

АГЛЯДЫ
REVIEWS

УДК 577.241
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-345-356>

Поступила в редакцию 05.04.2021
Received 05.04.2021

О. И. Тишук, А. Г. Полешко, И. Д. Волотовский

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ.
ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ
В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ**

Аннотация. Настоящий обзор посвящен индуцированным плюрипотентным стволовым клеткам (ИПСК), открытие которых стало одним из выдающихся достижений медико-биологической науки начала XXI в. ИПСК являются, по сути, искусственно созданным в лабораторных условиях аналогом эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), пул которых формируется в оплодотворенной яйцеклетке и затем вовлекается в чрезвычайно сложные процессы онтогенеза. Рассматривается место стволовых клеток вообще и ИПСК в частности в иерархии клеток организма.

Описаны основные свойства этих клеток, сходство и различия между ИПСК и ЭСК, перспективы их практического применения в биологии и медицине, в том числе при лечении заболеваний человека, а также механизмы индуцированной дедифференцировки как в унипотентных клетках (фибробласты, кератиноциты и др.), так и в мультипотентных гемопоэтических стволовых клетках (ГСК) и мезенхимальных стромальных клетках (МСК).

В обзоре представлена информация об используемых в мире способах получения ИПСК, описываются протоколы репрограммирования, которые различаются по способу доставки генетического материала в клетку, условиям культивирования клеток в процессе их дедифференцировки и эффективности. В качестве примера приводится описание всего цикла дедифференцировки фибробластов человека в ИПСК. Кроме того, представлены данные об уникальных свойствах ИПСК, которые позволяют изучать *in vitro* процессы онтогенеза, патофизиологические процессы, имеющие место при различных заболеваниях, а также использовать данный тип клеток при разработке потенциальных лекарственных препаратов.

Ключевые слова: стволовые клетки, плюрипотентность, репрограммирование, дедифференцировка, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, эмбриональные стволовые клетки

Для цитирования: Тишук, О. И. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Получение, свойства и перспективы применения в биологии и медицине / О. И. Тишук, А. Г. Полешко, И. Д. Волотовский // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2021. – Т. 66, № 3. – С. 345–356. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-345-356>

Olga I. Tishuk, Anna G. Poleshko, Igor D. Volotovskiy

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS. OBTAINING, PROPERTIES AND APPLICATION PROSPECTS
IN BIOLOGY AND MEDICINE**

Abstract. This review dedicated to induced pluripotent stem cells discovery of which became one of the outstanding achievements of biomedical science at the beginning of 21th century. These cells are in fact a artificially induced analogue of embryonic stem cells. They are the progenitors of all cells contained in organism of animals and human. The pool of embryonic stem cells forms in fertilized cell and they are involved in extremely complex processes of organogenesis. The position of these cells in general and of induced pluripotent stem cells in particular in hierarchy of cells in organism is described.

The main properties of these cells, similarities and differences between embryonic and induced pluripotent stem cells, prospects for their practical use in biology and medicine including treatment of human diseases are considered.

The mechanisms of induced dedifferentiation in both unipotent cells, for example fibroblasts and keratinocytes, and multipotent cells as hemopoietic or mesenchymal stromal stem cells are described.

In this review the information on used in the world approaches for obtaining of induced pluripotent stem cells is presented, the ways of reprogramming different in the methods of delivery of genetic material into the cells and conditions of their cultivation during dedifferentiation process and efficacy. As an example, description of all dedifferentiation cycle of human fibroblasts in induced pluripotent stem cells is provided. Besides, the data on unique properties of induced pluripotent stem cells what allowed to study ontogenesis processes, pathophysiology of various diseases both *in vitro* and in animals' models to be obtained using induced pluripotent stem cells and also on approaches of these cells application for medicine screening when they are synthesized and tested are given.

Keywords: stem cells, pluripotency, reprogramming, dedifferentiation, induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells

For citation: Tishuk O. I., Poleshko A. G., Volotovskiy I. D. Induced pluripotent stem cells. Obtaining, properties and application prospects in biology and medicine. *Vesti Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 3, pp. 345–356 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-345-356>

Введение. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) – это стволовые клетки, полученные из иных (соматических, репродуктивных) клеток путем репрограммирования, основанного на изменении эпигенома клетки. Получение ИПСК человека и изучение их биологии является актуальной задачей современной клеточной биологии и регенеративной медицины. ИПСК, получаемые с помощью репрограммирования, открывают широкие перспективы для фундаментальных и прикладных исследований, направленных на изучение процессов, лежащих в основе онтогенеза человека [1, 2]. С использованием ИПСК стали возможными изучение молекулярно-генетических механизмов развития в первую очередь наследственных заболеваний человека, создание моделей генетических заболеваний, разработка новых протоколов их лечения, а также использование ИПСК для тестирования лекарственных препаратов. Акцент на наследственных заболеваниях оказался не случайным. По разным данным, порядка 800–900 заболеваний человека прямо или косвенно связаны с модификациями на уровне генома.

Большой интерес к ИПСК обусловлен еще одним важным обстоятельством. С открытием ИПСК возникла возможность придать любой клетке нашего организма свойства эмбриональной стволовой клетки (ЭСК), являющейся, как известно, прародительницей порядка 200 типов клеток, из которых построен человеческий организм. Иными словами, из ИПСК, как и из ЭСК, можно получить в лабораторных условиях практически все типы специализированных клеток, присутствующих во взрослом организме [3]. Открытие ИПСК поставило перед исследователями фундаментальный вопрос о том, какие генетические и эпигенетические механизмы отвечают за превращение генома соматической клетки в геном клетки, идентичной раннему эмбриональному состоянию. В отличие от ЭСК, аутологичный материал которых, как правило, недоступен, ИПСК, созданные с помощью генно-инженерных методик из аутологичских соматических клеток, лишены недостатков, связанных с иммунологической несовместимостью и этическими моментами [1].

В настоящее время детальные события процесса получения ИПСК широко исследуются во многих лабораториях в разных странах, апробировано большое количество протоколов репрограммирования, которые различаются как по способу доставки индуцирующих факторов или генетического материала в клетку, так и по условиям культивирования клеток в процессе их дедифференцировки. Однако следует отметить, что до сих пор не существует универсальных высокоэффективных подходов получения ИПСК.

Для репрограммирования чаще всего используют такие соматические клетки человека, как фибробласты, кератиноциты и гемопоэтические стволовые клетки (ГСК). Их главным преимуществом является доступность, простота получения и высокая пролиферативная активность.

Один из успешных и часто используемых в лабораторной практике протоколов репрограммирования основан на введении в геном клетки четырех кодирующих транскрипционных факторов плюрипотентности генов, таких как *oct-4* (octamer-4), *sox2* (sry-sex 4determining region Y-box 2), *klf4* (Kruppel-like factor 4) и *c-myc* (cellular myelocytomatosis oncogene) – так называемый «коктейль Яманаки». В литературе эту четверку факторов маркируют как факторы OSKM. Индуцированная экспрессия данных генов переключает метаболические пути клетки, что приводит к ее дедифференцировке [4]. Одним из важных этапов репрограммирования является подбор протокола введения целевого гена в клетку с целью поддержания его экспрессии.

Несмотря на имеющиеся перспективы использования вирусного метода репрограммирования соматических клеток, последний потенциально способен вызывать генетическую нестабильность клеток, что исключает возможность применения полученных таким образом ИПСК в регенеративной медицине [1]. Поскольку, согласно литературным данным, существующие методики все еще являются низкоэффективными, в настоящее время разрабатываются альтернативные методы получения ИПСК, которые помимо минимизации рисков их использования в клинической практике позволят увеличить выход репрограммированных клеток.

Место стволовых клеток в клеточной иерархии организма. Основным свойством любой клетки является ее потентность, определяемая степенью дифференцировки и способностью превращаться в другие клетки. Иными словами, потентность – это способность любой клетки дифференцироваться в определенные виды клеток различных органов. Чем большее количество видов клеток может образовываться из исходной клетки, тем выше ее потентность. Исходя из этого, выделяют следующие разновидности стволовых клеток [3]:

тотипотентные клетки характеризуются наибольшим потенциалом дифференцировки и способны превращаться в любую клетку, в том числе в эмбриональную и везародышевую клетку; тотипотентностью характеризуются зигота и бластомер;

плюрипотентные клетки обладают неограниченной пролиферацией и могут дифференцироваться в производные трех первичных зародышевых листков энтодермы, мезодермы и эктодермы;

мультипотентные и олигопотентные клетки – взрослые стволовые клетки, находящиеся во всех тканях и органах, способны превращаться в клетки одной линии, например ГСК, мезенхимальные стволовые клетки;

унипотентные клетки – предшественники клеток одного типа, образуются из мультипотентных и олигопотентных стволовых клеток.

В рассматриваемом контексте с потентностью клеток связаны еще два термина: **репрограммирование** (расширение потентности и дифференцировочного потенциала клеток), достигаемое тремя способами – переносом ядер, слиянием клеток и генетическими манипуляциями, и **трансдифференцировка** (расширение потенции клеток и возникновение клеток других линий), под которой понимают индукцию транскрипционными факторами взаимопревращения между различными дифференцированными клеточными типами.

Открытие ИПСК произошло благодаря синтезу научных фундаментальных результатов и технологий, получивших распространение в течение нескольких последних десятилетий [5]. Это было обусловлено следующим:

демонстрацией переноса ядер между соматическими клетками и тем фактом, что дифференцированные клетки сохраняют в своем генетическом аппарате ту же информацию, что и эмбриональные клетки;

развитием технических возможностей, позволяющих выделять, культивировать и исследовать плюрипотентные стволовые клетки;

установлением того, что транскрипционные факторы являются ключевыми регуляторными структурами, принудительная экспрессия которых запускает процесс превращения одного типа зрелых клеток в другие.

История получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Идентификация природы ключевых транскрипционных факторов. Первые линии плюрипотентных стволовых клеток были получены из внутренней клеточной массы бластоцисты мыши в 1981 г. [5], а первое репрограммирование соматических клеток до плюрипотентного состояния было проведено в 2006 г. группой японских исследователей, возглавляемых С. Яманака. Ими было установлено, что использование комбинации четырех транскрипционных факторов – Oct3/4, Sox2, Klf4 и с-Мус (OSKM) – достаточно для перехода мышинных фибробластов в плюрипотентное состояние при репрограммировании [4]. Также было доказано, что указанная комбинация факторов эффективно работает и в отношении клеток человека. С. Яманака с сотр. [4] обнаружили, что такие факторы транскрипции, как Oct3/4, Sox2 и Nanog, поддерживают состояние плюрипотентности как у ранних эмбрионов, так и у ЭСК, а онкогены *Stat3* (signal transducer and activator of transcription 3, кодирует сигнальный белок и активатор транскрипции), *E-Ras* (expressed gas, кодирует малые ГТФазы), с-Мус и *Klf4* способствуют долгосрочному сохранению фенотипа и усиливают пролиферацию ЭСК в культуре. Для эксперимента было отобрано 24 гена в качестве кандидатов на кодирование транскрипционных факторов, которые вызывают плюрипотентность в соматических клетках. В результате были получены данные, которые свидетельствуют о том, что фактор Nanog не является критичным для получения ИПСК, а факторы с-Мус и Klf4 не могут быть заменены другими онкогенами, в том числе E-Ras, Tcl1 (T-cell leukemia/lymphoma 1), β-катенин и Stat3.

Кроме того, исследователи из той же лаборатории под руководством С. Яманака сообщили об успешной дедифференцировке фибробластов взрослого человека и получении ИПСК с помощью идентичных пептидных факторов [4]. Этот процесс получил название прямого генетического репрограммирования, т. е. репрограммирования путем прямого воздействия на эпигенетическое состояние взрослой клетки в отличие от переноса ядра соматических клеток (somatic cell nuclear transfer, SCNT) и слияния клеток. Технология репрограммирования позволила получать плюрипотентные стволовые клетки из разных типов клеток (фибробласты кожи, клетки крови, нервные клетки, эндотелиальные клетки и др.) различных организмов.

В то же время Дж. Томсон с соавт. [6], которые использовали для репрограммирования клеток гены факторов Oct3/4, Sox2, Nanog и Lin28, показали, что при репрограммировании возможна замена с-Мус, так как была установлена его роль в индукции апоптоза ЭСК человека, а также в стимуляции 20 % случаев опухолевой трансформации ИПСК мышей при реактивации соответствующей области ретровирусного вектора [4]. Во многих работах по репрограммированию соматических клеток для индукции плюрипотентности приведены данные о значительном увеличении эффективности репрограммирования при добавлении гена *Lin28* в набор факторов репрограммирования. Основным вкладом транскрипционного фактора *Lin28* в этот процесс связывают с его участием в процессинге микроРНК. Предполагается, что в ЭСК *Lin28* ингибирует процессинг микроРНК *let7*, известного супрессора опухолевого роста. Он участвует в подавлении активности с-Мус [7]. Кроме того, было показано, что ключевые факторы репрограммирования Oct3/4, Sox2 и Nanog могут запускать синтез семейства микроРНК miR-290, члены которого экспрессируются в ЭСК в норме, принимая участие в регуляции пролиферации и стабилизации этих клеток. С участием miR-290 происходит ремоделирование хроматина с помощью с-Мус [7]. Одной из мишеней транскрипционных факторов плюрипотентности Oct3/4, Sox2, Nanog и Rex1 является промотор кластера микроРНК miR-302–367. Его продукты могут опосредованно индуцировать сигнальные пути TGF- β (transforming growth factor β)/Nodal (протеины суперсемейства TGF- β)/Activin (представитель надсемейства лигандов TGF- β). Этот сигнальный путь играет существенную роль в поддержании плюрипотентного статуса ЭСК и в подавлении их дифференцировки, ингибируя некоторые регуляторы этого пути, что в свою очередь положительно сказывается на поддержании клеток в недифференцированном состоянии [8]. Позже С. Яманака с соавт. [4] на 60 % повысили эффективность введения векторов с *oct3/4*, *sox2*, *c-мус*, *klf4* в клетки, используя для этого лентивирусные векторы, которые содержали гены мышиных рецепторов для ретровирусов – Slc7a1 (solute carrier family 7 member 1) и среды для культивирования, обогащенные bFGF (basic fibroblast growth factor), что стимулировало пролиферацию ЭСК человека.

Уникальность компонентов «коктейля Яманака» состоит не только в том, что входящие в его состав факторы участвуют в поддержании плюрипотентного состояния, но и в том, что некоторые компоненты этого «коктейля» играют большую роль в регуляции клеточного цикла, пролиферации и эпигенетического статуса клеток.

Уже в первых работах по изучению технологии репрограммирования было показано негативное влияние процесса старения на эффективность индукции плюрипотентного состояния. Одним из важных моментов при репрограммировании явился выбор исходного клеточного материала – он должен быть легкодоступным и не иметь в геноме накопленных повреждений ДНК (например, от УФ-излучения и других факторов внешней среды). Эффективность репрограммирования, как оказалось, сильно зависела и от так называемого эффекта положения, т. е. места, куда внедрялся вирусный вектор, влияющий на экспрессию закодированных в нем генов. Кроме того, снижению эффективности данного способа способствовал естественный клеточный иммунитет, защищающий клетку от внедрения чужеродных генов [6].

Основной же проблемой использования интеграционных методов является высокий риск канцерогенеза. Существуют эпигенетические механизмы, подавляющие активность генов плюрипотентности, что обеспечивает дальнейшую нормальную дифференцировку клеток. Эти же механизмы действуют и на гены, внедренные вирусными векторами. Однако существует вероятность того, что внедренные гены, которые по природе являются онкогенами для соматических клеток и клеток, вступивших на путь дифференцировки, будут продолжать экспрессироваться. В таком случае это приведет к развитию из ИПСК злокачественных опухолей [3].

Сравнение эмбриональных и индуцированных стволовых клеток. На сегодняшний день известно два типа плюрипотентных клеток, имеющих широкий потенциал применения в биомедицине: ЭСК и ИПСК. ЭСК представляют собой практически неисчерпаемый источник недифференцированных клеток с нормальным диплоидным кариотипом, которые могут быть дифференцированы по самым разным направлениям. До недавнего времени практически единственным их источником была внутренняя масса бластоцисты, которую получали в лабораторных условиях через несколько дней после процедуры экстракорпорального оплодотворения. Следует отметить, что манипуляции с ЭСК сопровождаются высоким риском их злокачественной трансформации, а также значительными проблемами этического характера, связанными с необходимостью забора клеток из человеческих эмбрионов [3].

Альтернативой ЭСК служат ИПСК. Этот тип плюрипотентных клеток получают, как упоминалось выше, из соматических клеток взрослого организма путем репрограммирования с помощью эктопической экспрессии определенного набора транскрипционных факторов [4]. Главной характеристикой плюрипотентных стволовых клеток является их способность к неограниченной пролиферации и дифференцировке в производные трех первичных зародышевых листков. Важный момент состоит в том, что ИПСК теряют эту способность в ходе дифференцировки [4].

ИПСК по своим свойствам аналогичны ЭСК. В них работают каскады сигнальных путей, которые блокируют индукцию дифференцировки и способствуют поддержанию в активном состоянии транскрипционных факторов, ответственных за состояние плюрипотентности [4]. Доказано, что в ЭСК существуют две подсистемы регуляторов плюрипотентности: внешняя и внутренняя. Подсистема «внешних регуляторов плюрипотентности» включает в себя несколько сигнальных путей, основными из которых являются каскады, запускаемые белками LIF (leukemia inhibitory factor), BMP4 (bone morphogenetic protein), TGF β , активином A, NODAL и bFGF [9]. Подсистема «внутренних регуляторов плюрипотентности» – это подсистема транскрипционных факторов, действующих в ядрах клеток. К числу ключевых регуляторов в данной подсистеме относятся транскрипционные факторы Oct-4, Nanog и Sox2 [4].

ЭСК и ИПСК имеют сходные морфологические (компактность колоний, высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение, четкая визуализация ядер), молекулярно-биологические, иммуноцитохимические (экспрессируют гликолипиды SSEA-3, SSEA-4 (stage-specific embryonic 8 antigen) и протогликаны Tга-1-60 и Tга-1-81) данные и функциональные характеристики, теломеразную активность и способность дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков [1].

Установлено также, что ИПСК и ЭСК экспрессируют сходный спектр генов, формируют тератомы, содержащие производные всех трех зародышевых листков [4]. При сравнении ИПСК и ЭСК руководствуются такими критериями, как способность к дифференцировке и профиль экспрессии генов, эпигенетические характеристики и др. Для ИПСК мыши в качестве основного теста на способность к дифференцировке обычно используется тест на формирование жизнеспособных химер [10]. Инъекция диплоидных ИПСК в тетраплоидную бластоцисту мыши (тетраплоидная комплементация) позволила полностью развить организм из ИПСК, что указывает на эквивалентность некоторых линий ИПСК, в плане их способности к дифференцировке, ЭСК. В отношении клеток человека по этическим причинам для исследования доступны тесты, основанные на дифференцировке *in vitro*, формировании тератома-подобных новообразований при введении стволовых клеток иммунодефицитным мышам и способности к образованию эмбрионидных тел, что характеризует клетки как плюрипотентные [7]. В таблице приведены сравнительные характеристики ЭСК, взрослых МСК и ИПСК.

Сравнительные свойства эмбриональных (ЭСК), взрослых мезенхимальных стволовых клеток (ВМСК) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) [11]

Comparative properties of embryonic, adult mesenchymal stem cells and induced pluripotent stem cells [11]

Свойства клеток	ЭСК	ВМСК	ИПСК
Природа (локализация)	Находятся во внутренней клеточной массе бластоцисты	Входят в состав тканей и органов	Получают при репрограммировании соматических клеток с различным дифференцировочным потенциалом <i>in vitro</i>
Способность к самообновлению	Высокая	Ограниченная	Высокая
Потентность	Плюрипотентность	Мультипотентность	Плюрипотентность
Дифференцировка	Дифференцируются в клетки трех зародышевых листков	Обладают ограниченной дифференцировочной способностью	Дифференцируются в клетки трех зародышевых листков
Маркеры	OCT-3/4, SOX-2, NANOG, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81	CD90+, CD73+, CD105+, CD15–, CD3–, CD19–, CD11–, CD79–, HLA–DR–	OCT-3/4, SOX-2, NANOG, SSEA-4, KLF-4, TRA-1-60, TRA-1-81
Спонтанная онкотрансформация	Возможна	Отсутствует	Возможна
Иммунный ответ	Сильный	Присутствует для аллогенных клеток, отсутствует для аутологичных клеток	Сильный для ИПСК аллогенного происхождения, отсутствует для аутологичных клеток
Этические моменты	Присутствуют	Отсутствуют	Отсутствуют

ИПСК по сравнению с ЭСК имеют ряд преимуществ, два из которых являются основными: получение клеток не требует использования человеческих бластоцист, которые остаются невостребованными после процедуры экстракорпорального оплодотворения, что снимает этические вопросы; перспектива получения ИПСК рутинными методами из клеток любого пациента снимает проблемы иммунологической совместимости.

В настоящее время исследование свойств и характеристик ИПСК, а также разработка протоколов их получения особо актуальны. Резюмируя вышесказанное, ИПСК можно получить из различных соматических клеток взрослого организма, репрограммируя их до плюрипотентного состояния с помощью набора определенных генов (например, *oct3/4*, *sox2*, *klf4*, *c-myc*, *nanog* и *lin28*), большинство из которых кодируют транскрипционные факторы [10]. Кроме того, показано, что ИПСК мыши и человека можно получить путем введения в клетку микроРНК, рекомбинантных белков, матричных РНК, эписомных плазмид [12].

Получение ИПСК. В литературе имеется большое количество протоколов получения ИПСК, которые различаются по способу доставки трансгенов в клетки и условиям их культивирования в процессе репрограммирования [13]. Все существующие методы получения ИПСК условно можно разделить на две группы: вирусные и невирусные. При этом вирусные методы получения ИПСК подразделяются на методы с интеграцией трансгена в геном клетки реципиента и без интеграции. Первыми были разработаны вирусные системы доставки генетического материала в клетку на основе ретро- и лентивирусов.

Ретро- и лентивирусы интегрируют трансген в геном хозяина, что обеспечивает его высокий уровень экспрессии и эффективное заражение делящихся клеток. Однако существует опасность инсерционного мутагенеза и активации протоонкогенов, что может увеличить риск образования опухолей [10]. Первое получение ИПСК было осуществлено благодаря одновременной трансдукции четырьмя ретровирусами, несущими гены *oct3/4*, *sox2*, *klf4* и *c-myc* [4].

Для решения проблемы инсерционного мутагенеза и снижения риска канцерогенеза были разработаны неинтеграционные методы, использующие векторы на основе аденовирусов и вируса Сендай. Неинтеграционный метод получения ИПСК был использован в 2008 г. группой ученых во главе с С. Дунканом. В качестве вектора для доставки репрограммирующих факторов (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*) был применен аденовирус. Аденовирусы способны переносить генетический материал как в делящиеся, так и в неделящиеся клетки и обеспечивают достаточно высокую экспрессию генов, как правило, не встраиваясь в геном. Риск канцерогенеза был сведен к минимуму, но эффективность данного метода оказалась более низкой, чем эффективность при использовании интеграционных векторов. В 2009 г. Н. Фузакки с соавт. получили ИПСК, используя вектор на основе вируса Сендай. Этот вирус содержит РНК, а следовательно, не может встроиться в геном клетки. Несмотря на способность вируса спонтанно элиминироваться в процессе деления клеток, данный подход требовал применения либо дополнительных процедур по селекции ИПСК, либо модификации векторов. Основным препятствием для использования таких векторов остается низкая эффективность репрограммирования.

Еще одним неинтеграционным методом доставки репрограммирующих факторов является использование плазмид. Это довольно простой, доступный метод, при котором исключается интеграция плазмиды в геном. В то же время в первых экспериментах К. Окита такая интеграция плазмидного вектора в геном клетки имела место, однако оптимизация протокола позволила избежать впоследствии интеграции экзогенной ДНК и в 2010 г. были получены ИПСК без внедренной в геном стволовой клетки плазмидной ДНК. Недостатком использования плазмид является низкая эффективность репрограммирования [14].

Альтернативный способ репрограммирования – использование искусственных хромосом, которые обладают большой вместимостью и сохраняются при делении клетки. Экспрессия генов, внедренных с помощью этих хромосом, гораздо более стабильна и менее зависима от эффекта положения [14].

М. Хирацука с соавт. разработали искусственную хромосому, содержащую ДНК, в которой были закодированы 4 репрограммирующих фактора (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) и ген, «выключающий» белок p53, который является опухолевым супрессором, а также выполняет множество других функций, например принимает участие в дифференцировке и регуляции клеточного цикла (в данном случае подавление его активности позволяет повысить эффективность репрограммирования). Недостатками этого метода являются опасность интеграции экзогенного генетического материала в геном клетки, довольно низкая эффективность метода и возможные отрицательные последствия, связанные с подавлением активности белка p53 в процессе репрограммирования [15].

Л. Варреном с соавт. разработан также метод, заключающийся в периодическом введении в культуру соматических клеток синтетической мРНК, кодирующей 5 транскрипционных факторов (*Klf4*, *c-Myc*, *Oct4*, *Sox2*, *Lin28*). Основной проблемой использования экзогенной мРНК является слишком быстрая ее деградация и необходимость периодического введения в клетку синтетической мРНК, что может привести к повреждению клеток.

Х. Чжоу с коллегами разработали метод получения ИПСК с помощью введения в клетки рекомбинантных белков, в которых полиаргинин (выполняющий транспортную функцию) был связан с С-концевыми доменами 4 факторов – *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*. Доставка белков в клетку осуществлялась как инвазивными методами (микроинъекция, электропорация), так и неинвазивным методом (введение рекомбинантного белка, связанного с коротким катионным пептидом, способным проникать через клеточную

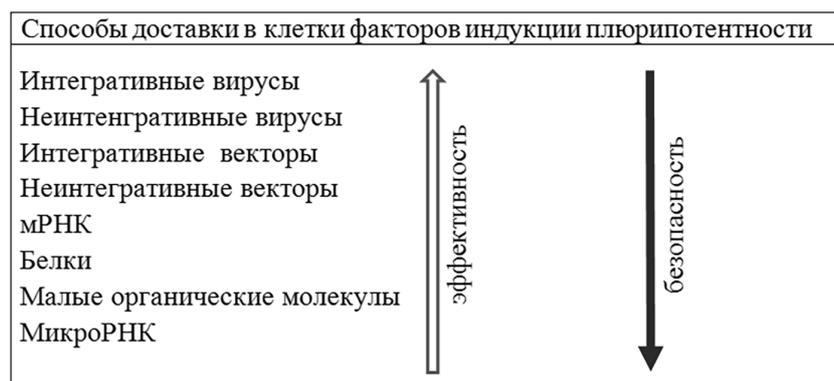


Рис. 1. Способы доставки индукторов дедифференцировки в клетки

Fig. 1. The methods of delivery of dedifferentiation inducers into cells

мембрану) [14]. Несмотря на то что при использовании неинвазивного метода клетки не повреждаются, не требуется специального оборудования, а риск инсерционного мутагенеза отсутствует, его эффективность низкая. Сам процесс репрограммирования довольно длительный и включает несколько циклов, а кроме того, использование данного метода требует достаточного количества хорошо очищенного рекомбинантного белка [14].

Важно отметить, что некоторые низкомолекулярные соединения (например, оксистерол, пурморфамин и другие метаболиты, аскорбиновая кислота, бутират натрия, форсколин) повышают эффективность репрограммирования. Самостоятельно они, к сожалению, не эффективны. Правда, считается, что некоторые из них либо их комбинации могут функционально заменить транскрипционные факторы. Основным недостатком такого подхода является сложная процедура обработки клеток комбинациями из малых молекул. Вероятно, из-за большей сложности молекулярных процессов, происходящих при репрограммировании клеток у человека, пока не удастся подобрать состав «коктейля» из малых молекул для получения человеческих ИПСК.

Следует отметить, что в ряду интеграционных вирусов – микроРНК безопасность по отношению к стабильности генома растёт, т. е. снижается вероятность нежелательных событий на его уровне (например, нежелательной активности транскрипционных факторов или образования в нем мутаций), приводящих к нарушению его структурно-функциональной целостности. В то же время в данном ряду эффективность индукции плюрипотентности снижается (рис. 1) [16].

Стадии репрограммирования. Превращение соматических клеток в ИПСК. На сегодня имеется опыт получения ИПСК из различных типов клеток взрослого организма, например из нейтральных стволовых клеток, клеток эндотелия, кератиноцитов, клеток периферической крови, гепатоцитов и эпителиальных клеток желудка, волосяных фолликулов, клеток слизистых оболочек глаза, фибробластов, МСК и др. Однако по причине простоты получения наиболее популярными объектами для репрограммирования являются фибробласты, кератиноциты кожи и мононуклеарных клеток периферической крови.

Процесс репрограммирования клеток состоит из трех стадий: инициации, созревания и стабилизации. На **первой стадии (инициации)** после трансфекции клеток факторами Oct3/4, Sox2, Klf4 и c-Myc происходит метилирование промоторов генов, экспрессия которых характерна для соматических клеток. Далее число быстро пролиферирующих клеток увеличивается и в них происходит метаболическое переключение с окислительного фосфорилирования на гликолиз, что характерно для ЭСК, которые адаптируются к условиям гипоксии на ранних стадиях эмбриогенеза [11].

Переключение метаболического пути с окислительного фосфорилирования на гликолиз происходит через 7 дней после начала процесса репрограммирования. Ключевым сигнальным каскадом на данной стадии является фосфатидил-инозитол-3-киназный (PI3K/AKT) путь. Во время репрограммирования компоненты данного пути, такие как киназы PI3 (phosphoinositide 3-kinases), Pdk1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1) и Akt (alpha serine/threonine-protein kinase), активируются, а гены, кодирующие белки гликолиза, экспрессируются [10].

Запускается процесс мезенхимально-эпителиального перехода (МЭП), что приводит к потере клетками подвижности вследствие реорганизации цитоскелета, приобретению клеточной полярности и индукции экспрессии E-кадгерина, который относится к семейству белков плотных контактов. МЭП является обратимым по причине непродолжительной экспрессии генов, кодирующих факторы (Oct3/4, Sox2, Klf4

и *c-Myc*) [17]. Поэтому экзогенные Oct3/4, Sox2, Klf4 и *c-Myc* должны присутствовать в клетках достаточно продолжительное время.

Ключевым геном в МЭП в течение репрограммирования является Sox2, продукт которого супрессирует фактор Snail, в норме обеспечивающий обратный процесс – эпителиально-мезенхимальный переход. Klf4 отвечает за индукцию гена, кодирующего E-кадгерин [17], в поддержание экспрессии которого затем вступают факторы семейства белков BMP. В отсутствие Klf4 его может функционально заменять один из эндогенных белков семейства BMP, что у мышей приводит к возможности репрограммирования фибробластов только при внесении экзогенного Oct3/4 [18]. Но конститутивная сверхэкспрессия генов, кодирующих семейство факторов BMP, препятствует получению ИПСК из фибробластов человека [18]. Подобное различие в механизмах, лежащих в основе репрограммирования, характерна для клеток человека и мыши.

Через 3 дня после одновременной трансфекции транскрипционными факторами OSKM наблюдается увеличение пролиферативной активности клеток, обусловленное сверхэкспрессией гена *c-Myc* [18]. Также на данном этапе происходит усиление экспрессии гена *lin28*, что приводит к регуляции пролиферации за счет взаимодействия с циклинами A, B и циклин-зависимой киназой Cdk4 (cyclin-dependent kinase 4) [19]. Во время стадии инициации минимальное число клеток становятся устойчивыми к апоптозу и старению.

После инициации следует **вторая стадия созревания** ИПСК. Только небольшое число клеток проходит стадию созревания успешно, что проявляется в низкой эффективности репрограммирования в целом [20]. На данном этапе эпигенетические модификации позволяют активировать экспрессию генов, кодирующих такие эндогенные факторы плюрипотентности, как Oct3/4, Nanog, Sall4 (Sal-like protein 4) и др.

Важную роль в созревании ИПСК играет LIF-STAT сигнальный путь. При культивировании клеток на среде без добавления LIF, который служит активирующим агентом данного сигнального пути, формирующиеся колонии, схожие по морфологии с колониями ЭСК, открепляются от адгезивной поверхности флакона, в котором культивируются. Активация LIF-STAT-пути приводит к деметилированию промоторов генов, обеспечивающих поддержание плюрипотентного состояния. Было показано, что транскрипционный фактор Stat3 напрямую блокирует ДНК-метилтрансферазу DNMT1 и гистоновые деацетилазы HDAC2, HDAC3 и HDAC8 [21].

WNT-сигнальный путь участвует в созревании ИПСК, так как добавление Wnt3a-активирующего лиганда между 6-м и 9-м днем после начала репрограммирования увеличивает количество сформированных ИПСК колоний [22].

До **третьей стадии стабилизации** доходит лишь 1 % клеток, вступивших на путь репрограммирования. Данная стадия характеризуется наличием эндогенной экспрессии факторов поддержания плюрипотентности. Было показано, что при элиминации экзогенных факторов на 9-й день репрограммирования фенотипической реверсии клеток не происходит, т. е. на этой стадии процесс необратим.

На стадии стабилизации наиболее четко прослеживаются различия между ИПСК мыши и человека. При репрограммировании соматических клеток мышей имеет место реактивация X-хромосомы, которая в норме у особей женского пола инактивирована. В клетках человека реактивации X-хромосомы не происходит.

Ниже представлен примерный протокол получения ИПСК человека из фибробластов дермы человека, используемый в настоящее время в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.

1. *Получение стока вирусных частиц.* Клетки HEK 293T/Phoenix одновременно трансфецируются плазмидами, экспрессирующими упаковочные вирусные белки (например, Gag, Pol и VSV-G), а также плазмидами, экспрессирующими целевые гены белков плюрипотентности OSKM, в соответствии с протоколом производителя трансфекционного реагента. Через 24 ч после трансфекции среда меняется. Затем каждые 24 ч проводится сбор среды, содержащей вирусные частицы. До завершения сбора эта среда хранится при +4 °C. После этого накопленный объем пропускается через целлюлозно-ацетатный фильтр с размерами пор 0,45 мкм и концентрируется путем центрифугирования при 70 000 g в течение 1 ч при +4 °C. По окончании этой процедуры материал закладывается на хранение при –80 °C.

2. *Подготовка культуры фибробластов дермы человека к репрограммированию.* Для получения более высокой эффективности репрограммирования используются фибробласты ранних пассажей (2–5-й). В концентрации 3000–5000 кл/см² фибробласты дермы человека высаживаются в питательную среду для культивирования и инкубируются при +37 °C в атмосфере 5 % CO₂. Каждые 2 дня среда (2 мл) меняется на свежую. По достижении культурой 80 % монослоя фибробласты пассируются в соотношении от 1:4 до 1:6 и инкубируются при +37 °C в атмосфере 5 % CO₂ до готовности к репрограммированию. Перед началом работы в каждую лунку 6-луночного планшета, в которой проводится трансфекция/трансдукция, добавляется субстрат для культивирования ЭСК и ИПСК, повышающий адгезию клеток и оказывающий трофический эффект. Затем фибробласты ресуспендируются в 2 мл питательной среды для культивирования в конечной концентрации 5·10⁴ клеток в 1 мл и добавляются в каждую лунку 6-луночного планшета,

содержащую субстрат для культивирования ЭСК и ИПСК и инкубируются при +37 °С и 5 % CO₂ в течение 12 ч.

3. *Репрограммирование.* При вирусной индукции плюрипотентности к клеткам добавляется реагент, повышающий эффективность трансфекции (например, Polybrene в концентрации до 8 мкг/мл). Затем определяется титр полученных вирусных частиц, т. е. их концентрация при добавлении к клеткам. Через 2 дня после посева клетки инфицируются четырьмя собранными вирусными векторами. На первых этапах дедифференцировки в течение первой недели после инфицирования в среду культивирования клеток добавляются такие демителирующие агенты, как вальпроевая кислота и VIX-01294. В данной среде фибробласты культивируются в течение недели, после чего пассируются в соотношении 1 к 10 на 35-миллиметровые пластиковые культуральные чашки. На следующий день после пересева среда меняется на среду для культивирования ЭСК человека. В этой среде клетки культивируются в течение 10–12 дней, среда меняется через каждые 2 дня до появления ЭСК-подобных колоний. С помощью стеклянного микрокапилляра образовавшиеся колонии механически пересаживаются в новые покрытые фидерным субстратом пластиковые чашки Петри с питательной ростовой средой для ИПСК (например, mTeSR 1 или TeSR E8 (Stem Cell Technologies, Канада)). Для повышения адгезии фрагментов колоний ИПСК в поддерживающую среду добавляется ингибитор Rho-киназы. Колонии ИПСК культивируются при +37 °С в атмосфере 5 % CO₂ с заменой каждые 2 дня кондиционированной ростовой среды и проведением мониторинга морфологии клеток под микроскопом.

Перспективы применения ИПСК в регенеративной медицине и биологии. На сегодняшний день недифференцированные ИПСК нашли практическое применение в сфере биомедицинских исследований. Создаются банки ИПСК, которые в дальнейшем могут быть использованы при проведении фундаментальных исследований, а в перспективе – при персонализированной клеточной терапии.

ИПСК, созданные с помощью безвирусных методов репрограммирования, потенциально могут применяться при персонализированной клеточной терапии различных тяжелых заболеваний человека, когда необходимо восстановить поврежденные в результате патологического процесса или травмы клетки, ткани и органы пациента. В частности, при макулярной дистрофии с помощью ИПСК удастся частично восстановить поврежденный слой клеток пигментного эпителия сетчатки [11]. Особенно перспективно их использование при лечении заболеваний органов. Ведь с помощью ИПСК можно получить собственные кардиомиоциты и гепатиты и выйти на лечение инфаркта миокарда и дистрофии печени. В настоящее время с использованием направленно дифференцированных *in vitro* ИПСК проводятся доклинические исследования возможности лечения серповидно-клеточной анемии [23], сердечно-сосудистых заболеваний [24], болезни Паркинсона, заболеваний глаз [11] и др., созданы линии ИПСК человека от пациентов с такими заболеваниями, как муковисцидоз, болезнь Гоше, мышечная дистрофия, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, а также активно ведутся исследования в направлении генетической модификации различных линий ИПСК [25]. Приведенный выше перечень заболеваний далеко не полный, но очевидно, что в ближайшем будущем появятся новые клеточные технологии с использованием ИПСК, позволяющие лечить заболевания, трудно поддающиеся обычной терапии. К ним относятся нейродегенеративные заболевания центральной нервной системы, инфаркт миокарда, диабет, заболевания печени, почек и легких. При этом следует иметь в виду, что получение аутологичных ИПСК с использованием биологического материала пациента позволит исключить отторжение трансплантированных клеток вследствие возможных иммунных конфликтов при использовании чужеродного клеточного материала, т. е. аллогенных ИПСК.

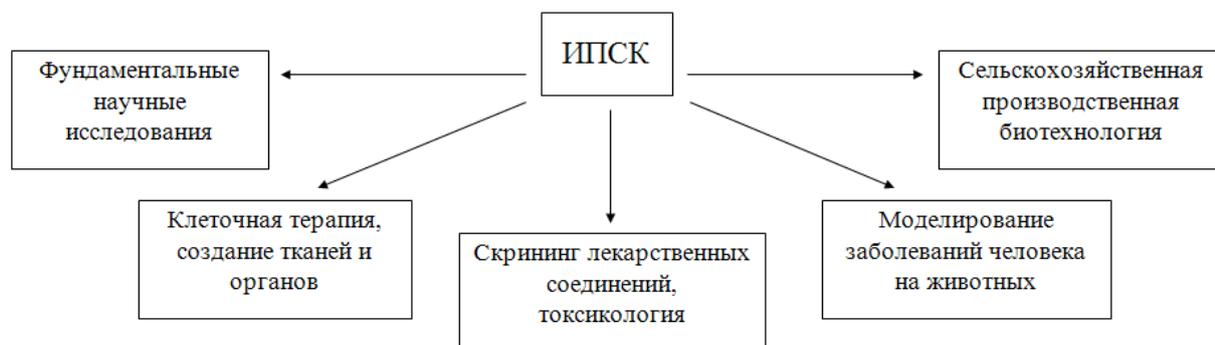


Рис. 2. Варианты использования ИПСК на практике

Fig. 2. Use cases of iPSC in practice

Следует отметить, что использование ИПСК в тандеме с технологией редактирования генома является перспективным в плане исправления мутаций в генах, ответственных за развитие того или иного генетически детерминированного заболевания. К перечисленным лечебным подходам с использованием ИПСК тесно примыкает еще одна важная проблема. Речь идет о создании органов человека не с помощью 3D печати, а на основе аутологичных ИПСК с их введением в биоинкубатор – эмбрион животного, в организме которого, в конечном счете, сформируется персонифицированный орган человека. Подобного рода опыты начали проводиться на уровне пары животных мышь–крыса. Кроме того, еще одной прикладной задачей, которую позволяет решить технология получения ИПСК *in vitro*, является восстановление и сохранение генофонда исчезающих видов животных, увеличение их популяций и генетического разнообразия [26].

ИПСК имеют большой потенциал не только в регенеративной медицине, но и в фармакологии и токсикологии. ИПСК являются оптимальной тест-системой для апробации новых лекарственных препаратов, позволяют изучать патогенез болезней на клеточном и субклеточном уровне, осуществлять поиск новых лекарственных средств, тестирование эффективности лекарственных препаратов, оценку их токсичности, подбор протоколов лечения и т. д. Получение ИПСК путем репрограммирования соматических клеток больных и здоровых пациентов определяет их преимущество перед ЭСК, открывается перспектива персонифицированного подхода в подборе протоколов лечения заболеваний различного генеза. Ввиду способности ИПСК к дифференцировке в различных направлениях возможно проведение точных доклинических испытаний лекарственных препаратов на клетках человека, без использования животных [27].

Однако широкое использование ИПСК в клеточной терапии пока ограничивается рядом проблем, которые предстоит решить в ближайшем будущем. Это полный отказ от вирусных конструкций; повышение эффективности репрограммирования (на сегодня при дедифференцировке удалось достигнуть репрограммирования в среднем у 1 % популяции клеток); снижение или полное подавление иммуногенности ИПСК; решение проблемы высокой вероятности злокачественной трансформации ИПСК *in vivo* при использовании их в терапии.

Во многих лабораториях активно ведется разработка протоколов экспрессного получения ИПСК с высоким выходом из соматических клеток и протоколов последующей модификации ИПСК с целью минимизации риска их злокачественной трансформации при попадании в организм человека.

Список использованных источников

1. Zhu, Z. Human pluripotent stem cells: an emerging model in developmental biology / Z. Zhu, D. Huangfu // *Development*. – 2013. – Vol. 140, N 4. – P. 705–717. <https://doi.org/10.1242/dev.086165>
2. Вологовский, И. Д. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, CRISPR-Cas9 (Криспер) система редактирования геномов и перспективы решения проблемы генной терапии наследственных заболеваний человека / И. Д. Вологовский, А. Г. Полешко // *Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук*. – 2018. – Т. 63, № 1. – С. 113–125.
3. Kolios, G. Introduction to stem cells and regenerative medicine / G. Kolios, Y. Moodley // *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* – 2013. – Vol. 85, N 1. – P. 3–10. <https://doi.org/10.1159/000345615>
4. Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future / S. Yamanaka // *Cell Stem Cell*. – 2012. – Vol. 10, N 6. – P. 678–684. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.005>
5. Stadtfeld, M. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications / M. Stadtfeld, K. Hochedlinger // *Genes Dev.* – 2010. – Vol. 24, N 20. – P. 2239–2263. <https://doi.org/10.1101/gad.1963910>
6. Генетическое репрограммирование клеток: новая технология для фундаментальных исследований и практического использования / А. Н. Богомазова [и др.] // *Генетика*. – 2015. – Т. 51, № 4. – С. 466–478.
7. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки / А. И. Шевченко [и др.] // *Генетика*. – 2009. – Т. 45, № 2. – С. 160–168.
8. Молекулярные механизмы индуцированной плюрипотентности / И.А. Мучкаева [и др.] // *Acta Naturae* (русскоязычная версия). – 2012. – Т. 4, № 1 (12). – С. 12–23.
9. Boiani, M. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells / M. Boiani, H. R. Schöler // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 6, N 11. – P. 872–884. <https://doi.org/10.1038/nrm1744>
10. *Regenerative medicine and stem cells biology* / ed. El-Badri Nagwa. – Cham : Springer, 2020. – 374 p.
11. Hanna, J. H. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues / J. H. Hanna, K. Saha, R. Jaenisch // *Cell*. – 2010. – Vol. 143, N 4. – P. 508–525. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.008>
12. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency / F. Anokye-Danso [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2011. – Vol. 8, N 4. – P. 376–388. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.001>
13. Maherali, N. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells / N. Maherali, K. Hochedlinger // *Cell Stem Cell*. – 2008. – Vol. 3, N 6. – P. 595–605. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.11.008>
14. Malik, N. A review of the methods for human iPSC derivation / N. Malik, M. S. Rao // *Meth. Mol. Biol.* – New York, 2013. – Vol. 997 : *Pluripotent Stem Cells. Methods and Protocols* / ed. : U. Lakshmiathy, M. C. Vemuri. – P. 23–33.

15. Lin, T. p53 switches off pluripotency on differentiation / T. Lin, Y. Lin // *Stem Cell Res. Ther.* – 2017. – Vol. 8, N 1. – P. 44. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0498-1>
16. Research and therapy with induced pluripotent stem cells (iPSCs): social, legal, and ethical considerations / M. Sharif [et al.] // *Stem Cell Res. Ther.* – 2019. – Vol. 10, N 1. – Art. 341. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1455-y>
17. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts / R. Li [et al.] // *Cell Stem Cell.* – 2010. – Vol. 7, N 2. – P. 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.014>
18. BMPs functionally replace Klf4 and support efficient reprogramming of mouse fibroblasts by Oct4 alone / J. Chen [et al.] // *Cell Res.* – 2011. – Vol. 21, N 1. – P. 205–212. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.172>
19. Apostolou, E. Chromatin dynamics during cellular reprogramming / E. Apostolou, K. Hochedlinger // *Nature.* – 2013. – Vol. 502, N 7472. – P. 462–471. <https://doi.org/10.1038/nature12749>
20. Maturation, not initiation, is the major roadblock during reprogramming toward pluripotency from human fibroblasts / K. Tanabe [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – Vol. 110, N 30. – P. 12172–12179. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310291110>
21. Tang, Y. JAK-STAT3 and somatic cell reprogramming / Y. Tang, X. C. Tian // *JAK-STAT.* – 2013. – Vol. 2, N 4. – P. e24935. <https://doi.org/10.4161/jkst.24935>
22. Stage-specific regulation of reprogramming to induced pluripotent stem cells by Wnt signaling and T cell factor proteins / R. Ho [et al.] // *Cell Rep.* – 2013. – Vol. 3, N 6. – P. 2113–2126. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.015>
23. iPSC modeling of severe aplastic anemia reveals impaired differentiation and telomere shortening in blood progenitors / D. Melguizo-Sanchis [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2018. – Vol. 9, N 2. – P. 128. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0141-1>
24. Generating patient-specific induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes for the treatment of cardiac diseases / D. Jeziorowska [et al.] // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2015. – Vol. 15, N 10. – P. 1399–1409. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1064109>
25. Induced pluripotent stem cells: fundamentals and applications of the reprogramming process and its ramifications on regenerative medicine / B. Walia [et al.] // *Stem Cell Rev.* – 2012. – Vol. 8, N 1. – P. 100–115. <https://doi.org/10.1007/s12015-011-9279-x>
26. Induced pluripotent stem cells from highly endangered species / Inbar Friedrich Ben-Nun [et al.] // *Nat. Meth.* – 2011. – Vol. 8, N 10. – P. 829–831. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1706>
27. Некрасов, Е. Д. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки как модель для изучения болезней человека / Е. Д. Некрасов, М. А. Лагарькова, С. Л. Киселев // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* – 2011. – Т. 6, № 2. – С. 32–37.

References

1. Zhu Z., Huangfu D. Human pluripotent stem cells: an emerging model in developmental biology. *Development*, 2013, vol. 140, no. 4, pp. 705–717. <https://doi.org/10.1242/dev.086165>
2. Volotovskii I. D., Poleshko A. G. Induced pluripotent stem cells, CRISPR-Cas9 (Krisper) genome editing system and perspectives of solving the problem of gene therapy of human hereditary diseases. *Vestsi Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2018, vol. 63, no. 1, pp. 113–125 (in Russian).
3. Kolios G., Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration. International Journal of Thoracic Medicine*, 2013, vol. 85, no. 1, pp. 3–10. <https://doi.org/10.1159/000345615>
4. Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell*, 2012, vol. 10, no. 6, pp. 678–684. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.005>
5. Stadtfeld M., Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes and Development*, 2010, vol. 24, no. 20, pp. 2239–2263. <https://doi.org/10.1101/gad.1963910>
6. Bogomazova A. N., Vassina E. M., Kiselev S. L., Lagarkova M. A., Lebedeva O. S., Nekrasov E. D. [et al.]. Genetic cell reprogramming: a new technology for basic research and applied usage. *Russian Journal of Genetics*, 2015, vol. 51, no. 4, pp. 386–396. <https://doi.org/10.1134/S102279541504002X>
7. Shevchenko A. I., Medvedev S. P., Mazurok N. A., Zakian S. M. *Russian Journal of Genetics*, 2009, vol. 45, no. 2, pp. 139–146. <https://doi.org/10.1134/S1022795409020021>
8. Muchkaeva I. A., Dashinimaev E. B., Terskikh V. V., Sukhanov Yu. V., Vasil'ev A. V. Molecular mechanisms of induced pluripotency. *Acta Naturae*, 2012, vol. 4, no. 1 (12), pp. 12–23 (in Russian).
9. Boiani M., Schöler H. R. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005, vol. 6, no. 11, pp. 872–884. <https://doi.org/10.1038/nrm1744>
10. Nagwa El-Badri (ed.). *Regenerative medicine and stem cells biology*. Cham, Springer, 2020. 374 p.
11. Hanna J. H., Saha K., Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*, 2010, vol. 143, no. 4, pp. 508–525. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.008>
12. Anokye-Danso F., Trivedi C. M., Jühr D., Gupta M., Cui Z., Tian Y. [et al.]. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2011, vol. 8, no. 4, pp. 376–388. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.001>
13. Maherali N., Hochedlinger K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, vol. 3, no. 6, pp. 595–605. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.11.008>
14. Malik N., Rao M. S. A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods in Molecular Biology. Vol. 997. Pluripotent Stem Cells. Methods and Protocols*. New York, 2013, pp. 23–33.

15. Lin T., Lin Y. p53 switches off pluripotency on differentiation. *Stem Cell Research and Therapy*, 2017, vol. 8, no. 1, p. 44. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0498-1>
16. Moradi Sh., Mahdizadeh H., Šarić T., Kim J., Harati J., Shahsavarani H., Greber B., Moore J. B. Research and therapy with induced pluripotent stem cells (iPSCs): social, legal, and ethical considerations. *Stem Cell Research and Therapy*, 2019, vol. 10, no. 1, art. 341. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1455-y>
17. Li R., Liang J., Ni S., Zhou T., Qing X., Li H. [et al.]. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2010, vol. 7, no. 2, pp. 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.014>
18. Chen J., Liu J., Yang J., Chen Y., Chen J., Ni S., Song H., Zeng L., Ding K., Pei D. BMPs functionally replace Klf4 and support efficient reprogramming of mouse fibroblasts by Oct4 alone. *Cell Research*, 2011, vol. 21, no. 1, pp. 205–212. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.172>
19. Apostolou E., Hochedlinger K. Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature*, 2013, vol. 502, no. 7472, pp. 462–471. <https://doi.org/10.1038/nature12749>
20. Tanabe K., Nakamura M., Narita M., Takahashi K., Yamanaka S. Maturation, not initiation, is the major roadblock during reprogramming toward pluripotency from human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, vol. 110, no. 30, pp. 12172–12179. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310291110>
21. Tang Y., Tian X.C. JAK-STAT3 and somatic cell. *JAK-STAT*, 2013, vol. 2, no. 4, p. e24935. <https://doi.org/10.4161/jkst.24935>
22. Ho R., Papp B., Hoffman J. A., Merrill B. J., Plath K. Stage-specific regulation of reprogramming to induced pluripotent stem cells by Wnt signaling and T cell factor proteins. *Cell Reports*, 2013, vol. 3, no. 6, pp. 2113–2126. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.015>
23. Melguizo-Sanchis D., Xu Y., Taheem D., Yu M., Tilgner K., Barta T. [et al.]. iPSC modeling of severe aplastic anemia reveals impaired differentiation and telomere shortening in blood progenitors. *Cell Death & Disease*, 2018, vol. 9, no. 2, p. 128. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0141-1>
24. Jeziorowska D., Korniat A., Salem J.-E., Fish K., Hulot J.-S. Generating patient-specific induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes for the treatment of cardiac diseases. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2015, vol. 15, no. 10, pp. 1399–1409. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1064109>
25. Walia B., Satija N., Tripathi R. P., Gangenahalli G. U. Induced pluripotent stem cells: fundamentals and applications of the reprogramming process and its ramifications on regenerative medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2012, vol. 8, no. 1, pp. 100–115. <https://doi.org/10.1007/s12015-011-9279-x>
26. Ben-Nun I. F., Montague S. C., Houck M. L., Tran H. T., Garitaonandia I., Leonardo T. R. [et al.]. Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. *Nature Methods*, 2011, vol. 8, no. 10, pp. 829–831. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1706>
27. Nekrasov E. D., Lagar'kova M. A., Kiselev S. L. Induced pluripotent stem cells as a model for the study of human diseases. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya* [Cell transplantation and tissue engineering], 2011, vol. 6, no. 2, pp. 32–37 (in Russian).

Информация об авторах

Тишук Ольга Игоревна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tishukoi@gmail.com

Полишко Анна Григорьевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: renovacio888@yandex.ru

Волотовский Игорь Дмитриевич – академик, д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: volotovski@yahoo.com

Information about the authors

Olga I. Tishuk – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tishukoi@gmail.com

Anna G. Poleshko – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: renovacio888@yandex.ru

Igor D. Volotovskiy – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Chief Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: volotovski@yahoo.com