Zarbalis K., Wurst W., Nagamatsu S., Lammert E. // *Cell.* 2007. V. 129. № 2. P. 359–370.
133. Zhang T., Saunee N.A., Breslin M.B., Song K., Lan M.S. // *J. Cell Physiol.* 2012. V. 227. № 6. P. 2470–2479.
134. Lima M.J., Muir K.R., Docherty H.M., Drummond R., McGowan N.W., Forbes S., Heremans Y., Houbracken I., Ross J.A., Forbes S.J., et al. // *Diabetes.* 2013. V. 62. № 8. P. 2821–2833.
135. Wang A.Y., Ehrhardt A., Xu H., Kay M.A. // *Mol. Ther.* 2007. V. 15. № 2. P. 255–263.
136. Collombat P., Xu X., Ravassard P., Sosa-Pineda B., Dussaud S., Billestrup N., Madsen O.D., Serup P., Heimberg H., Mansouri A. // *Cell.* 2009. V. 138. P. 449–462.
137. Yang Y.P., Thorel F., Boyer D.F., Herrera P.L., Wright C.V. // *Genes Dev.* 2011. V. 25. P. 1680–1685.
138. Chung C.H., Hao E., Piran R., Keinan E., Levine F. // *Stem Cells.* 2010. V. 28. P. 1630–1638.
139. Thorel F., Nepote V., Avril I., Kohno K., Desgraz R., Chera S., Herrera P.L. // *Nature.* 2010. V. 464. P. 1149–1154.

140. Nir T, Melton D.A., Dor Y. // *J. Clin. Invest.* 2007. V. 117. P. 2553–2561.
141. Fujikawa T, Oh S.-H., Pi L., Hatch H.M., Shupe T, Petersen B.E. // *Am. J. Pathol.* 2005. V. 166. P. 1781–1791.
142. Enseñat-Waser R., Santana A., Vicente-Salar N., Cigudosa J.C., Roche E., Soria B., Reig J.A. // *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2006. V. 42. P. 115–123.
143. Fernandes K.J., McKenzie I.A., Mill P., Smith K.M., Akhavan M., Barnabé-Heider F., Biernaskie J., Junek A., Kobayashi N.R., Toma J.G. // *Nat. Cell Biol.* 2004. V. 6. P. 1082–1093.
144. Toma J.G., McKenzie I.A., Bagli D., Miller F.D. // *Stem Cells.* 2005. V. 23. P. 727–737.
145. Bi D., Chen F.G., Zhang W.J., Zhou G.D., Cui L., Liu W., Cao Y. // *BMC Cell Biol.* 2010. V. 11. P. 46.
146. Kim B., Yoon B.S., Moon J.-H., Kim J., Jun E.K., Lee J.H., Kim J.S., Baik C.S., Kim A., Whang K.Y. // *Exp. Mol. Med.* 2012. V. 44. P. 26–35.
147. Toma J.G., Akhavan M., Fernandes K.J., Barnabé-Heider F., Sadikot A., Kaplan D.R., Miller F.D. // *Nat. Cell Biol.* 2001. V. 3. P. 778–784.
148. Bakhtiari M., Mansouri K., Sadeghi Y., Mostafaie A. // *Cell Prolif.* 2012. V. 45. P. 148–157.
149. Mehrabi M., Mansouri K., Hosseinkhani S., Yarani R., Yari K., Bakhtiari M., Mostafaie A. // *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2015. V. 51. № 6. P. 595–603.
150. Da Silva M.L., Chagastelles P.C., Nardi N.B. // *J. Cell Sci.* 2006. V. 119. № 11. P. 2204–2213.
151. Trounson A // *BMC Med.* 2009. V. 7. P. 29.
152. Kang H.M., Kim J., Park S., Kim J., Kim H., Kim K.S., Lee E.J., Seo S.I., Kang S.G., Lee J.E., et al. // *Stem Cells.* 2009. V. 27. № 8. P. 1999–2008.
153. Le Douarin N.M., Cruzet S., Couly G., Dupin E. // *Development.* 2004. V. 131. № 19. P. 4637–4650.
154. Huang C.Y., Peláez D., Domínguez-Bendala J., Garcia-Godoy F., Cheung H.S. // *Regen. Med.* 2009. V. 4. № 6. P. 809–821.
155. Prabakar K.R., Domínguez-Bendala J., Molano R.D., Pileggi A., Villate S., Ricordi C., Inverardi L. // *Cell Transplant.* 2012. V. 21. № 6. P. 1321–1339.
156. Wu Y., Chen L., Scott P.G., Tredget E.E. // *Stem Cells.* 2007. V. 25. № 10. P. 2648–2659.
157. Ball S.G., Shuttleworth C.A., Kielty C.M. // *J. Cell. Mol. Med.* 2007. V. 11. № 5. P. 1012–1030.
158. Ferber S., Halkin A., Cohen H., Ber I., Einav Y., Goldberg I., Barshack I., Seiffers R., Kopolovic J., Kaiser N., Karasik A. // *Nat. Med.* 2000. V. 6. № 5. P. 568–572.
159. Horb M.E., Shen C.N., Tosh D., Slack J.M. // *Curr. Biol.* 2003. V. 13. № 2. P. 105–115.
160. Li W.C., Horb M.E., Tosh D., Slack J.M. // *Mech. Dev.* 2005. V. 122. № 6. P. 835–847.
161. Bonner-Weir S., Li W.C., Ouziel-Yahalom L., Guo L., Weir G.C., Sharma A. // *Diabetes.* 2010. V. 59. P. 2340–2348.
162. Gianani R., Putnam A., Still T., Yu L., Miao D., Gill R.G., Beilke J., Supon P., Valentine A., Iveson A., et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006. V. 91. P. 1855–1861.
163. Dor Y., Melton D.A. // *Cell.* 2008. V. 132. P. 183–184.
164. Li Y., Peng M., Gong G. // *Exp. Ther. Med.* 2014. V. 7. P. 131–136.
165. Basta G., Racanicchi L., Mancuso F., Guido L., Luca G., Macchiarulo G., Brunetti P., Calafiore R. // *Transplant. Proc.* 2004. V. 36. P. 2857–2863.
166. Liu T., Wang C.Y., Yu F., Gou S.M., Wu H.S., Xiong J.X., Zhou F. // *World J. Gastroenterol.* 2007. V. 13. P. 5232–5237.
167. Anastasi E., Ponte E., Gradini R., Bulotta A., Sale P., Tiberti C., Okamoto H., Dotta F., Di Mario U. // *Eur. J. Endocrinol.* 1999. V. 141. P. 644–652.
168. Higuchi Y., Herrera P., Muniesa P., Huarte J., Belin D., Ohashi P., Aichele P., Orci L., Vassalli J.D., Vassalli P. // *J. Exp. Med.* 1992. V. 176. P. 1719–1731.
169. Gu D., Arnush M., Sawyer S.P., Sarvetnick N. // *Am. J. Physiol.* 1995. V. 269. P. 1089–1094.
170. Krizik M.R., Jones E., Chen Z., Krakowski M., Krahl T., Good A., Wright C., Fox H., Sarvetnick N. // *J. Endocrinol.* 1999. V. 163. P. 523–530.
171. Tanaka S., Kobayashi T., Nakanishi K., Okubo M., Murase T., Hashimoto M., Watanabe G., Matsushita H., Endo Y., Yoshizaki H., et al. // *Diabetes Care.* 2001. V. 24. P. 1661–1667.
172. Baeyens L., Lemper M., Leucx G., De Groef S., Bonfanti P., Stangé G., Shemer R., Nord C., Scheel D.W., Pan F.C., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2014. V. 32. № 1. P. 76–83.
173. Egéa J.C., Hirtz C., Gross R., Lajoix A.D., Traskawka E., Ribes G., de Périère D.D. // *Eur. J. Oral. Sci.* 2000. V. 108. № 4. P. 292–296.
174. Smith P.H., Patel D.G. // *Diabetes.* 1984. V. 33. № 7. P. 661–666.
175. Shubnikova E.A., Pogodina L.S. // *Ontogenez.* 2000. V. 31. № 6. P. 476–480.
176. Gvazava I.G., Vasiliev A.V., Balan O.V., Terskikh V.V. // *Tsitologiya.* 2011. V. 53. № 2. P. 129–134.
177. Okumura K., Nakamura K., Hisatomi Y., Nagano K., Tanaka Y., Terada K., Sugiyama T., Umeyama K., Matsumoto K., Yamamoto T., et al. // *Hepatology.* 2003. V. 38. P. 104–113.
178. Hisatomi Y., Okumura K., Nakamura K., Matsumoto S., Satoh A., Nagano K., Yamamoto T., Endo F. // *Hepatology.* 2004. V. 39. № 3. P. 667–675.
179. Sato A., Okumura K., Matsumoto S., Hattori K., Hattori S., Shinohara M., Endo F. // *Cloning Stem Cells.* 2007. V. 9. № 2. P. 191–205.
180. Baek H., Noh Y.H., Lee J.H., Yeon S.I., Jeong J., Kwon H. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2014. V. 8. № 9. P. 717–727.
181. Vacanti J.P., Langer R. // *Lancet.* 1999. V. 354. P. 32–34.
182. Chun S., Huang Y., Xie W.J., Hou Y., Huang R.P., Song Y.M., Liu X.M., Zheng W., Shi Y., Song C.F. // *Transplant. Proc.* 2008. V. 40. P. 1658.
183. Kawazoe N., Tateishi T. // *J. Bioact. Compat. Polym.* 2009. V. 24. P. 25.
184. Kaufman-Francis K., Koffler J., Weinberg N., Dor Y., Levenberg S. // *PLoS One.* 2012. V. 7. e40741.
185. Hynes R.O. // *Science.* 2009. V. 326. № 5957. P. 1216–1219.
186. Otonkoski T., Banerjee M., Korsgren O., Thornell L.E., Virtanen I. // *Diabetes Obes. Metab.* 2008. V. 10. № 4. P. 119–127.
187. Edamura K., Nasu K., Iwami Y., Ogawa H., Sasaki N., Ohgawara H. // *Cell Transplant.* 2003. V. 12. № 4. P. 439–446.
188. Stendahl J.C., Kaufman D.B., Stupp S.I. // *Cell Transplant.* 2009. V. 18. № 1. P. 1–12.
189. Montesano R., Mouron P., Amherdt M., Orci L. // *J. Cell Biol.* 1983. V. 97. № 3. P. 935–939.
190. Weber L.M., Hayda K.N., Anseth K.S. // *Tissue Eng. Part A.* 2008. V. 14. № 12. P. 1959–1968.
191. Wang R.N., Rosenberg L. // *J. Endocrinol.* 1999. V. 163. № 2. P. 181–190.
192. Rosenberg L., Wang R., Paraskevas S., Maysinger D. // *Surgery.* 1999. V. 126. № 2. P. 393–398.
193. Meda P., Hooghe-Peters E.L., Orci L. // *Diabetes.* 1980. V. 29. № 6. P. 497–500.
194. Rabinovitch A., Russell T., Mintz D.H. // *Diabetes.* 1979. V. 28. № 12. P. 1108–1113.
195. Thivolet C.H., Chatelain P., Nicoloso H., Durand A., Bertrand J. // *Exp. Cell Res.* 1985. V. 159. № 2. P. 313–322.
196. Lucas-Clerc C., Massart C., Champion J.P., Launois B., Nicol M. // *Mol. Cell Endocrinol.* 1993. V. 94. № 1. P. 9–20.

197. Han B., Qi S., Hu B., Luo H., Wu J. // *J. Immunol.* 2011. V. 186. № 10. P. 5833–5844.
198. Crisera C.A., Maldonado T.S., Kadison A.S., Li M., Alkasab S.L., Longaker M.T., Gittes G.K. // *Differentiation.* 2000. V. 65. № 5. P. 255–259.
199. Salvatori M., Katari R., Patel T., Peloso A., Mugweru J., Owusu K., Orlando G. // *J. Diabetes Sci. Technol.* 2014. V. 8. № 1. P. 159–169.
200. Song J.J., Ott H.C. // *Trends Mol. Med.* 2011. V. 17. № 8. P. 424–432.
201. Orlando G., Baptista P., Birchall M., De Coppi P., Farney A., Guimaraes-Souza N.K., Opara E., Rogers J., Seliktar D., Shapira-Schweitzer K., et al. // *Transpl. Int.* 2011. V. 24. № 3. P. 223–232.
202. Orlando G., Wood K.J., Stratta R.J., Yoo J.J., Atala A., Soker S. // *Transplantation.* 2011. V. 91. № 12. P. 1310–1317.
203. Orlando G., Wood K.J., De Coppi P., Baptista P.M., Binder K.W., Bitar K.N., Breuer C., Burnett L., Christ G., Farney A., et al. // *Ann. Surg.* 2012. V. 255. № 5. P. 867–880.
204. Badylak S.F., Weiss D.J., Caplan A., Macchiarini P. // *Lancet.* 2012. V. 379. № 9819. P. 943–952.
205. Gilbert T.W., Sellaro T.L., Badylak S.F. // *Biomaterials.* 2006. V. 27. № 19. P. 3675–3683.
206. Mirmalek-Sani S.H., Orlando G., McQuilling J.P., Pareta R., Mack D.L., Salvatori M., Farney A.C., Stratta R.J., Atala A., Opara E.C., et al. // *Biomaterials.* 2013. V. 34. № 22. P. 5488–5495.
207. Baptista P.M., Siddiqui M.M., Lozier G., Rodriguez S.R., Atala A., Soker S. // *Hepatology.* 2011. V. 53. № 2. P. 604–617.
208. Song J.J., Kim S.S., Liu Z., Madsen J.C., Mathisen D.J., Vacanti J.P., Ott H.C. // *Ann. Thorac. Surg.* 2011. V. 92. № 3. P. 998–1006.
209. Loai Y., Yeger H., Coz C., Antoon R., Islam S.S., Moore K., Farhat W.A. // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2010. V. 94. № 4. P. 1205–1215.
210. Wicha M.S., Lowrie G., Kohn E., Bagavandoss P., Mahn T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982. V. 79. № 10. P. 3213–3217.