

## ГИСТОЛОГИЯ, ЦИТОЛОГИЯ, КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

**Ш.К. Адамбеков, Ю.И. Янцен, Р.Б. Исаева, Ш.Н. Аскарлова**  
**ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В**  
**РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ, ФАРМАКОЛОГИИ И НАУКЕ О СТАРЕНИИ**

(Центр наук о жизни, Назарбаев Университет, г. Астана)

Открытие в 2006 году метода индуцирования плюрипотентности в клетках взрослого организма дало новые возможности в применении стволовых клеток в регенеративной медицине, исследованиях механизмов старения, патогенеза генетических заболеваний и клинических испытаниях лекарственных средств. Тем не менее существуют определенные сложности, связанные с применением индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в медицине и фармакологии. В представленном обзоре мы обсуждаем преимущества и недостатки данной технологии в контекстах регенеративной медицины, исследований механизмов старения, патогенеза генетических заболеваний и клинических испытаний лекарственных средств.

Исследования в области биологии стволовых клеток являются одними из наиболее интересных и многообещающих направлений развития современной биомедицины. Понятие «стволовая клетка» было предложено в начале прошлого века русским гистологом Александром Максимовым, постулировавшим существование стволовой кроветворной клетки. За прошедшее столетие это понятие обрело более широкий смысл и в настоящее время характеризует клетки, способные к неограниченному самовоспроизведению и дифференцировке в различные типы клеток. Способность стволовых клеток к росту и дифференциации в культуре открывает широкие возможности для их использования в моделировании заболеваний и разработке лекарств *in vitro*, а также для создания полнофункциональных тканей и органов.

В соответствии со способностью к дифференцировке выделяют две большие группы стволовых клеток – тканеспецифичные (соматические) стволовые клетки и плюрипотентные стволовые клетки. Соматические стволовые клетки выделяют из тканей взрослых организмов, и они, в основном, ограничены в своей способности к росту и дифференцировке. В отличие от тканеспецифичных стволовых клеток, эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) являются плюрипотентными, так как обладают неограниченным пролиферативным потенциалом и теоретически способны дать начало любому типу соматических клеток.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) представляют собой искусственно репрограммированные плюрипотентные стволовые клетки, трансформированные с помощью транскрипционных факторов из взрослых

соматических клеток. Они идентичны ЭСК в отношении экспрессии определенных генов и белков, эпигенетических факторов, способности формирования тератом у иммунодефицитных животных и, что наиболее важно, способности к дифференцировке в любой тип соматических клеток [1].

В настоящий момент разработан ряд протоколов дифференциации плюрипотентных стволовых клеток *in vitro*. В различных исследованиях была продемонстрирована способность иПСК воспроизводить определенные функциональные типы клеток, включая нейронные клетки, эндотелий сосудов, клетки гладкой мускулатуры, кардиомиоциты, гематопоэтические клетки, инсулин-продуцирующие клетки поджелудочной железы и гепатоцито-подобные клетки [2-8]. На данный момент существуют протоколы дифференциации в более чем 200 видов клеток [9]. Потенциально эти клетки могут быть использованы в тканевой и клеточной терапии, но для полноценного их применения в клинической практике существуют определенные ограничения. Во-первых, это канцерогенный потенциал, во-вторых, существуют определенные трудности, связанные с получением высокодифференцированных клеток, и в-третьих, это существующая на данный момент сложность методов клеточной трансплантации.

Однако, несмотря на существующие сложности, развитие технологий иПСК является многообещающим направлением, так как позволяет обойти такие препятствия, ограничивающие применение ЭСК в медицине, как этическая сторона, доступность материала для исследований и иммунологическая несовместимость между клетками-производными ЭСК и реципиентом по факторам гистосовместимости [1, 10-12]. В данной статье мы попытались обобщить последние научные исследования, связанные с

иПСК, в русле регенеративной медицины, фармакологии и геронтологии.

### **Развитие методов клеточного репрограммирования и оценка их эффективности**

С целью выявления факторов, отвечающих за плюрипотентность, разными группами ученых был проведен детальный анализ генов, активно экспрессирующихся в ЭСК [1, 10]. В этой связи особо следует выделить работу Yamanaka и его коллег (Университет Киото, Япония), которым удалось подобрать минимальное сочетание факторов, индуцирующих плюрипотентность, и впервые получить иПСК из фибробластов взрослых мышей [1]. Технология включала в себя действие четырех транскрипционных факторов (oct-3/4, SOX-2, c-Мус, Klf4), экспрессия которых характерна для эмбриональных клеток. Эти факторы были внесены в геном клетки ретровирусным вектором, который способен интегрироваться в геном клетки-реципиента и инициировать дедифференцировку клетки.

Следующим шагом было воспроизведение данной технологии на человеческих клетках. В 2007 году команда исследователей под руководством Thompson'a и Yu из Университета Висконсин представила свой метод получения иПСК из клеток кожного эпителия взрослого человека с использованием измененного набора транскрипционных факторов – Oct4, SOX-2, NANOG и LIN28 и лентивирусного вектора [10]. В этом же эксперименте было доказано, что ген c-Мус, обладающий онкогенными свойствами, не является необходимым для индуцирования плюрипотентности во взрослых соматических клетках [10]. Основной проблемой вышеперечисленных методов репрограммирования является то, что вирусные векторы, используемые для трансформации, способны инициировать процесс формирования опухолей из трансплантированных иПС клеток [11]. В связи с этим разработка новых методов введения генетической информации в клетку, не зависящих от интеграции вируса в геном, является одним из наиболее важных направлений развития иПСК технологий.

В 2007 году Hochedlinger и его коллеги разработали альтернативный метод доставки транскрипционных факторов в геном клетки с помощью аденовируса и получили иПСК, по всем параметрам идентичные эмбриональным стволовым клеткам. Этот вирус не вызывает развития опухолей, так как не интегрируется в геном клетки-реципиента [13, 14]. Однако,

данный метод, как и ранее применявшиеся протоколы, продемонстрировал низкую эффективность клеточной трансформации и составлял 0.2-0.8% [15,16]. Тем не менее группе ученых из Университета Пенсильвании с помощью микроРНК удалось увеличить эффективность получения иПСК на два порядка [16]. Суммируя вышесказанное, в таблице 1 приведены сравнительные данные по текущим методам индуцирования плюрипотентности в соматических клетках.

Также следует отметить, что существующая вариабельность между линиями ЭСК свойственна и для линий иПСК [17]. Они варьируются по эпигенетической информации, экспрессионному профилю и способности к дифференциации [18, 19]. Более того, анализ экспрессионного профиля иПСК показал активность, отличную не только от исходной популяции, но также и от стандартной популяции человеческих ЭСК [20]. В своем исследовании данной проблемы Chin et al. выявили 15 генов, экспрессия которых постоянно варьируется в ЭСК и иПСК линиях, выращенных в разных лабораториях. Результаты этого исследования привели авторов к заключению, что эти вариации не случайны, и могут быть следствием разных условий культивирования в разных лабораториях, т.е. за счет разницы в технологии репрограммирования, клетках-предшественниках, а также совокупности всех этих факторов [21]. Соответственно, для безопасного использования иПСК в клинической практике необходимо максимально исключить возможность вариаций, которые могут привести к мутациям, нарушению метаболизма и последующему развитию болезни. В этой связи Мейсснер и его коллеги из Университета Гарварда разработали своего рода оценочную систему – определенный тип эпигенетического маркера, который позволяет идентифицировать иПСК линии с наименьшим количеством вариаций [22].

### **Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки и клеточная терапия**

Один из наиболее многообещающих аспектов иПСК технологии – это возможность создавать аутологичные клетки для заместительной тканевой терапии. Соматическое происхождение иПСК минимизировало, но не избавило от проблем, которые ограничивали применение терапии на основе ЭСК. В первую очередь, способность транслировать достижения биологии плюрипотентных стволовых клеток в тканевую

терапию (bench to bed) будет зависеть от эффективности дифференцировки в специфичные клеточные линии, эффективности

сортировки клеток для устранения риска развития тератом и развития новых методов доставки клеток в органы-мишени.

Таблица 1

## Методы репрограммирования и их эффективность [66]

Тип вектора	Метод	Интеграция в геном	Факторы <sup>d</sup>	Эффективность репрограммирования (%)
вирус	Ретровирус	+	OSKM	>1%
	Лентивирус	+	OSNL	>0.1%
	Аденовирус	- <sup>a</sup>	OSKM	<0.001%
	Сендай вирус	- <sup>b</sup>	OSKM	>1%
ДНК	Эписомная плаزمида	- <sup>a</sup>	OSKMNLT	<0.001%
	Транспозон	- <sup>a,c</sup>	OSKM	<0.01%
	Миниплазмиды	- <sup>a</sup>	OSNL	<0.001%
РНК	РНК	-	OSKM	>0.1%
	микроРНК	-	miR362/367	>1%
Белок	Белок	-	OSKM	<0.001%

Примечание: <sup>a</sup> Отсутствие интеграции в геном должно быть подтверждено экспериментально  
<sup>b</sup> Отсутствие геном РНК вируса должно быть подтверждено экспериментально  
<sup>c</sup> Вектор транспозона интегрируется в геном, но может быть удален  
<sup>d</sup> O, OCT3/4; S, SOX2; K, KLF4; M, C-MYC; N, NANOG; L, LIN28; T, SV40-большой Т антиген

В области трансплантации iPСК для терапевтической регенерации был проведен ряд исследований, в одном из которых было описано восстановление здорового фенотипа у мыши с серповидно-клеточной анемией путем инфузии кроветворных производных iPСК клеток [23]. Другое исследование показало улучшение симптоматики заболевания в крысиной модели болезни Паркинсона за счет введения допаминергических нейронов, полученных из iPСК мышцей [24]. Также учеными были получены клетки, продуцирующие инсулин [18], гепатоциты [19], кишечные клетки [17]. Несмотря на все достижения в области iPСК, воспроизведение функционально активных энтодермальных клеток до сих пор остается сложной задачей. Однако возможности iPСК в формировании функционирующих органов можно проследить в следующем эксперименте: iPСК дикого типа мышцей были введены в бластоцисты Pdx1-мутантов, не способных формировать нормальную поджелудочную железу. У полученных химерных мышцей поджелудочная железа была полностью сформирована из iPСК клеток. Функциональная активность этих клеток была исследована путем трансплантации β-клеток, полученных от химерных особей, мышцам с индуцированным диабетом. Мыши с трансплантированными β-клетками восстановили свою способность регулировать уровень глюкозы. Хотя возможность того, что данная методика будет методологически и этически осуществима на человеке, остается сомнительной, подобные

эксперименты проливают свет на функциональность и способность к дифференциации iPСК клеток *in vivo*, а также развивают новые подходы к моделированию заболеваний.

Тем не менее, прежде чем клеточная терапия на основе iPСК может быть безопасно апробирована на человеке, потребуется преодолеть определенные препятствия. С одной стороны, для любой терапии на основе плюрипотентных стволовых клеток есть существенный риск формирования тератом. В большинстве доклинических испытаний по трансплантации человеческих ЭСК и iPСК были использованы иммунодефицитные модельные животные, и, соответственно, неизвестен риск формирования тератом у человека по сравнению с тем, что наблюдался у иммунодефицитных животных. Частота возникновения тератом после трансплантации человеческих ЭСК в лабораторных животных напрямую зависела от уровня иммуносупрессии у этих животных [25]. Таким образом, трансплантация генетически идентичных производных iPСК клеток пациентам, предполагающая отсутствие иммунологического ответа, может увеличить риск формирования тератом. С другой стороны, незавершенное репрограммирование и генетические нарушения, возникающие во время формирования iPСК, могут сделать иммуногенными даже генетически идентичные линии iPСК. До сих пор ни одно исследование не оценивало иммуногенность iPСК после трансплантации изогенным реципиентам.

В настоящее время нет достоверных данных о том, что какая-либо из доступных на данный момент стратегий по созданию дифференцированных клеток из иПСК способна отделять их от остаточных плюрипотентных клеток, способных формировать тератомы. Несмотря на то, что наблюдается селективное выживание человеческих кардиомиоцитов и нейронов, полученных из ЭС клеток, трансплантированных иммунодефицитным грызунам [20, 24, 26], вопрос о том, будет ли наблюдаться подобный эффект при аутологичной трансплантации человеческих иПСК, остается открытым. Кроме того, становится все более очевидной проблема того, что дифференцированные клетки, полученные из ЭСК/иПСК, по большей части являются незрелыми. Эти клетки подражают развитию эмбриональных клеток и фенотипически становятся похожи на фетальные или неонатальные клетки [27, 28]. Может ли подобная незрелость повлиять на клиническое использование этих клеток, зависит как от самого типа клеток, так и от вида заболевания. Для лечения дегенеративных процессов, например болезней Паркинсона и Альцгеймера, сердечной недостаточности, необходима трансплантация зрелых клеток, способных заменить утерянные клетки и восстановить функциональность органа. Подобным образом, клеточная зрелость может стать решающим фактором при лечении заболеваний с нарушением секреторной функции, например заболевания поджелудочной железы, печени и кроветворной системы. Способность трансплантированных клеток дифференцироваться на месте вживления в более зрелые остается неизученной. Таким образом, будущие разработки в этой области должны сконцентрироваться на повышении зрелости дифференцированных плюрипотентных клеток *in vitro*.

Последним фактором, влияющим на успешное применение в регенеративной медицине клеток-производных из иПСК, является их способность интегрироваться в уже существующие ткани и органы. Большинство паренхиматозных органов имеют сложную внутреннюю архитектуру, базирующуюся на количественных соотношениях каждого типа клеток и их пространственного расположения, сформированного в процессе развития. Предстоит выяснить, если трансплантированная клеточная суспензия (в основном одного типа клеток) может самостоятельно интегрироваться в архитектуру

ткани или органа. Далее, интегрированные клетки должны будут функционировать совместно с уже существующими в органе структурами. Это особенно важно для таких органов, как сердце, легкое, почки и печень, где индивидуальные функциональные единицы, например, вентрикулярные миоциты, нефроны, альвеолярные мешочки и гепатобилиарная система, взаимосвязаны с другими функциональными единицами и объединены системой сосудов.

Тем не менее недавние успехи в тканевой инженерии позволяют снять ограничения, связанные с клеточной трансплантацией. Недавние исследования продемонстрировали, что высеванием децеллюляризованных тканевых структур эндотелиальными и эпителиальными клетками можно получить искусственные легкие [29, 30], печень [31] и сердце [32], которые, будучи пересаженными в лабораторных животных, способны поддерживать нормальное функционирование органа. Пересадка трахеи человека, проведенная в 2008 году учеными из Университета Барселоны, а также другие подобные операции, подтвердили жизнеспособность этой технологии [33].

#### **Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки и моделирование заболеваний**

Способность производить плюрипотентные линии клеток предоставляет теоретическую возможность получения неограниченного количества клеточного материала для воспроизведения всех типов тканей и органов, иммунологически идентичных пациенту. Это позволяет создавать не только здоровые клетки для клеточной терапии, но и моделировать заболевания в целях изучения патогенеза и методов лечения на клеточном уровне. Действительно, недавние исследования описали линии иПС клеток пациентов с разнообразными наследственными и спорадическими генетическими заболеваниями. На данный момент существует целый ряд исследований, показывающих, что пациент-специфичные иПСК способны отображать патогенез заболевания. Так было показано, что при дифференциации *in vitro* иПСК, полученных от пациента со спинальной мышечной атрофией, наблюдалась прогрессирующая атрофия мотонейронов, воспроизводящая потерю мотонейронов, наблюдаемую в процессе развития этого заболевания [34].

Другим примером является экспериментальная модель синдрома

Хатчинсона-Гилфорда, созданная Zhang и его коллегами из Университета Гонконга. С помощью модели им удалось установить, что прогерин, обуславливающий патогенез данного заболевания, также экспрессируется в высокой степени в дифференцированных клетках, полученных из иПСК пациентов, страдающих этим недугом [35]. Кроме того, перспективным является разработка пациент-специфичных моделей заболеваний с характерными генетическими детерминантами. Несмотря на

то, что воспроизведение фенотипа заболевания в дифференцированных иПСК *in vitro* является необходимым первым шагом в моделировании заболевания, основной задачей данного метода является идентификация новых метаболических путей и поиск лекарств, специфичных к данному заболеванию. В таблице 2 приведены примеры иПСК моделирования фенотипа заболеваний с указанием полигенной или моногенной генетической природы.

Таблица 2

Заболевания, которые были использованы для моделирования в иПСК [67]

Тип заболевания	Название заболевания	Генетическая причина заболевания	Вид поражаемых клеток	Фенотип
Неврологическое	Болезнь Паркинсона	полигенное	Допамиnergические нейроны	Нарушений не наблюдалось
		полигенное	Допамиnergические нейроны	Смерть нейронов при воздействии химических соединений
	Амниотрофичный латеральный склероз	полигенное	мотонейроны	НО*
	Спинальная мышечная атрофия	моногенное	мотонейроны	Отсутствие формирования нейронов
	Семейная дисаутономия	моногенное	Нервные клетки гребня	Потеря нервных клеток гребня
	Синдром Ретта	моногенное	Нейроны	Потеря синапсов, уменьшенный размер клеток
	Болезнь Хантингтона	моногенное	НО	НО
	Атаксия Фридрейха	моногенное	НО	Изменяет повтор GAA-TTC
	Анемия Фанкони	моногенное	Клетки крови	Потеря функции <i>FANCA</i>
Кровотворной системы	Синдром Мартина-Белла	моногенное	НО	Потеря экспрессии <i>FMR1</i>
	Синдром долгого QT	моногенное	Кардиомиоциты	Увеличенная деполяризация кардиомиоцитов
Сердечно-сосудистой системы	Прогрессивный кардиомиопатический лентигиноз	моногенное	Кардиомиоциты	Увеличенный размер кардиомиоцитов, снижена активность MAPK
	Синдром Тимоти	моногенное	кардиомиоциты	Увеличенная деполяризация кардиомиоцитов
	Прогерия Хатчисона-Гилфорда	моногенное	Клетки гладкой мускулатуры, мезенхимальные стволовые клетки	Апоптоз клеток гладкой мускулатуры и мезенхимальных клеток, фенотип клеточного старения
	Миодистрофия Дюшена	моногенное	НО	НО
	Сахарный диабет 1-го типа	полигенное	Клетки, продуцирующие инсулин и глюкагон	НО
Поджелудочной железы	Дефицит A1 антитрипсина	моногенное	Гепатоциты	Потеря экспрессии A1 антитрипсина
Печени	Синдром Прадера-Вилли	моногенное	нейроны	Нарушения импринтинга
Другие	Синдром Дауна	моногенное	НО	НО
	Синдром Дауна	моногенное	НО	НО

Таким образом, иПСК, полученные от пациентов, страдающих различными заболеваниями, могут быть использованы как промежуточное звено между исследованиями на животных-моделях, которые не всегда адекватно отражают человеческий фенотип заболевания, и клиническими испытаниями, которые требуют больших финансовых и

временных затрат. Однако следует понимать, что соединения, проявившие терапевтическую эффективность в исследованиях на иПС клетках *in vitro*, не могут быть напрямую использованы в клинических испытаниях на человеке. Потребуется дальнейшая оценка метаболических свойств, токсичности и эффективности на животных моделях [36].

Следует заметить, что пока не было опубликовано данных об использовании «больных» иПСК в крупных скрининговых исследованиях. Тем не менее исследования в области химии и биологии стволовых клеток предвещают успешное использование подобных, основанных на иПСК, скрининг систем в ближайшем будущем. Помимо этого, технология иПСК позволит исследователям моделировать пре-симптоматические нарушения в клетках пациентов, которые помогут сформировать новые взгляды на развитие заболевания, а также будут способствовать разработке методов ранней диагностики и лечения заболеваний [36].

Однако прежде чем начать использование иПСК в качестве платформы для скрининга новых метаболических путей и лекарственных средств, необходимо решить несколько технологических задач. В первую очередь, необходимо создание достоверных протоколов воспроизведения фенотипа заболевания *in vitro*, с помощью которых стало бы возможным проследить развитие заболевания *in vivo*. Несмотря на то, что был достигнут определенный успех в моделировании моногенных заболеваний, нейродегенеративные нарушения, такие, как болезнь Паркинсона, составляют определенную сложность при моделировании [37]. Главную роль в определении сложности моделирования заболевания *in vitro* играют три фактора: возраст первичного проявления заболевания, поражает ли заболевание один или несколько типов клеток, а также количество генетических дефектов, вызывающих заболевание. Например, такие социально важные заболевания, как болезнь Паркинсона, сердечная недостаточность, болезнь Альцгеймера и сахарный диабет дебютируют поздно, вызываясь комплексом внешних и внутренних (генетических) факторов и, соответственно, сложнее моделируются. Однако с растущим пониманием патогенеза заболеваний и развитием клеточных технологий расширяются и возможности моделирования фенотипов данных заболеваний с помощью иПСК.

Одним из методов, доступных на сегодняшний день, является воссоздание воздействия патогенных факторов дегенеративных заболеваний с помощью физических и химических агентов при изученной этиологии заболевания. Например, исследование, проведенное группой Jaenisch, показало, что в допаминергических нейронах, полученных из иПСК пациента, страдающего

болезнью Паркинсона, патологических изменений не возникало [37]. Тем не менее в условиях окислительного стресса подобные клетки демонстрировали повышенную восприимчивость к апоптозу [38], который является одним из составляющих патогенеза данной болезни.

Несмотря на то, что фенотипы множества заболеваний могут быть воспроизведены на клеточном уровне *in vitro*, возникают определенные трудности при использовании подобных тест-систем в масштабном скрининге лекарственных средств. Главное ограничение в использовании подобных клеток состоит в том, что не существует общепринятых протоколов дифференциации в специфичные линии клеток, которые могли бы производить достаточное количество чистого материала для широкомасштабного скрининга. Несмотря на наличие протоколов дифференциации ЭСК и иПСК в различные типы клеток, таких, как нейроны [39, 40], кардиомиоциты [20, 41-43], клетки крови [44-47] и поджелудочной железы [48, 49], ни один из этих протоколов не воспроизводит клетки-мишени с более чем 95% эффективностью. Выделение клеток с фенотипом заболевания из культуры гетерогенных иПСК также является сложной задачей, однако такие методики, как флуоресцентная сортировка клеток, градиентное центрифугирование и изоляция функциональных маркеров, могут позволить преодолеть это препятствие.

В настоящий момент 2 ведущие компании занимаются коммерциализацией в области иПСК. Компания iPierian использует технологию соматического репрограммирования с последующей дифференциацией для создания моделей различных заболеваний, главным образом неврологических расстройств, таких, как болезнь Паркинсона, спинальная мышечная атрофия и амиотрофический латеральный склероз. Целью является разработка новых молекулярных мишеней и непосредственно лечение данных заболеваний [50]. Компания Fate Therapeutics, напротив, направлена на понимание способов активации и модуляции взрослых стволовых клеток, используя технологию иПСК с целью выявления непосредственных модуляторов стволовых клеток (малые молекулы моделирующие развитие клетки *in vivo*). Таким образом, становится реальной возможность использования иПСК в качестве платформы для скрининга новых метаболических путей и

лекарственных средств, а также *in vivo* регенерации поврежденных тканей [50].

### **Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки и старение**

Как уже упоминалось, существуют методы воздействия внешних и внутренних факторов, комбинирование которых позволяет получать фенотип нейродегенеративных заболеваний у клеток, производных иПСК. Так как дегенеративные заболевания зачастую являются составляющей частью старения, то возникает закономерный вопрос: а можно ли смоделировать само старение, используя иПСК? Таким образом, старение можно было бы изучать на уровнях, которые до этого были не доступны в связи с ограничением в проведении исследований на человеке, а также не полной адекватностью животных моделей. Учитывая дифференцировочный потенциал иПСК, процессы старения можно было бы изучать на десятках разнообразных типов клеток, моделируя разнообразные физиологические процессы и внешние факторы. Изучение стареющих клеток сердца, мозга, печени, поджелудочной железы в культуре позволило бы изучать клеточное старение и вовлеченные в этот процесс механизмы в режиме реального времени. Неограниченное количество клеточного материала, которое теоретически предоставляет технология иПСК, позволит получить необходимое количество материала для исследования различных теорий старения, а также их комбинаций. При развитии тканевой инженерии можно будет рассматривать процессы старения тканей, а возможно и целых органов.

Однако те же факторы, которые ограничивают применение производных иПСК в регенеративной медицине и экспериментальной фармакологии, существуют и здесь: нет стандартных протоколов для получения большого количества дифференцированных клеток, недостаточная степень клеточной дифференцировки производных иПСК, а также отсутствие отработанных протоколов формирования тканевых структур из производных иПСК клеток. Данные препятствия ограничивают применение иПСК в моделировании процессов старения, однако, учитывая скорость, с которой развивается это направление, можно предположить, что эти преграды будут преодолены в ближайшем будущем.

Несмотря на тот факт, что вопросы моделирования процессов старения с помощью иПСК еще не были подняты в литературе, в

ходе проводимых исследований были обнаружены определенные взаимоотношения между процессом репрограммирования и механизмами старения. Несмотря на то, что старение и репрограммирование, которое в некотором контексте можно воспринимать как «омоложение» клетки, являются антагонистичными процессами, оба процесса вовлекают общие механизмы контроля пролиферации, в частности белки p53, p16 и p21. Прямое сравнение способности молодых и старых клеток к репрограммированию показывает, что, чем ближе клетки к старости, тем выше уровни экспрессируемых p16 и p21 и, соответственно, тем сложнее их репрограммировать. Фибробласты старых мышей гораздо менее эффективно трансформируются в иПСК клетки [51]. Похожее снижение результативности трансформации было получено у клеток с укороченными теломерами, характерными для старых клеток и клеток находящихся под стрессом [52]. Тем не менее интересным фактом остается то, что у клеток с нарушенной функцией биогенеза теломер, как, например, при врожденном дискератозе, несмотря на сниженную эффективность трансформации, при индуцировании восстанавливается способность к элонгации теломер [53]. В другом исследовании описывается влияние процесса клеточной трансформации на митохондрии взрослых соматических клеток. В этой работе группа Adjae показала, что во время процесса репрограммирования митохондрии подвергаются «обновлению», т.е. возвращаются к состоянию, схожему с состоянием, характерным для эмбриональных клеток и перестраивают свой метаболизм в сторону анаэробного дыхания и снижения окислительного стресса. Данные исследования показывают, что процесс репрограммирования обращает вспять биологические часы клетки, позволяя «постаревшей» клетке обрести черты «юности» [54].

Как уже было отмечено выше, процесс репрограммирования отличается низкой эффективностью. Только 0,2-0,8% клеток проходят этот процесс успешно. В немалой степени это связано с тем фактом, что клетки, не прошедшие процесс репрограммирования, как и в случае подавления опухолевого процесса, элиминируются механизмами, в нормальном состоянии ответственными за старение и апоптоз [55,56] (рисунок 1).

Было показано, что рапамицин, который удлиняет продолжительность жизни различных модельных организмов [57], также влияет на

процесс трансформации иПСК. mTOR, который ингибируется рапамицином, предположительно модулирует как продолжительность жизни, так и эффективность репрограммирования. Также были протестированы эффекты шести других соединений-геропротекторов на эффективность репрограммирования, включая 2 активатора сиртуина (ресвератрол и фисетин), индуктор аутофагии (спермидин), антиоксидант (куркумин) и ингибитор АМФ-зависимой протеин киназы (метформин). Все эти соединения, за исключением метформина, в

разной степени улучшали эффективность репрограммирования [58].

Таким образом, процессы, контролируемые клеточный цикл и старение клетки, имеют глубокое влияние на процессы репрограммирования. Изучение подобных механизмов может не только увеличить эффективность репрограммирования, но и углубить понимание базовых процессов, ограничивающих жизнеспособность клетки и приводящих к ее старению.



Рисунок 1 - Судьбы клеток во время репрограммирования [68]

Технологии репрограммирования взрослых соматических клеток значительно расширяют возможности регенеративной медицины, открывают новые горизонты в моделировании как моногенных, так и полигенных дегенеративных заболеваний, таких, как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, диабет, патологии сердечнососудистой и эндокринной систем, и т. д. [34, 53, 59-62]. Пациент-специфичные иПСК могут стать источником не только генетической информации, но и потенциально – самим фенотипом заболевания [63-65]. Подобный подход к моделированию заболеваний позволит значительно расширить понимание этиологии и патогенеза различных заболеваний и пересмотреть уже известные аспекты [63]. Клеточные и тканевые модели

заболеваний позволят тестировать новые лекарственные средства, изучать новые пути метаболизма, анализировать процессы старения и, самое главное, определять методы их коррекции.

Платформы для разработки лекарственных препаратов на основе иПСК могут быть полезными в заполнении пробела между животными моделями и клиническими

испытаниями, помочь решить проблему с определением эффективности и токсичности лекарственных соединений на модельных клетках человека. Очевидное преимущество в использовании иПСК по сравнению с ЭСК состоит в том, что иПСК могут быть получены непосредственно от пациента, позволяя

развивать платформу для определения индивидуальных генетических особенностей, а также персонализированного изучения фармакокинетических и фармакодинамических свойств лекарственных препаратов [12]. iPСК клетки представляют новый виток в развитии наших знаний о биологии стволовых клеток, которые в будущем позволят улучшить качество медицинского обслуживания, повысить доступность тканей и органов для трансплантации, развить понимание механизмов заболевания и способность производить новые лекарства – все для здоровой, качественной и продолжительной жизни человека.

1. Takahashi, K., Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*.- 2006.- №126. - С. 663–676

2. Dimos, J.T. et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with aLS can be differentiated into motor neurons // *Science*.- 2008. - №321. -С.1218–1221

3. Karumbayaram, S. et al. Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons // *Stem Cells*. – 2009. - №27.- С.806–811

4. Tateishi, K., He, J., Taranova, O., Liang, G., D'alessio, a.C. & Zhang, y. Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts // *J. Biol. Chem*.- 2008. - №283. – С.31601–31607

5. Si-Tayeb, K. et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells // *Hepatology*. – 2010. - №51. - С.297–305

6. Sullivan, G.J. et al. Generation of functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent stem cells // *Hepatology*. – 2010. - №51. – С.329–335

7. Taura, D. et al. Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells—brief report // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*.- 2009.- №29.- С. 1100–1103

8. Narazaki, G. et al. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells // *Circulation*.- 2008.- №118.- С.498– 506

9. Boheler, K.R. Stem cell pluripotency: a cellular trait that depends on transcription factors, chromatin state and a checkpoint deficient cell cycle // *J. Cell. Physiol*. - 2009.- №221.- С.10–17

10. Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I. and Thomson, J.A. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences // *Science*.- 2009. - DOI:10.1126/science.1172482.

11. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // *Cell*.-2007.- №131.- С. 861–872

12. Inoue, H. and Yamanaka, S. The Use of Induced Pluripotent Stem Cells in Drug Development // *Clinical pharmacology & Therapeutics*.- 2011.- VOL.89.- №5

13. Stadtfeld M, Maherali N, Breault DT, Hochedlinger K. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell*.- 2008. - №2.- С.230–40

14. Woltjen, K. et al. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells // *Nature*.-2009.- №458.- С.766–770

15. Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D.A. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2 // *Nat. Biotechnol*.-2008.- №26.- С.1269–1275.

16. Frederick Anokye-Danso, Chinmay M. Trivedi, Denise Juhr, Mudit Gupta, Zheng Cui, Ying Tian, Yuzhen Zhang, Wenli Yang, Peter J. Gruber, Jonathan A. Epstein, and Edward E. Morrisey. Highly Efficient miRNA-Mediated Reprogramming of Mouse and Human Somatic Cells to Pluripotency // *Cell Stem Cell*. – 2011. - №8. – С.376–388

17. Spence, J. R. et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro* // *Nature*. – 2011. - №470.- С.105–109

18. Kroon, E. et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells *in vivo* // *Nat. Biotechnol*. - 2008. - №26. - С.443–452

19. Song, Z. et al. Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells // *Cell Res*.-2009. - №19. С.1233–1242

20. van Laake, L. W. et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction // *Stem Cell Res*.- 2007. - №1.- С.9–24

21. Chin M.H., Mason M.J., Xie W., Volinia S., Singer M., Peterson C., Ambartsumyan G., Aimiwu O., Richter L., Zhang J., Khvorostov I., Ott V., Grunstein M., Lavon N., Benvenisty N., Croce C.M., Clark A.T., Baxter T., Pyle A.D., Teitell M.A., Pelegriani M., Plath K., Lowry W.E. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures // *Cell Stem Cell*. - 2009. - №5. – С.111–23.

22. Bock C., et al. Reference Maps of Human ES and iPS Cell Variation Enable High-Throughput Characterization of Pluripotent Cell Lines // *Cell*. – 2011. - №144. – С.439–452

23. Hanna J. et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin // *Science*. - №318.- С.1920–1923

24. Wernig M. et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 2008. - №105.- С.5856–5861

25. Swijnenburg R.J. et al. Immunosuppressive therapy mitigates immunological rejection of human embryonic stem cell xenografts // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*.- 2008. - №105.- С.12991–12996

26. Laflamme M. A. et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts // *Nat. Biotechnol.* - 2007. - №25.- C.1015–1024
27. Boheler K. R. et al. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes // *Circ. Res.*- 2002. - №91.- C.189–201
28. Olivier E. N., Qiu C., Velho M., Hirsch R. E. & Bouhassira E. E. Large-scale production of embryonic red blood cells from human embryonic stem cells // *Exp. Hematol.*-2006.- №34.- C.1635–1642
29. Petersen T. H. et al. Tissue-engineered lungs for *in vivo* implantation // *Science.*- 2010. - №329.- C.538–541
30. Ott H. C. et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung // *Nat. Med.*-2010.- №16.- C.927–933
31. Uygun B. E. et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix // *Nat. Med.*- 2010.- №16.- C.814–820
32. Ott H. C. et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart // *Nat. Med.*- 2008.- №14.- C.213–221
33. Macchiarini P., Jungebluth P., Go T., Asnagli M.A., Rees L.E., Cogan T.A., Dodson A., Martorell J., Bellini S., Parnigotto P.P., Dickinson S.C., Hollander A.P., Mantero S., Conconi M.T., Birchall M.A. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway // *The Lancet.*-2008. - Vol. 372. - № 9655. – C. 2023-2030
34. Ebert A. D. et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient // *Nature.*- 2009. №457.- C. 277–280
35. Zhang J. et al. A human iPSC model of Hutchinson Gilford progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects // *Cell Stem Cell.*-2011.- №8.-C.31–45
36. Sean M. Wu and Konrad H. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine // *Nature Cell Biology.*- 2011.- Vol.13. – No5
37. Soldner F. et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors // *Cell.*- 2009. - №136. – C.964–977
38. Nguyen H. N. et al. LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress // *Cell Stem Cell.* - №8.- C.267–280
39. Swistowski A. et al. Efficient generation of functional dopaminergic neurons from human induced pluripotent stem cells under defined conditions // *Stem Cells.*- 2010.- №28.-1893-1904
40. Nizzardo M. et al. Human motor neuron generation from embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells // *Cell Mol. Life Sci.*-2010.- №67. – C.3837–3847
41. Yang L. et al. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic- stem-cell-derived population // *Nature.*- 2008.- №453.- C.524–528
42. Laflamme M. A. et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts // *Nat. Biotechnol.* - 2007.- №25.- C.1015–1024
43. Kattman S. J. et al. Expression of Flk-1/KDR and PDGFR- $\alpha$  marks the emergence of cardiac mesoderm from mouse and human pluripotent stem cells // *Cell Stem Cell.* – 2011. -№8.- C. 228–240
44. Irion S. et al. Temporal specification of blood progenitors from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells // *Development.* – 2010. - №137. C.2829–2839
45. Choi K.D. et al. Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells // *Stem Cells.* – 2009. - №27. – C.559–567
46. Lengerke C. et al. Hematopoietic development from human induced pluripotent stem cells // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*- 2009. - №1176. – C.219–227
47. Ma Y. D., Lugas J. J., Park C. & Choi K. Differentiation of mouse embryonic stem cells into blood // *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* – 2008. – 1, 1F.4
48. Kroon E. et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells *in vivo* // *Nat. Biotechnol.*- 2008. - №26. – C.443–452
49. D'Amour K.A. et al. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm.// *Nat. Biotechnol.*- 2005.- №23. – C.1534–1541
50. Hayden E.C. The growing pains of pluripotency // *Nature.* – 2011. - Vol.473
51. Li H., Collado M., Villasante A., Strati K., Ortega S., Canamero M., Blasco M.A., Serrano M. The Ink4 / Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming // *Nature.* – 2009.- №460. – C. 1136–1139
52. Marion M., Strati K., Li H, Tejera A., Schoeffner S., Ortega S., Serrano M., Blasco M. Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells // *Cell Stem Cell.* – 2009. - №4. – C.141–154
53. Agarwal S. et al. Telomere elongation in induced pluripotent stem cells from dyskeratosis congenita patients // *Nature.* -2010. - №464. – C.292–296
54. Ana B., Gil J. Induced pluripotent stem cells and senescence: learning the biology to improve the technology // *EMBO reports.* – 2010. - Vol.11.- No5
55. Banito A. et al. Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells // *Genes Dev.* – 2009. - №23. – C.2134–2139
56. Kawamura T., Suzuki J., Wang V., Menendez S., Morera B., Raya A., Wahl M., Belmonte J. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming // *Nature.*-2009.- №460. – C.1140–1144
57. Fontana L., Partridge L., Longo V.D. Extending healthy life span– from yeast to humans // *Science.* – 2010. - №328. – C.321–326
58. Taotao C., Li S., Jie Y., Hongjiang W., Ao G., Jiekai C., Yuan L., Jian Z. and Gang P. Rapamycin and other longevity-promoting compounds enhance the generation of mouse induced pluripotent stem cells // *Aging Cell.* – 2011. – C.1–5
59. Lee G. et al. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysau using patient-specific iPSCs // *Nature.* - 2009. - №461. –C. 402–406

60. Raya A. et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from F anaemia induced pluripotent stem cells // Nature - 2009. - №460. - С.53–59

61. Carvajal-Vergara X. et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPaRD syndrome // Nature. - 2010. - №465. - С.808–812

62. Marchetto M.C. et al. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells // Cell. - 2010. - №143. - С.527–539

63. Marchetto M.C., Winner B. & Gage F.H. Pluripotent stem cells in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases // Hum. Mol. Genet.- 2010. - №19. - С.71–76

64. Wichterle H. & Przedborski S. What can pluripotent stem cells teach us about neurodegenerative diseases // Nat. Neurosci. - 2010. - №13. - С.800–804

65. Lee G. & Studer L. Induced pluripotent stem cell technology for the study of human disease // Nat. Methods. - 2010. - №7. - С.25–27

66. Okita K., Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges // Phil. Trans. R. Soc. B. - 2011. - 366. - P.2198-2207

67. Sean M. Wu, Konrad H. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine // Nat. Cell Biol. - 2011. - Vol.13. - 5. - P.497-505

68. Banito A., Gil J. Induced pluripotent stem cells and senescence: learning the biology to improve the technology // EMBO reports. - 2010. - Vol.11. - N5. - 353-359

\*\*\*

The discovery of induced pluripotent stem cells in 2006 opened new capabilities for the use of stem cells in regenerative medicine, research of ageing mechanisms, pathogenesis of genetic disorders and clinical drug trials. However, there are substantial drawbacks for the use of induced pluripotent stem cells in medicine and pharmacology. In this review we discussed advantages and limitations of this technology in regards to regenerative medicine, pathogenesis of genetic conditions and clinical drug trials.

\*\*\*

2006 жылы ашылған ересек организмнің жасушаларында плюрипотенцияны индукциялаудың методы дiңгек жасушаларының регенеративті медицинада, қартайу механизмдер мен генетикалық аурулардың патогенезін зерттеуде және дәрілердiң клиникалық сынауында қолданылуына жаңа мүмкіндіктерін ашты. Алайда, индукцияланған плюрипотентті дiңгек жасушалардың медицина және фармакологияда қолданылуында айқын қиыншылықтар бар. Ұсынылған шолуда бiз бұл технологияның артықшылықтарын және кемшіліктерін регенеративті медицинаның, қартайу механизмдер мен генетикалық аурулардың патогенезін зерттеуінің және дәрілердiң клиникалық сынауының құрамында талқылаймыз.