

## ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: ОТ ПОЛУЧЕНИЯ ДО ПРИМЕНЕНИЯ В БИОХИМИЧЕСКИХ И БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

© 2014 г. Е. В. НОВОСАДОВА, И. А. ГРИВЕННИКОВ

*Институт молекулярной генетики РАН, г. Москва*

I. Введение. II. Способы получения и свойства индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. III. Некоторые аспекты использования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в биохимических и биомедицинских исследованиях. IV. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Результаты исследований последних лет в области молекулярной генетики и клеточной биологии открывают новые возможности для исследований молекулярных основ развития ряда тяжелых заболеваний человека, включая нейродегенеративные, и разработки подходов к их клеточной терапии.

Еще относительно недавно считалось, что дифференцированные в ходе нормального эмбрионального развития организма соматические клетки невозможно вернуть в их первоначальное (недифференцированное) состояние (рис. 1).

Различные воздействия на дифференцированные соматические клетки могли приводить к их частичной дедифференцировке, что в большинстве случаев было связано с малигнизацией клеток и развитием злокачественных новообразований, что схематически

---

*Принятые сокращения:* ЭС клетки – эмбриональные стволовые клетки; ИПС клетки – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ТФ – транскрипционный фактор; МЭФ – мышинные эмбриональные фибробласты; БП – болезнь Паркинсона; SNCA – альфа-синуклеин.

*Адрес для корреспонденции:* Гривенников Игорь Анатольевич, igorag@img.ras.ru.

Работа в этой области проводилась при частичной поддержке грантов Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий», гранта Министерства образования и науки РФ ГК № 14.604.21.0115 и гранта Российского фонда фундаментальных исследований (N 14–08–01089-а)..

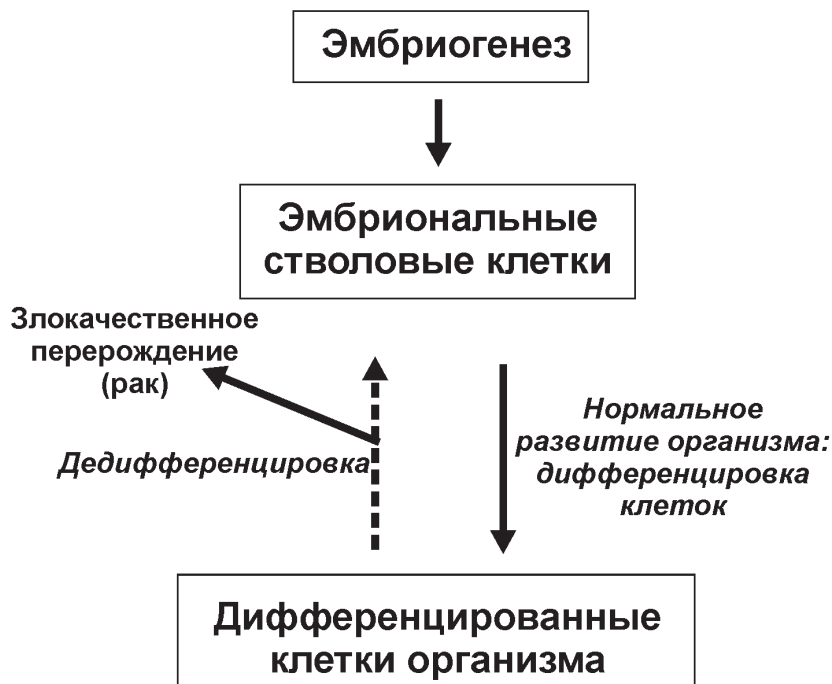


Рис.1. Схематическое представление дифференцировки соматических клеток при развитии организма.

представлено на рис. 1. Однако полученные в последние примерно 10 лет результаты указывают на возможность обращения процесса дифференцировки клеток.

Речь идет о репрограммировании соматических клеток человека в плюрипотентные стволовые клетки с дальнейшей их дифференцировкой в клетки различных типов, а также в перспективе с трансплантацией таких клеток пациентам, страдающим различными тяжелыми заболеваниями. В 2006 г. японским исследователям Такахаши и Яманаке [1] удалось осуществить репрограммирование взрослых и эмбриональных фибробластов мыши в плюрипотентные стволовые клетки путем введения в эти клетки с помощью ретровирусных векторов четырех транскрипционных факторов (ТФ) Oct3/4, Sox2, c-Myc и Klf4. Авторы назвали эти клетки индуцированными плюрипотентными стволовыми (ИПС) клетками. Полученные в результате такой обработки ИПС клетки обладали сходной с эмбриональными стволовыми (ЭС) клетками морфологией, ростовыми свойствами и

экспрессировали специфические маркеры, присущие ЭС клеткам. Уже через год Такахаши с сотр. [2], а затем Накагава с сотр. [3] из той же лаборатории Киотского университета сообщили об успешном репрограммировании фибробластов взрослого человека и получении ИПС клеток с помощью тех же факторов (Oct4, Sox2, c-Мyc и Klf4). В настоящем обзоре будут рассмотрены способы получения ИПС клеток, сравнение их с ЭС клетками и перспективы их использования для изучения биохимических основ развития ряда тяжелых патологий нервной системы человека, а также для разработки подходов к клеточной терапии этих заболеваний.

## **II. СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И СВОЙСТВА ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

### **ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ**

В начале остановимся на некоторых свойствах ЭС клеток. В 1998 году Джеймсу Томсону и его сотрудникам из Винконсинского университета в Маддисоне удалось вывести первую линию ЭС клеток человека [4]. Они были выделены из внутренней клеточной массы и культивировались на фидерном слое из мышечных эмбриональных фибробластов (МЭФ). Известно, что МЭФ секретируют все необходимые факторы (LIF, FGF, TGF $\beta$ , Activin, Wnt и др.), необходимые для поддержания роста и самообновления ЭС клеток [5, 6]. Однако впоследствии был разработан так называемый бесфидерный способ культивирования ЭС клеток на искусственных подложках таких как Matrigel, CELLstart, и некоторые другие [7–9]. На сегодняшний момент наиболее популярными и эффективными методами культивирования ЭС клеток является использование в качестве подложки фибробластов (мышечных и человеческих) или коммерческой подложки Matrigel с ростовой средой mTeSt, содержащей все необходимые факторы для поддержания плюрипотентного состояния. В этих условиях недифференцированные ЭС клетки растут плотными, чаще всего округлыми колониями. Размер клеток составляет около 20 микрон, наблюдается высокое соотношение ядро–цитоплазма, хорошо видны ядрышки, характерно перинуклеарное расположение митохондрий, низкое содержание АТФ, высокий уровень потребления кислорода и низкий уровень содержания митохондриальной ДНК [10–13].

ЭС клетки обладают уникальной картиной модификации гистонов: вокруг старта транскрипции генов, принимающих участие

в раннем эмбриональном развитии, располагаются протяженные участки триметилированного гистона H3 (H3K27me3, метка репрессированного хроматина), которые окружают менее протяженные участки диметилированного гистона H3 (H3K4me2, метка активного хроматина). Такие двойные хроматиновые домены получили название «бивалентных». В результате гены раннего эмбрионального развития в ЭС клетках находятся в промежуточном состоянии, их нельзя считать ни полностью активированными, ни полностью инактивированными [14, 15]. Возможно, гипердинамичная структура хроматина связана с тем, что различные варианты гистонов взаимодействуют с хроматином очень непродолжительно (в течение нескольких секунд или минут) [16]. Надо отметить, что в соматических клетках также встречаются «бивалентные» домены, но у них репрессивная метка H3K27me3 преобладает над меткой активного хроматина H3K4me2. ЭС клетки способны неограниченно пролиферировать *in vitro*, не теряя своих плюрипотентных свойств и сохраняя при этом нормальный хромосомный набор. В этих клетках работают каскады сигнальных путей, которые блокируют индукцию дифференцировки и способствуют поддержанию в активном состоянии ТФ, ответственных за состояние плюрипотентности.

В конце 20 века были выявлены несколько основных ТФ, необходимых для поддержания состояния плюрипотентности – Oct3/4 (POU5F1), Sox2 и Nanog [17–19].

Они тесно взаимодействуют как между собой, так и с множеством других генов. Часть генов ответственна за поддержание плюрипотентности ЭС клеток, а часть – за дифференцировку в экто-, энто- и мезодермальном направлении, а также в экстраэмбриональные ткани. Активно транскрибирующиеся в ЭС клетках гены – это непосредственно Oct3/4, Sox2, Nanog, затем гены, кодирующие ТФ: STAT3, Zic3, Hesx1 и Esrrb, а также гены, кодирующие белки, модифицирующие хроматин (SET, MYST3), ингибиторы нейрогенеза (Rest), белки связанные с теломерами (Rif2 в комплексе с другими белками защищает от деградации концы хромосом). К неактивным в ЭС клетках относятся, в частности, гены, участвующие в различных дифференцировочных процессах [20]. Интересно отметить, что, несмотря на «открытую организацию» хроматина, уровень метилирования ДНК в ЭС клетках выше, чем у ДНК дифференцированных соматических клеток [21]. Отличается также и сама картина метилирования, если для клеток фибробластов метилирование в CpG островках ДНК происходит в 99,98% случаев, то для ЭС клеток только в 75%.

## ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Впервые прямое репрограммирование соматических клеток с помощью набора ТФ было осуществлено в 2006 году японскими исследователями Такахашии и Яманакой, что послужило началом отдельного направления исследований в области биологии развития [1]. Лаборатория Яманаки работала над поиском факторов, поддерживающих в ЭС клетках программу плюрипотентности. Было найдено несколько десятков генов, активность которых в этих клетках была намного выше, чем в дифференцированных клетках, и, кроме того, уже было известно, что слияние ЭС и специализированной клетки может давать плюрипотентные клетки [22].

В первом оригинальном эксперименте по получению клеток с индуцированной плюрипотентностью были репрограммированы клетки МЭФ. Для того, чтобы подобрать набор факторов, необходимых и достаточных для репрограммирования этих соматических клеток, японские исследователи протестировали сочетания 24 ТФ, вовлеченных в самоподдержание плюрипотентных клеток. При инфицировании соматических клеток ретровирусами, содержащими разные наборы ТФ, было выяснено, что достаточно четырех ТФ, названных впоследствии «коктейлем Яманаки» (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc), для индукции плюрипотентного состояния в клетках МЭФ. Уже в 2007 году Такахашии и Яманака опубликовали данные о получении ИПС клеток из фибробластов кожи взрослого человека [2]. Полученные в результате такой обработки ИПС клетки обладали сходной с ЭС клетками морфологией, ростовыми свойствами и экспрессировали специфические маркеры, присущие ЭС клеткам.

На рис. 2 А и Б показана сходная морфология ЭС клеток человека и ИПС клеток, полученных из фибробластов здорового донора. Размеры ИПС клеток составляют порядка 20 мкм, для них как и для ЭС клеток характерно большое соотношение размеров ядро–цитоплазма. Растут ИПС клетки монослойными колониями с плотными контактами между соседними клетками.

ЭС клетки являются своеобразным «золотым стандартом» для ИПС клеток, ибо ИПС клетки, по сути, являются полученными *in vitro* ЭС клетками. Таким образом, оба этих типа клеток проявляют схожесть, если не сказать идентичность по своим морфологическим, молекулярно-биологическим, иммуноцитохимическим и функциональным характеристикам. Недифференцированные ИПС клетки характеризуются наличием таких общепринятых маркеров (характерных для ЭС клеток), как высокая активность щелочной фосфатазы, экспрессия протеогликанов TRA-1-60, TRA-1-81 и гликолипида

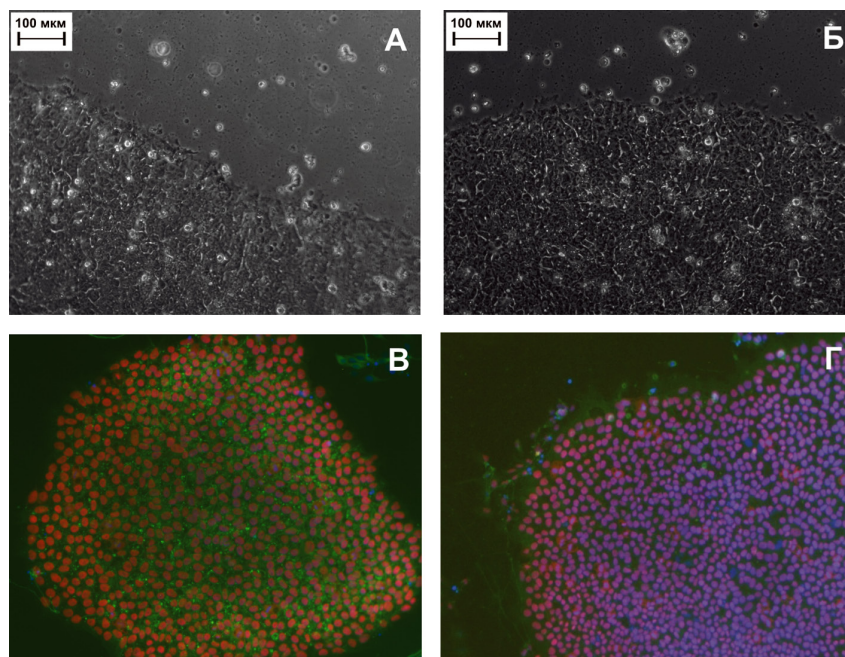


Рис.2. ЭС и ИПС клетки человека в культуре.

А. Колония ЭС клеток человека, линия HUES9. Б. Колония ИПС клеток, полученных из фибробластов здорового донора. Увеличение X200.

В, Г. Иммуноцитохимическое окрашивание клонов ИПС клеток на маркеры плюрипотентности. В. Oct4 (красный), SSEA4 (зеленый), DAPI (голубой).

Г. Sox2 (красный), TRA-1-61 (зеленый), DAPI (голубой). Увеличение X100.

SSEA-4 и, в меньшей степени, гликолипида SSEA-3 [2]. SSEA-4 и SSEA-3 характерны только для плюрипотентных клеток человека и приматов, ЭС и ИПС клетки мыши несут на своей поверхности специфический гликопротеин SSEA-1 [1].

Внутриклеточными маркерами недифференцированного состояния являются ТФ, необходимые для поддержания плюрипотентности ИПС и ЭС клеток, такие как Oct4, Nanog и Sox2 [1, 2]. Также ИПС клетки и ЭС клетки схожи по эпигенетическому состоянию генома. Так в плюрипотентных клетках, в отличие от дифференцированных клеток, промоторы генов *Oct4* и *Nanog* деметилированы. На рис. 2 В и Г представлены данные по экспрессии ряда маркеров плюрипотентности в ИПС клетках человека.



*Транскрипционные факторы,  
участвующие в репрограммировании*

Рассмотрим по отдельности свойства четырех ТФ, выявленных в работах коллектива ученых под руководством Яманаки [1, 2].

**Транскрипционный фактор Oct.** Этот ТФ, также известный как Oct3/4(POU5F1), по-видимому, является ключевым в регуляции плюрипотентности. Гомеодомен-содержащий белок, кодируемый геном *Oct4(pou5f1)*, связывается с последовательностью ДНК 5'-ATGСААТ-3', при этом может происходить как активация, так и супрессия транскрипции, в зависимости от последовательностей нуклеотидов, фланкирующих сайт связывания. Таким образом, подтверждается его основополагающая роль в индукции плюрипотентности и в контроле дифференцировки клеток [23]. В мышиных и человеческих эмбрионах экспрессия *Oct4* локализуется в клетках внутренней клеточной массы бластоцисты, и при нокауте этого гена эмбрионы погибают после стадии бластоцисты [24]. Плюрипотентные стволовые клетки чувствительны к колебаниям белкового уровня *Oct4*. Снижение экспрессии *Oct4* в ЭС клетках приводит к спонтанной дифференцировке в трофобласт, а его увеличение индуцирует образование примитивной энтодермы и мезодермы [25–27]. Такое влияние, вероятно, происходит за счет связи *Oct4* с его генами-мишенями. К примеру, *Hand* ответственен за развитие ранней трофобластической энтодермы, *Spp1* кодирует белок остеопонтин, экспрессирующийся в примитивной эктодерме, *Fbx15* и *FGF4* – экспрессируются во ВКМ и т.д. [28]. *Oct4* является классическим протоонкогеном, нарушение его экспрессии приводит к диспластическому росту и формированию различных типов опухолей [29, 30]. Кроме того, *Oct4* влияет на проявление онкогенности ЭС клеток *in vitro*, так увеличение его уровня индуцирует раковую трансформацию в неопухолевых клетках [25].

**Транскрипционный фактор Sox2.** Sox2 (SRY – sex determining region Y-box2) относится к членам Sox семейства ТФ, участвующих в регуляции разных этапов клеточного развития и дифференцировки. Белки этого семейства имеют высококонсервативный ДНК-связывающий домен, известный как HMG (high-mobility group) и состоящий примерно из 80 аминокислотных остатков. Данная группа белков участвует в регуляции транскрипции и архитектуры хроматина. Sox2 образует комплекс с Oct4, который участвует в регуляции экспрессии генов *UTF1*, *Fgf4*, *Fbx15*, необходимых для поддержания плюрипотентности ЭС клеток [19, 31, 32]. Эмбрионы *Sox2*<sup>-/-</sup> не достигают стадии эпибласта и погибают в имплантационной стадии, а

нокаутирование *Sox2* в ЭС клетках мыши приводит к их дифференцировке в различные клеточные типы, включая трофоэктодерму, что указывает на важную роль *Sox2* в индукции и поддержании плюрипотентности [33, 34]. *Sox2* также является протоонкогеном. Изменения в его экспрессии могут приводить к возникновению рака груди, мелкоклеточного рака легкого и рака простаты [35, 36].

**Транскрипционный фактор *Klf4*.** *Klf4* относится к семейству транскрипционных факторов Krippel-like. Белки этого семейства вовлечены в самые разнообразные процессы такие как: эмбриональное развитие, клеточная пролиферация, дифференцировка и апоптоз [37]. В экспериментах на мышах была продемонстрирована последовательная экспрессия этого гена во время эмбрионального развития. Так, вначале экспрессия *Klf4* обнаруживается в экстраэмбриональных тканях, затем в желудочно-кишечном тракте и, наконец, в развивающихся слоях кожи эмбриона [38–40].

Во взрослом организме *Klf4* продолжает экспрессироваться в желудочно-кишечном тракте и в коже, а также в терминально дифференцированных эпителиальных тканях [39, 40]. Интересной особенностью *Klf4* является высокий уровень его экспрессии в неделящихся клетках и практически полное отсутствие в активно пролиферирующих клетках [41]. Эмбрионы мышей с нокаутированным геном *Klf4* нормально развиваются, но гибнут вскоре после рождения из-за дефекта в защитной функции кожи [39].

Снижение белкового уровня *Klf4* в ЭС клетках никак не проявляется фенотипически, однако, одновременное уменьшение уровней экспрессии нескольких членов этого семейства приводит к дифференцировке клеток. Опираясь на эти данные было предположено, что другие белки *Klf* семейства могут компенсировать функцию *Klf4* [28, 42]. В отличие от *Oct4* и *Sox2*, *Klf4* идентифицирован и как возможный онкоген, и как опухолевый супрессор. *Klf4* связывают с возникновением рака кишечника, пищевода и груди [43–47].

**Транскрипционный фактор *c-Myc*.** *c-Myc* – мультидоменный ТФ, также участвующий в процессах пролиферации, дифференцировки и клеточного роста [48, 49]. Показано, что *c-Myc* вовлечен в регуляцию транскрипции более 10% от всех известных генов [48, 50]. Соответственно по примерным расчетам у него может быть более 2500 сайтов связывания по всему геному человека [51]. Помимо того, что *c-Myc* регулирует транскрипцию генов, кодирующих определенные белки, он еще и вовлечен в регуляцию некодирующих генов микро-РНК [52, 53].



Эмбрионы мышей с нокаутированным геном *c-myc* имеют нормальное развитие на начальных этапах, однако на поздних стадиях появляются нарушения в развитии сердца, нервной трубки, сосудов и клеток крови, что приводит к смерти эмбрионов на 10 день после оплодотворения [54, 55]. Любопытно отметить, что ЭС клетки с нокаутированным *c-myc* нормально пролиферируют и способны к самообновлению *in vitro* [54]. *C-Myc*, как и все остальные представленные выше ТФ, является протоонкогеном. Его повышенная экспрессия прослеживается более чем в 70% различных опухолей человека, что делает его одним из самых часто детектируемых опухолевых маркеров [48].

Однако следует отметить, что ИПС клетки можно получить, используя не только комбинацию Oct4, Sox2, Klf4 и *c-Myc*. Так, вскоре после сообщения о получении первых ИПС клеток с помощью «коктейля Яманаки», появились данные о том, что Klf4 и *c-myc* можно заменить на Nanog и Lin28 [56], а Sox2 и Klf4 на Sox1 и Klf2 [3].

В дальнейшем работы по получению ИПС клеток развивались, в частности, по пути повышения эффективности процесса репрограммирования и поиска новых подходов, в которых не использовались бы вектора, основанные на лентивирусных или ретровирусных последовательностях, интегрирующихся в геном клетки реципиента.

#### СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ИПС КЛЕТОК

Большинство известных к настоящему времени способов получения ИПС клеток представлены на рис. 3.

Все эти методы условно можно разделить на две большие группы: вирусные и невирусные. В свою очередь вирусные методы получения ИПС клеток бывают с интеграцией трансгена в геном хозяйской клетки и без интеграции. Исторически первыми были разработаны вирусные системы индукции: ретровирусная [1, 2] и лентивирусная [56]. При таком способе переноса трансгены встраиваются в случайные места генома с разной интенсивностью. В результате их экспрессии происходит запуск процесса репрограммирования. При этом, по мере того как клетки проходят этапы репрограммирования, экспрессия трансгенов должна замолкнуть из-за активации соответствующих генов клетки-хозяина и работы гистоновых метилтрансфераз [57]. Замолкание транскрипции трансгенов должно произойти в строго определенный промежуток времени. При раннем замолкании репрограммирование может не пройти, или образуются частично репрограммированные клетки, которые будут зависеть от экзогенной экспрессии [58]. При этом постоянно работающие трансгены могут

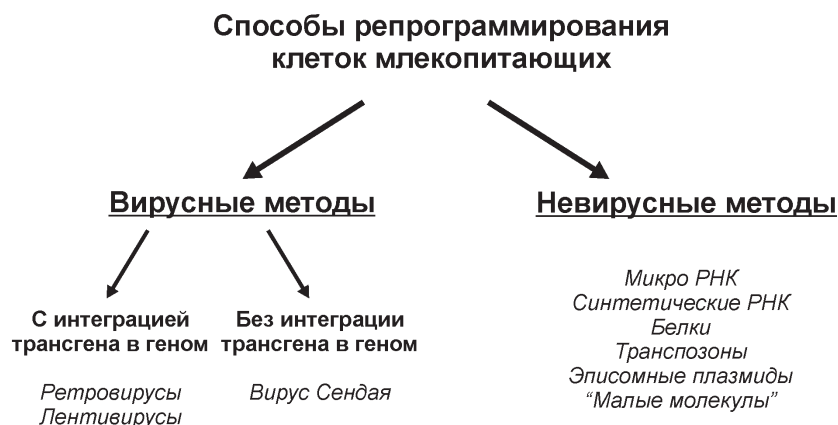


Рис.3. Некоторые известные способы репрограммирования клеток млекопитающих.

смещать потенциал дифференцировки ИПС клеток и приводить к увеличению возникновения опухолей у химерных животных [59]. Проблему с замолканием экспрессии трансгена в определенное время можно обойти, применяя индуцибельные вектора. Например, широко используемая Dox-индуцибельная система лентивирусной доставки ТФ, позволяет регулировать экспрессию трансгенов добавлением доксициклина в культуральную среду. В этом методе есть свои нюансы. Во-первых, для таких систем характерно «подтекание» вектора, когда частичная экспрессия трансгена идет даже в отсутствие активатора, во-вторых, практически для каждой линии клеток необходимо подбирать концентрацию доксициклина и оптимальное время выключения трансгена. Для фибробластов и кератиноцитов уже определены временные границы, составляющие 16 и 10 дней, соответственно [60]. С помощью Dox-системы на мышах были получены химеры, которые содержали молчащие трансгены во всех тканях организма. Клетки мышей, дефицитных по одному из трансгенов, использовались для скрининга малых молекул, которые могли бы заменить соответствующий фактор репрограммирования [61].

Решением проблемы внедрения трансгена в геном может быть использование ДНК рекомбиназ. Были сконструированы лентивирусные векторные системы, в которых трансгены фланкировали LoxP сайты [62, 63]. Последовательность ДНК, заключенная между прямыми повторами LoxP сайтов, при рекомбинации, осуществляемой Cre рекомбиназой, вырезается. Cre рекомбиназу можно доставить в ядро с помощью бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, при этом проис-

ходит впрыскивание в клетку белков с N-концевой сигнальной последовательностью, и далее белок доставляется в ядро [64].

Векторные системы на основе эписомных плазмид не требуют интеграции трансгенов в геном и поэтому считаются потенциально более безопасными, если рассматривать получаемые таким образом ИПС клетки в качестве источника для клеточной терапии некоторых заболеваний человека. Использование комбинации плазмид, несущих *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*, *Lin-28* и малой интерферирующей РНК в сочетании с EBNA1 (ядерный антиген 1 Эпштейн-Барра, необходимый для амплификации эписомных векторов), позволяет повысить эффективность репрограммирования в несколько раз [65]. Весьма популярным способом репрограммирования в последнее время является использование вируса Сендай из семейства *Paramyxoviridae*, содержащего одноцепочечную РНК [66–68]. Вирус Сендай не интегрирует в геном клетки, более того, его можно удалить, проинкубировав ИПС клетки при температуре 39°C. Полностью репрограммированные клетки обычно получают через 25 дней после инфекции. Как и при использовании других методов, эффективность репрограммирования сильно варьирует для разных типов клеток. Так, например, для фибробластов эффективность составляет около 1%, что является довольно хорошим показателем, а для клеток крови – в 10 раз ниже, всего 0,1% [68]. Одним из методов невирусной доставки генов, подходящих для разных типов соматических клеток, является использование ДНК-транспозонов. ДНК-транспозоны относятся к мобильным генетическим элементам, способным к передвижению в геноме, и обладают свойством «вырезать и вставлять» благодаря специальному ферменту транспозазе [69]. Транспозоны состоят из инсерционных сегментов ДНК, которые способны перемещаться как единое целое, при этом происходит одновременное перемещение лежащих между ними генов. К настоящему моменту описано несколько транспозонных систем, используемых для транспортировки генов в клетки млекопитающих: *Sleeping Beauty* (SB), *SB100X*, *PiggyBag* (PB) и *Tol2* [70–72]. Использование вектора на основе *PiggyBag* с кассетой из ДНК, кодирующей 4 ТФ (*Oct4*, *c-Myc*, *Klf4*, *Sox2*), плюс *Rarg* (гамма-рецептор ретиноевой кислоты) и *LRH-1* (печеночный рецептор гомолога 1) позволило получить ИПС клетки человека и мыши. Последние два гена рецепторов были введены не случайно. *LRH-1* – важный элемент в регуляции транскрипции генов, а также один из значимых факторов для поддержания плюрипотентности. *Rarg* и *LRH-1* совместно активировали экспрессию *Oct4*. Все это способствовало повышению эффективности репрограммирования.

Следующий способ преодоления ограничений, связанных с внедрением в репрограммируемые клетки вирусных последовательностей, а также с избыточной активностью генов плюрипотентности, является использование микро-РНК [73, 74]. Известно, что некоторые микро-РНК высоко экспрессируются в ЭС клетках и играют важную роль в контроле активности генов, связанных с поддержанием плюрипотентности. Так микро РНК из семейства miR-302 связывается с p52 и способствует прохождению фазы G1/S, а miR-195 связывается с WEE1 киназой (негативный регулятор комплекса циклин В/CDK) и облегчает прохождение G2/M фазы клеточного цикла [75, 76]. Использование микро-РНК, в частности, miR-93, которая подавляет экспрессию рецептора TGF- $\beta$  II, способствует значительному повышению эффективности репрограммирования [77]. Совместное использование ТФ и семейства микро-РНК miR302 существенно увеличивает эффективность репрограммирования фибробластов человека [74]. Миоши с коллегами осуществили репрограммирование человеческих и мышинных клеток с помощью зрелой двухцепочечной микро-РНК и назвали такие клетки микро-РНК индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (миРИПС) [78]. Использование «коктейля» из микро-РНК (miR302-367) без введения дополнительных ТФ также позволяло получать ИПС клетки [79].

Еще одним методом получения ИПС клеток, не изменяющим геном клетки, является использование РНК соответствующих ТФ. Варрен с коллегами провели репрограммирование человеческих неонатальных фибробластов с эффективностью 1,4% и смогли повысить эффективность своего метода до 4,4%, добавив к стандартному коктейлю из 4 ТФ еще один фактор Lin28 в присутствии ингибитора метилтрансферазы (вальпроевая кислота). При этом репрограммирование фибробластов осуществлялось при пониженном содержании O<sub>2</sub> (5%), то есть в условиях гипоксии [80]. Однако данный метод пока не получил широкого распространения из-за своей сложности (использование модифицированной РНК) и дороговизны.

В нескольких лабораториях осуществили успешное репрограммирование человеческих [81] и мышинных фибробластов [82] с помощью рекомбинантных белков соответствующих ТФ, несущих Tat пептид вируса иммунодефицита человека и полиаргинин, необходимых для доставки этих белков внутрь клетки [82]. При этом эффективность такого репрограммирования была крайне низкой (0,006% для мышинных и 0,001% для человеческих фибробластов). Технические сложности, низкая эффективность ставят под сомнение развитие данного метода в ближайшие годы.

Были предприняты попытки поиска и использования для повышения эффективности процесса репрограммирования, а также сокращения его времени, так называемых «малых молекул», многие из которых оказывали влияние на эпигенетический статус клетки и способствовали деконденсации хроматина [83].

Так, к примеру, было показано, что совместное использование *Vix G9a* (ингибитор гистоновой метилтрансферазы) и *Bayak8644* (активатор кальциевых каналов) делает возможным отказаться от двух ТФ и использовать для получения ИПС клеток только вектора, несущие гены *Oct4* и *Klf4* [84]. Оказалось, что достаточно использовать только вальпроевую кислоту (ингибитор гистоновых деацетилаз) в комбинации с *Oct4* и *Sox2*, чтобы получить ИПС клетки из фибробластов человека [85]. Также вальпроевая кислота усиливала эффективность процесса репрограммирования при получении ИПС клеток с помощью рекомбинантных белков соответствующих ТФ, о чем уже упоминалось выше [82]. Молекулы SB432542 и PD0325901, являющиеся ингибиторами сигнальных путей TGFβ и MEK, соответственно, позволяют повысить эффективность репрограммирования почти в 100 раз при использовании четырех основных ТФ (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) [86].

В 2013 году впервые было осуществлено успешное репрограммирование фибробластов мыши с использованием исключительно «малых молекул». Эффективность метода составила около 0,2%, что является сопоставимой с эффективностью при использовании вирусных векторов. Такие клетки авторы назвали химическими индуцированными плюрипотентными стволовыми (ХИПС) клетками [87].

Однако достаточно долгое время было неясно, почему эффективность репрограммирования является такой низкой (от 0,002 до 2–4%), даже при использовании в экспериментах избыточных количеств репрограммирующих факторов (вирусные векторы, плазмиды, РНК, «малые молекулы» и т.д.). Только совсем недавно ученым из Израиля удалось приблизиться к 100% эффективности репрограммирования человеческих фибробластов [88]. Выяснилось, что необходимым условием эффективного репрограммирования является подавление активности белкового комплекса ремоделирования нуклеосом и деацетилирования – NuRD (nucleosome remodeling and deacetylation), экспрессия которого наблюдается во всех типах соматических клеток [89]. Одной из субъединиц этого комплекса является белок Mbd3. Вероятно, Mbd3/NuRD является неким эпигенетическим регулятором, который ограничивает экспрессию ключевых генов плюрипотентности. Так было показано, что повышение экспрессии Mbd3

препятствует образованию ИПС клеток. Происходит это за счет деацетилирования данным комплексом лизина 27 в молекуле гистона H3, в результате чего другой комплекс PRC2 (поликомб репрессорный комплекс 2) осуществляет триметилирование этого остатка лизина в гистоне H3, что в свою очередь ведет к ингибированию экспрессии ряда генов плюрипотентности, в том числе генов *Oct4* и *Nanog* [90]. С другой стороны, подавление Mbd3 повышает эффективность репрограммирования и способствует образованию плюрипотентных стволовых клеток, которые способны генерировать жизнеспособных химерных мышей, даже в случае отсутствия *c-myc* или *Sox2* [91].

Ханна с коллегами показали, что использование 4 классических ТФ (*Oct3*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) совместно с подавлением экспрессии Mbd3 позволяет осуществить детерминированное и синхронизированное репрограммирование клеток кожи мыши и человека в ИПС клетки в течение всего семи дней с эффективностью около 100% [89]. Таким образом, можно заключить, что к настоящему времени проблема эффективного репрограммирования клеток млекопитающих решена. Хотя, справедливости ради, следует отметить, что даже при низкой эффективности репрограммирования от 0.01 до 0.1% (первые работы по получению ИПС клеток) при использовании, к примеру, для вирусной трансфекции 1000000 клеток фибробластов в итоге можно получить от 100 до 1000 независимых клонов ИПС клеток, что является вполне достаточным для проведения дальнейших экспериментов.

#### ИСТОЧНИКИ ПОЛУЧЕНИЯ ИПС КЛЕТОК

Несмотря на то, что наиболее популярным источником ИПС клеток являются фибробласты кожи, нельзя не отметить, что и другие соматические клетки могут быть успешно репрограммированы. Так ИПС клетки были получены из нейтральных стволовых клеток [92], клеток эндотелия [93], кератиноцитов [60], терминально дифференцированных лимфоцитов [94], гепатоцитов и эпителиальных клеток желудка [95], волосяных фолликул [96], слизистой оболочки глаза [97], моноклеарных клеток периферической крови [98].

Приведенное разнообразие источников для получения ИПС клеток свидетельствует о том, что ИПС клетки могут быть получены из любого типа соматических клеток организма, но предпочтение, особенно в случае человека, будет отдаваться простоте получения соответствующих биоптатов. И здесь фибробласты и кератиноциты кожных покровов и клетки волосяных фолликул вне конкуренции.



Один из важных вопросов, связанных с репрограммированием: восстановление плюрипотентности клетки – случайный процесс или он связан с цепью последовательных событий? Для ответа на этот вопрос были проведены соответствующие исследования по изучению восстановления плюрипотентного статуса клеток. Были проанализированы изменения, происходящие в фибробластах при репрограммировании на разных этапах, и показано, что через 3 дня после вирусной инфекции происходит замолкание фибробласто-специфичных генов с одновременной активацией экспрессии генов, характерных для ЭС клеток (щелочная фосфатаза, SSEA1, Fbx5). Спустя 10–15 дней после трансфекции начинает детектироваться эндогенная экспрессия *Oct4*, *Sox2* и *Nanog*. Одновременно с ростом экспрессии этих генов происходит реактивация теломеразы и инактивация X хромосомы [99]. На этой стадии процесс репрограммирования становится все менее зависим от вирусной экспрессии трансгенов, однако такие клетки все еще не полностью репрограммированы и снижение уровня экспрессии трансгенов неминуемо приведет обратно к дифференцированному состоянию – фибробластам [99]. Когда уровень экспрессии эндогенных *Oct4*, *Sox2* и *Nanog* увеличится, устанавливается стабильное функционирование ауторегуляторной петли эндогенных генов, связанных с плюрипотентностью, происходит реактивация ЭС-специфичной транскрипционной сети и полное замолкание трансгенов.

В своем обзоре Шепер и Копрей [100], опираясь на эти и другие работы, предложили свою модель репрограммирования и назвали ее «двухфазным переключением» (two stage switch). На первой стадии происходит подавление экспрессии линии-специфических генов и удаление репрессивных эпигенетических меток из ключевых генов плюрипотентности и ремоделирование участков хроматина, где находятся гены плюрипотентности. На второй стадии репрограммирования происходит реактивация эндогенной петли ауторегуляции и запуск основной транскрипционной сети, лежащей в основе плюрипотентности. Экзогенные *Oct4* и *Sox2* теперь способны активировать эндогенные участки *Oct4*, *Sox2* и *Nanog*. Полное эпигенетическое ремоделирование других генов плюрипотентности приводит к их активации и полноценному восстановлению транскрипционной сети, характеризуя тем самым плюрипотентный статус клеток. Наконец, происходит полное замолкание трансгенов и теперь плюрипотентность полностью зависит от работы ауторегуляторной петли эндогенов. Своими экспериментами ученые показали, что гиперэкспрессия небольшого количества ключевых факторов

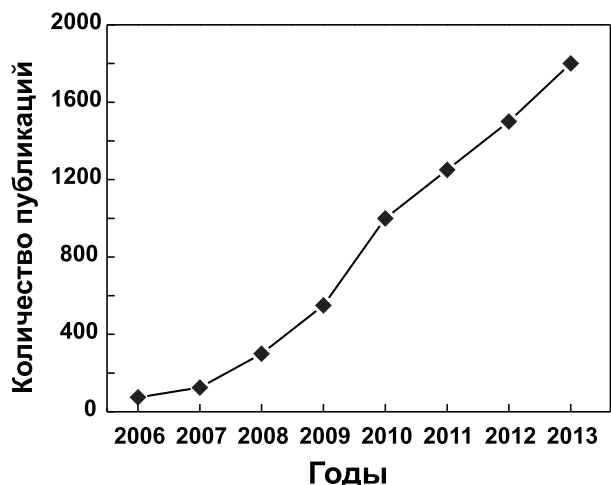


Рис. 4. Рост числа публикаций в мире по тематике, связанной с ИПС клетками по данным National Center for Biotechnology Information USA.

способна привести клетки в новое стабильное состояние, связанное с изменениями активности сотен генов в процессе репрограммирования, при этом происходит удлинение теломер и впоследствии их нормальное укорачивание по мере дифференцировки ИПС клеток обратно в фибробласты [101].

Открытие Яманаки и его сотрудников – важнейшее фундаментальное открытие в биологии в начале XXI века, которое было отмечено Нобелевской премией в 2012 году. Наглядно демонстрирует важность и перспективность этого открытия ежегодный прирост публикаций по теме ИПС клеток, представленный на рис. 4.

#### СХОДСТВА И РАЗЛИЧИЯ ЭС И ИПС КЛЕТОК

Как уже отмечалось выше, полностью репрограммированные клетки имеют те же маркеры плюрипотентности, что и ЭС клетки.

Кроме белковых маркеров существуют функциональные тесты на плюрипотентность. Самым простым из них является спонтанная дифференцировка ЭС клеток *in vitro*. После культивирования ЭС клеток человека в отсутствие фидера из мышинных эмбриональных фибробластов происходит образование эмбрионидных тел, а при дальнейшем культивировании в дифференцирующихся клетках обнаруживается экспрессия маркеров энтодермы, мезодермы и эктодермы [102]. Аналогичная картина наблюдается и при культивировании и дифференцировке ИПС клеток *in vitro*. На рис. 5 представлены фото-

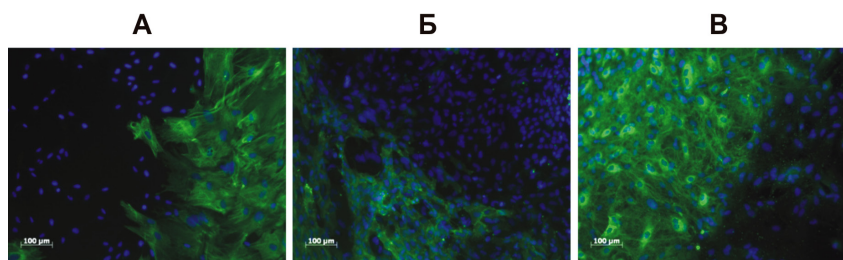


Рис. 5. Спонтанная дифференцировка ИПС клеток *in vitro* с образованием представителей трех зародышевых листков: эктодермы (А), мезодермы (Б), энтодермы (В).

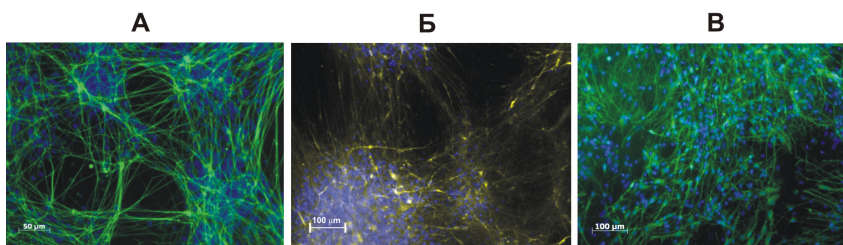


Рис.6. Нейрональная дифференцировка ИПС клеток *in vitro*. Иммунофлуоресцентная детекция.

А. DAPI – голубой, бета-III тубулин – зеленый.

Б. DAPI – голубой, дофаминергические нейроны – желтый.

В. DAPI – голубой, ГАМК-ергические нейроны – зеленый.

графии ИПС клеток после иммуноцитофлуоресцентной детекции маркеров эктодермы (А), мезодермы (Б) и энтодермы (В) при их спонтанной дифференцировке.

Единственным возможным для человеческих ЭС и ИПС клеток тестом на плюрипотентность *in vivo* является образование тератом при введении их иммунодефицитным (SCID) мышам. В тератомах обнаруживаются такие ткани, как кишечный эпителий (энтодерма), хрящ, кость и гладкие мышцы (мезодерма); нейральный эпителий (эктодерма) [2, 103]. ИПС и ЭС клетки, полученные из дифференцированных клеток мыши, могут включаться не только в соматические ткани химерного животного, но и образовывать клетки половой линии [82, 104].

ИПС клетки полностью повторяют способность ЭС клеток к дифференцировке в определенные специализированные типы клеток *in vitro*. Так на рис. 6 показаны нейроны, которые были получены из ИПС клеток человека при их дифференцировке в определенных условиях культивирования.

Таблица  
Сравнение свойств ИПС и ЭС клеток человека

Характеристики	ЭС клетки	ИПС клетки
Плюрипотентность	+	+
Хромосомный набор	нормальный	нормальный
Источник	эмбрион (бластоциста)	взрослый орга- низм
Возможность получения «больных» клеток	–	+
Возможность исправления генетических дефектов	+	+
Пациентоспецифичность	–	+

Как уже отмечалось выше, ЭС и ИПС клетки практически идентичны по морфологическим и функциональным характеристикам, однако отношение общества к этим типам плюрипотентных клеток и их потенциальные области применения значительно различаются. ЭС клетки имеют ряд «недостатков», ограничивающих их применение в медицине и лабораторной практике. Некоторые характерные свойства ЭС и ИПС клеток приведены в табл.

Действительно и ЭС, и ИПС клетки обладают плюрипотентностью – способностью дифференцироваться во все известные клетки взрослого организма. И те, и другие клетки способны неограниченно долго расти в определенных условиях в культуре, сохраняя при этом, что очень важно, нормальный хромосомный набор. Принципиальные различия между этими клетками заключаются в их источнике: ЭС клетки получают из бластоцисты, а ИПС клетки – из клеток взрослого организма. И конечно важным преимуществом ИПС клеток является возможность получения так называемых «больных» клеток, то есть клеток от пациентов с различными заболеваниями, включая и врожденные. Кроме того, ИПС клетки обеспечивают индивидуализацию или пациентоспецифичность, что очень важно в перспективе при разработке подходов к индивидуальной клеточной терапии.

Говоря о клеточной терапии, следует отметить один из основных недостатков ЭС клеток – возможное развитие иммунного ответа на трансплантат. Поскольку существует ограниченное количество линий

ЭС клеток, не для всех реципиентов можно подобрать подходящий по антигенам лейкоцитов человека (HLAs) трансплантат. Выходом из этого положения могут служить генетически измененные ЭС клетки человека с антигенами лейкоцитов HLA реципиента, но такой подход сложный и трудоемкий, никто не знает, сколько клонов необходимо будет получить. Другой альтернативой является получение новой пациент-специфичной линии ЭС клеток путем переноса ядра соматической клетки в энуклеированный ооцит. Эта методика позволит избежать развития иммунного ответа у реципиента, но она сопряжена с получением человеческого эмбриона и последующим его разрушением для выделения ЭС клеток, то есть данная методика объединяет в себе клонирование человека и разрушение человеческого эмбриона, два наиболее этически и политически спорных вопроса [105]. Правовой статус эмбриона, а значит и возможность или невозможность разрушить его для получения ЭС клеток обсуждается в течение длительного времени политиками, биоэтиками, правозащитниками и журналистами. В ряде стран манипуляции с эмбрионами человека запрещены законом.

И, наконец, ИПС клетки дают возможность (так же как и ЭС клетки) исправлять с помощью гомологичной рекомбинации генетические дефекты, которые встречаются при некоторых тяжелых врожденных заболеваниях человека.

### **III. НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В БИОХИМИЧЕСКИХ И БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

Перейдем теперь к рассмотрению вопросов, связанных с использованием ИПС клеток в биологических и медицинских исследованиях. На рис. 7 схематично представлены этапы получения ИПС клеток, а также некоторые возможные пути их применения [106].

В первую очередь ИПС клетки представляют уникальный объект для создания на их основе банка клеток, которые затем, по мере необходимости, могут быть использованы как для фундаментальных исследований, так и в перспективе для индивидуализированной клеточной терапии конкретного пациента. Кроме того, при разработке стандартизованных методик эти клетки найдут свое применение и в тест-системах для отбора потенциальных лекарственных соединений. В настоящее время работы по созданию криохранилищ для таких клеток ведутся в Японии, США, России и некоторых европейских странах [107].

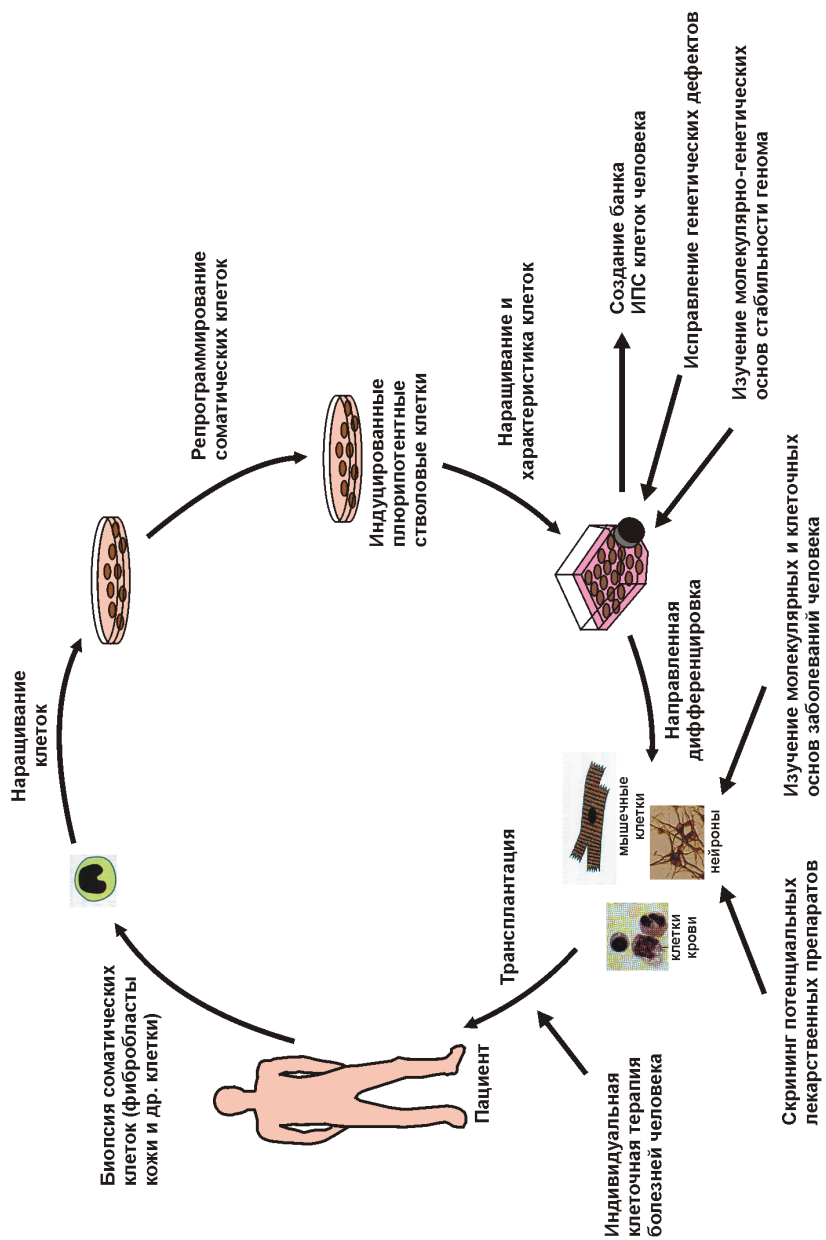


Рис. 7. Получение и различные возможности применения ИПС клеток (представлено с изменениями из статьи [106]).



## ТЕСТИРОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Одной из актуальных проблем современной фармакологии и медицины является создание эффективных и безопасных лекарственных препаратов, направленных на лечение тех или иных заболеваний. Для их создания необходимы адекватные, высокопроизводительные и воспроизводимые, а также относительно дешевые технологии скрининга потенциальных лекарственных соединений. Тот факт, что технология репрограммирования позволяет получать ИПС клетки из индивидуальных дифференцированных соматических клеток больных и здоровых пациентов, создает ей существенные преимущества перед технологией ЭС клеток. Развитие такой технологии позволит существенным образом сократить эксперименты по тестированию перспективных для фармакологии соединений на клетках животных. Возможность дифференцировки ИПС клеток в кардиоциты, гепатоциты, фибробласты и нейроны позволит проводить прицельный доклинический токсикологический скрининг соединений *in vitro* [108–110].

## КЛЕТОЧНЫЕ МОДЕЛИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

За последние несколько лет появилось значительное количество сообщений о получении ИПС клеток от пациентов с различными заболеваниями, и, в частности, с врожденными. После направленной дифференцировки эти клетки демонстрируют специфические изменения, характерные для конкретного заболевания [111–115].

Особый интерес вызывает моделирование различных нейродегенеративных заболеваний центральной нервной системы. Это связано с рядом причин. Во-первых, получение биопсийного материала из мозга человека в обычной практике невозможно и осуществляется только при некоторых хирургических операциях, чаще всего связанных с удалением опухолей. Во-вторых, взрослые нейроны практически невозможно культивировать *in vitro*. Кроме того, в мозге человека существует колоссальное разнообразие нервных клеток, отличающихся по своей морфологии, эргичности и по выполняемой ими функциями. В случае использования ИПС клеток, указанные выше трудности можно преодолеть. Так как ИПС клетки способны практически неограниченное время расти в культуре *in vitro*, то можно иметь и необходимое количество клеточного материала для проведения любых биологических экспериментов. К настоящему времени разработаны достаточно эффективные методы дифференцировки этих клеток как в нейроны определенной эргичности, так и в глиальные клетки [116–118].

В качестве примера обратимся к некоторым результатам, полученным при исследовании патогенеза болезни Паркинсона (БП) с помощью ИПС клеток. БП – хроническое прогрессирующее дегенеративное заболевание центральной нервной системы, в основе которого лежит потеря дофаминергических нейронов и снижение уровня нейромедиатора дофамина в стриатуме [119]. Причем данная болезнь может быть как врожденной, так и спорадической. Для врожденной формы определен ряд генов, которые участвуют в развитии этого заболевания (*Park8*, *Park2*, *Pink1*, *Snca*). Санчес-Данез с сотрудниками [120] провели большое исследование по изучению патогенеза БП на модели ИПС клеток, полученных от 7 пациентов со спорадической формой, 4 пациентов с мутацией G2019S в гене *Lrrk2* и 4 пациентов, не имеющих в анамнезе нейродегенеративных заболеваний. Эффективность образования клонов ИПС клеток варьировала между донорами, но не была связана с наличием БП, а также с возрастом доноров. В результате дифференцировки были получены взрослые дофаминергические нейроны с преимущественным А9 субтипом. Именно эта группа нейронов формирует компактную часть черной субстанции, которая, в свою очередь, подвергается значительной дегенерации при БП. Еще одним белком, нарушения в функционировании которого связывают с развитием БП, является альфа-синуклеин (SNCA). Точная функция белка до сих пор не известна. Имеются данные о том, что возможно, он является молекулярным шапероном и регулирует белок-белковые и белок-липидные взаимодействия, а также может играть важную роль в обмене синаптических везикул, в хранении и компартментализации нейротрансмиттеров, в первую очередь, дофамина [116].

Хорошо известно, что протофибриллы SNCA являются основным компонентом телец Леви при БП. Это указывает на важную роль процессов агрегации альфа-синуклеина в патогенезе заболевания. Были проведены исследования по выявлению SNCA в дифференцированных дофаминергических нейронах, полученных из ИПС клеток пациентов с различными формами БП, а также здоровых доноров и было показано, что эти нейроны от пациентов с мутацией G2019S в гене *Lrrk2* демонстрируют аномальное накопление SNCA по сравнению с дофаминергическими нейронами от здоровых доноров и больных со спорадической формой БП [120].

Еще одна группа ученых показала высокий уровень альфа-синуклеина на модели дофаминергических нейронов, полученных от больных с мутацией в гене *Lrrk2* [121]. Таким образом, эти результаты не только способствуют подтверждению гипотезы о взаимном

влиянии мутации *Lrrk2* и *Snca*, но и дают возможность использовать полученные ИПС клетки в качестве модели моногенной формы БП. Известно, что БП развивается в течение нескольких, а иногда и десятков лет. Принципиальным оказалось длительное (65–75 дней) культивирование полученных из ИПС клеток дофаминергических нейронов от всех групп пациентов (больные со спорадической формой БП, с мутацией в гене *Lrrk2* и здоровые доноры) [120]. Причем такое длительное культивирование осуществляли на монослое из постнатальных мышечных астроцитов. Было показано, что дофаминергические нейроны от здоровых доноров были морфологически гомогенны с фенотипом зрелых нейронов с хорошо разветвленными отростками. В то же время дофаминергические нейроны пациентов с БП имели различные и существенные изменения в морфологии (уменьшение длины и количества отростков, полное отсутствие отростков, фрагментированные ядра и вакуолизация). Важно отметить, что такие отличия не были видны при стандартном, 30-дневном, культивировании клеток. Через 75 дней культивирования дофаминергические нейроны, полученные от больных с мутантным геном *Lrrk2* и со спорадической формой БП несли большой процент апоптотических клеток по сравнению с нормальными клетками.

Другой группой ученых были получены ИПС клетки от пациентов с наследственной формой БП с мутацией в гене *Pink1*. Было показано, что данная мутация не влияет на репрограммирование и дифференцировку ИПС клеток в дофаминергические нейроны. Однако уже в зрелых нейронах, несущих мутацию, в условиях стресса нарушается мобилизация паркина к поврежденным митохондриям, тогда как в нейронах, полученных из генетически нормальных ИПС клеток, подобные нарушения не встречаются [122].

Нгуен с соавторами [121] показали, что клетки, несущие мутантный ген *Lrrk2*, экспрессируют повышенный уровень генов оксидативного стресса в ответ на различные повреждающие агенты, такие как перекись водорода, 6-гидроксидофамин и ингибитор протеасом MG-132. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что клетки, несущие мутантные гены, и клетки от здоровых доноров могут по-разному реагировать на тестируемые фармакологические препараты и, в частности, на концентрацию вносимого вещества. Перспективным подходом в изучении молекулярных механизмов возникновения и развития паркинсонизма является построение карты метаболических путей, в которых принимают участие продукты мутантных генов [123].

#### РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

В настоящее время рядом исследователей проводятся эксперименты по пересадке дофаминергических нейронов, полученных из ИПС клеток на животных моделях. Так, вполне успешно осуществили пересадку дифференцированных клеток крысам с моделью БП, индуцированной 6-гидроксидофамином. После имплантации донорскими клетками были отмечены существенные улучшения моторных функций [124–126].

Однако использование ИПС клеток для клеточной терапии пока ограничивается рядом проблем. До настоящего времени отсутствуют работы, связанные с изучением корреляций между клеточными характеристиками культивируемых нейронов и клиническими параметрами заболевания у пациентов-доноров. В связи с этим, не до конца ясным остается потенциал этих культур в качестве адекватных клеточных моделей нейродегенеративных заболеваний. Неисследована роль производных ИПС клеток в разработке информативных прижизненных диагностических и прогностических биомаркеров БП и других нейродегенеративных заболеваний [127]. В единичных публикациях показано, что культуры нейронов, получаемые из ИПС клеток, могут быть использованы в качестве адекватных клеточных биоматриц для изучения молекулярно-биологических и патохимических закономерностей развития нейродегенеративного процесса: его стадийности, возможностей предотвращения и/или терапии [126, 128, 129]. Тем не менее, работы в направлении использования ИПС клеток в трансплантологии развиваются достаточно быстро. Так, в ближайшем будущем планируется начать клинические испытания с использованием производных ИПС клеток для коррекции ряда заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, тромбоцитопения, сердечно-сосудистые заболевания, рассеянный склероз, поражения сетчатки и травмы спинного мозга [130–134].

#### IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка технологии репрограммирования соматических клеток и получения ИПС клеток млекопитающих, включая человека, открыла новые перспективы в трансплантологии и изучении молекулярных и клеточных основ тяжелых болезней человека *in vitro* [1, 2]. Развитие этой технологии также открыло новые возможности для создания моделей ряда тяжелых патологий человека, в том числе нейродегенеративных, а также тест-систем, позволяющих проводить масштаб-

ный скрининг и выяснять свойства лекарственных средств, направленных на лечение конкретных заболеваний *in vitro*, учитывая при этом индивидуальные особенности пациента. Тот факт, что технология репрограммирования позволяет получать ИПС клетки из индивидуальных дифференцированных соматических клеток больных и здоровых пациентов создает ей существенные преимущества перед технологией ЭС клеток, что, в свою очередь, открывает большие перспективы в развитии персонализированной медицины. Развитие такой технологии в дальнейшем позволит существенным образом сократить эксперименты по тестированию перспективных для фармакологии соединений на клетках животных, а осуществлять их сразу на клетках человека. Возможность дифференцировки ИПС клеток в кардиомициты, гепатоциты, фибробласты и нейроны и т.д. позволит проводить прицельный доклинический токсикологический скрининг соединений *in vitro*.

ИПС клетки, созданные с помощью различных методик, особенно тех, которые не затрагивают структуру генов в соматических клетках (безвирусные методы репрограммирования), могут стать ключом для массового их применения в клеточной терапии при лечении различных тяжелых заболеваний человека, при которых необходимо восстановить поврежденные в результате патологического процесса или травмы клетки и органы пациента.

Нельзя не упомянуть о возможности коррекции врожденных генетических мутаций в генах, ответственных за возникновение того или иного наследственного заболевания. В последние годы появились работы, посвященные этой важной проблеме, и с уверенностью можно предположить, что их количество будет возрастать [135–139].

Однако широкое использование ИПС клеток для клеточной терапии пока ограничивается рядом проблем, основной из которых является проблема их возможного злокачественного перерождения в организме. Кроме того, если говорить о болезнях мозга, то, учитывая исключительную сложность строения нервной системы человека, возникает ряд дополнительных проблем при использовании ИПС клеток для трансплантации. Во-первых, это получение в достаточных количествах нейронов определенной ергичности и обеспечение их жизнеспособности после пересадки. Во-вторых, правильное встраивание трансплантированных клеток в определенных участках мозга, включая их дифференцировку, и установление правильных контактов между нейронами. И, наконец, в-третьих, это функциональная активность трансплантированных ИПС клеток.

Тем не менее, технология ИПС клеток является в настоящее время одной из самых перспективных в плане изучения молекулярных механизмов клеточных патологий в условиях персонифицированного подхода, создания эффективных тест-систем для поиска и скрининга фармакологических препаратов, а также разработки подходов к клеточной терапии различных заболеваний человека [140].

*Благодарности.* Авторы выражают признательность сотрудникам Лаборатории молекулярной генетики соматических клеток Института молекулярной генетики РАН: О. С. Лебедевой за предоставленные фотоматериалы и С. А. Антонову за помощь в подготовке текста данного обзора.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, **126**, 663–676.
2. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, **131**, 861–872.
3. Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochizuki, Y., Takizawa, N., Yamanaka, S. (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts, *Nature Biotechnology*, **26**, 101–106.
4. Thomson, J.A., Itskovitz–Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, **282**, 1145–1147.
5. Prowse, A.B., McQuade, L.R., Bryant, K.J., Marcal, H., Gray, P.P. (2007) Identification of potential pluripotency determinants for human embryonic stem cells following proteomic analysis of human and mouse fibroblast conditioned media, *Journal of Proteome Research*, **6**, 3796–3807.
6. Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., Gough, N.M. (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells, *Nature*, **336**, 684–687.
7. Nakagawa, M., Taniguchi, Y., Senda, S., Takizawa, N., Ichisaka, T., Asano, K., Morizane, A., Doi, D., Takahashi, J., Nishizawa, M., Yoshida, Y., Toyoda, T., Osafune, K., Sekiguchi, K., Yamanaka, S. (2014) A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells, *Scientific Reports*, **4**, 1–7.
8. Chen, K.G., Mallon, B.S., McKay, R.D., Robey, P.G. (2014) Human Pluripotent Stem Cell Culture: Considerations for Maintenance, Expansion, and Therapeutics, *Cell Stem Cell*, **14**, 13–26.
9. Dolley-Sonneville, P.J., Romeo, L.E., Melkounian, Z.K. (2013) Synthetic Surface for Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells in Xeno-Free, Chemically Defined Culture Conditions, *PLoS ONE*, **8**, e70263.
10. Parker, G.C., Acsadi, G., Brenner, C.A. (2009) Mitochondria: determinants of stem cell fate?, *Stem Cells and Development*, **18**, 803–806.



11. Facucho-Oliveira, J.M., St John, J.C. (2009) The relationship between pluripotency and mitochondrial DNA proliferation during early embryo development and embryonic stem cell differentiation, *Stem Cell Reviews and Reports*, **5**, 140–158.
12. Mattout, A., Meshorer, E. (2010) Chromatin plasticity and genome organization in pluripotent embryonic stem cells, *Current Opinion in Cell Biology*, **22**, 334–341.
13. Park, S.H., Kook, M.C., Kim, E.Y., Park, S., Lim, J. (2004) Ultrastructure of human embryonic stem cells and spontaneous and retinoic acid-induced differentiating cells, *Ultrastructural Pathology*, **28**, 229–238.
14. Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S.L., Lander, E.S. (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells, *Cell*, **125**, 315–326.
15. Zhao, X.D., Han, X., Chew, J.L., Liu, J., Chiu, K.P., Choo, A., Orlov, Y.L., Sung, W.K., Shahab, A., Kuznetsov, V.A., Bourque, G., Oh, S., Ruan, Y., Ng, H.H., Wei, C.L. (2007) Whole-genome mapping of histone H3 Lys4 and 27 trimethylations reveals distinct genomic compartments in human embryonic stem cells, *Cell Stem Cell*, **1**, 286–298.
16. Meshorer, E., Yellajoshula, D., George, E., Scambler, P.J., Brown, D.T., Misteli, T. (2006) Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells, *Developmental Cell*, **10**, 105–116.
17. Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., Smith, A. (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells, *Cell*, **113**, 643–655.
18. Schöler, H.R., Hatzopoulos, A.K., Balling, R., Suzuki, N., Gruss, P. (1989) A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor, *The EMBO Journal*, **8**, 2543–2550.
19. Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C., Dailey, L. (1995) Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3, *Genes & Development*, **9**, 2635–2645.
20. Scheper, W., Copray, S. (2009) The molecular mechanism of induced pluripotency: a two-stage switch, *Stem Cell Reviews and Reports*, **5**, 204–223.
21. Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J.R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A.H., Thomson, J.A., Ren, B., Ecker, J.R. (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences, *Nature*, **462**, 315–322.
22. Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., Tada, T. (2001) Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells, *Current Biology*, **11**, 1553–1558.
23. Boiani, M., Schöler, H.R. (2005) Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **6**, 872–884.
24. Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., Smith, A. (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4, *Cell*, **95**, 379–391.
25. Gidekel, S., Pizov, G., Bergman, Y., Pikarsky, E. (2003) Oct-3/4 is a dose dependent oncogenic fate determinant, *Cancer Cell*, **4**, 361–370.

26. Niwa, H., Miyazaki, J., Smith, A.G. (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells, *Nature Genetics*, **24**, 372–376.
27. Zaehres, H., Lensch, M.W., Daheron, L., Stewart, S.A., Itskovitz-Eldor, J., Daley, G.Q. (2005) High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells, *Stem Cells*, **23**, 299–305.
28. Nakatake, Y., Fukui, N., Iwamatsu, Y., Masui, S., Takahashi, K., Yagi, R., Yagi, K., Miyazaki, J., Matoba, R., Ko, M.S., Niwa, H. (2006) Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells, *Molecular and Cellular Biology*, **26**, 7772–7782.
29. Trosko, J. E. (2006) From adult stem cells to cancer stem cells: Oct-4 Gene, cell-cell communication, and hormones during tumor promotion, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1089**, 36–58.
30. Cheng, L., Sung, M.T., Cossu-Rocca, P., Jones, T.D., MacLennan, G.T., De Jong, J., Lopez-Beltran, A., Montironi, R., Looijenga, L.H. (2007) OCT4: biological functions and clinical applications as a marker of germ cell neoplasia, *The Journal of Pathology*, **211**, 1–9.
31. Miyagi, S., Saito, T., Mizutani, K., Masuyama, N., Gotoh, Y., Iwama, A., Nakauchi, H., Masui, S., Niwa, H., Nishimoto, M., Muramatsu, M., Okuda, A. (2004) The Sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct types of multipotent stem cells, *Molecular and Cellular Biology*, **24**, 4207–4220.
32. Tokuzawa, Y., Kaiho, E., Maruyama, M., Takahashi, K., Mitsui, K., Maeda, M., Niwa, H., Yamanaka, S. (2003) Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development, *Molecular and Cellular Biology*, **23**, 2699–2708.
33. Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A. A., Ko, M. S., Niwa, H. (2007) Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells, *Nature Cell Biology*, **9**, 625–635.
34. Chew, J.L., Loh, Y.H., Zhang, W., Chen, X., Tam, W.L., Yeap, L.S., Li, P., Ang, Y.S., Lim, B., Robson, P., Ng, H.H. (2005) Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells, *Molecular and Cellular Biology*, **25**, 6031–6046.
35. Kelberman, D., Rizzoti, K., Avilion, A., Bitner-Glindzicz, M., Cianfarani, S., Collins, J., Chong, W.K., Kirk, J.M., Achermann, J.C., Ross, R., Carmignac, D., Lovell-Badge, R., Robinson, I.C., Dattani, M.T. (2006) Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitarygonadal axis in mice and humans, *The Journal of Clinical Investigation*, **116**, 2442–2455.
36. Dong, C., Wilhelm, D., Koopman, P. (2004) Sox genes and cancer, *Cytogenetic and Genome Research*, **105**, 442–447.
37. Dang, D.T., Pevsner, J., Yang, V.W. (2000) The biology of the mammalian Kruppel-like family of transcription factors, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **32**, 1103–1121.
38. Wei, D., Kanai, M., Huang, S., Xie, K. (2006) Emerging role of KLF4 in human gastrointestinal cancer, *Carcinogenesis*, **27**, 23–31.
39. Segre, J.A., Bauer, C., Fuchs, E. (1999) Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin, *Nature Genetics*, **22**, 356–360.
40. Conkright, M.D., Wani, M.A., Anderson, K.P., Lingrel, J.B. (1999) A gene encoding an intestinal-enriched member of the Kruppel-like factor

- family expressed in intestinal epithelial cells, *Nucleic Acids Research*, **27**, 1263–1270.
41. Shields, J.M., Christy, R.J., Yang, V.W. (1996) Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest, *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 20009–20017.
  42. Chen, X., Johns, D.C., Geiman, D.E., Marban, E., Dang, D.T., Hamlin, G., Sun, R., Yang, V.W. (2001) Kruppel-like factor 4 (gut-enriched Kruppel-like factor) inhibits cell proliferation by blocking G1/S progression of the cell cycle, *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 30423–30428.
  43. Ohnishi, S., Ohnami, S., Laub, F., Aoki, K., Suzuki, K., Kanai, Y., Haga, K., Asaka, M., Ramirez, F., Yoshida, T. (2003) Downregulation and growth inhibitory effect of epithelial-type Kruppel-like transcription factor KLF4, but not KLF5, in bladder cancer, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **308**, 251–256.
  44. Katz, J.P., Perreault, N., Goldstein, B.G., Actman, L., McNally, S.R., Silberg, D.G., Furth, E.E., Kaestner, K.H. (2005) Loss of Klf4 in mice causes altered proliferation and differentiation and precancerous changes in the adult stomach, *Gastroenterology*, **128**, 935–945.
  45. Foster, K.W., Frost, A.R., McKie-Bell, P., Lin, C.Y., Engler, J.A., Grizzle, W.E., Ruppert, J.M. (2000) Increase of GKLF messenger RNA and protein expression during progression of breast cancer, *Cancer Research*, **60**, 6488–6495.
  46. Wang, N., Liu, Z.H., Ding, F., Wang, X. Q., Zhou, C.N., Wu, M. (2002) Downregulation of gut-enriched Kruppel-like factor expression in esophageal cancer, *World Journal of Gastroenterology*, **8**, 966–970.
  47. Zhao, W., Hisamuddin, I.M., Nandan, M.O., Babbin, B.A., Lamb, N.E., Yang, V.W. (2004) Identification of Kruppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer, *Oncogene*, **23**, 395–402.
  48. Dang, C.V., O'Donnell, K.A., Zeller, K. I., Nguyen, T., Osthus, R. C., Li, F. (2006) The c-Myc target gene network, *Seminars in Cancer Biology*, **16**, 253–264.
  49. Lebofsky, R., Walter, J.C. (2007) New Myc-anisms for DNA replication and tumorigenesis? *Cancer Cell*, **12**, 102–103.
  50. Patel, J.H., Loboda, A.P., Showe, M.K., Showe, L.C., McMahon, S.B. (2004) Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC, *Nature Reviews Cancer*, **4**, 562–568.
  51. Cawley, S., Bekiranov, S., Ng, H.H., Kapranov, P., Sekinger, E.A., Kampa, D., Piccolboni, A., Sementchenko, V., Cheng, J., Williams, A.J., Wheeler, R., Wong, B., Drenkow, J., Yamanaka, M., Patel, S., Brubaker, S., Tammana, H., Helt, G., Struhl, K., Gingeras, T.R. (2004) Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs, *Cell*, **116**, 499–509.
  52. Cowling, V. H., Cole, M.D. (2006) Mechanism of transcriptional activation by the Myc oncoproteins, *Seminars in Cancer Biology*, **16**, 242–252.
  53. Chang, T.C., Yu, D., Lee, Y.S., Wentzel, E.A., Arking, D.E., West, K.M., Dang, C.V., Thomas-Tikhonenko, A., Mendell, J.T. (2008) Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis, *Nature Genetics*, **40**, 43–50.
  54. Davis, A.C., Wims, M., Spotts, G.D., Hann, S.R., Bradley, A. (1993) A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in

- heterozygous female mice, *Genes & Development*, **7**, 671–682.
55. Baudino, T.A., McKay, C., Pendeville-Samain, H., Nilsson, J.A., Maclean, K.H., White, E.L., Davis, A.C., Ihle, J.N., Cleveland, J.L. (2002) c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression, *Genes & Development*, **16**, 2530–2543.
  56. Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I., Thomson, J.A. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells, *Science*, **318**, 1917–1920.
  57. Matsui, T., Leung, D., Miyashita, H., Maksakova, I.A., Miyachi, H., Kimura, H., Tachibana, M., Lorincz, M.C., Shinkai, Y. (2010) Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET, *Nature*, **464**, 927–931.
  58. Sridharan, R., Tchieu, J., Mason, M.J., Yachechko, R., Kuoy, E., Horvath, S., Zhou, Q., Plath, K. (2009) Role of the murine reprogramming factors in the induction of Pluripotency, *Cell*, **136**, 364–377.
  59. Okita, K., Ichisaka, T., Yamanaka, S. (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells, *Nature*, **448**, 313–317.
  60. Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., Cowan, C., Hochdinger, K. (2008) A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, **3**, 340–345.
  61. Markoulaki, S., Hanna, J., Beard, C., Carey, B.W., Cheng, A.W., Lengner, C.J., Dausman, J.A., Fu, D., Gao, Q., Wu, S., Cassady, J.P., Jaenisch, R. (2009) Transgenic mice with defined combinations of drug-inducible reprogramming factors, *Nature Biotechnology*, **27**, 169–171.
  62. Kaji, K., Norrby, K., Pasa, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., Woltjen, K. (2009) Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors, *Nature*, **458**, 771–775.
  63. Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., Isacson, O., Jaenisch, R. (2009) Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors, *Cell*, **136**, 964–977.
  64. Bichsel, C., Neeld, D.K., Hamazaki, T., Wu, D., Chang, L.J., Yang, L., Terada, N., Jin S. (2011) Bacterial delivery of nuclear proteins into pluripotent and differentiated cells, *PLoS One*, **6**, e16465.
  65. Okita, K., Yamakawa, T., Matsumura, Y., Sato, Y., Amano, N., Watanabe, A., Goshima, N., Yamanaka, S. (2013) An Efficient Non-viral Method to Generate Integration-Free Human iPS Cells from Cord Blood and Peripheral Blood Cells, *Stem Cells*, **31**, 458–466.
  66. Nakanishi, M., Otsu, M. (2012) Development of Sendai Virus Vectors and their Potential Applications in Gene Therapy and Regenerative Medicine, *Current Gene Therapy*, **12**, 410–416.
  67. Macarthur, C.C., Fontes, A., Ravinder, N., Kuninger, D., Kaur, J., Bailey, M., Taliana, A., Vemuri, M.C., Lieu, P.T. (2012) Generation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells by a Nonintegrating RNA Sendai Virus Vector in Feeder-Free or Xeno-Free Conditions, *Stem Cells International*, **2012**, Article ID 564612, 9 pages, doi:10.1155/2012/564612.
  68. Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., Hasegawa, M. (2009) Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into

- the host genome, *Proceedings of the Japan Academy - Series B: Physical & Biological Sciences*, **85**, 348–362.
69. Голубовский М.Д. (2011) Нестабильность генов и мобильные элементы: к истории изучения и открытия, *Историко-биологические исследования*, **4**, 60–78.
70. Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., Kaji, K., Sung, H.K., Nagy, A. (2009) piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells, *Nature*, **458**, 766–770.
71. Hackett, P.B Jr., Aronovich, E.L., Hunter, D., Urness, M., Bell, J.B., Kass, S.J., Cooper, L.J., McIvor, S. (2011) Efficacy and Safety of Sleeping Beauty Transposon-Mediated Gene Transfer in Preclinical Animal Studies, *Current Gene Therapy*, **11**, 341–349.
72. Belay, E., Dastidar, S., VandenDriesche, T., Chuah, M.K. (2011) Transposon-Mediated Gene Transfer into Adult and Induced Pluripotent Stem Cells, *Current Gene Therapy*, **11**, 406–413.
73. Mallanna, S.K., Rizzino, A. (2010) Emerging roles of microRNAs in the control of embryonic stem cells and the generation of induced pluripotent stem cells, *Developmental Biology*, **344**, 16–25.
74. Subramanyam, D., Lamouille, S., Judson, R.L., Liu, J.Y., Bucay, N., Derynck, R., Blesch, R. (2011) Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells, *Nature Biotechnology*, **29**, 443–448.
75. Qi, J., Yu, J.-Y., Shcherbata, H.R., Mathieu, J., Wang, A.J., Seal, S., Zhou, W., Stadler, B.M., Bourgin, D., Wang, L., Nelson, A., Ware, C., Raymond, C., Lim, L.P., Magnus, J., Ivanovska, I., Diaz, R., Ball, A., Cleary, M.A., Ruohola-Baker, H. (2009) microRNAs regulate human embryonic stem cell division, *Cell Cycle*, **8**, 3729–3741.
76. Dolezalova, D., Mraz, M., Barta, T., Plevova, K., Vinarsky, V., Holubcova, Z., Jaros, J., Dvorak, P., Pospisilova, S., Hampl, A. (2012) microRNAs regulate p21(Waf1/Cip1) protein expression and the DNA damage response in human embryonic stem cells, *Stem Cells*, **30**, 1362–1372.
77. Li, Z., Yang, C.S., Nakashima, K., Rana, T.M. (2011) Small RNA-mediated regulation of Generation iPS cell, *The EMBO Journal*, **30**, 823–834.
78. Miyoshi, N., Ishii, H., Nagano, H., Haraguchi, N., Dewi, D.L., Kano, Y., Nishikawa, S., Tanemura, M., Mimori, K., Tanaka, F., Saito, T., Nishimura, J., Takemasa, I., Mizushima, T., Ikeda, M., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Doki, Y., Mori, M. (2011) Reprogramming of Mouse and Human Cells to Pluripotency Using Mature MicroRNAs, *Cell Stem Cell*, **8**, 633–638.
79. Liao, B., Bao, X., Liu, L., Feng, S., Zovoilis, A., Liu, W., Xue, Y., Cai, J., Guo, X., Qin, B., Zhang, R., Wu, J., Lai, L., Teng, M., Niu, L., Zhang, B., Esteban, M.A., Pei, D. (2011) MicroRNA cluster 302-367 enhances somatic cell reprogramming by accelerating a mesenchymal-to-epithelial transition, *The Journal of Biological Chemistry*, **286**, 17359–17364.
80. Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., Daley, G.Q., Brack, A.S., Collins, J.J., Cowan, C., Schlaeger, T.M., Rossi, D.J. (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA, *Cell Stem Cell*, **7**, 618–630.
81. Kim, D., Kim, C.H., Moon, J. I., Chung, Y.G., Chang, M.Y., Han, B.S.,



- Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., Kim, K.S. (2009) Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins, *Cell Stem Cell*, **4**, 472–476.
82. Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., Siuzdak, G., Schöler, H.R., Duan, L., Ding, S. (2009) Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins, *Cell Stem Cell*, **4**, 381–384.
83. Efe, J.A., Ding, S. (2011) The evolving biology of small molecules: controlling cell fate and identity, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **366**, 2208–2221.
84. Shi, Y., Despons, C., Do, J.T., Hahm, H.S., Schöler, H.R., Ding, S. (2008) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small molecule compounds, *Cell Stem Cell*, **3**, 568–574.
85. Duinsbergen, D., Eriksson, M., 't Hoen, P. A., Frisén, J., Mikkers, H. (2008) Induced pluripotency with endogenous and inducible genes, *Experimental Cell Research*, **314**, 3255–3263.
86. Lin, T., Ambasudhan, R., Yuan, X., Li, W., Hilcove, S., Abujarour, R., Lin, X., Hahm, H. S., Hao, E., Hayek, A., Ding, S. (2009) A chemical platform for improved induction of human iPSCs, *Nature Methods*, **6**, 805–808.
87. Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., Ge, J., Xu, J., Zhang, Q., Zhao, Y., Deng, H. (2013) Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds, *Science*, **341**, 651–654.
88. Rais, Y., Zviran, A., Geula, S., Gafni, O., Chomsky, E., Viukov, S., Mansour, A.A., Caspi, I., Krupalnik, V., Zerbib, M., Maza, I., Mor, N., Baran, D., Weinberger, L., Jaitin, D.A., Lara-Astiaso, D., Blecher-Gonen, R., Shipony, Z., Mukamel, Z., Hagai, T., Gilad, S., Amann-Zalcenstein, D., Tanay, A., Amit, I., Novershtern, N., Hanna, J.H. (2013) Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency, *Nature*, **502**, 65–70.
89. Kaji, K., Nichols, J., Hendrich, B. (2007) Mbd3, a component of the NuRD co-repressor complex, is required for development of pluripotent cells, *Development*, **134**, 1123–1132.
90. Reynolds, N., Salmon-Divon, M., Dvinge, H., Hynes-Allen, A., Balasooriya, G., Leaford, D., Behrens, A., Bertone, P., Hendrich, B. (2012) NuRD-mediated deacetylation of H3K27 facilitates recruitment of Polycomb Repressive Complex 2 to direct gene repression, *The EMBO Journal*, **31**, 593–605.
91. Luo, M., Ling, T., Xie, W., Sun, H., Zhou, Y., Zhu, Q., Shen, M., Zong, L., Lyu, G., Zhao, Y., Ye, T., Gu, J., Tao, W., Lu, Z., Grummt, I. (2013) NuRD Blocks Reprogramming of Mouse Somatic Cells into Pluripotent Stem Cell. *Stem Cells*, **31**, 1278–1286.
92. Eminli, S., Utikal, J., Arnold, K., Jaenisch, R., Hochedlinger, K. (2008) Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 Expression, *Stem Cells*, **26**, 2467–2474.
93. Lagarkova, M.A., Shutova, M.V., Bogomazova, A.N., Vassina, E.M. Glazov, E.A., Zhang, P., Rizvanov, A.A., Chestkov, I.V., Kiselev, S.L. (2010) Induction of pluripotency in human endothelial cells resets epigenetic profile on genome scale, *Cell Cycle*, **9**, 937–946.
94. Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B.W., Beard, C., Wernig, M., Creighton, M.P., Steine, E.J., Cassady, J.P., Foreman, R., Lengner,



- C.J., Dausman, J.A., Jaenisch, R. (2008) Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to Pluripotency, *Cell*, **133**, 250–264.
95. Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., Yamanaka, S. (2008) Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells, *Science*, **321**, 699–702.
96. Muchkaeva, I.A., Dashinimaev, E.B., Artyuhov, A.S., Myagkova, E.P., Vorotelyak, E.A., Yegorov, Y.Y., Vishnyakova, K.S., Kravchenko, I.E., Chumakov, P.M., Terskikh, V.V., Vasiliev, A.V. (2014) Generation of iPSC Cells from Human Hair Follicle Dermal Papilla Cells, *Acta Naturae*, **6**, 45–53.
97. Yang, J., Li, Y., Erol, D., Wu, W.H., Tsai, Y.T., Li, X.R., Davis, R.J., Tsang, S.H. (2014) Generation of induced pluripotent stem cells from conjunctiva, *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, **252**, 423–431.
98. Churko, J.M., Burridge, P.W., Wu, J.C. (2013) Generation of human iPSCs from human peripheral blood mononuclear cells using non-integrative Sendai virus in chemically defined conditions. *Methods Mol. Biol.*, **1036**, 81–88.
99. Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D., Hochedlinger, K. (2008) Defining Molecular Cornerstones during Fibroblast to iPSC Cell Reprogramming in Mouse, *Cell Stem Cell*, **2**, 230–240.
100. Schepers, W., Copray, S. (2009) The Molecular Mechanism of Induced Pluripotency: A Two-Stage Switch, *Stem Cell Reviews and Reports*, **5**, 204–223.
101. Yehezkel, S., Rebibo-Sabbah, A., Segev, Y., Tzukerman, M., Shaked, R., Huber, I., Gepstein, L., Skorecki, K., Selig, S. (2011) Reprogramming of telomeric regions during the generation of human induced pluripotent stem cells and subsequent differentiation into fibroblast-like derivatives, *Epigenetics*, **6**, 63–75.
102. Sun, N., Lee, A., Wu, J.C. (2009) Long term non-invasive imaging of embryonic stem cells using reporter genes, *Nature Protocols*, **4**, 1192–2001.
103. Brambrink, T., Foreman, R., Westhead, G.G., Lengner, C.J., Wernig, M., Suh, H., Jaenisch, R. (2008) Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells, *Cell Stem Cell*, **7**, 151–159.
104. Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., Plath, K., Hochedlinger, K. (2007) Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution, *Cell Stem Cell*, **1**, 55–70.
105. O'Mathuna, D.P. (2002) What to call human cloning: the technical terminology increasingly used in the cloning debate sidesteps the ethical questions raised, *EMBO Reports*, **3**, 502–505.
106. Гривенников И.А. (2008) Эмбриональные стволовые клетки и проблема направленной дифференцировки, *Успехи биологической химии*, **48**, 181–220.
107. Turner, M., Leslie, S., Martin, N.G., Peschanski, M., Rao, M., Taylor, C.J., Trounson, A., Turner, D., Yamanaka, S., Wilmut, I. (2013) Toward the development of a global induced pluripotent stem cell library, *Cell Stem Cell*, **13**, 382–384.
108. Mackay-Sim, A. (2013) Patient-derived stem cells: pathways to drug discovery for brain diseases, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **7**, Article 29, 1–10.
109. Grskovic, M., Javaherian, A., Strulovici, B., Daley, G.Q. (2011) In-

- duced pluripotent stem cells—opportunities for disease modeling and drug discovery, *Nature Reviews Drug Discovery*, **10**, 915–929.
110. Maury, Y., Gauthier, M., Peschanski, M., Martinat, C. (2012) Human pluripotent stem cells for disease modelling and drug screening, *Bioessays*, **34**, 61–71.
111. Park, I.H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., Daley, G.Q. (2008) Disease-specific induced pluripotent stem cells, *Cell*, **134**, 877–886.
112. Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F. Jr., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A., Svendsen, C.N. (2009) Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient, *Nature*, **457**, 277–280.
113. Raya, A., Rodriguez-Piza, I., Gueñechea, G., Vassena, R., Navarro, S., Barrero, M.J., Consiglio, A., Castella, M., Rio, P., Sleep, E., Gonzalez, F., Tiscornia, G., Garreta, E., Aasen, T., Veiga, A., Verma, I.M., Surrallés, J., Bueren, J., Izpisua Belmonte, J.C. (2009) Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells, *Nature*, **460**, 53–59.
114. Zhang, D., Jiang, W., Liu, M., Sui, X., Yin, X., Chen, S., Shi, Y., Deng, H. (2009) Highly efficient differentiation of human ES and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells, *Cell Research*, **19**, 429–438.
115. Некрасов Е.Д., Лебедева О.С., Васина Е.М., Богомазова А.Н., Честков И.В., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Иллариошкин С.Н., Гривенников И.А. (2012) Платформа для изучения болезни Гентингтона на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*, **6**, 30–35.
116. Byers, B., Lee, H.L., Reijo Pera, R. (2012) Modeling Parkinson's Disease Using Induced Pluripotent Stem Cells, *Current Neurology and Neuroscience Reports*, **12**, 237–242.
117. Yoshikawa, T., Samata, B., Ogura, A., Miyamoto, S., Takahashi, J. (2013) Systemic administration of valproic acid and zonisamide promotes differentiation of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic neurons, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **7**, Article 11, 1–10.
118. Narytnyk, A., Verdon, B., Loughney, A., Sweeney, M., Clewes, O., Taggart, M.J., Sieber-Blum, M. (2014) Differentiation of human epidermal neural crest stem cells (hEPI-NCSC) into virtually homogenous populations of dopaminergic neurons, *Stem Cell Reviews and Reports*, **10**, 316–26.
119. Иллариошкин С.Н. (2003) Конформационные болезни мозга. М.: Янус-К, 203 с.
120. Sanchez-Danes, A., Richaud-Patin, Y., Carballo-Carbajal, I., Jimenez-Delgado, S., Caig, C., Mora, S., Di Guglielmo, C., Ezquerro, M., Patel, B., Giralt, A., Canals, J.M., Memo, M., Alberch, J., Lopez-Barneo, J., Vila, M., Cuervo, A.M., Tolosa, E., Consiglio, A., Raya, A. (2012) Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease, *EMBO Molecular Medicine*, **4**, 380–395.
121. Nguyen, H.N., Byers, B., Cord, B. (2011) LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress, *Cell Stem Cell*, **8**, 267–280.
122. Seibler, P., Graziotto, J., Jeong, H., Simunovic, F., Klein, C., Krainc D. (2011) Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons

- derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells, *The Journal of Neuroscience*, **31**, 5970–5976.
123. Buchel, F., Saliger, S., Drager, A., Hoffmann, S., Wrzodek, C., Zell, A., Kahle, P.J. (2013) Parkinson's disease: dopaminergic nerve cell model is consistent with experimental finding of increased extracellular transport of  $\alpha$ -synuclein, *BMC Neuroscience*, **14**, 136–147.
124. Hargus, G., Cooper, O., Deleidi, M. (2010) Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 15921–15926.
125. Cai, J., Yang, M., Poremsky, E. (2010) Dopaminergic Neurons Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells Survive and Integrate into 6-OHDA-Lesioned Rats, *Stem Cells and Development*, **19**, 1017–1023.
126. Martinez-Morales, P.L., Liste, I. (2012) Stem Cells as In Vitro Model of Parkinson's Disease, *Stem Cells International*, **2012**, Article ID 980941, 7 pages, doi:10.1155/2012/980941.
127. Abdulkadir, A., Ronneberger, O., Wolf, R.C., Pfeleiderer, B., Saft, C., Kloppel, S. (2013) Functional and structural MRI biomarkers to detect pre-clinical neurodegeneration, *Current Alzheimer Research*, **10**, 125–134.
128. Лебедева О.С., Лагарькова М.А., Киселев С.Л., Мухина И.В., Ведунова М.В., Усова О.В., Ставровская А.В., Ямщикова Н.Г., Федотова Е.Ю., Гривенников И.А., Хаспеков Л.Г., Иллариошкин С.Н. (2013) Морфофункциональные свойства индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных из фибробластов кожи человека и дифференцированных в дофаминергические нейроны, *Нейрохимия*, **30**, 233–241.
129. Imamura, K., Inoue, H. (2012) Research on neurodegenerative diseases using induced pluripotent stem cells, *Psychogeriatrics*, **12**, 115–119.
130. Okano, H., Nakamura, M., Yoshida, K., Okada, Y., Tsuji, O., Nori, S., Ikeda, E., Yamanaka, S., Miura, K. (2013) Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells, *Circulation Research*, **112**, 523–533.
131. Kamao, H., Mandai, M., Okamoto, S., Sakai, N., Suga, A., Sugita, S.J., Kiryu, J.M., Takahashi, M. (2014) Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application, *Stem Cell Reviews and Reports*, **2**, 1–14.
132. Doi, D., Samata, B., Katsukawa, M., Kikuchi, T., Morizane, A., Ono, Y., Sekiguchi, K., Nakagawa, M., Parmar, M., Takahashi, J. (2014) Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation, *Stem Cell Reviews and Reports*, **2**, 337–350.
133. Kawamura, M., Miyagawa, S., Miki, K., Saito, A., Fukushima, S., Higuchi, T., Kawamura, T., Kuratani, T., Daimon, T., Shimizu, T., Okano, T., Sawa, Y. (2012) Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model, *Circulation*, **126**, S29–S37.
134. Nakamura, S., Takayama, N., Hirata, S., Seo, H., Endo, H., Ochi, K., Fujita, K.I., Koike, T., Harimoto, K.I., Dohda, T., Watanabe, A., Okita, K., Takahashi, N., Sawaguchi, A., Yamanaka, S., Nakauchi, H., Nishimura, S., Eto, K. (2014)

- Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, **14**, 535–548.
135. Reinhardt, P., Schmid, B., Burbulla, L.F., Schondorf, D.C., Wagner, L., Glatza, M., Hoing, S., Hargus, G., Heck, S.A., Dhingra, A., Wu, G., Muller, S., Brockmann, K., Kluba, T., Maisel, M., Kruger, R., Berg, D., Tsytsyura, Y., Thiel, C.S., Psathaki, O.E., Klingauf, J., Kuhlmann, T., Klewin, M., Muller, H., Gasser, T., Scholer, H.R., Sterneckert, J. (2013) Genetic correction of a LRRK2 mutation in human iPSCs links parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes in gene expression, *Cell Stem Cell*, **12**, 354–367.
136. Xie, F., Ye, L., Chang, J.C., Beyer, A.I., Wang, J., Muench, M.O., Kan, Y.W. (2014) Seamless gene correction of  $\beta$ -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac, *Genome Research*, **24**, 1526–1533.
137. Suzuki, K., Yu, C., Qu, J., Li, M., Yao, X., Yuan, T., Goebel, A., Tang, S., Ren, R., Aizawa, E., Zhang, F., Xu, X., Soligalla, R.D., Chen, F., Kim, J., Kim, N.Y., Liao, H.K., Benner, C., Esteban, C.R., Jin, Y., Liu, G.H., Li, Y., Izpisua Belmonte, J.C. (2014) Targeted gene correction minimally impacts whole-genome mutational load in human-disease-specific induced pluripotent stem cell clones, *Cell Stem Cell*, **15**, 31–36.
138. Mukherjee, S., Thrasher, A.J. (2014) Gene correction of induced pluripotent stem cells derived from a murine model of X-linked chronic granulomatous disorder, *Methods in Molecular Biology*, **1114**, 427–440.
139. Howden, S.E., Thomson, J.A. (2014) Gene targeting of human pluripotent stem cells by homologous recombination, *Methods in Molecular Biology*, **1114**, 37–55.
140. Rao, M., Gottesfeld, J.M. (2014) Introduction to thematic minireview series: Development of human therapeutics based on induced pluripotent stem cell (iPSC) technology, *The Journal of Biological Chemistry*, **289**, 4553–4554.