

УДК 577.21:576.364:615-085:576.367

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: проблемы и перспективы применения в заместительной клеточной терапии

С. П. Медведев¹, А. И. Шевченко¹, С. М. Закиян^{1,2*}¹Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 10²Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, 630117,

Новосибирск, ул. ак. Тимакова, 2

*E-mail: zakian@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 10.04.2010 г.

РЕФЕРАТ Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) – новый тип плюрипотентных клеток, которые можно получать путем репрограммирования дифференцированных клеток животных и человека. В обзоре рассматриваются вопросы, связанные с природой ИПСК, приведено описание различных методик получения ИПСК. Особое внимание уделено рассмотрению методов, направленных на получение ИПСК человека без генетической модификации геномов клеток, и способов повышения эффективности получения ИПСК. Рассматриваются вопросы возможности и безопасности применения ИПСК в заместительной клеточной терапии заболеваний человека и исследовании новых лекарственных веществ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА репрограммирование клеток, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, направленная дифференцировка стволовых клеток, клеточная терапия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЭСК – эмбриональные стволовые клетки, ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, НСК – нейральные стволовые клетки, СКЖТ – стволовые клетки жировой ткани, ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота, кДНК – кодирующая дезоксирибонуклеиновая кислота, РНК – рибонуклеиновая кислота, мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота, ФКС – фибробласты кожных сосочков, КМ – кардиомиоциты, СМА – спинальная мышечная атрофия, СМА-ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные из фибробластов пациентов, страдающих спинальной мышечной атрофией, GFP – green fluorescent protein (белок, флуоресцирующий зеленым светом), LTR – long terminal repeat (длинный концевой повтор).

ИНДУЦИРОВАННАЯ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ

Плюрипотентные стволовые клетки являются уникальным объектом для исследования множества процессов, происходящих во время раннего развития млекопитающих, а также перспективным инструментом при клеточной терапии заболеваний человека. Уникальность данных клеток состоит в способности, находясь в культуре, неограниченное время поддерживать самообновление и давать после дифференцировки все клеточные типы, из которых состоит взрослый организм [1]. Плюрипотентность поддерживается сложной системой сигнальных молекул и генной сети, специфической для плюрипотентных клеток. Центральное положение в иерархии генов, участвующих в поддержании плюрипотентности, занимают *Oct4*, *Sox2*

и *Nanog*, кодирующие транскрипционные факторы [2, 3]. Совместное действие сигнальных молекул, действующих извне, и внутренних факторов приводит к формированию специфического паттерна экспрессии генов, а также состояния эпигенома, характерного для стволовых клеток. Во время направленной или спонтанной дифференцировки происходят изменения паттерна экспрессии генов, а также широкомасштабные эпигенетические трансформации, приводящие к установлению транскриптома и эпигенома, характерных для конкретного типа клеток.

До недавнего времени единственным хорошо изученным источником плюрипотентных стволовых клеток были эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). ЭСК получают из внутренней клеточной массы и эпибласта бластоцист

[4–6]. В настоящий момент известен ряд протоколов получения различных клеточных производных из ЭСК человека. Однако использование ЭСК в заместительной клеточной терапии ограничено. Первая причина ограничения заключается в иммунной несовместимости донорских клеток и организма реципиента, что может приводить к отторжению трансплантированных клеток. Вторая причина носит этический характер, поскольку во время получения ЭСК эмбрион погибает. Первая проблема может быть решена с помощью пересадки ядра из соматической клетки в яйцеклетку с последующим получением эмбриона и ЭСК. При пересадке ядра из соматической клетки в яйцеклетку происходит репрограммирование генома за счет факторов, находящихся в цитоплазме. Такой способ получения плюрипотентных клеток от конкретного индивидуума получил название «терапевтическое клонирование». Однако данный метод технологически сложен, эффективность репрограммирования крайне низка. Кроме того, этот подход наталкивается на уже упомянутые проблемы этического характера, на этот раз связанные с получением большого числа яйцеклеток человека [7].

В 2006 г. была впервые опубликована работа, описывающая получение плюрипотентных клеток путем эктопической экспрессии четырех генов: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* в эмбриональных и взрослых фибробластах мыши [8]. Плюрипотентные клетки, полученные из соматических, были названы индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК). С помощью данного набора факторов (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*) ИПСК получены из различных типов дифференцированных клеток мыши [9–14] и человека [15–17]. Кроме того, ИПСК человека были получены с помощью несколько измененного набора генов: *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* и *LIN28* [18]. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки очень сходны с эмбриональными стволовыми клетками по широкому ряду характеристик. Они обладают сходной морфологией и способом роста, одинаково чувствительны к ростовым факторам и сигнальным молекулам. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, как и эмбриональные стволовые клетки, способны дифференцироваться *in vitro* в производные всех трех первичных зародышевых листков (эктодермы, энтодермы и мезодермы), а также формировать тератомы при подкожной инъекции иммунодефицитным мышам. ИПСК мыши, инъецированные в бластоцисты, нормально включаются в развитие, приводя к формированию животных с высокой степенью химеризации. Более того, ИПСК мыши способны развиваться в целый организм при инъекции в тетраплоидные бластоцисты [19, 20]. Таким образом, в руках исследователей оказался замечательный метод, позволяющий получать плюрипотентные стволовые клетки из соматических клеток различных типов, избегая проблем этического плана.

ПРОБЛЕМА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ИПСК И БЕЗОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ В ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

В первых работах по получению индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши и человека для доставки генов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* в соматические клетки применялись векторы на основе ретро- и лен-

тивирусов. Ретровирусы обладают достаточно высокой эффективностью трансдукции, хотя и не одинаковой для различных типов клеток. При использовании интеграции ретровирусов в геном клетки хозяина необходимо, чтобы эта клетка имела довольно высокий темп деления, что характерно для довольно ограниченного спектра клеток, которые можно поддерживать в культуре. Кроме того, транскрипция, происходящая с ретровирусной конструкцией и управляемая промотором, находящимся в 5'LTR (long terminal repeat), прекращается при переходе соматической клетки в плюрипотентное состояние [21]. Это свойство делает ретровирусы привлекательными при получении ИПСК. Однако ретровирусы обладают рядом свойств, делающих ИПСК, полученные с их помощью, непригодными для использования в клеточной терапии болезней человека. Во-первых, ретровирусная ДНК интегрируется в геном клетки-хозяина. Интеграция происходит в случайном порядке, не существует каких-либо специфических последовательностей либо закономерностей интеграции ретровирусов. Число копий экзогенной ретровирусной ДНК, которая интегрируется в геном, может сильно варьировать [15]. Ретровирусы, интегрирующиеся в геном клетки, могут привносить промоторные элементы, сигналы полиаденилирования, встраиваться в кодирующие части генов, вызывая нарушение транскрипции. Во-вторых, поскольку уровень транскрипции экзогенных *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* в ретровирусной конструкции снижается при переходе клеток в плюрипотентное состояние, это может приводить к уменьшению эффективности получения стабильных линий ИПСК, так как процесс переключения от экзогенной экспрессии генов плюрипотентности к эндогенной может не произойти. В-третьих, некоторые исследования показывают, что в ретровирусных конструкциях может возобновляться транскрипция трансгенов в клетках производных ИПСК [22]. Высокая вероятность возобновления эктопической экспрессии генов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* делает невозможным использование ИПСК, полученных с помощью ретровирусов, для клинических исследований, кроме того, данные ИПСК сложно применять даже в фундаментальных исследованиях основ репрограммирования и плюрипотентности клеток. Lentивирусы, которые используются для получения ИПСК, также обладают способностью интегрироваться в геном и сохранять транскрипционную активность в плюрипотентных клетках. Выходом из данной ситуации является использование промоторов, управляемых веществами, добавляемыми в культуральную среду, например тетрациклином или доксициклином, что позволяет регулировать транскрипцию трансгенов. ИПСК уже получены с помощью подобных систем [23].

Другая серьезная проблема заключается в самом наборе генов, используемом для индукции плюрипотентности [22]. Эктопическая транскрипция генов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* может вызывать развитие раковых новообразований из клеток, предшественниками которых были ИПСК, так как экспрессия генов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* ассоциирована с развитием множества видов опухолей, известных в онкогенетике [22, 24]. В частности, показано, что сверхэкспрессия *Oct4* вызывает дисплазию клеток эпителия у мышей [25], аберрантная экспрессия *Sox2* вызывает развитие

зубчатых полипов и слизистой карциномы толстой кишки [26], в опухолях молочной железы наблюдается повышение экспрессии гена *Klf4* [27], а нарушение экспрессии гена *c-Myc* наблюдается в 70 % всех типов рака у человека [28]. Развитие опухолей наблюдается у ~ 50 % химерных мышей, полученных при инъекции ретровирусных ИПСК в бластоцисты, что, вероятнее всего, связано с реактивацией экзогенного *c-Myc* [29, 30].

Существует несколько возможных стратегий решения описанных выше проблем:

- поиск менее «канцерогенного» набора генов, необходимых и достаточных для репрограммирования;
- уменьшение числа генов, необходимых для репрограммирования, поиск негенетических факторов, способствующих репрограммированию;
- поиск систем, позволяющих удалить экзогенную ДНК из генома клетки после репрограммирования;
- разработка способов доставки в клетку генетических конструкций, которые не интегрируются в ее геном;
- поиск способов репрограммирования соматических клеток с использованием рекомбинантных белков.

ГЕНЫ, КОТОРЫЕ МОГУТ ЗАМЕНИТЬ *c-Myc* И *Klf4* ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ИПСК

Эктопическая экспрессия генов *c-Myc* и *Klf4* является наиболее опасной из-за высокой вероятности образования злокачественных опухолей [22]. Следовательно, необходимо найти другие гены, которые могли бы заменить *c-Myc* и *Klf4* при получении ИПСК. Было показано, что при репрограммировании соматических клеток человека эти гены могут быть с успехом заменены генами *NANOG* и *LIN28* [18]. Кроме того, ИПСК были получены из эмбриональных фибробластов мыши с помощью сверхэкспрессии генов *Oct4*, *Sox2*, а также гена *Esrrb*, кодирующего ядерный орфановый рецептор. Ранее было показано, что *Esrrb*, действующий как активатор транскрипции таких генов, как *Oct4*, *Sox2* и *Nanog*, необходим для самообновления и поддержания плюрипотентности ЭСК мыши. Более того, *Esrrb* может позитивно регулировать ген *Klf4*. Таким образом, факторы, вызывающие повышенную канцерогенность ИПСК и их производных, могут быть с успехом заменены менее «опасными» генами [31].

МЕТОДЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ИПСК

Клеточные линии, наиболее эффективно подвергающиеся репрограммированию

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки мыши и человека могут быть получены из фибробластов без использования *c-Myc* с помощью трех факторов: *Oct4*, *Sox2* и *Klf4*. Однако при этом наблюдается замедление процесса репрограммирования и значительное снижение выхода стабильных клонов ИПСК [32, 33]. Снижение числа необходимых факторов без потери эффективности возможно при получении ИПСК из нейтральных стволовых клеток (НСК) мыши и человека [12, 34, 35]. Так, ИПСК были получены из нейтральных стволовых клеток, выделенных из мозга взрослой мыши, с помощью факторов *Oct4* и *Klf4*, а также одного фактора *Oct4* [12, 34]. Позже были получены

ИПСК человека путем репрограммирования фетальных НСК после трансдукции ретровирусом, несущим кДНК только одного гена – *ОСТ4* [35]. Наиболее вероятно, что отсутствие необходимости использования факторов *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* связано с высоким эндогенным уровнем экспрессии этих генов в НСК.

Успешного репрограммирования удалось добиться и при исследовании других линий клеток, в частности меланоцитов, имеющих нейроэктодермальное происхождение [36]. Меланоциты мыши и человека характеризуются достаточно высоким уровнем экспрессии гена *Sox2*, особенно на ранних пассажах. ИПСК из меланоцитов мыши и человека удалось получить без использования *Sox2* или *c-Myc*. Однако эффективность получения клонов ИПСК из меланоцитов мыши была снижена (0.03 % без *Sox2*; 0.02 % без *c-Myc*) по сравнению с выходом клонов при использовании всех четырех факторов на меланоцитах (0.19 %) и фибробластах (0.056 %). Снижение эффективности при неиспользовании *Sox2* или *c-Myc* наблюдали и при репрограммировании меланоцитов человека (0.05 % – при использовании всех четырех факторов и 0.01 % – при удалении *Sox2* или *c-Myc*). Попытки получить стабильные клоны ИПСК из меланоцитов одновременно без *Sox2* и *c-Myc* потерпели неудачу [36]. Таким образом, задачу уменьшения числа факторов, необходимых для получения ИПСК, можно решить путем удачного выбора типа соматических клеток, наиболее эффективно подвергающихся репрограммированию меньшим числом факторов, например за счет эндогенной экспрессии «генов плюрипотентности». Однако, если речь идет о получении ИПСК человека, подобные соматические клетки должны быть широко доступны, относительно легко культивироваться, и способ их получения должен быть как можно менее инвазивным.

Одним из таких типов клеток могут быть стволовые клетки жировой ткани (СКЖТ). Это гетерогенная группа мультipotентных клеток, которые сравнительно легко и в большом количестве получают из жировой ткани после операций по липоаспирации. ИПСК человека были успешно получены из СКЖТ, причем скорость репрограммирования была выше в 2 раза, а эффективность – в 20 раз (0.2 %), чем соответствующие показатели при репрограммировании фибробластов [37].

Еще более доступным ресурсом для эффективного получения ИПСК человека являются кератиноциты. ИПСК человека были получены из кератиноцитов с эффективностью, в 100 раз превышающей таковую у фибробластов кожи. Кроме того, скорость репрограммирования была в 2 раза выше, чем при репрограммировании фибробластов [38].

Недавно было обнаружено, что фибробласты кожных сосочков (ФКС) мыши могут быть с высокой эффективностью репрограммированы в ИПСК с помощью сверхэкспрессии всего двух генов: *Oct4* и *Klf4* – в составе ретровирусных векторов [39]. ФКС – это специализированный тип клеток, имеющих мезодермальное происхождение, окружающий стволовые клетки волосных фолликулов. Характерной чертой данных клеток является наличие эндогенной экспрессии генов *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*, а также щелочной фосфатазы – одного из маркеров ЭСК мыши и человека. ФКС можно достаточно легко отделить от остальных ти-

пов клеток кожи посредством клеточного сортирования (FACS, fluorescence activated cell sorting) с использованием прижизненного окрашивания антителами к поверхностным антигенам, характерным для того или иного типа клеток. Эффективность репрограммирования ФКС четырьмя факторами (Oct4, Sox2, Klf4 и с-Мус) с использованием ретровирусов составляет 1.38 %, что в 1000 раз больше, чем эффективность репрограммирования фибробластов кожи с применением той же системы. Двумя факторами – Oct4 и Klf4 – ФКС репрограммируются с эффективностью 0.024 %, что сравнимо с эффективностью репрограммирования фибробластов кожи с использованием всех четырех факторов. Эффективность репрограммирования ФКС сравнима с таковой у нейтральных стволовых клеток, при этом способ выделения линий ФКС гораздо менее инвазивен и более стабилен [39]. Вероятно, использование линий ФКС возможно и для человека; этот тип клеток может быть одним из наиболее перспективных при получении ИПСК человека для фармакологических исследований и заместительной клеточной терапии. Особенно актуальным является применение на подобных типах клеток, более эффективно поддающихся репрограммированию, методов доставки «генов плюрипотентности», позволяющих избежать интеграции чужеродной ДНК в геном, а также химических соединений, повышающих эффективность репрограммирования и заменяющих собой некоторые необходимые для репрограммирования факторы.

Химические соединения, повышающие эффективность репрограммирования клеток

Как уже отмечалось выше, снижение числа факторов, используемых для репрограммирования, снижает эффективность получения ИПСК. Однако в последнее время появилось несколько работ, в которых показано, что использование генетических механизмов, т.е. запуск эктопической экспрессии генов, можно заменить использованием химических соединений, основная часть которых действует на эпигенетическом уровне. Так, показано, что использование соединения VIX-01294, которое является ингибитором гистон-метилтрансферазы G9a, позволяет репрограммировать фибробласты мыши с использованием всего двух факторов – Oct4 и Klf4, при этом эффективность получения клонов ИПСК повышается в 5 раз по сравнению с экспериментом, где ИПСК получали без VIX-01294 [40]. Комбинация VIX-01294 с другими соединениями еще больше повышает эффективность репрограммирования. Так, например, комбинация VIX-01294 с ВауК8644 повышает эффективность получения ИПСК в 15, а с RG108 – в 30 раз, при этом для репрограммирования использовались всего два фактора: Oct4 и Klf4. RG108 является ингибитором ДНК-метилтрансфераз, и его роль в процессе репрограммирования, очевидно, заключается в запуске более быстрого и эффективного деметилирования промоторов генов, специфичных для плюрипотентных клеток, в то время как ВауК8644 является антагонистом кальциевых каналов L-типа, и его роль в процессе репрограммирования не вполне ясна [40]. Еще более весомые результаты были получены при репрограммировании нейтральных стволовых клеток мыши. Использование VIX-01294 позволило в 1.5 раза повысить эффективность полу-

чения ИПСК с помощью двух факторов: Oct4 и Klf4, даже по сравнению с репрограммированием всеми четырьмя факторами. Более того, VIX-01294 может заменить даже Oct4 при репрограммировании нейтральных стволовых клеток, хотя это происходит с очень низкой эффективностью [41]. Вальпроовая, или 2-пропилвалериановая кислота, являющаяся ингибитором гистондеацетилазы, также способна заменить с-Мус при репрограммировании фибробластов мыши и человека. Вальпроовая кислота повышает эффективность репрограммирования фибробластов мыши в 50 раз, а фибробластов человека – в 10–20 раз при использовании трех факторов [42, 43]. Помимо вальпроовой кислоты повышению эффективности репрограммирования способствуют другие ингибиторы деацетилаз: TSA (trichostatin A) и SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid). TSA повышает эффективность репрограммирования фибробластов мыши в 15 раз, а SAHA – в 2 раза при использовании всех четырех факторов [42]. Кроме веществ, действующих на эпигенетическом уровне, для замены факторов можно использовать соединения, ингибирующие белки – компоненты сигнальных путей, задействованных в дифференцировке плюрипотентных клеток. Например, ингибиторы киназ MEK и GSK3 (PD0325901 и CHIR99021 соответственно) способствуют установлению полной, стабильной плюрипотентности ИПСК, получаемых из нейтральных стволовых клеток мыши с помощью двух факторов: Oct4 и Klf4 [41, 44].

Недавно было показано, что эффективность репрограммирования соматических клеток могут существенно повышать вещества, обладающие антиоксидантной активностью. Аскорбиновая кислота (витамин С) способна существенно влиять на эффективность получения ИПСК мыши и человека из различных типов соматических клеток [45]. Было показано, что трансдукция эмбриональных фибробластов мыши (ЭФМ) ретровирусами, несущими гены *Oct4*, *Sox2* и *Klf4*, вызывает существенное по сравнению с контролем и эмбриональными фибробластами, трансдуцированными генами *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4*, повышение продукции активных форм кислорода (АФК). Повышение уровня АФК, в свою очередь, вызывает быстрое старение клетки и повышенный уровень апоптоза, что не может не сказываться на эффективности репрограммирования клеток. Протестировав несколько веществ, обладающих антиоксидантной активностью, таких, как витамин В1, селенит натрия, восстановленный глутатион, аскорбиновая кислота, авторы обнаружили, что комбинация этих веществ повышает выход GFP-позитивных клеток при репрограммировании эмбриональных фибробластов (ген *Gfp* находился под контролем промотора гена *Oct4*). Применение данных веществ по отдельности показало, что только аскорбиновая кислота обладает ярко выраженным свойством повышать уровень GFP-позитивных клеток, хотя остальные вещества сохраняют способность снижать уровень АФК. По всей видимости, данное свойство аскорбиновой кислоты не связано напрямую с ее антиоксидантной активностью [45]. Подсчет GFP-позитивных колоний ИПСК, экспрессирующих щелочную фосфатазу, показал, что эффективность получения ИПСК тремя факторами Oct4, Sox2 и Klf4 из ЭФМ в присутствии аскорбиновой кислоты может достигать 3.8 %. Применение всех четырех факторов Oct4, Sox2, Klf4 и с-Мус совмест-

но с аскорбиновой кислотой позволяет получать колонии ИПСК с эффективностью около 8.75 %. Повышение выхода ИПСК наблюдалось и при репрограммировании фибробластов молочной железы мыши, т.е. действие витамина С не специфично для одного типа клеток. Более того, действие витамина С на эффективность репрограммирования носит более выраженный характер, чем действие ингибитора деацетилаз – 2-пропилвалериановой (вальпроевой) кислоты. Совместное действие витамина С и вальпроевой кислоты имеет аддитивный характер, т.е. данные вещества имеют разный механизм действия. Кроме того, витамин С способствует переходу т.н. пре-ИПСК к стабильному плюрипотентному состоянию. Данное свойство витамина С сходно с действием веществ PD0325901 и CHIR99021, являющихся ингибиторами киназ MEK и GSK3 соответственно. Подобное действие витамина С распространяется и на клетки человека [45]. Так, авторами были получены ИПСК после трансдукции фибробластов человека ретровирусами, несущими *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*, и обработки аскорбиновой кислотой с эффективностью до 6.2 %. При репрограммировании подобным образом стволовых клеток жировой ткани эффективность доходила до 7.06 %. Механизм действия витамина С на эффективность репрограммирования остается не до конца ясным. Однако было замечено увеличение темпа пролиферации клеток на промежуточном этапе репрограммирования. Кроме того, было обнаружено снижение уровня белков p53 и p21 в клетках, обрабатываемых аскорбиновой кислотой, при одновременно нормально работающей машине репарации повреждений ДНК [45]. Интересно, что ранее было показано существенное снижение эффективности получения ИПСК под действием процессов, запускаемых белками p53 и p21 [46–50].

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ИПСК БЕЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ГЕНОМА КЛЕТОК

Как уже отмечалось выше, первоначально для получения ИПСК мыши и человека в качестве векторов для доставки генов, необходимых для репрограммирования, были применены ретро- и лентивирусы. Основным недостатком данного метода является неконтролируемая интеграция провирусной ДНК в геном клетки. В настоящее время рядом групп ученых предложены методы доставки «генов плюрипотентности» в клетку-реципиент, которые не предусматривают интеграцию чужеродной ДНК в геном либо предусматривают возможность удаления экзогенных генетических конструкций из генома.

Cre-loxP-опосредованная рекомбинация

Для получения ИПСК людей, страдающих болезнью Паркинсона, были применены лентивирусы, провирусы которых могут удаляться из генома клетки посредством *Cre*-рекомбиназы. Для этого *loxP*-сайт был помещен в 3' LTR-районы лентивирусов, содержащих отдельные репрограммирующие гены под контролем доксициклин-индуцибельного промотора. Во время репликации вируса *loxP* дуплицировался в 5' LTR вектора. В результате интегрирующийся в геном провирус фланкировался двумя *loxP*-сайтами. Удаление встроок производилось с помощью временной трансфекции ИПСК вектором, экспрессирующим *Cre*-рекомбиназу [51].

В другой работе для получения ИПСК мыши была использована плазида, несущая гены *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* в одной рамке считывания, в которой отдельные кДНК были разделены последовательностями, кодирующими 2А пептиды, при этом практически вся конструкция была фланкирована *loxP*-сайтами [52]. Использование такого вектора позволило значительно снизить количество интеграций экзогенной ДНК в геном клеток-реципиентов и, следовательно, упростить их дальнейшую эксцизию [52]. Ранее с использованием лентивирусов, несущих подобные полицистронные конструкции, было показано, что наличие одной копии трансгена, обеспечивающего высокий уровень экспрессии экзогенных факторов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*, достаточно для репрограммирования дифференцированных клеток к плюрипотентному состоянию [53, 54].

Недостатком *Cre-loxP*-системы является то, что вырезание интегрирующихся участков происходит не полностью, и в геноме остается, по крайней мере, последовательность *loxP*-сайта, из-за чего сохраняется риск появления инсерционных мутаций.

Плазмидные векторы

Применение лентивирусов и плазмид, несущих *loxP*-сайты, необходимые для удаления трансгенной конструкции, хотя и незначительно, но все-таки модифицирует геном клетки-реципиента. Выходом из данной ситуации является применение векторных систем, которые вообще не предусматривают интеграцию вектора или его частей в геном клетки. Одна из таких систем, заключающаяся в использовании временной трансфекции полицистронных плазмидных конструкций, была использована для получения ИПСК из эмбриональных фибробластов мыши [29]. Полицистронную плазмиду, несущую кДНК генов *Oct4*, *Sox2* и *Klf4*, а также плазмиду, экспрессирующую ген *c-Myc*, трансфицировали в эмбриональные фибробласты мыши на 1-е, 3-е, 5-е и 7-е сут после их первичного посева, на 9-й день фибробласты пассировали, а на 25-й день отбирали колонии ИПСК. Из 10 проведенных по данному протоколу экспериментов в 7 авторам удалось получить GFP-позитивные колонии (ген *Gfp* находился под контролем промотора гена *Nanog*). Полученные ИПСК по своим свойствам были сходны с ЭСК мыши и не содержали в своем геноме встроок ДНК использованных конструкций. Таким образом, было показано, что полные ИПСК мыши могут быть воспроизводимо получены без интеграции трансгенов, и для запуска репрограммирования достаточно временной сверхэкспрессии генов *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*. Главным недостатком данного метода является его низкая эффективность. В 10 экспериментах удалось получить от 1 до 29 колоний ИПСК на 10^6 фибробластов, при этом при использовании ретровирусов на таком же количестве клеток авторами данной работы были получены до 1000 колоний [29].

Эписомные векторы

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки человека были успешно получены из фибробластов кожи с помощью единичной трансфекции полицистронными эписомными конструкциями, содержащими различные

комбинации генов *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Klf4*, *c-Myc*, *Lin28* и *SV40LT*. Данные конструкции были построены на основе вектора oriP/EBNA1 (Epstein-Barr nuclear antigen-1) [55]. В векторе oriP/EBNA1 для линкирования участков, кодирующих необходимые для успешного репрограммирования гены, использовалась последовательность IRES2, позволяющая экспрессировать несколько отдельных кДНК в составе одной полицистронной мРНК, с которой в дальнейшем транслируется несколько белков. Вектор oriP/EBNA1 характеризуется также тем, что в клетках приматов он поддерживается как низкокопийная плаزمиды и способен реплицироваться один раз за клеточный цикл (следовательно, не происходит быстрой элиминации вектора, как в случае с обычными плазмидами). Плазмиды элиминируются в отсутствие селекции со скоростью примерно 5 % за клеточный цикл [56]. В работе тестировали большой спектр различных комбинаций репрограммирующих факторов, и в итоге наилучшая эффективность репрограммирования была достигнута при котрансфекции трех эписом, содержащих следующие наборы генов: *Oct4 + Sox2 + Nanog + Klf4*, *Oct4 + Sox2 + SV40LT + Klf4*, *c-Myc + Lin28*. *SV40LT* (*SV40 large T gene*) нейтрализует возможный токсический эффект от сверхэкспрессии *c-Myc* [57]. Авторами было показано, что полноценные ИПСК, обладающие всеми характеристиками плюрипотентных клеток, могут быть получены после временной экспрессии определенной комбинации генов в соматических клетках человека без интеграции эписомной ДНК в геном. Однако, как и при использовании плазмидных векторов, данный способ репрограммирования отличается низкой эффективностью. Авторам удалось получить в отдельных экспериментах от 3 до 6 стабильных колоний ИПСК на 10^6 трансфицированных фибробластов [55]. Несмотря на то что фибробласты кожи относительно легко культивируются и доступны, вероятнее всего, требуется поиск клеточных типов, которые легче и эффективнее подвергаются репрограммированию данным способом. Еще одно ограничение использования представленной выше системы заключается в том, что эписомы данного типа неодинаково эффективно поддерживаются в разных типах клеток.

PiggyBac-транспозиция

Одна из перспективных систем, используемых для получения ИПСК без модификации генома клеток, основана на применении ДНК-транспозонов. Так называемые *PiggyBac*-транспозоны, содержащие 2A-линкированные репрограммирующие гены, расположенные между 5'- и 3'-терминальными повторами, были использованы для получения ИПСК из фибробластов. Интеграция данных конструкций в геном осуществляется за счет совместной трансфекции с плазмидой, кодирующей транспозазу. После репрограммирования в результате кратковременной экспрессии транспозазы происходило удаление встроок из генома [58, 59]. Преимущество *PiggyBac*-системы перед *Cre-loxP* заключается в том, что экзогенная ДНК удаляется полностью [60].

Однако, несмотря на то что эффективность вырезания экзогенной ДНК из генома методом *PiggyBac*-транспозиции достаточно высока, все же удаление большого числа копий транспозона трудно достижимо.

Неинтегрирующиеся вирусные векторы

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки мыши были успешно получены из гепатоцитов и фибробластов в результате использования 4 аденовирусных векторов, не интегрирующихся в геном и несущих гены *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*. Анализ ИПСК, полученных таким образом, показал, что они по своим свойствам (образование тератом, метилирование ДНК промоторных областей генов, экспрессия маркеров плюрипотентности) близки к ЭСК мыши, однако не несут в геноме встроок вирусной ДНК [61]. Позже данным методом были получены ИПСК из фибробластов человека [62].

Авторы отмеченных работ утверждают, что при использовании аденовирусных векторов можно получать ИПСК, пригодные для применения без риска проявления вирусной или онкогенной активности. Недостатками метода являются крайне низкая эффективность (0.0001–0.001 %), замедление процесса репрограммирования и вероятность образования тетраплоидных клеток. Кроме того, не все типы клеток одинаково чувствительны к трансдукции аденовирусами.

Недавно для получения ИПСК человека был применен еще один способ доставки генов, основанный на использовании вирусов. В данном случае был использован вектор на основе вируса Сендай (SeV) [63]. Сендай – РНК-содержащий вирус, не модифицирующий геном клеток-реципиентов, – представляет собой хороший вектор для экспрессии необходимых факторов в репрограммируемых клетках. Векторы, содержащие все «факторы плюрипотентности» либо 3 фактора (не содержащие *c-Myc*), использовались для репрограммирования фибробластов человека. Впоследствии векторная конструкция, полученная на основе SeV, элиминировалась в ходе пролиферации клеток. Кроме того, имеется возможность удалять клетки, в которые произошла интеграция провируса, посредством негативной селекции против поверхностного антигена HN, представленного на инфицированных клетках. Авторы утверждают, что технология репрограммирования, основанная на SeV, позволит получать клинически применимые ИПСК человека [63].

Трансдукция клеток рекомбинантными белками

Несмотря на то что существуют методы получения ИПСК без генетической модификации генома клеток (аденовирусный, плазмидный перенос генов и др.), теоретическая вероятность того, что экзогенная ДНК интегрируется в геном клетки, все-таки сохраняется. Мутагенность веществ, применяемых в настоящий момент для повышения эффективности получения ИПСК, тоже до конца не изучена. Полная проверка генома получаемых ИПСК на наличие инсерций экзогенной ДНК и прочих мутаций представляет собой трудную, а при массовом культивировании множества линий – невыполнимую задачу. Решением данной проблемы может быть использование готовых белковых факторов, доставляемых в дифференцированную клетку вместо экзогенной ДНК. В данный момент уже опубликованы две работы, в которых ИПСК мыши и человека были получены с помощью рекомбинантных белков OCT4, SOX2, KLF4 и C-MYC [64, 65]. Метод доставки белков в клетку основан на способности пептидов, обогащенных основными остатками (например, аргинином или лизином), проникать через

клеточную мембрану. ИПСК мыши были получены с помощью рекомбинантных белков OCT4, SOX2, KLF4 и C-МЫС, экспрессированных в кишечной палочке, которые содержали на С-концах тракты из 11 остатков аргинина. Авторам удалось получить ИПСК мыши в результате четырех раундов трансдукции белков в эмбриональные фибробласты [65]. Однако ИПСК были получены только в том случае, когда клетки были дополнительно обработаны ингибитором деацетилаз – 2-пропилвалериановой кислотой. Для получения ИПСК человека с помощью белков был использован тот же принцип, однако экспрессия белков проводилась в клетках человека HEK293, белки экспрессировали с фрагментом из 9 остатков аргинина на С-конце белка. После шести раундов трансдукции исследователям удалось получить ИПСК человека без обработки какими-либо дополнительными веществами [64]. Эффективность получения ИПСК человека данным способом составила 0.001 %, что на порядок ниже эффективности репрограммирования при использовании ретровирусов. Несмотря на это, данный метод является крайне перспективным при получении пациент-специфичных ИПСК.

ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ – МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПАТОГЕНЕЗА ЗАБОЛЕВАНИЙ И ИСТОЧНИК МАТЕРИАЛА ДЛЯ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Первые линии плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток человека были получены в 1998 г. [6]. Помимо явной фундаментальной значимости исследований эмбриональных стволовых клеток, касающихся множества процессов, происходящих во время раннего эмбриогенеза, огромный интерес ученых привлекла возможность использовать ЭСК и их производных в качестве моделей для исследования патогенеза заболеваний человека, тестирования новых лекарств и заместительной клеточной терапии. На данный момент исследования направленной дифференцировки ЭСК человека и возможности их использования для коррекции дегенеративных заболеваний достигли большого прогресса. В результате дифференцировки ЭСК можно получать функциональные типы клеток: мотормые и дофаминэргические нейроны, кардиомиоциты, предшественники клеток гематопоэтического ряда. Данные клеточные производные по своим биохимическим и физиологическим свойствам потенциально пригодны для терапии сердечно-сосудистых заболеваний, болезней нервной системы, заболеваний крови человека [66]. Более того, производные, полученные из ЭСК, были успешно применены для лечения заболеваний на модельных животных. Так, предшественники клеток крови, полученные из ЭСК, были с успехом применены для коррекции иммунодефицита у мышей. С помощью фоторецепторов, полученных из ЭСК человека, была восстановлена функция зрения у слепых мышей, а на крысах, моделирующих развитие болезни Паркинсона, с помощью дофаминэргических нейронов, полученных из ЭСК человека, восстановлена нормальная функциональность нервной системы [67–70]. Несмотря на явные успехи, полномасштабное применение ЭСК в терапии и моделировании заболеваний затруднено, поскольку для этого необходимо создание банков ЭСК, соответствующих всем HLA-гаплотипам,

что практически нереально и затруднено из-за проблем технического и этического характера.

Альтернативой ЭСК в области клинического применения в заместительной клеточной терапии и скрининге новых лекарственных средств могут стать индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. На сегодняшний день известно, что ИПСК по своим свойствам крайне близки к ЭСК и в то же время могут быть получены в практически неограниченном количестве из дифференцированных клеток каждого конкретного пациента. Несмотря на то что первые ИПСК были получены сравнительно недавно, работы по направленной дифференцировке ИПСК и получению пациент-специфичных ИПСК ведутся активно, и уже наметился значительный прогресс в данной области.

Из ИПСК человека путем направленной дифференцировки *in vitro* были получены дофаминэргические и мотонейроны [71, 72]. Данные виды нейронов повреждаются при многих видах врожденных и приобретенных заболеваний человека, таких, как механическое повреждение спинного мозга, болезнь Паркинсона, спинальная мышечная атрофия, амиотрофный латеральный склероз. Несколькими группами исследователей удалось получить из ИПСК мыши и человека различные типы клеток сетчатки глаза [73–75]. Было показано, что ИПСК человека могут спонтанно дифференцироваться *in vitro* в клетки пигментированного эпителия сетчатки [76]. Еще одной группой исследователей было продемонстрировано, что обработка ИПСК мыши и человека антагонистами WNT и NODAL в суспензионной культуре вызывает появление маркеров клеток-предшественников и клеток пигментированного эпителия. Дальнейшая обработка клеток ретиновой кислотой и таурином активизирует появление клеток, экспрессирующих маркеры фоторецепторов [75].

Несколькими группами исследователей из ИПСК мыши и человека были получены *in vitro* функциональные кардиомиоциты (КМ) [77–81]. По своим характеристикам, включающим морфологию, экспрессию маркеров, электрофизиологические показатели и чувствительность к химическим веществам, получаемые из ИПСК кардиомиоциты очень сходны с КМ сердечной мышцы и с КМ, получаемыми при дифференцировке ЭСК. Более того, показано, что инъекции ИПСК мыши могут восстанавливать повреждения мышечной и эндотелиальной тканей сердца, вызываемые инфарктом миокарда [77].

Кроме уже перечисленных типов дифференцированных клеток к настоящему моменту из ИПСК мыши и человека получены: гепатоцитоподобные клеточные производные, дендритные клетки и макрофаги, кластеры инсулинпродуцирующих клеток, подобные клеткам островков Лангерганса поджелудочной железы, гематопоэтические и эндотелиальные клетки [82–85].

Кроме направленной дифференцировки *in vitro* большие усилия исследователей направлены на получение пациент-специфичных ИПСК. Наличие плюрипотентных клеток конкретных пациентов позволяет исследовать патогенез и проводить эксперименты по терапии наследственных заболеваний, развитие которых связано с конкретным типом клеток, которые тяжело получить путем биопсии, применение ИПСК дает практически неограниченный ресурс для подобных исследований. Возможность лечения

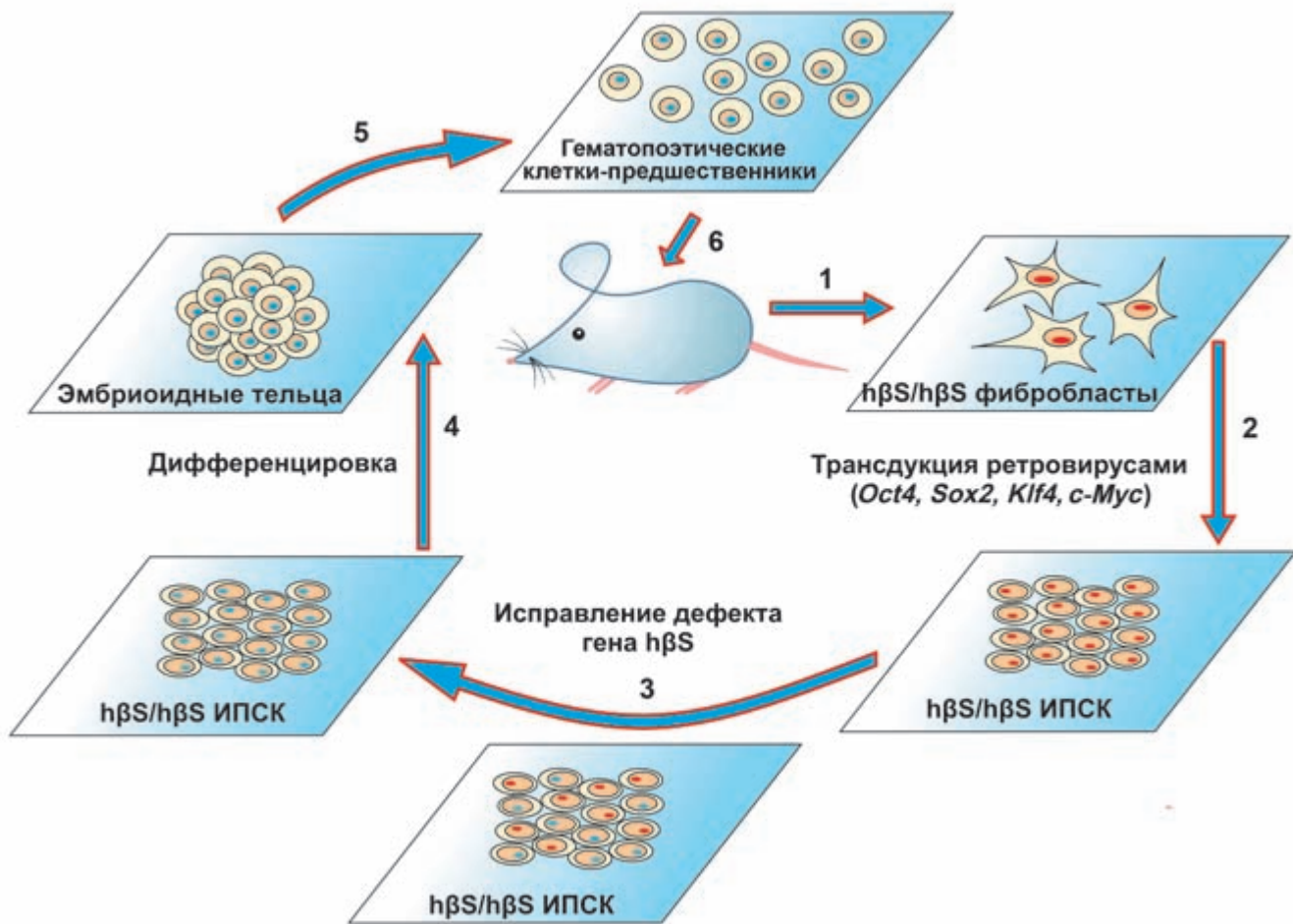


Схема эксперимента по исправлению мутантного фенотипа у мышей, моделирующих развитие серповидно-клеточной анемии [2]. Фибробласты, полученные из хвоста мыши (1), несущей мутантный аллель гена, кодирующего β-цепи гемоглобина человека (hβs), были использованы для получения ИПСК (2). В ИПСК мутация была исправлена с помощью гомологичной рекомбинации (3), а затем клетки дифференцировали путем образования эмбрионных телец посредством направленной дифференцировки были получены гематопозитические клетки-предшественники (5), которые затем были инъецированы в мышью, подвергнутую ионизирующему излучению (6).

заболеваний посредством ИПСК была недавно с успехом продемонстрирована, схема данного эксперимента представлена на рисунке. В фибробластах мыши, являющейся моделью развития серповидно-клеточной анемии человека, мутантный аллель был заменен на нормальный с помощью гомологичной рекомбинации. Из «исправленных» фибробластов были получены ИПСК, которые затем были дифференцированы в предшественники клеток гематопозитического ряда. Гематопозитические предшественники затем были инъецированы в мышью, из кожи которой изначально были получены фибробласты (см. рисунок). В результате произошло значительное исправление изначального патологического фенотипа [86]. Подобный подход был применен на фибробластах и кератиноцитах человека, страдающего анемией Фанкони. Нормальный аллель мутантного гена, вызвавшего анемию, был введен в геном соматических кле-

ток с помощью лентивируса, затем из этих клеток были получены ИПСК. ИПСК, несущие здоровый аллель, были дифференцированы в гематопозитические клетки, сохраняющие нормальный фенотип [87]. Безусловно, использование лентивирусов невозможно при получении клеток, которые затем будут введены в организм человека, вследствие потенциальной онкогенности. Однако в настоящее время развиваются новые, относительно безопасные методы манипуляции с геномами, например, с использованием синтетических нуклеаз, содержащих домены «цинковые пальцы», которые дают возможность эффективно исправлять генетические дефекты *in vitro* [88].

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки являются прекрасной моделью для исследования патогенеза заболеваний на клеточном уровне и тестирования соединений, обладающих потенциальным лечебным эффектом.

Таблица. Линии ИПСК, полученные в результате репрограммирования соматических клеток пациентов с различными патологиями

Заболевание	Дефект, вызывающий развитие заболевания	Тип репрограммируемых клеток	Способ репрограммирования	Ссылка
Дефицит аденозин деаминазы	Замена GGG на AGG в 7-м экзоне, вызывающая замену аминокислот G216R, либо делеция GAAGA в экзоне 10 гена ADA (<i>Adenosine deaminase</i>)	Фибробласты кожи, кариотип 46, XY	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[91]
Болезнь Гаучера, тип III	Замена AAC на AGC в экзоне 9 либо инсерция G в позиции 84 кДНК гена GBA (<i>β-acid glucosidase</i>)	Фибробласты кожи, кариотип 46, XY	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[91]
Мышечная дистрофия Дюшена	Делеция экзонов 45–52 гена DMD (<i>Distrophin</i>)	Фибробласты кожи, кариотип 46, XY	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[91]
Мышечная дистрофия Беккера	Неустановленная мутация в гене DMD	Фибробласты кожи, кариотип 46, XY	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[91]
Синдром Дауна	Трисомия по 21-й паре хромосом	Фибробласты кожи, кариотип 47, XY	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[91]
Болезнь Паркинсона	Мультифакториальное заболевание	Фибробласты кожи, кариотип 46, XY	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[91]
		Фибробласты, возраст пациентов на момент биопсии 53–85 лет, кариотип шести линий 46, XY и одной 46, XX	Трансдукция лентивирусами, несущими гены OCT4, SOX2 и KLF4 либо OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC; LTR вирусов содержали сайты loxP, необходимые для вырезания экзогенной конструкции из генома клеток	[51]
Ювенильный сахарный диабет	Мультифакториальное заболевание	Фибробласты кожи, кариотип 46, XX	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[91]
Синдром Швахмана-Бодиа-Даймонда	Точечные мутации в гене SBDS (<i>Shwachman-Bodian-Diamond syndrome</i>)	Мезенхимальные клетки костного мозга, кариотип 46, XY	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[91]
Болезнь Хантингтона	Удлинение (CAG) _n триплетного повтора в гене <i>Huntingtin</i> от 37 до 100 мономеров (норма 11–34 мономера)	Фибробласты кожи, кариотип 46, XX	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[91]
Синдром Леш-Нихана	Мутации гена HPRT (<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>)	Фибробласты кожи, кариотип 46, XX	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC; одна линия получена в результате трансдукции доксициклинрегулируемых лентивирусных векторов, несущих кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC и NANOG	[91]
		Фибробласты, кариотип 46, XX	Трансдукция лентивирусами, несущими гены OCT4, SOX2 и KLF4, LTR вирусов содержали сайты loxP, необходимые для вырезания экзогенной конструкции из генома клеток	[51]
Врожденный дискератоз	Мутация гена DKC (<i>Dyskeratosis congenital</i>)	Фибробласты, кариотип 46, XX	Трансдукция лентивирусами, несущими гены OCT4, SOX2 и KLF4	[51]
Спинальная мышечная атрофия	Мутация гена SMN1 (<i>Survival motor neuron 1</i>), вызывающая понижение уровня белка SMN	Фибробласты кожи, кариотип 46, XY	Трансдукция лентивирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, NANOG и LIN28	[89]
Семейная дизавтономия	Мутация гена IKBKAP (<i>Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein</i>), вызывающая нарушение сплайсинга его транскрипта (пропуск экзона 20)	Фибробласты кожи и легкого, кариотип 46, XX и 46, XY	Трансдукция лентивирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[90]
β-Талассемия	Мутация гена HBB (<i>Haemoglobin beta</i>)	Фибробласты кожи, кариотип 46, XY	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[92]
Диабет I типа	Мультифакториальное заболевание	Фибробласты кожи, кариотип 46, XY	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2 и KLF4	[93]
Амиотрофный латеральный склероз	Замена L144F в белке супероксиддисмутазы, кодируемым доминантным аллелем гена SOD1 (<i>Superoxide dismutase1</i>), данная мутация ассоциирована с медленно прогрессирующей формой АЛС	Фибробласты кожи, кариотип 46, XX	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC	[94]
Анемия Фанкони	Обнаружено 13 генов, мутации которых вызывают развитие анемии Фанкони	Фибробласты кожи и эпидермальные кератиноциты	Трансдукция ретровирусами, несущими кДНК генов OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC. Из кератиноцитов ИПСК получены без использования c-MYC	[87]

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки были получены из фибробластов пациента, страдающего спинальной мышечной атрофией (СМА) (СМА-ИПСК). СМА – это аутосомно-рецессивное заболевание, вызванное мутацией в гене (*SMN1*, *survival motor neuron 1*), выражающееся в избирательной нежизнеспособности нижних α -мотонейронов. Как правило, пациенты, страдающие этим заболеванием, умирают в возрасте около 2 лет. Существующие на настоящий момент экспериментальные модели данного заболевания, основанные на использовании плоских червей, дрозофил и мышей, несовершенны. Имеющиеся в распоряжении исследователей линии фибробластов пациентов, страдающих СМА, также не могут дать необходимых данных по патогенезу заболевания. Было показано, что из СМА-ИПСК могут быть получены моторные нейроны, сохраняющие признаки развития СМА, селективную гибель нейронов и отсутствие транскрипции гена *SMN1*. Более того, авторам удалось проследить повышение уровня экспрессии и агрегации белка SMN (кодируемого геном *SMN2*, экспрессия которого может компенсировать отсутствие белка *SMN1*) в ответ на обработку мотонейронов и астроцитов, полученных из СМА-ИПСК, вальпроевой кислотой и торбомицином [89]. То, что ИПСК и их производные могут быть объектом фармакологических исследований было показано на ИПСК больных семейной дизавтономией [90]. Семейная дизавтономия – это наследственное аутосомно-рецессивное заболевание, выражающееся в деградации сенсорных и автономных нейронов. В основе заболевания лежит мутация, вызывающая тканеспецифичное нарушение сплайсинга гена *IKBKAP*, что приводит к понижению уровня представленности полноразмерного белка *IKAP*. ИПСК были получены из фибробластов пациентов, страдающих семейной дизавтономией (СД). ИПСК обладали всеми характеристиками плюрипотентных клеток. Нейральные производные, полученные из данных клеток, имели признаки патогенеза СД, низкий уровень полноразмерного транскрипта *IKBKAP*. Авторы исследовали

влияние трех веществ: кинетина, эпигаллокатехингаллата и токотриенола на параметры, связанные с патогенезом СД. Было показано, что только кинетин способен вызывать повышение уровня полноразмерного транскрипта *IKBKAP*. Продолжительная обработка кинетином вызывает повышение уровня дифференцировки нейронов и экспрессии маркеров периферических нейронов.

В настоящий момент получен довольно широкий спектр ИПСК пациентов с различными наследственными патологиями и мультифакторными заболеваниями, которые часто смертельны и с трудом поддаются классической терапии, таких, как болезнь Паркинсона, синдром Дауна, диабет I типа, мышечная дистрофия Дюшена, β -талассемия и другие [51, 87, 89, 91–94]. Данные о ИПСК, полученных в результате репрограммирования соматических клеток пациентов с различными патологиями, приведены в таблице.

Можно с уверенностью сказать, что ИПСК сами по себе и их производные являются мощным инструментом, который может найти применение в биомедицине, заместительной клеточной терапии, фармакологии, токсикологии. Однако для безопасного применения технологий, основанных на ИПСК, необходимо использование методов получения ИПСК и направленной дифференцировки, которые сводили бы к минимуму возможность появления мутаций в геномах клеток при культивировании *in vitro*, вероятность ракового перерождения клеток после инъекции. Требуется разработка методов культивирования ИПСК человека без применения клеток животных (например, фидерного слоя фибробластов мыши), чтобы исключить возможность переноса патогенов вирусного происхождения от животных человеку. Существует потребность в максимальной стандартизации условий культивирования и дифференцировки клеток. ●

Работа поддержана Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Smith A.G. // Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 2001. V. 17. P. 435–462.
- Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F., et al. // Cell. 2005. V. 122. P. 947–956.
- Loh Y.H., Wu Q., Chew J.L., et al. // Nat. Genet. 2006. V. 38. P. 431–440.
- Martin G.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 7634–7638.
- Evans M.J., Kaufman M.H. // Nature. 1981. V. 292. P. 154–156.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., et al. // Science. 1998. V. 282. P. 1145–1147.
- Hochedlinger K., Jaenisch R. // Nature. 2006. V. 441. P. 1061–1067.
- Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. V. 126. P. 663–676.
- Aoi T., Yae K., Nakagawa M., et al. // Science. 2008. V. 321. P. 699–702.
- Eminli S., Utikal J., Arnold K., et al. // Stem Cells. 2008. V. 26. P. 2467–2474.
- Hanna J., Markoulaki S., Schorderet P., et al. // Cell. 2008. V. 133. P. 250–264.
- Kim J.B., Zaehres H., Wu G., et al. // Nature. 2008. V. 454. P. 646–650.
- Stadtfeld M., Brennand K., Hochedlinger K. // Curr. Biol. 2008. V. 18. P. 890–894.
- Wernig M., Meissner A., Foreman R., et al. // Nature. 2007. V. 448. P. 318–324.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., et al. // Cell. 2007. V. 131. P. 861–872.
- Park I.H., Zhao R., West J.A., et al. // Nature. 2008. V. 451. P. 141–146.
- Lowry W.E., Richter L., Yachechko R., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 2883–2888.
- Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., et al. // Science. 2007. V. 318. P. 1917–1920.
- Kang L., Wang J., Zhang Y., et al. // Cell Stem Cell. 2009. V. 5. P. 135–138.
- Zhao X.Y., Li W., Lv Z., et al. // Nature. 2009. V. 461. P. 86–90.
- Hotta A., Ellis J. // J. Cell Biochem. 2008. V. 105. P. 940–948.
- Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. // Nature. 2007. V. 448. P. 313–317.
- Carey B.W., Markoulaki S., Hanna J., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 157–162.
- Ben-Porath I., Thomson M.W., Carey V.J., et al. // Nat. Genet. 2008. V. 40. P. 499–507.
- Hochedlinger K., Yamada Y., Beard C., Jaenisch R. // Cell. 2005. V. 121. P. 465–477.
- Park E.T., Gum J.R., Kakar S., et al. // Int. J. Cancer. 2008. V. 122. P. 1253–1260.
- Ghaleb A.M., Nandan M.O., Chanchevalap S., et al. // Cell Res. 2005. V. 15. P. 92–96.
- Kuttler F., Mai S. // Genome Dyn. 2006. V. 1. P. 171–190.
- Okita K., Nakagawa M., Hyenjong H., et al. // Science. 2008. V. 322. P. 949–953.

30. Duinsbergen D, Salvatori D, Eriksson M, Mikkers H. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009. V. 1176. P. 197–204.
31. Feng B., Jiang J., Kraus P., et al. // *Nat. Cell. Biol.* 2009. V. 11. P. 197–203.
32. Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 101–106.
33. Wernig M., Meissner A., Cassady J.P., Jaenisch R. // *Cell Stem Cell.* 2008. V. 2. P. 10–12.
34. Kim J.B., Sebastiano V., Wu G., et al. // *Cell.* 2009. V. 136. P. 411–419.
35. Kim J.B., Greber B., Arauzo-Bravo M.J., et al. // *Nature.* 2009. V. 461. P. 649–643.
36. Utikal J., Maherali N., Kulalert W., Hochedlinger K. // *J. Cell Sci.* 2009. V. 122. P. 3502–3510.
37. Sun N., Panetta N.J., Gupta D.M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 15720–15725.
38. Aasen T., Raya A., Barrero M.J., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 1276–1284.
39. Tsai S.Y., Clavel C., Kim S., et al. // *Stem Cells.* 2010. V. 28. P. 221–228.
40. Shi Y., Despons C., Do J.T., et al. // *Cell Stem Cell.* 2008. V. 3. P. 568–574.
41. Shi Y., Do J.T., Despons C., et al. // *Cell Stem Cell.* 2008. V. 2. P. 525–528.
42. Huangfu D., Maehr R., Guo W., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 795–797.
43. Huangfu D., Osafune K., Maehr R., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 1269–1275.
44. Silva J., Barrandon O., Nichols J., et al. // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. P. e253.
45. Esteban M.A., Wang T., Qin B., et al. // *Cell Stem Cell.* 2010. V. 6. P. 71–79.
46. Hong H., Takahashi K., Ichisaka T., et al. // *Nature.* 2009. V. 460. P. 1132–1135.
47. Utikal J., Polo J.M., Stadtfeld M., et al. // *Nature.* 2009. V. 460. P. 1145–1148.
48. Marion R.M., Strati K., Li H., et al. // *Nature.* 2009. V. 460. P. 1149–1153.
49. Li H., Collado M., Villasante A., et al. // *Nature.* 2009. V. 460. P. 1136–1139.
50. Kawamura T., Suzuki J., Wang Y.V., et al. // *Nature.* 2009. V. 460. P. 1140–1144.
51. Soldner F., Hockemeyer D., Beard C., et al. // *Cell.* 2009. V. 136. P. 964–977.
52. Kaji K., Norrby K., Paca A., et al. // *Nature.* 2009. V. 458. P. 771–775.
53. Shao L., Feng W., Sun Y., et al. // *Cell Res.* 2009. V. 19. P. 296–306.
54. Sommer C.A., Stadtfeld M., Murphy G.J., et al. // *Stem Cells.* 2009. V. 27. P. 543–549.
55. Yu J., Hu K., Smuga-Otto K., et al. // *Science.* 2009. V. 324. P. 797–801.
56. Nanbo A., Sugden A., Sugden B. // *EMBO J.* 2007. V. 26. P. 4252–4262.
57. Hahn W.C., Counter C.M., Lundberg A.S., et al. // *Nature.* 1999. V. 400. P. 464–468.
58. Woltjen K., Michael I.P., Mohseni P., et al. // *Nature.* 2009. V. 458. P. 766–770.
59. Yusa K., Rad R., Takeda J., Bradley A. // *Nat. Methods.* 2009. V. 6. P. 363–369.
60. Elick T.A., Bauser C.A., Fraser M.J. // *Genetica.* 1996. V. 98. P. 33–41.
61. Stadtfeld M., Nagaya M., Utikal J., et al. // *Science.* 2008. V. 322. P. 945–949.
62. Zhou W., Freed C.R. // *Stem Cells.* 2009. V. 27. P. 2667–2674.
63. Fusaki N., Ban H., Nishiyama A., et al. // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2009. V. 85. P. 348–362.
64. Kim D., Kim C.H., Moon J.I., et al. // *Cell Stem Cell.* 2009. V. 4. P. 472–476.
65. Zhou H., Wu S., Joo J.Y., et al. // *Cell Stem Cell.* 2009. V. 4. P. 381–384.
66. Murry C.E., Keller G. // *Cell.* 2008. V. 132. P. 661–680.
67. Rideout W.M., 3rd, Hochedlinger K., Kyba M., et al. // *Cell.* 2002. V. 109. P. 17–27.
68. Lamba D.A., Gust J., Reh T.A. // *Cell Stem Cell.* 2009. V. 4. P. 73–79.
69. Yang D., Zhang Z.J., Oldenburg M., et al. // *Stem Cells.* 2008. V. 26. P. 55–63.
70. Kim J.H., Auerbach J.M., Rodriguez-Gomez J.A., et al. // *Nature.* 2002. V. 418. P. 50–56.
71. Karumbayaram S., Novitch B.G., Patterson M., et al. // *Stem Cells.* 2009. V. 27. P. 806–811.
72. Chambers S.M., Fasano C.A., Papapetrou E.P., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2009. V. 27. P. 275–280.
73. Hirami Y., Vugler A.A., Hikita S.T., et al. // *PLoS One.* 2009. V. 4. P. e8152.
74. Meyer J.S., Shearer R.L., Capowski E.E., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 16698–16703.
75. Hirami Y., Osakada F., Takahashi K., et al. // *Neurosci. Lett.* 2009. V. 458. P. 126–131.
76. Buchholz D.E., Hikita S.T., Rowland T.J., et al. // *Stem Cells.* 2009. V. 27. P. 2427–2434.
77. Nelson T.J., Martinez-Fernandez A., Yamada S., et al. // *Circulation.* 2009. V. 120. P. 408–416.
78. Tanaka T., Tohyama S., Murata M., et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 385. P. 497–502.
79. Kuzmenkin A., Liang H., Xu G., et al. // *FASEB J.* 2009. V. 23. P. 4168–4180.
80. Mauritz C., Schwanke K., Reppel M., et al. // *Circulation.* 2008. V. 118. P. 507–517.
81. Gai H., Leung E.L., Costantino P.D., et al. // *Cell. Biol. Int.* 2009. V. 33. P. 1184–1193.
82. Song Z., Cai J., Liu Y., et al. // *Cell Res.* 2009. V. 19. P. 1233–1242.
83. Senju S., Haruta M., Matsunaga Y., et al. // *Stem Cells.* 2009. V. 27. P. 1021–1031.
84. Tateishi K., He J., Taranova O., et al. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 31601–31607.
85. Choi K.D., Yu J., Smuga-Otto K., et al. // *Stem Cells.* 2009. V. 27. P. 559–567.
86. Hanna J., Wernig M., Markoulaki S., et al. // *Science.* 2007. V. 318. P. 1920–1923.
87. Raya A., Rodriguez-Piza I., Guenechea G., et al. // *Nature.* 2009. V. 460. P. 53–59.
88. Zou J., Maeder M.L., Mali P., et al. // *Cell Stem Cell.* 2009. V. 5. P. 97–110.
89. Ebert A.D., Yu J., Rose F.F., Jr., et al. // *Nature.* 2009. V. 457. P. 277–280.
90. Lee G., Papapetrou E.P., Kim H., et al. // *Nature.* 2009. V. 461. P. 402–406.
91. Park I.H., Arora N., Huo H., et al. // *Cell.* 2008. V. 134. P. 877–886.
92. Wang Y., Jiang Y., Liu S., et al. // *Cell Res.* 2009. V. 19. P. 1120–1123.
93. Maehr R., Chen S., Snitow M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 15768–15773.
94. Dimos J.T., Rodolfa K.T., Niakan K.K., et al. // *Science.* 2008. V. 321. P. 1218–1221.